

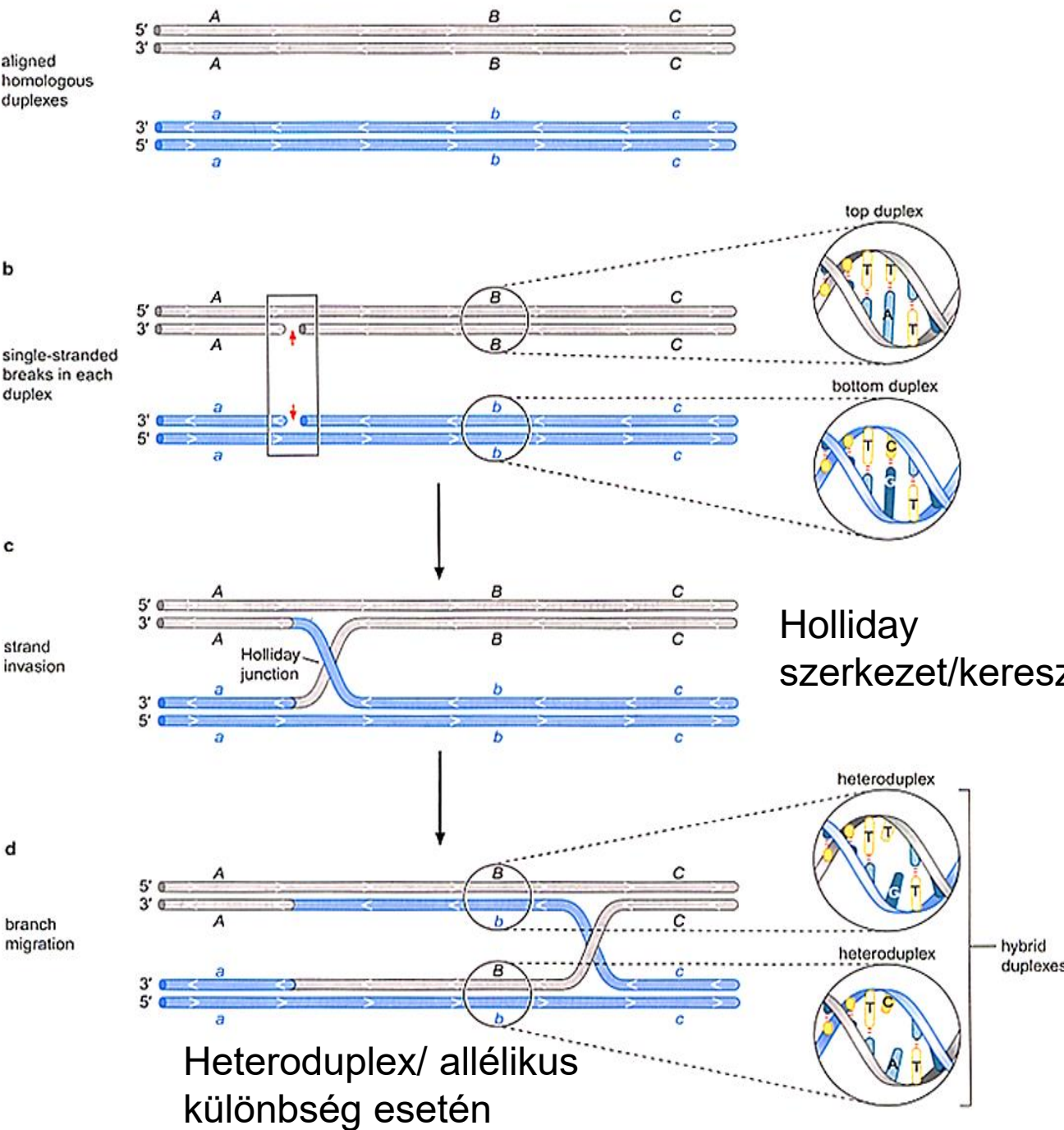
Homológ rekombináció

A molekuláris modellek közös tulajdonságai

- Homológia (>100bp, közel identikus)
- Törés (1 vagy 2 szál)
- Támadás, szál-invázió (strand invasion)
- Kereszthíd vándorlás (branch migration)
- Feloldás (resolution)

A Holliday modell

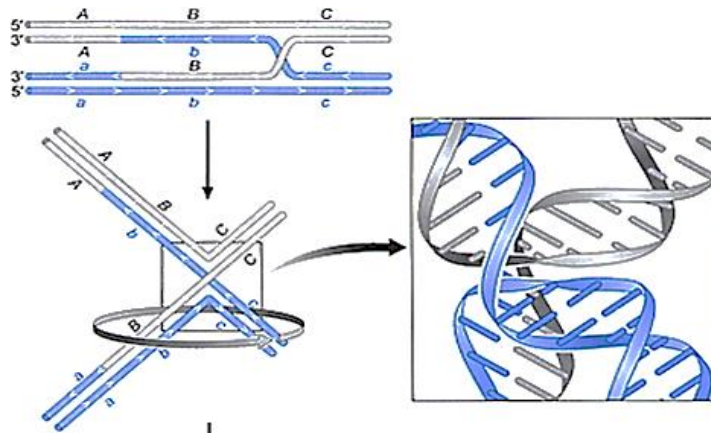
(Robin Holliday, 1964)



Kereszthíd vándorlás – heteroduplex területe nő – génkonverzió, mismatch repair

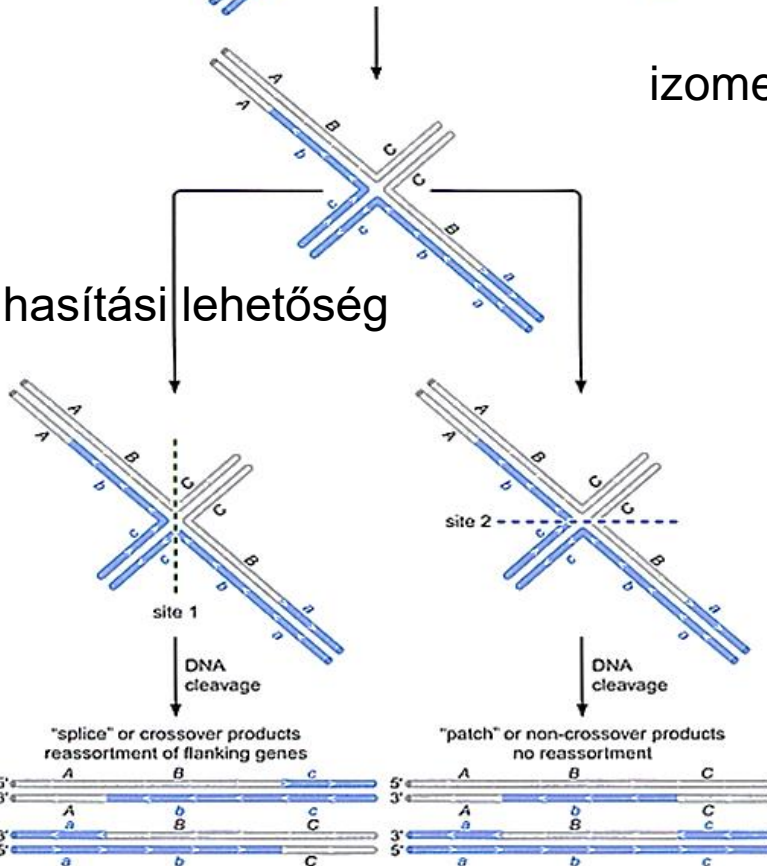
Holliday kereszt feloldása

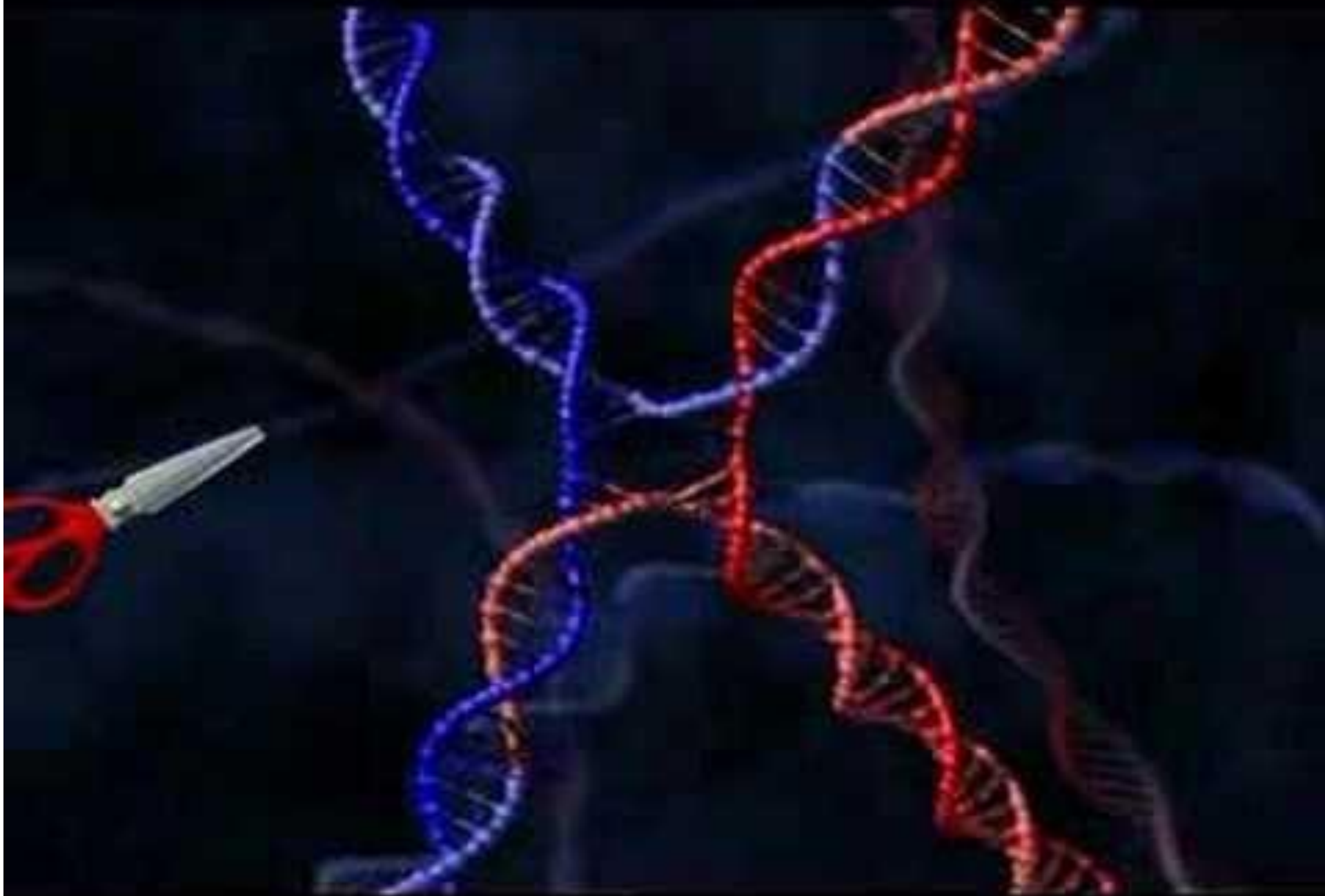
Holliday kereszt



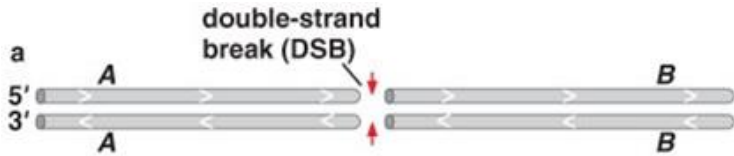
izomerek

Két hasítási lehetőség





DSB- gyakori



processing to generate gapped DNA with 3' ss tails



strand invasion of 3' end



D-hurok: 3 szálú DNS

Egyszálú DNS, 3' véggel

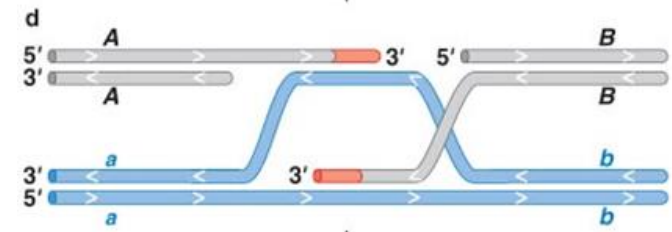
támadás

Kettősszálú törés modell, DSBR

DNS szintézis!

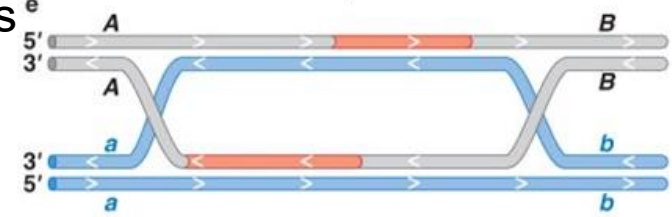
3' vég primer, másik szál templát

second strand invasion and DNA repair synthesis from 3' ends Allél veszhet el



branch migration and formation of an intermediate with two Holliday junctions

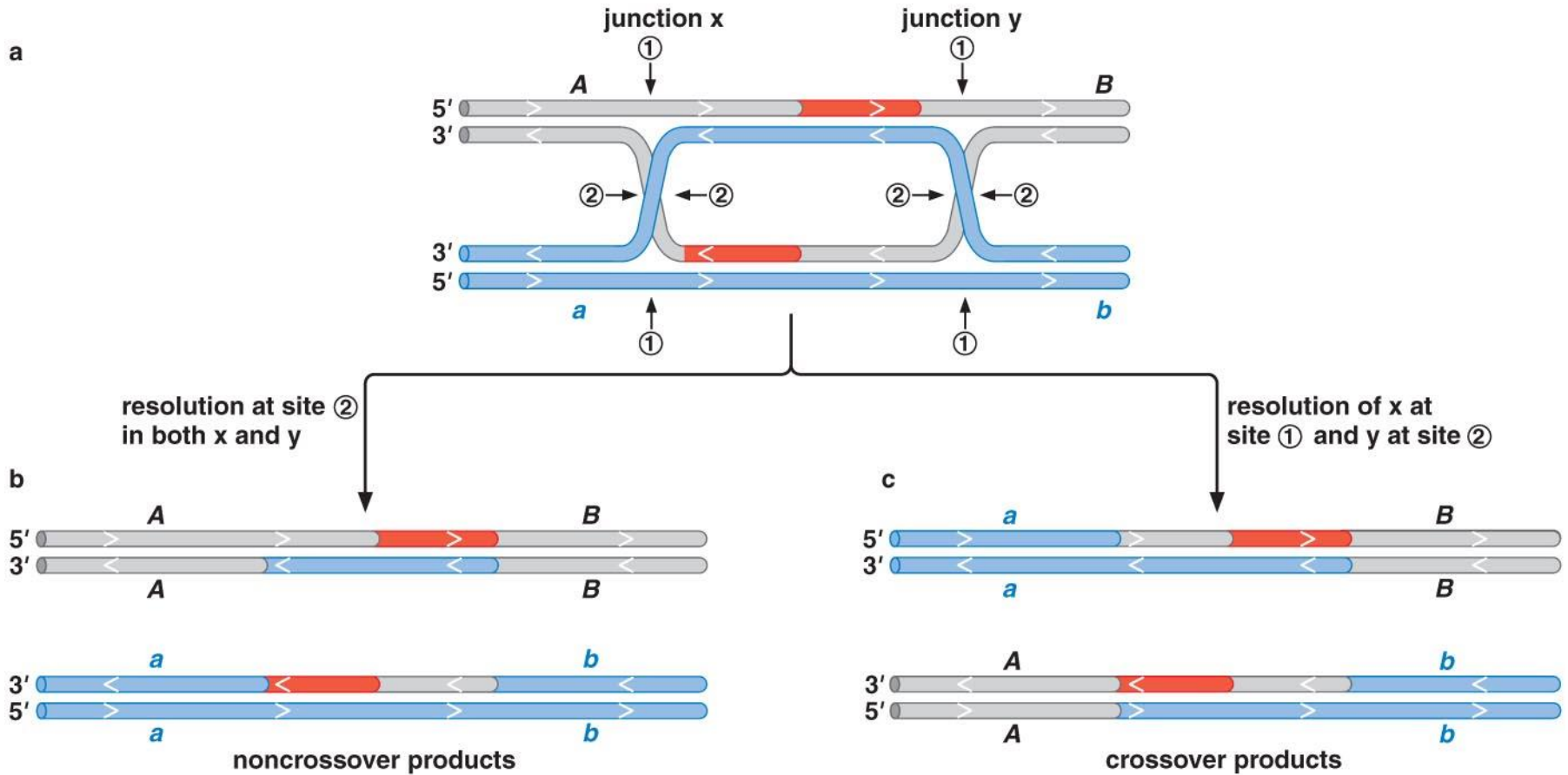
Két Holliday szerkezet - vándorlás



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin

Génkonverzió repair nélkül

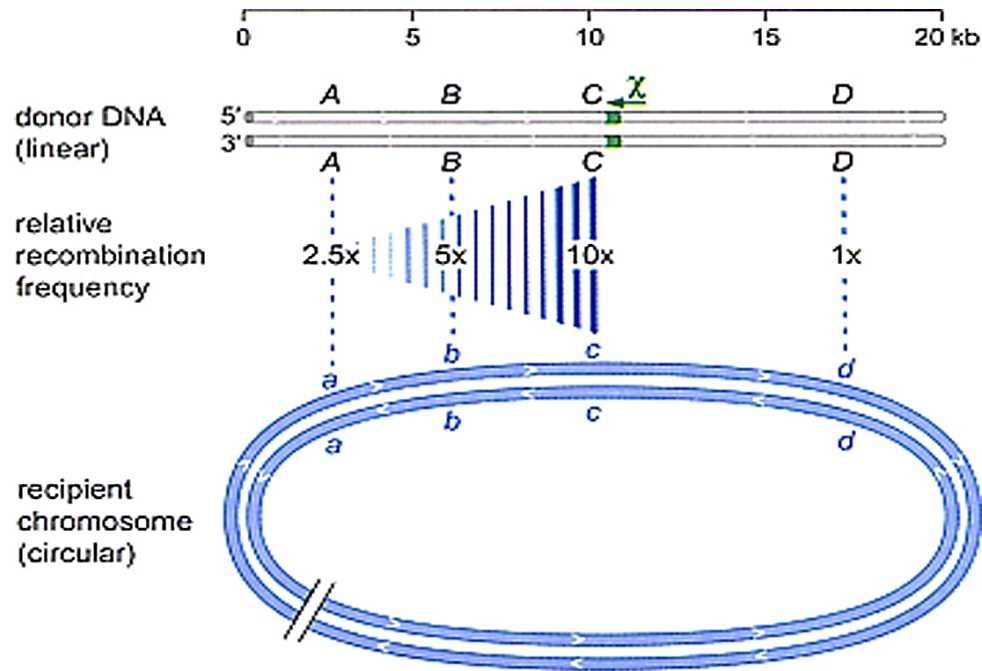
Két Holliday szerkezet feloldása



Fehérjék

Funkció	prokarióta	eukarióta
Dupla törés	Nem ismert	Spo11
Egyszálú DNS kialakítása	RecBCD helikáz/nukleáz	MRX komplex (Rad50, 58, 60)
Támadás (invázió)	RecA	Dmc1, Rad51
Szálvándorlás	RuvAB	Nem ismert
Feloldás	RuvC	Mus81 és mások

Az *E. coli* χ (Chi) szekvenciája



A χ szekvenciája *E. coli*-ban: GCTCGTGG.

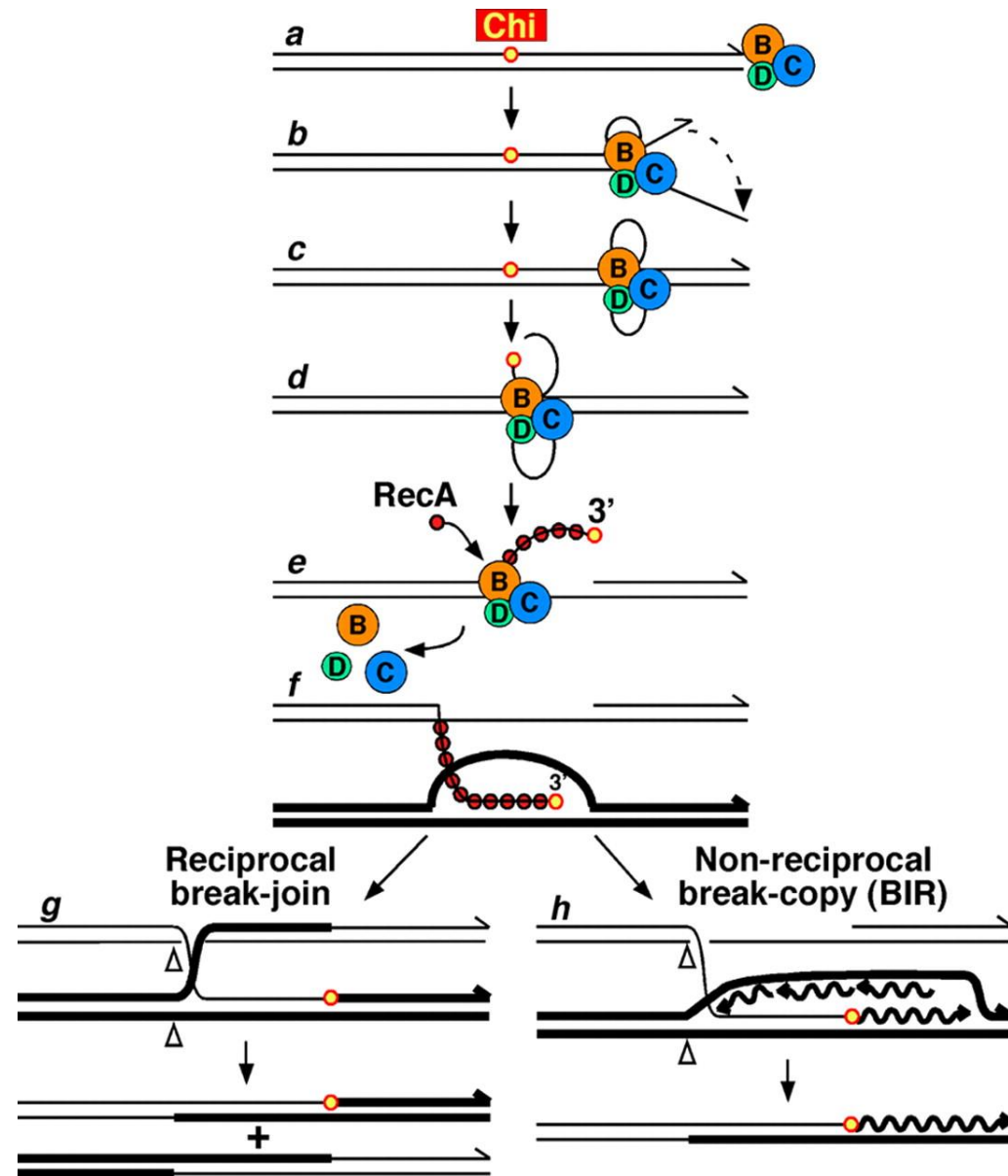
A RecBCD rekombinációs útvonal ismeri fel χ szekvenciák környezetében a rekombináció valószínűsége 10 nagyobb, mint máshol.

A RecBCD útvonal

RecBCD, SSB, RecA és RuvABC fehérjék, szükséges χ szekvencia.

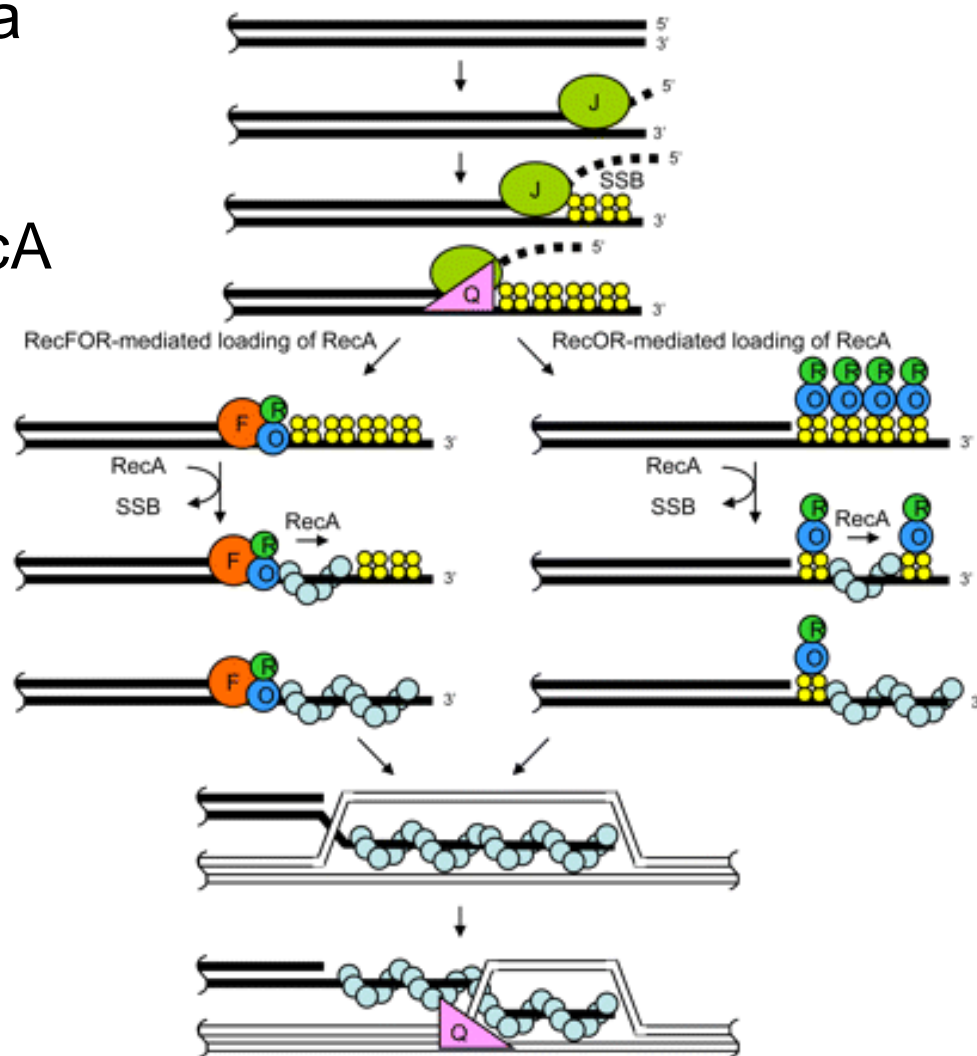
A RecBCD felismeri a kettős töréseket, majd mindkét szálát degradálja, amíg a χ (*crossover hotspot instigator*) szekvenciáig nem ér.

A χ szekvencia után már csak a χ -t nem tartalmazó szálát emészti, így alakul ki a 3' egyszálú DNS.

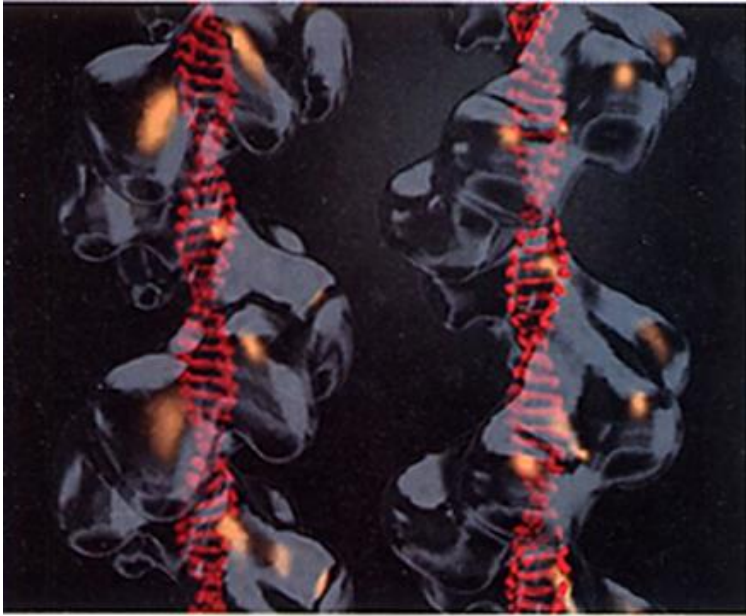


A RecF útvonal

A RecF útvonalban fehérjéi: a RecJ (5'→3' exonukleáz), a RecQ (3'→5' helikáz), a RecF, RecO, a RecR, az SSB, a RecA rekombináz, valamint a RuvABC komplex.

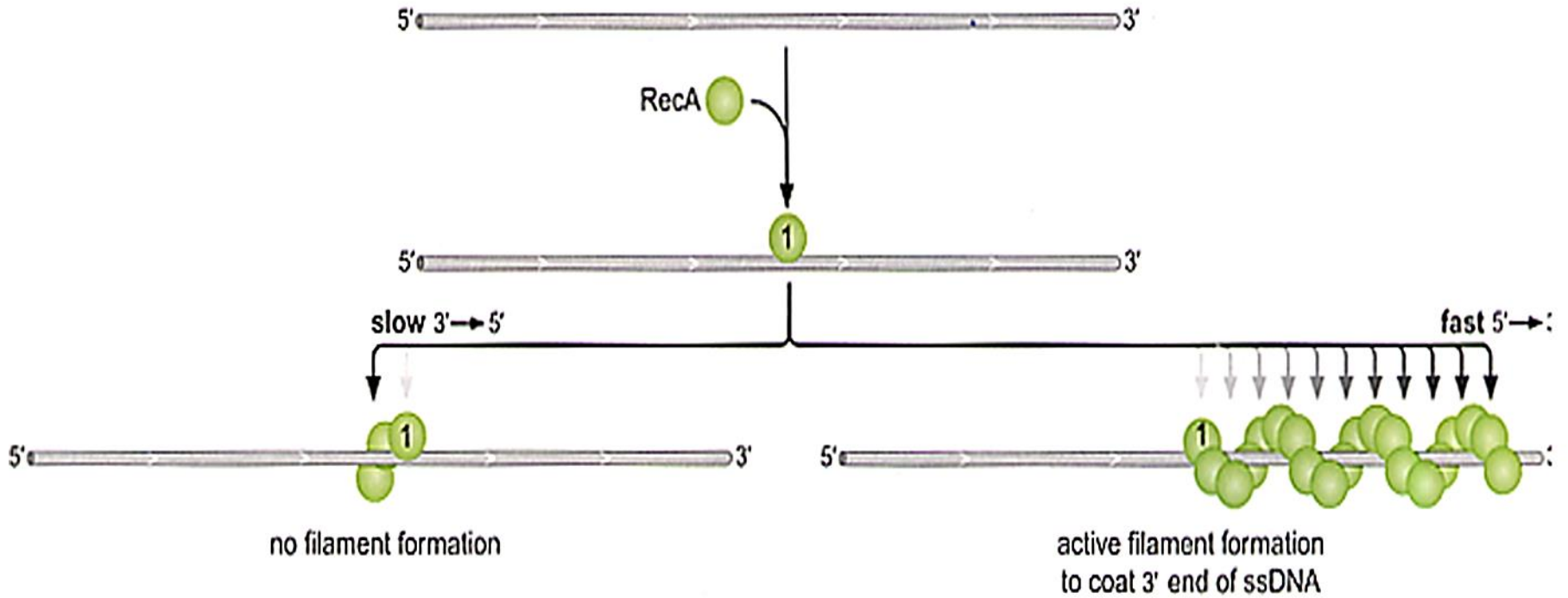


RecA

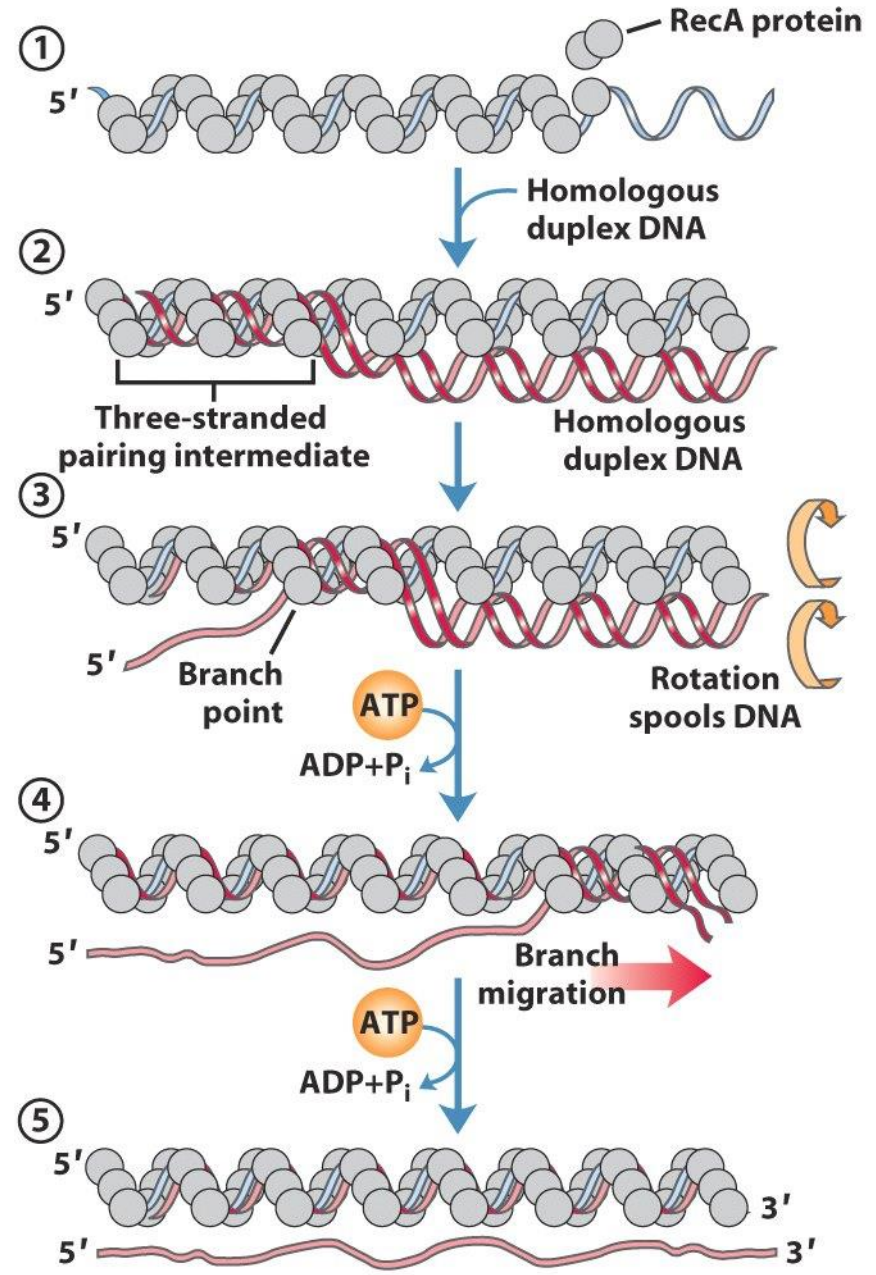
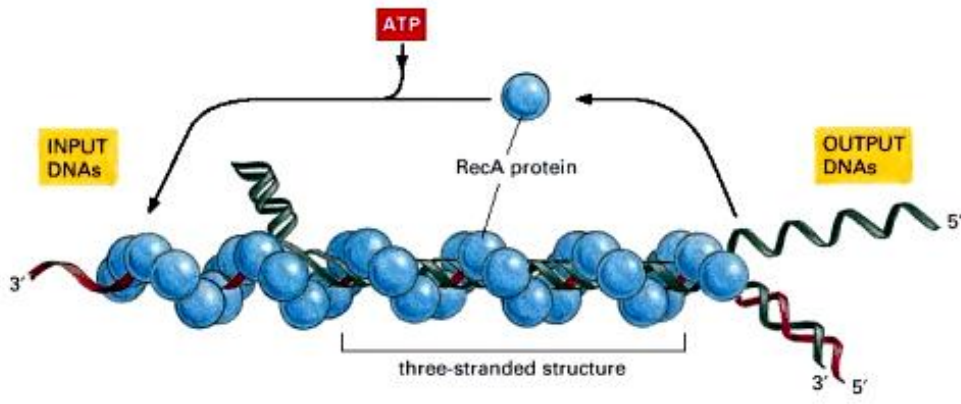


RecA filament –
nukleoprotein filament

RecA – egyszálú DNS-hez köt, kooperatívan

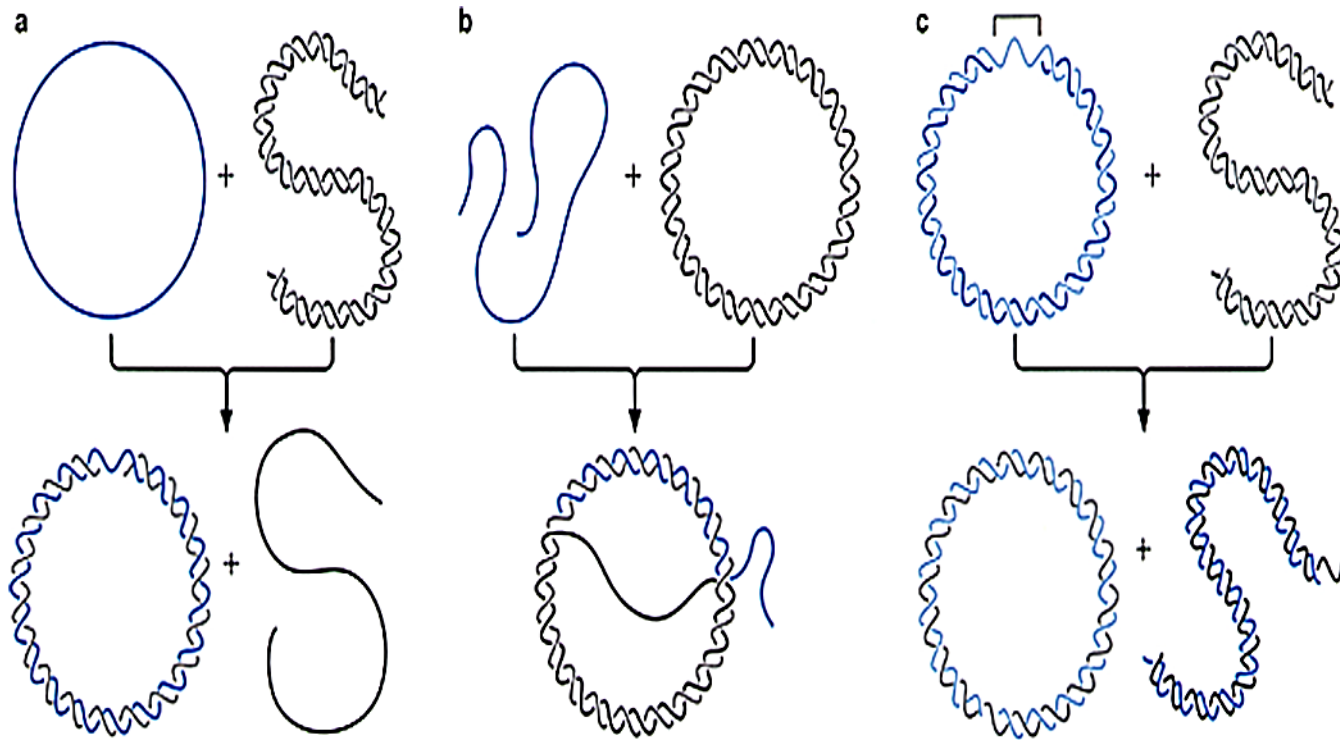


RecA filamentum: aktív, akár 100fehérje



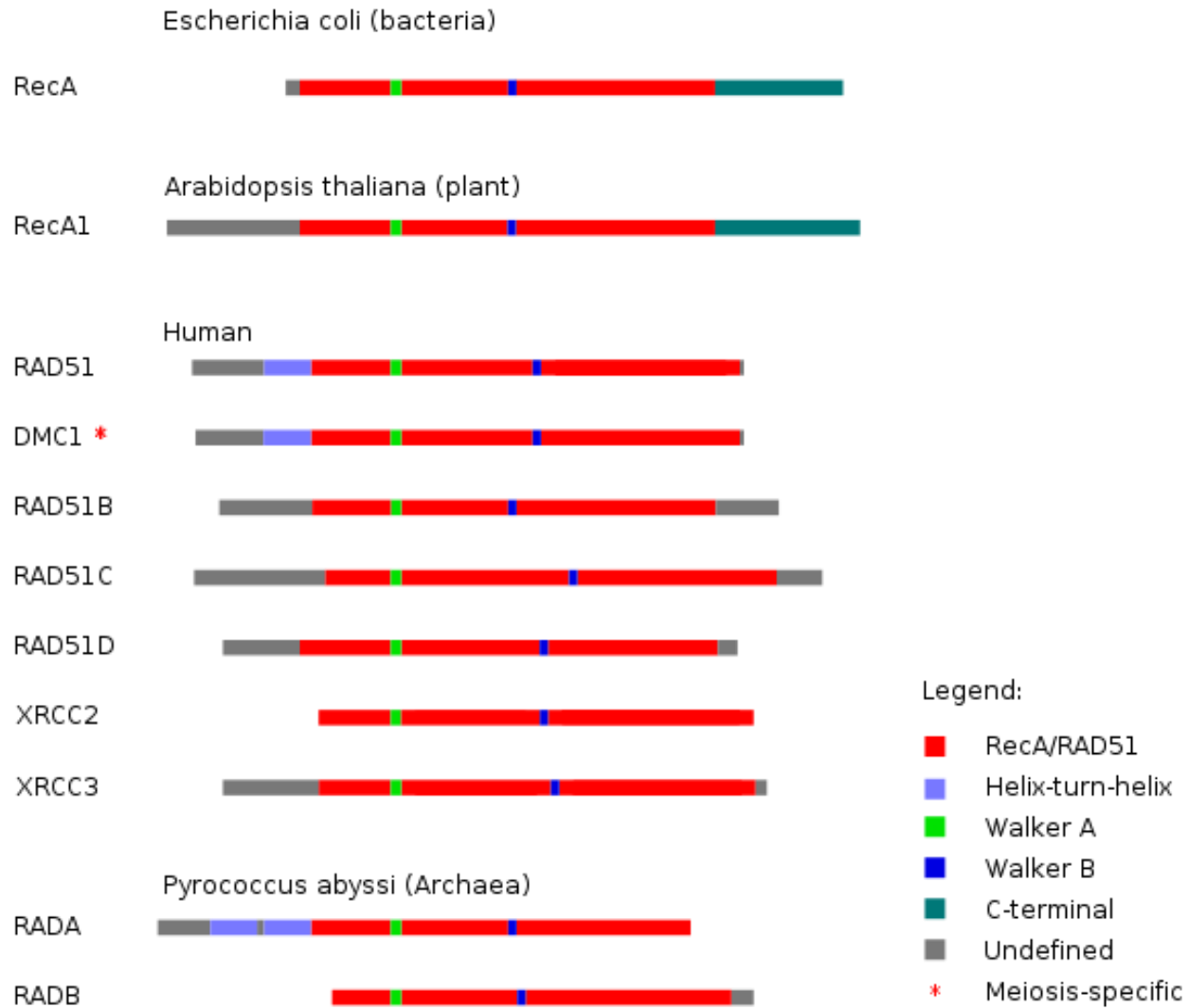
Több DNS kötő hely – egy egyszálú és egy duplaszálú DNS-t egyszerre köthet

- a ssDNS-t a homológ dsDNS mellé rendezi
- a ssDNS-t a homológ dsDNS egyik szálának helyébe helyezi

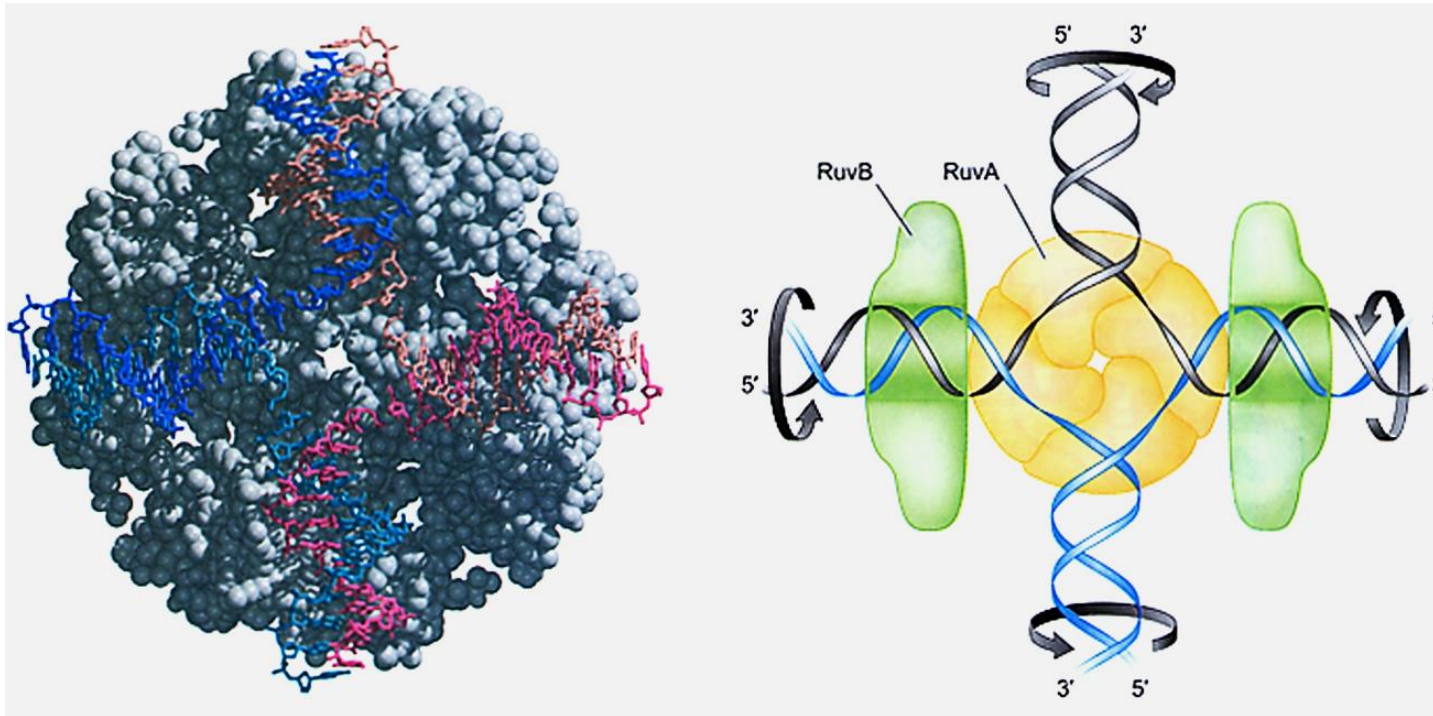


Három feltétel a szálcseréhez: -Homológia, ssDNS, szabad DNS vég

A RecA evolúciós konzerváltsága



RuvAB: kereszt vándorlás



heteroduplex

RuvA (tetramer): Holliday kereszt felismerése, Holliday kereszt specifikus DNS kötő fehérje

RuvB toborzása

RuvB (hexamer): ATPáz, helikáz - szálvándorlás

RuvC: Holliday kereszt feloldása

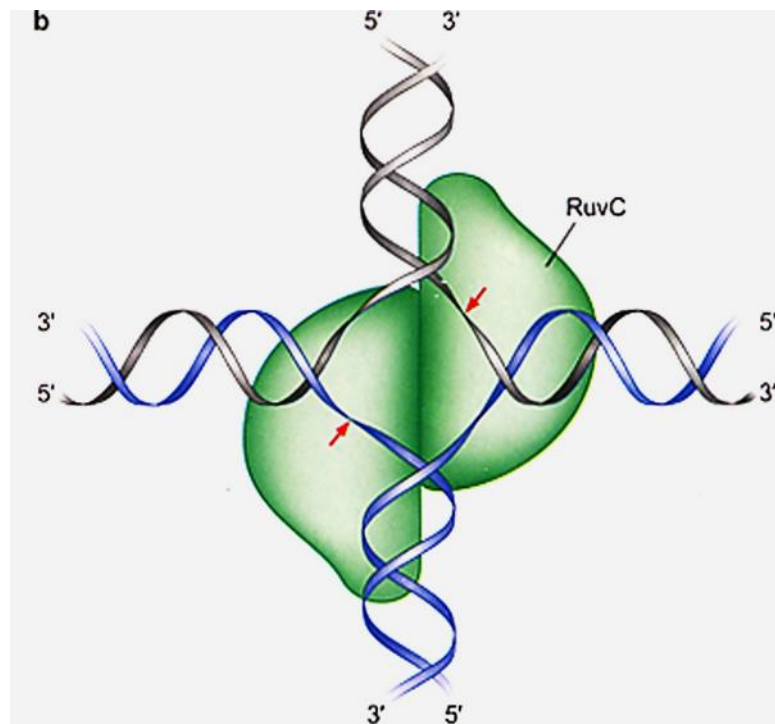
Struktúrát, nem szekvenciát ismer fel

Hasítóhely konszenzus

szekvenciája:

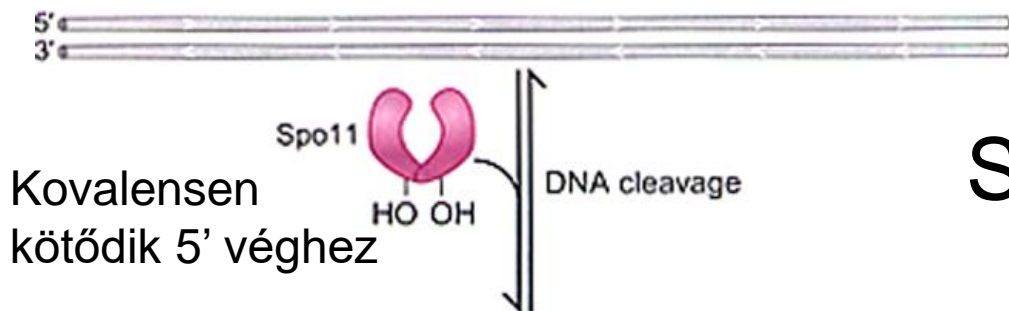
3'-(A/T)TT↓(G/C)- 5'

RuvC: nukleáz (resolvase)



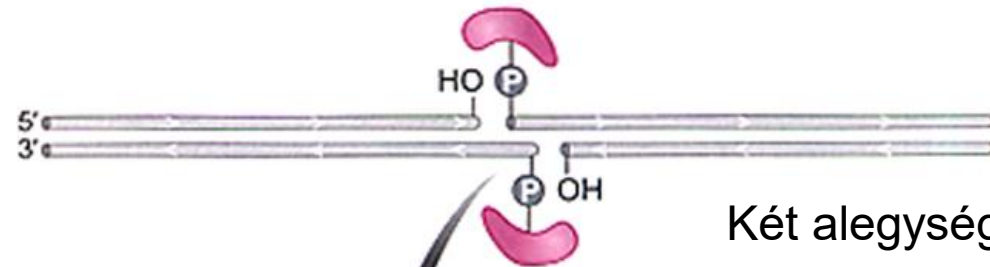
Eukarióták

- Meiózis: rekombináció nélkül gyakran nem megfelelő a kromoszómák párba állása
- DNS repair: kettős szálú DNS törés, replikáció során létrejött törés
- Homológ rekombináció hibája gyakran gyenge a fertilitást okoz

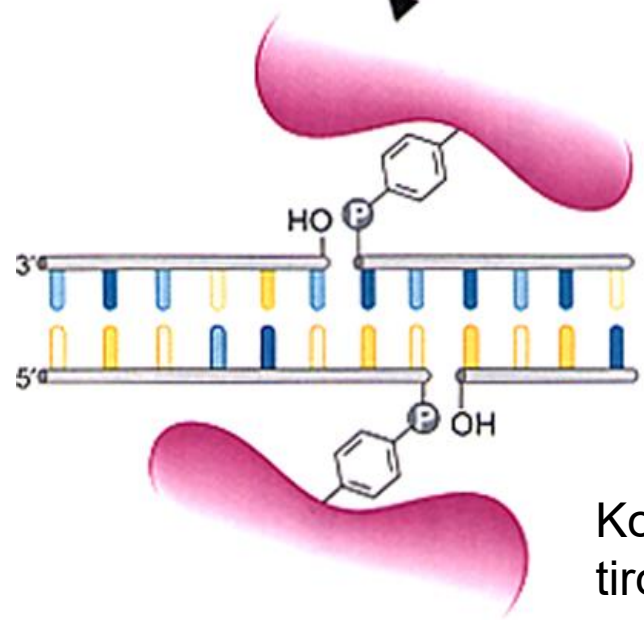


Kovalensen
kötődik 5' véghez

Spo11: programozott DSB



Két alegység kell a DSB-hez

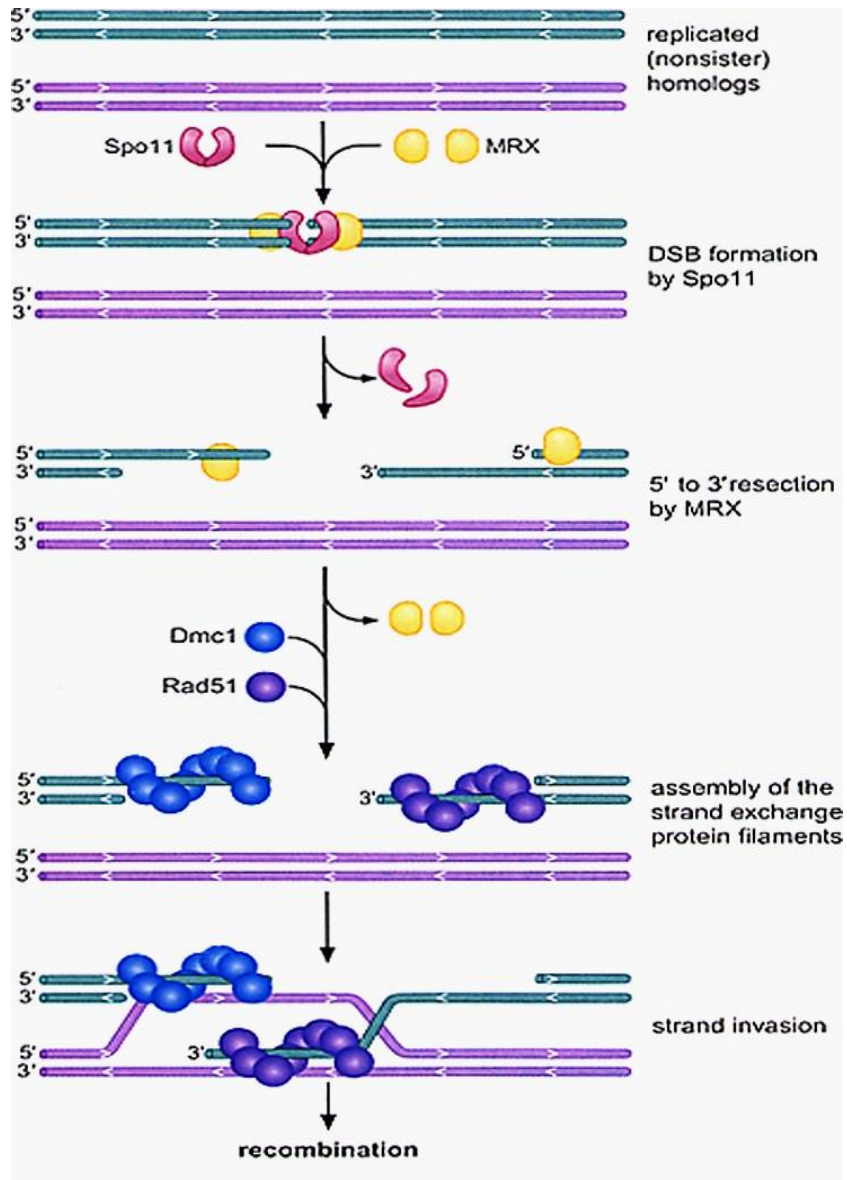


Kovalens kötés egy
tirozinon keresztül

Időzített: homológok
párba állásakor!

Kis szekvencia specifitás

Meiotikus rekombináció



MRX komplex

- 3' egyszálú DNS kialakítás
- Nem homológja a RecBCD-nek
- Alegységei: MRE11, Rad50, Xrs2

Dmc1, Rad51

- RecA szerű fehérjék
- Rad51: mitózis, meiózis
- Dmc1: csak meiózis alatt – nem testvér kromatidák között történik a kicserélődés

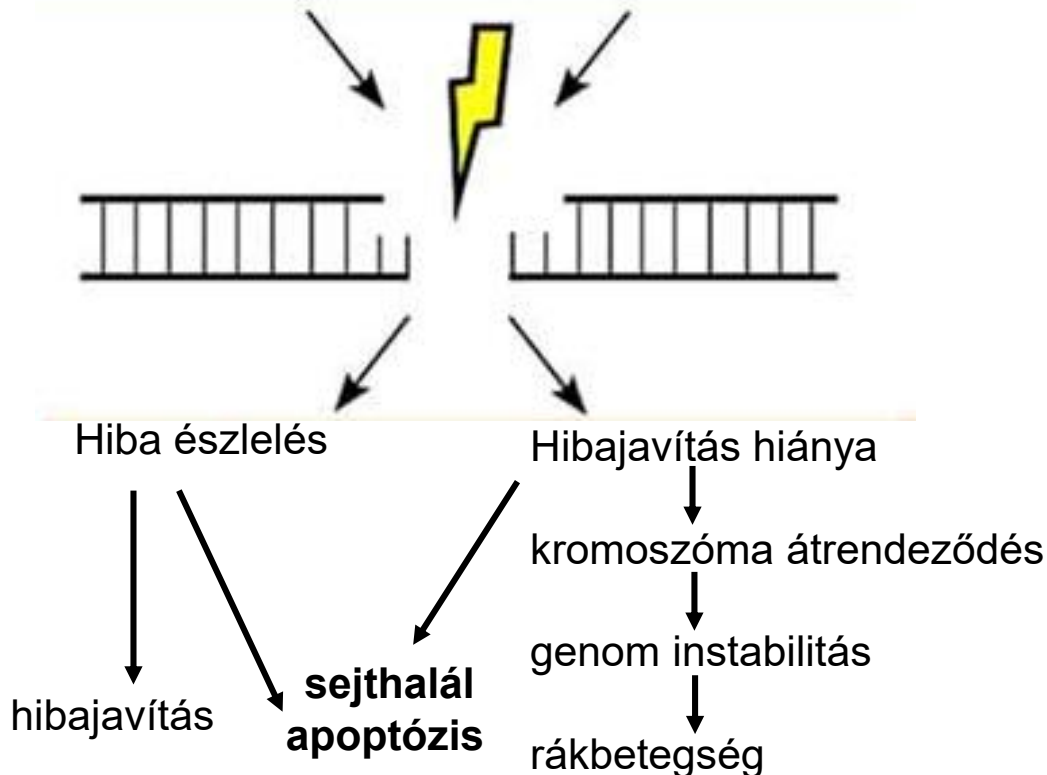
A DNS kettősszálú töréseinek javítása

Környezeti hatás:

mérgek
ionizáló sugárzás
(Röntgen, gamma)

Belső hatások:

anyagcsere folyamatok
oxigén szabadgyök
replikációs hiba



A kettősszálú törést a sejtek kétféleképpen képesek kijavítani:

A., nemhomológ törött végek összekötésével, hibásan. NHEJ

B., rekombinációval a testvérkromatidáról hibamentesen.

Nem homológ végek összekapcsolása, NHEJ

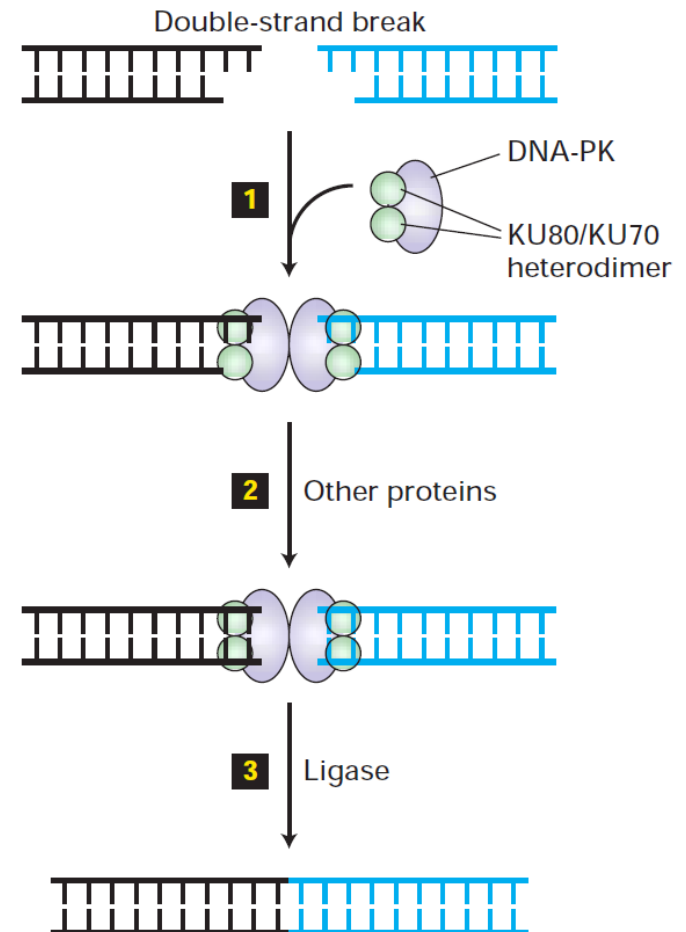
Nemhomológ végek összekapcsolása, nem hibamentes javítás.

Lépései:

1., A törött végekhez három fehérje (KU70, KU80 és DNS-függő kináz) kapcsolódik

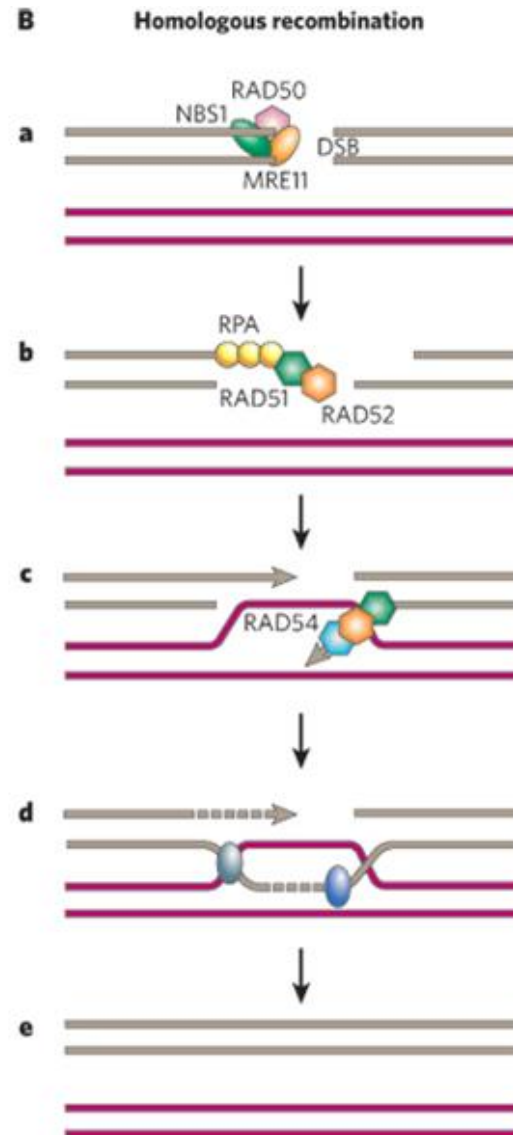
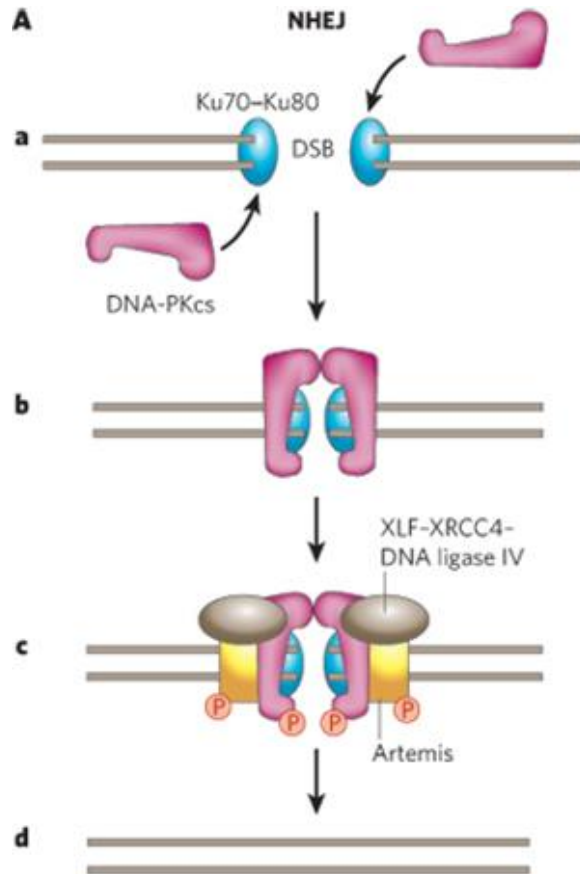
2., A végek egyenesre vágása

3., A végek összekapcsolása



A nemhomológ végek összekapcsolása könnyen okozhat kromoszóma átrendeződést. A javítás eredményeként szekvenciák vesznek el.

Rekombinációs hibajavítás

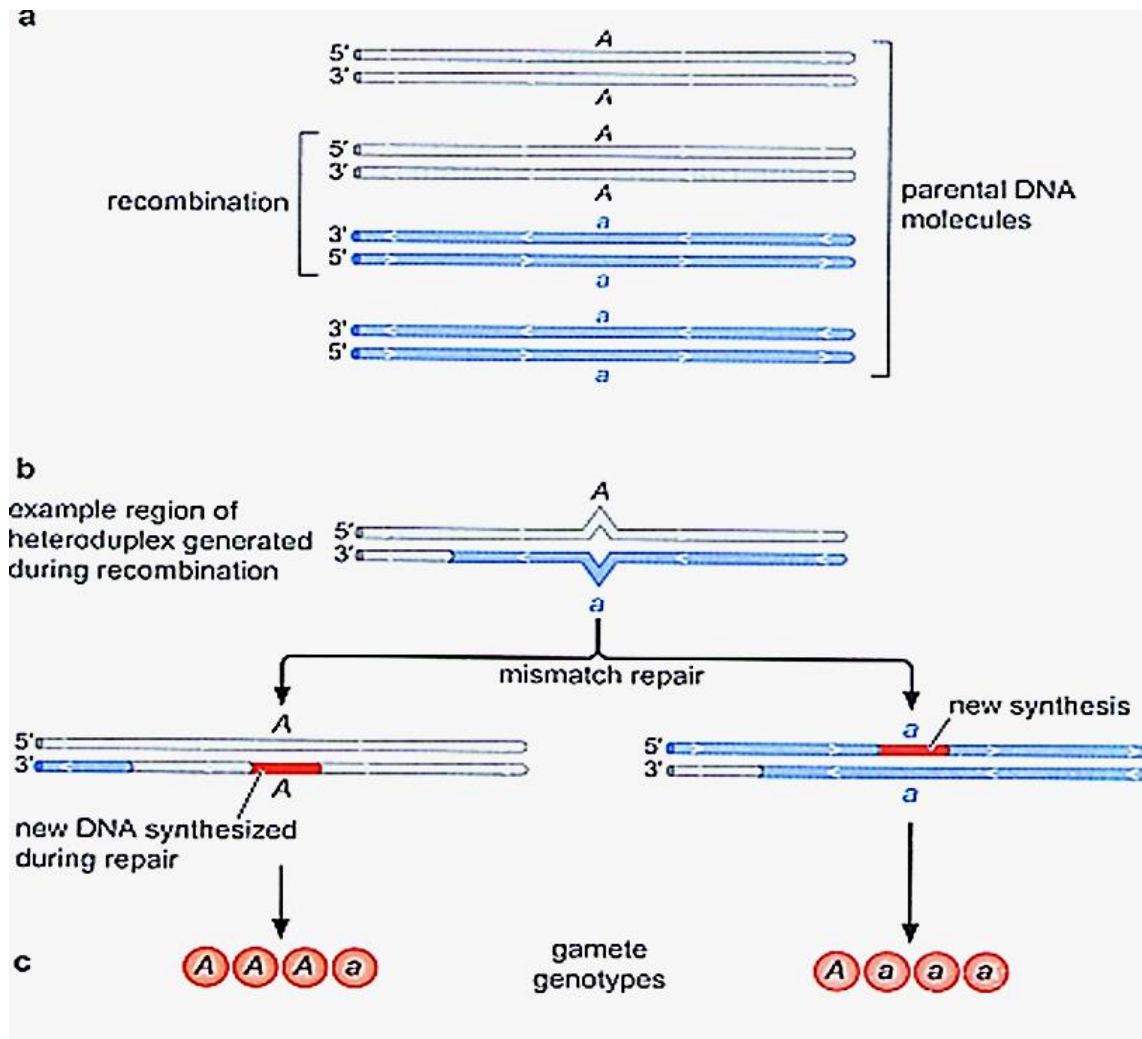


Evolúciós kitekintés

A rekombinációs hibajavítás és a a homológ rekombináció molekuláris mechanizmusa megegyezik.

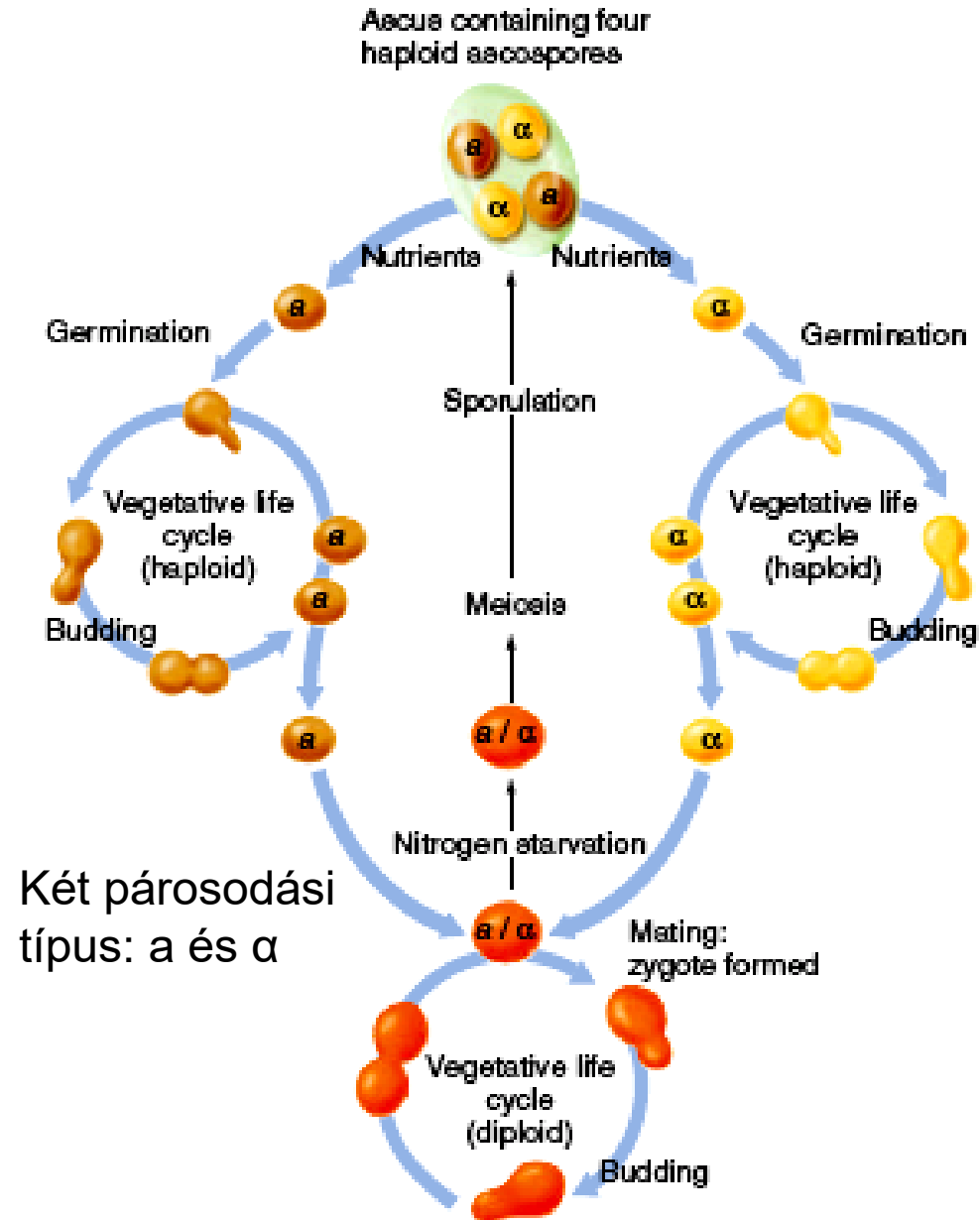
A homológiák -eukarióta rekombinációs hibajavító rendszer és a rekombinációs rendszer a korábbi bakteriális hibajavító rendszerek módosulásával keletkezhetett

Mismatch repair



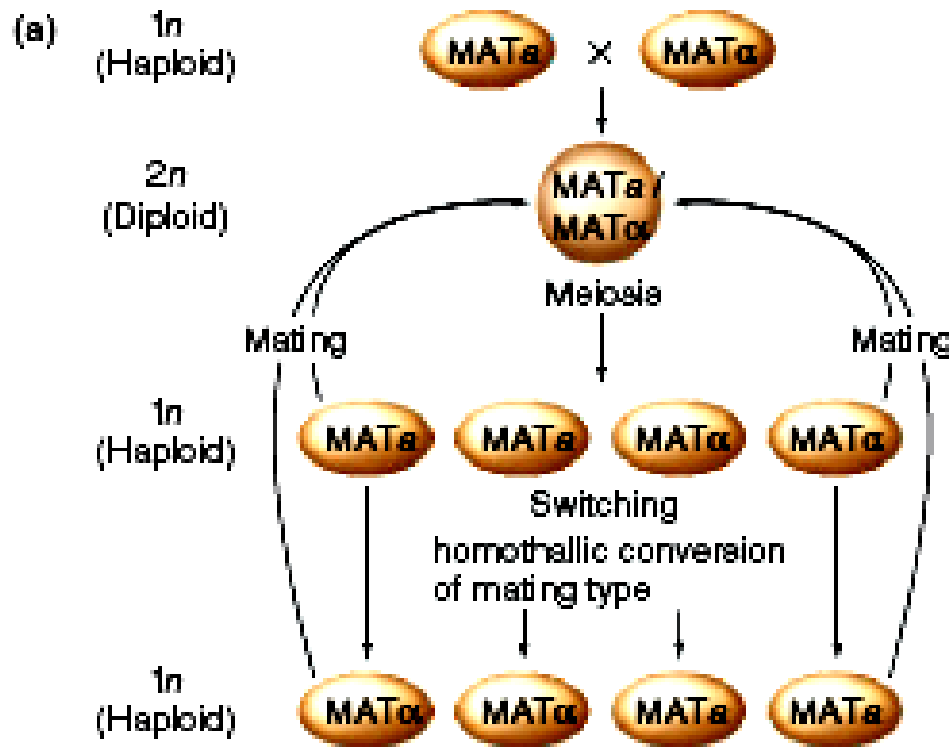
Párosodási típus váltás élesztőben

Élesztő élelciklusa



Párosodási típus váltás homotallikus élesztő törzsben.

Az élesztő törzsek egy része nemzedékről nemzedékre stabilan megtartja párosodási típusát, más törzsek azonban képesek párosodási típust váltani. Az előző típust **heterotallikusnak**, az utóbbit **homotallikusnak** nevezzük.



Párosodási típus váltás molekuláris háttere

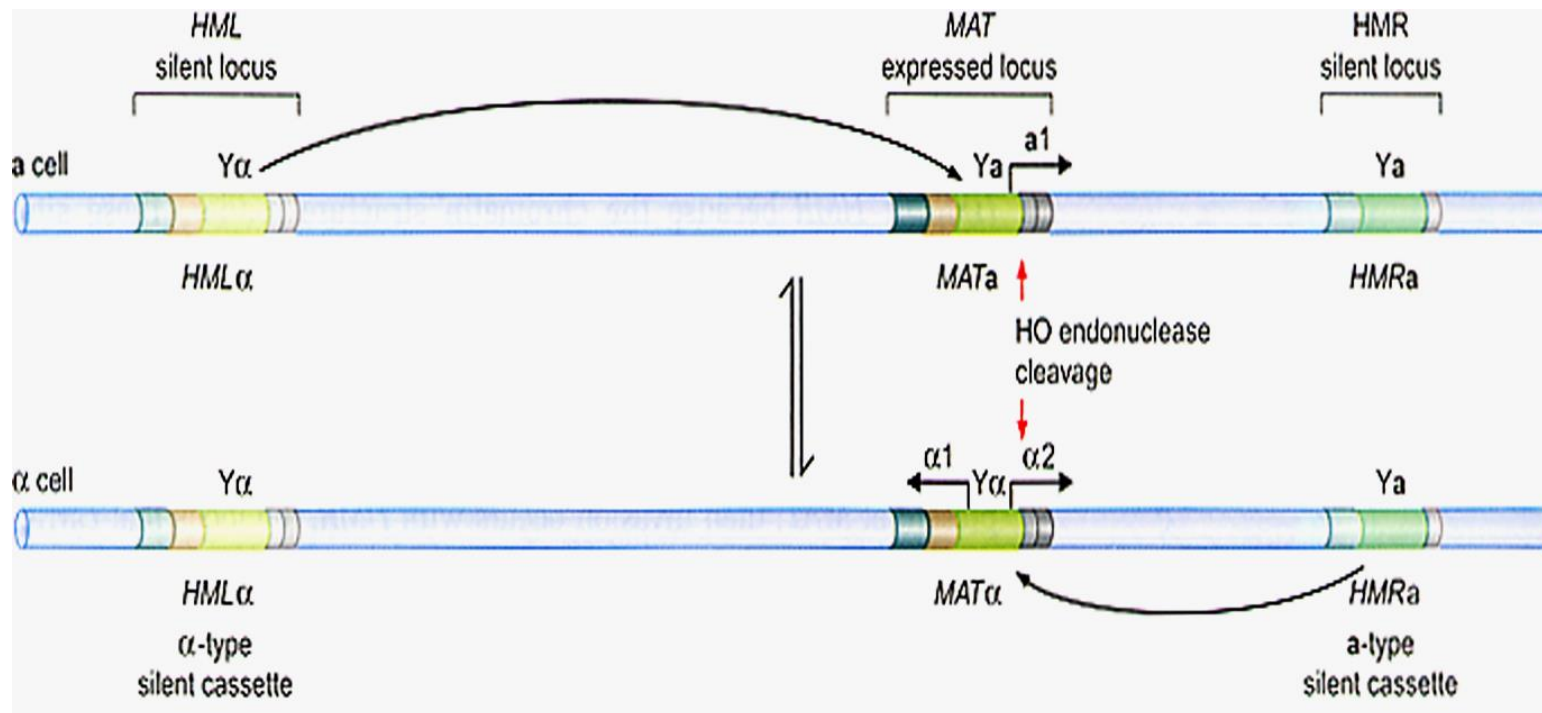
Az élesztő HO (homotallikus) lókuszt szabja meg, hogy az élesztő sejt stabilan megtartja párosodási típusát, vagy az instabil és az osztódás során néha megváltozik.

A HO (homotallikus) lókuszt domináns allélje jelenlétében történik párosodási típus váltás, a funkcióvesztéses, recesszív (ho) allél stabilitást biztosít.

A HO lókuszt terméke egy 18 bp hosszú DNS szakaszt felismerő endonukleáz enzim.

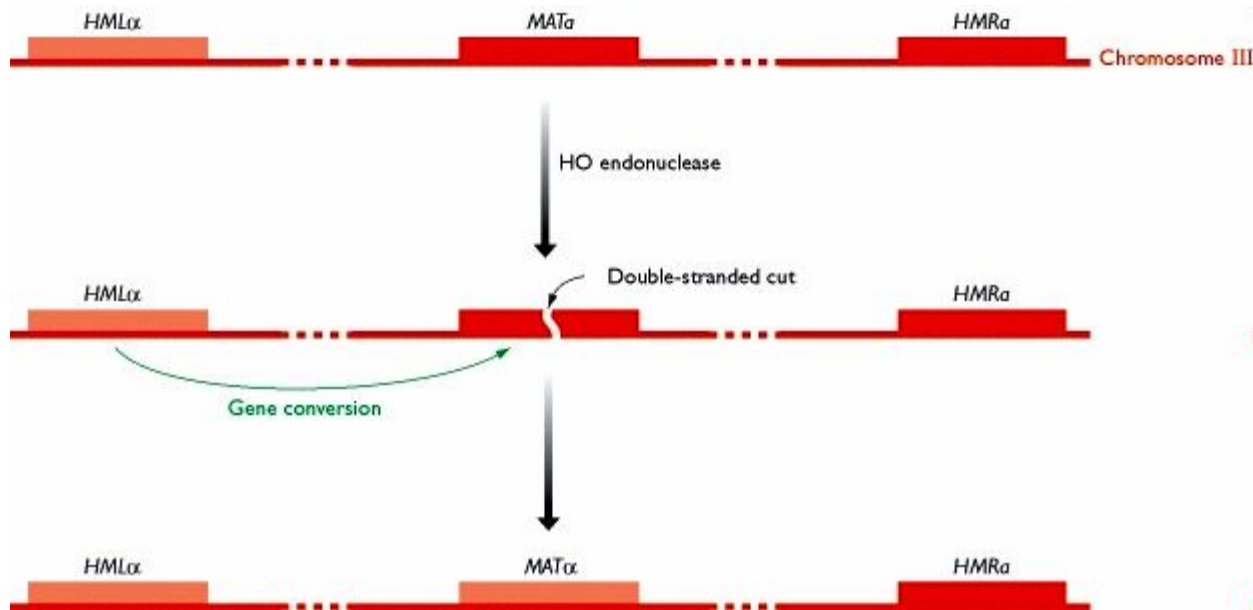
MAT (mating type) lókuszt

A MAT lókuszt MATa formáját hordozó sejt a párosodási típusú, a MAT α formát hordozó α típusú



A MAT α két transzkriptet termel. Az $\alpha1$ egy *Mcm1* transzkripciósi faktorrall együtt az *a* specifikus funkciók aktivátora. Az $\alpha2$ az *Mcm1*-el az *a* specifikus funkciók represszora.

A MATa egyetlen transzkriptért felelős. Az *a* sejtekben az $\alpha1$ hiánya miatt nem aktiválódnak az α specifikus funkciók. Az $\alpha2$ hiányában az *a* specifikus funkciók nem represszáltak. Sőt *Mcm1* magában aktiválja az MATa1-et



Silent locus

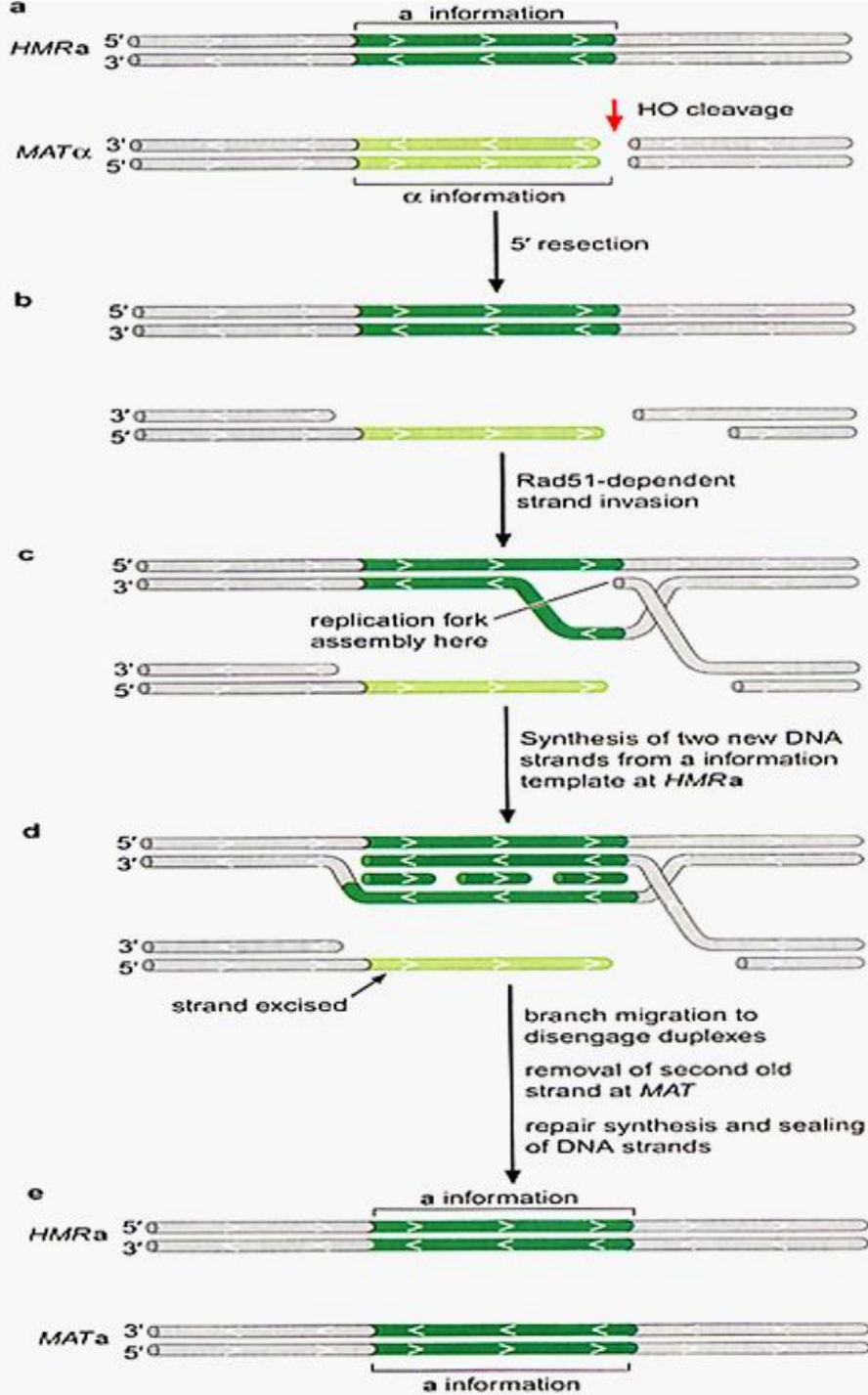
Silencer
szakasz –
SIR (Silent
Information
Regulator)
tartja fenn

A HO endonukleáz kétszálú bemetszést ejt a MAT lókuszt Y szakasza szélén - a rekombinációs javítómechanizmus templátként a HML vagy HMR megfelelő részét használja, a MAT lókuszt DNS-e kicserélődik valamelyik tároló lókuszt DNS-ére.

A MAT lókuszt megfelelő szakasza kivágódik és elvész.

A párosodási típus váltás egyirányú!

Speciális génkonverzió – SDSA modell



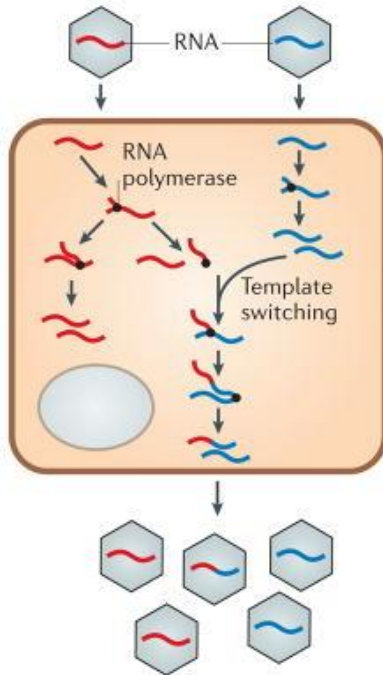
SDSA modell

synthesis-dependent
strand-annealing

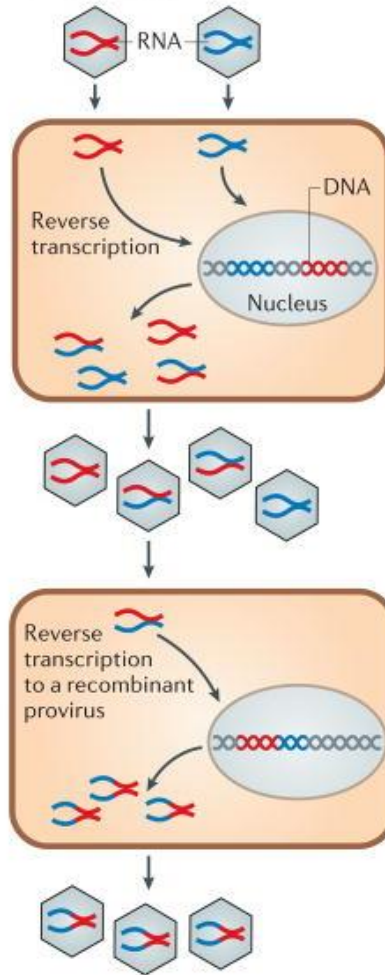
Génkonverzió cross over nélkül!

Rekombináció vírusokban

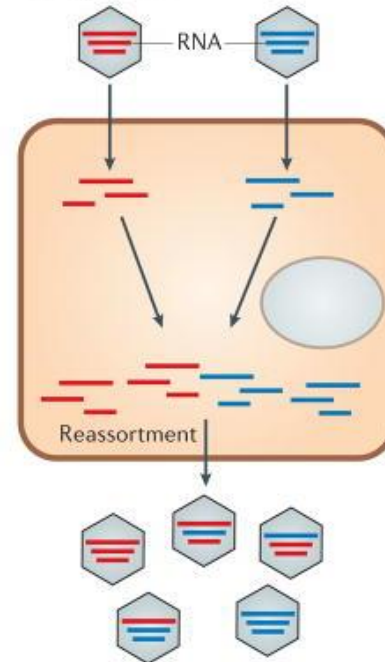
a Unsegmented RNA viruses



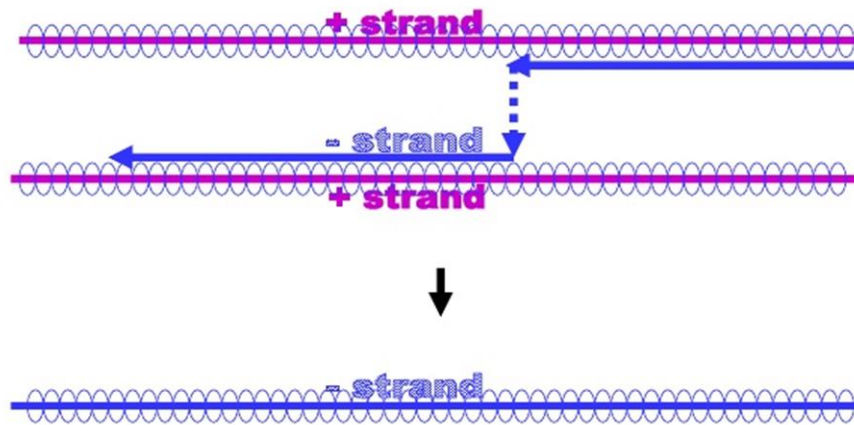
b Retroviruses



c Segmented RNA viruses



Copy choice



Az RNS-függő RNS polimerázok és a reverz traszkriptázok templát szálát válthatnak a szintézis során – ezzel kevert eredetű RNS-t hoznak létre.

- lokális homológiák
- transzkripció kinetikája
- RNS másodlagos szerkezet