

## HOMOLOGOUS GENETIC RECOMBINATION

V. M. GLASER

*Genetic recombination is a major source of hereditary variation. This defines its important role in evolution as well as in processes of ontogenesis. In this article are examined the nature and current models of homologous (general) recombination, i.e. the process, when the interaction (synapsis) between recombining homologous molecules is based on mutual recognition and pairing of DNA complementary strands.*

**Генетическая рекомбинация является одним из основных источников наследственной изменчивости. Это определяет ее важную роль как в эволюции, так и в онтогенетической изменчивости. В статье рассмотрены природа и механизмы гомологичной (общей) рекомбинации, где взаимодействие (синапсис) между рекомбинирующими гомологичными молекулами основано на взаимном узнавании и спаривании комплементарных цепей ДНК.**

© Глазер В.М., 1998

## ГОМОЛОГИЧНАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

В. М. ГЛАЗЕР

Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова

## ВВЕДЕНИЕ

Генетическая рекомбинация — это перераспределение генетического материала (ДНК), приводящее к возникновению новых комбинаций генов. Рекомбинация может происходить путем обмена клеточными ядрами, целыми молекулами ДНК или частями молекул. В то время как процессы репликации и репарации ДНК<sup>1</sup> обеспечивают воспроизведение и сохранение генетического материала, рекомбинация приводит к генетической изменчивости. Биологическое значение рекомбинации столь велико, что она получила развитие у всех живых организмов. Она может происходить у эукариот (как при образовании половых клеток — гамет, так и в соматических клетках), у бактерий и даже при размножении вирусов, в том числе таких, генетический материал которых состоит из РНК. Перетасовка хромосом в мейозе, приводящая к огромному разнообразию гамет, случайность слияния гамет при оплодотворении, обмен частями между гомологичными хромосомами — все это (и далеко не только это) относится к рекомбинации.

Понятно, что из широкого круга рекомбинационных явлений интерес молекулярных биологов в первую очередь вызывает рекомбинация, заключающаяся в обменах частями между молекулами ДНК, ведь здесь можно применять весь арсенал методов генетики и молекулярной биологии, и эти исследования перекрываются с изучением других важных генетических процессов, прежде всего репликации и репарации ДНК. Но даже в таком виде, суженном до обменов частями молекул ДНК, понятие “рекомбинация” включает большой набор разных по своей природе явлений. При этом для всех рекомбинационных процессов общим является этап, на котором молекулы ДНК вступают в контакт в участке, где произойдет обмен полинуклеотидными цепями. Этот этап получил название “синапсис”. Однако механизм синапсиса при разных типах рекомбинации принципиально различен. Более того, он является одним из критериев при классификации рекомбинационных явлений.

Прежде чем перейти к их рассмотрению, напомним некоторые термины и понятия, которыми мы

<sup>1</sup> См. статьи: Фаворова О.О. Сохранение ДНК в ряду поколений: репликация ДНК // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 4. С. 11–17; Сойфер В.Н. Репарация генетических повреждений // Там же. 1997. № 8. С. 4–13.

будем пользоваться. Молекула ДНК представляет собой дуплекс — структуру из двух закрученных в спираль полинуклеотидных цепей<sup>1</sup>. Последовательность нуклеотидов в цепях определяет специфичность ДНК и несет генетическую информацию. Молекулы, имеющие общее происхождение и состоящие из одинаковых нуклеотидных последовательностей, называют гомологичными. Однако их идентичность нарушается из-за мутаций, накапливающихся в течение поколений. По большей части мутации приводят к заменам единичных нуклеотидов, реже к выпадениям и вставкам отдельных нуклеотидов. Поэтому нарушения гомологии в результате мутаций не очень существенны по сравнению с основной массой идентичных нуклеотидов, и в таких случаях можно говорить об общей гомологии молекул. Каждая новая мутация приводит к образованию нового аллеля в том гене, где она возникла. Следовательно, новые аллели обычно отличаются от исходной формы одним нуклеотидом. Если мутация приводит к изменению фенотипа у исходной формы, то к ней можно применять также термин “генетический маркер”.

Две цепи, составляющие дуплекс ДНК, антипаралельны, то есть имеют разную полярность: одна цепь имеет направление 5'—3', другая — 3'—5'. Цепи удерживаются вместе водородными связями между парами комплементарных оснований А—Т и Г—С. Поэтому обе цепи в дуплексе являются также комплементарными. Процесс расхождения цепей в результате разрыва водородных связей есть денатурация, обратная реакция — ренатурация. Все это сказано для того, чтобы подвести читателя к отправной идее статьи: поскольку отдельные цепи ДНК, полученные от разных родителей, гомологичны и, следовательно, комплементарны, они могут ренатурировать, формируя новый дуплекс. Иными словами, гомологичные ДНК могут узнавать друг друга по комплементарности их нуклеотидной последовательности. Новый дуплекс, состоящий из цепей от разных молекул, называется гетеродуплексом.

А теперь можно дать классификацию основных типов рекомбинации. Все, что говорилось о гомологии ДНК и комплементарности полинуклеотидных цепей, относится к гомологичной, или общей, рекомбинации (она же кроссинговер), основанной на спаривании комплементарных цепей ДНК. От других типов рекомбинационных процессов ее отличают необходимость в общей (по всей длине молекул) гомологии между рекомбинирующими ДНК и участие большого набора специальных белков. Гомологичная рекомбинация начинается с возникновения в одном или обоих дуплексах участков из одиночных цепей ДНК, которые затем с помощью специальных белков находят комплементарные

<sup>1</sup> Более подробно строение ДНК описано в статье: *Кнорре Д.Г.* Биохимия нуклеиновых кислот // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 3. С. 11–16.

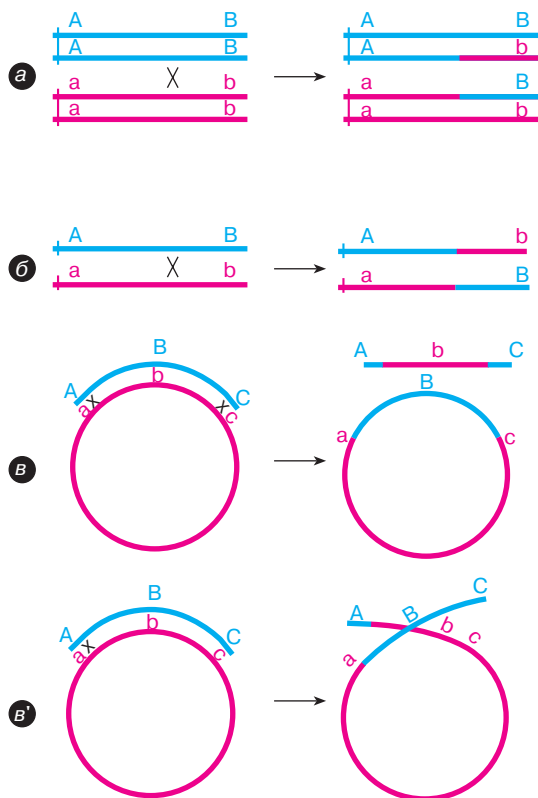
последовательности в гомологичном дуплексе и образуют с ними гетеродуплекс — ключевой промежуточный продукт (интермедиат) рекомбинации. Конечным результатом рекомбинации будет обмен равными частями гомологичных молекул (рис. 1).

Из общей рекомбинации можно выделить как частный случай так называемую эктопическую рекомбинацию. Она заключается в обменах (кроссинговерах) между отдельными участками гомологичной ДНК, разбросанными по геному. К ним относятся разнообразные подвижные элементы, названные так за способность перемещаться по геному, гены транспортных и рибосомных РНК, гистонов и многие другие повторяющиеся последовательности (повторы) ДНК. Такая локальная гомологичная рекомбинация интересна прежде всего тем, что она может приводить к хромосомным перестройкам, хотя ее биологическая роль этим не исчерпывается. На рис. 2 в качестве примера приведены схемы возникновения инверсий (поворотов внутренних участков хромосом на 180°), утрат (делаций) и удвоенных (дупликаций) частей хромосом в результате эктопической рекомбинации. Это только часть возможных перестроек хромосом. Другие их типы могут возникать в зависимости от того, какова ориентация повторов ДНК по отношению друг к другу (прямая или обратная), и от того, где они расположены: внутри одной хромосомы, в сестринских хроматидах или разных хромосомах. Несмотря на то, что обмены происходят между локальными участками гомологии, эктопическая рекомбинация осуществляется в основном теми же белками, что и гомологичная. Принципиально иными являются три других типа рекомбинации, которые основаны не на взаимодействии комплементарных цепей ДНК, а на совершенно иных механизмах и участии иных белков. Пока ограничимся тем, что просто перечислим их: сайт-специфическая<sup>2</sup> рекомбинация, транспозиции и незаконная рекомбинация. Этим типам рекомбинации посвящена следующая статья в этом номере журнала.

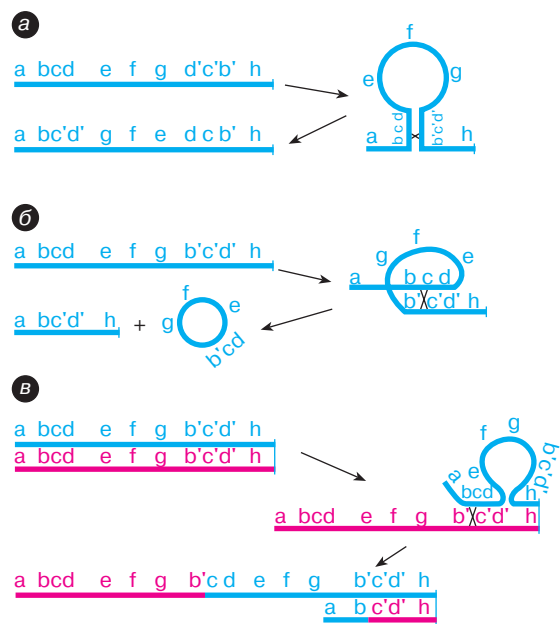
## МОДЕЛЬ ХОЛЛИДЕЯ

Рассмотрение гомологичной рекомбинации начнем с общей модели кроссинговера, опубликованной в 1964 году американским генетиком Р. Холлидеем. Сразу оговоримся, что Холлидей предложил эту модель с конкретной целью, а именно для объяснения результатов, полученных им и другими исследователями генетики грибов. Модель была формальной, без детализации молекулярных механизмов рекомбинационных реакций, она не рассматривала белки, их осуществляющие, поскольку в начале 60-х годов большинство из них не было известно. Но как раз в то время началось бурное развитие молекулярной генетики и случилось так, что

<sup>2</sup> Сайт — некая точка или участок в молекуле ДНК, РНК или белка.



**Рис. 1.** Схемы гомологичной рекомбинации (кроссингвера). Все линии соответствуют дуплексам ДНК. Синий и красный цвет позволяет различать гомологичные молекулы. Вертикальные черточки изображают центромеры. Кроссингвер обозначен знаком "X": а – кроссингвер в профазе 1-го деления мейоза. Четыре дуплекса ДНК здесь соответствуют хроматидам. Сестринские хроматиды соединены центромерой. Все хроматиды вместе составляют тетраду. В каждом акте кроссингвера участвуют две хроматиды из четырех. В данном случае кроссингвер произошел между двумя внутренними хроматидами. Продукты кроссингвера – две рекомбинантные и две нерекомбинантные хроматиды; б – кроссингвер в соматической клетке на стадии G1 клеточного цикла (клетки прошли через митотическое деление, но у них не произошла репликация хромосом). Поэтому здесь дуплекс ДНК соответствует хромосоме. Отметим, что кроссингвер в G1-клетках не выявляется генетическими методами, но обнаруживается физико-химическими методами; в – кроссингвер в клетке кишечной палочки *Escherichia coli*. Одна из участвующих в рекомбинации клеток (реципиент), имеющая кольцевую хромосому (красная), получила от клетки-донора линейный фрагмент двуцепочечной ДНК (синий). Большая часть донорного фрагмента замещает гомологичный участок в реципиентной хромосоме. Обращаем внимание на то, что здесь кроссингвер происходит дважды, вблизи обоих концов фрагмента. Единичный кроссингвер только на одном конце фрагмента привел бы к губительному для реципиентной клетки разрыву хромосомы. Такая гипотетическая ситуация изображена на рис. 1, в'



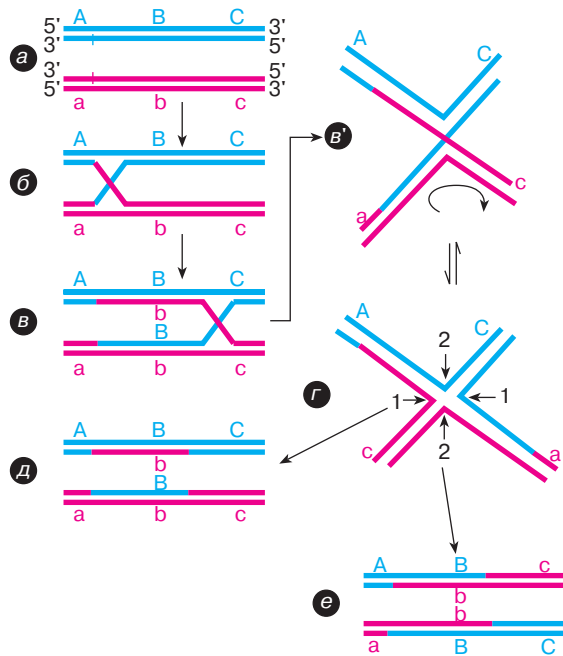
**Рис. 2.** Схемы перестроек хромосом, осуществляющихся путем кроссингвера между повторяющимися последовательностями ДНК: а – внутримолекулярная рекомбинация между обращенными повторами *bcd* и *d'c'b'* в участке между *b* и *c* (здесь и далее апострофы позволяют различать одинаковые части двух повторов) сопровождается поворотом на 180° (инверсией) участка *efg*, заключенного между повторами; б – внутримолекулярная рекомбинация по прямым повторам *bcd* и *b'c'd'*. Для их вхождения в синхронизированный дуплекс ДНК должен изогнуться в виде петли. Кроссингвер происходит на участке между *b* и *c*, что приводит к вырезанию сегмента хромосомы между участками кроссингвера и состыковке сегментов, расположенных снаружи от участков кроссингвера. Вырезаемая последовательность (*efg* вместе с одной копией повтора *bcd*) имеет кольцевую форму; в – рекомбинация по прямым повторам *bcd* и *b'c'd'* между сестринскими хроматидами (известна также под названием "неравный кроссингвер"). Ее результатом являются утрата (делеция) сегмента *efg* и одной копии повтора *bcd* в одной хроматиде и их прибавление (дупликация) к другой хроматиде. Многократное повторение неравного кроссингвера может привести к увеличению количества (амплификации) генов в хромосоме. Эта схема приложима и к рекомбинации между гомологичными хромосомами. Остальные условные обозначения те же, что в рис. 1

новые экспериментальные результаты хорошо вписались в модель Холлидея, дополняя и уточняя ее. По существу история молекулярной генетики рекомбинации – это развитие модели Холлидея. В усовершенствованном коллективными усилиями генетиков и молекулярных биологов виде модель представлена на рис. 3. Она разработана для мейотического кроссингвера. Напомним, что ядро мейотической клетки в профазе I содержит по четыре гомологичных хроматиды, но в каждом отдельном акте кроссингвера участвуют только две из них. На

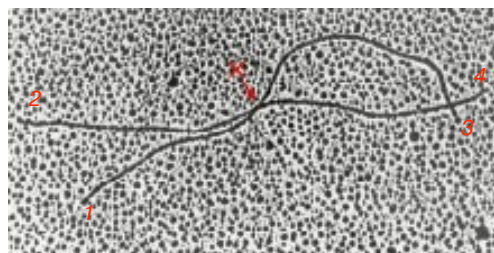
рис. 3 изображены два гомологичных дуплекса, соответствующие хроматидам. Для простоты изображены только те две хроматиды из четырех, которые участвуют в кроссинговере.

В принципе для того, чтобы гомологичные молекулы ДНК поменялись своими частями, сначала должны произойти разрывы во всех цепях обоих дуплексов, а уже потом – обмен цепями и замыкание разрывов. У Холлидея разрывы происходят не одновременно, а в два этапа. Рекомбинация начинается с первичных одноцепочечных разрывов фосфодиэфирных связей ДНК (их вносит фермент эндонуклеаза). Разрывы происходят в двух цепях одинаковой полярности (рис. 3, а). Холлидей также постулировал, что первичные разрывы возникают не в случайных, а в определенных сайтах ДНК. Впоследствии эта идея получила экспериментальное подтверждение.

Далее от точек первичных разрывов происходит обмен цепями между дуплексами, который приводит к образованию крестообразной структуры, получившей впоследствии название “полухиазма Холлидея” (рис. 3, б и 4). Такое название объясняется тем, что в полухиазме в обмен вовлечены только две цепи ДНК из четырех, что отличает ее от полной хиазмы – характерного продукта заверщенного мейотического кроссинговера, давно известного биологам. Затем происходит очень важный процесс – перемещение точки перекреста цепей в



**Рис. 3.** Модель Холлидея. В отличие от рис. 1 и 2 линии соответствуют цепям ДНК, две параллельные линии – дуплексу ДНК. Вертикальные черточки на рис. 3, а отмечают сайты первичных разрывов. Остальные пояснения даны в тексте



**Рис. 4.** Электронно-микроскопическая фотография полухиазмы Холлидея. Рекомбинантная структура выделена из хромосомной ДНК вегетативных клеток диплоидных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, находящихся в фазе G1 клеточного цикла. Хромосомная ДНК была обработана рестрикционной эндонуклеазой *EcoRI*. Поскольку рестрикционная эндонуклеаза производит двуцепочечные разрывы ДНК в определенном сайте, в случае гомологичной рекомбинации должна образоваться попарно равноплечая крестообразная структура. В данном случае ветвь 1 по длине равна ветви 4, а ветвь 2 – ветви 3. Точка перекреста помечена знаком x. Пересечение цепей в правой части рисунка – результат их наложения друг на друга при подготовке препарата к электронной микроскопии. Фото М.П. Самадашвили и автора

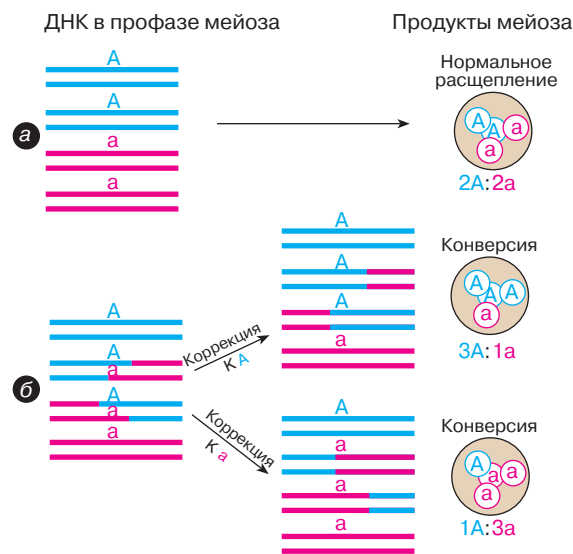
полухиазме вдоль рекомбинирующих дуплексов (рис. 3, в). Такое явление описано под названием “миграция ветвления”. Оно заключается в следующем: от точки перекреста цепей происходит расплетание исходных дуплексов и высвобождающиеся цепи тут же ренатурируют с комплементарными цепями из гомологичных дуплексов, что приводит к образованию и последующему удлинению гетеродуплекса (B/b на рис. 3, в). Именно в удлинении гетеродуплекса и заключается биологический смысл миграции ветвления. Ее осуществляют специальные ферменты. Размеры гетеродуплекса при мейотическом кроссинговере колеблются от нескольких сот до одной тысячи п.н., при рекомбинации в соматических клетках и клетках прокариот он еще протяженнее.

Гетеродуплекс сформирован. Образовавшаяся сложная разветвленная структура должна разделиться на гомологи. Это называется разрешением полухиазмы. Для разрешения необходимы еще два разрыва цепей: вторичные разрывы завершат обмен цепями. Но прежде чем это случится, полухиазма должна претерпеть еще одно превращение – изомеризацию. Изомеризация заключается в изменении структуры полухиазмы, которое происходит за счет обычного теплового движения молекул. На рис. 3 изображена схема изомеризации полухиазмы, предложенная Х. Поттером и Д. Дресслером в 1976 году. Структуры в и в' идентичны: просто вторая изображена в крестообразном виде, что приближает ее к реальной (рис. 4). В структуре в' происходит один поворот на 180° любой пары дуплексных сегментов (плеч), на рисунке это нижняя пара. Образовавшаяся структура (рис. 3, г) может разрешиться двумя парами вторичных разрывов. Парные разрывы цепей

одинаковой полярности 1–1 или 2–2 приводят к двум типам рекомбинантных хроматид: хроматиды первого типа (рис. 3, *д*) содержат внутренний гетеродуплекс В/в, а по конфигурации фланговых маркеров А и С не отличаются от исходных (некроссоверные хроматиды); рекомбинантные хроматиды второго типа (рис. 3, *е*) кроссоверные, они также содержат гетеродуплекс, но обмениваются частями по обе стороны от него. Оба типа продуктов рекомбинации равновероятны, что соответствует генетическим данным, на которые опирался Холлидей при создании своей модели.

Здесь необходимо сделать небольшое отступление по поводу одного важного процесса, происходящего в гетеродуплексе. Как уже указывалось, от исходных молекул в рекомбинационный гетеродуплекс могут войти разные аллели, и тогда в нем возникнут неспаренные основания, которые локально нарушают структуру двойной спирали ДНК. Эти нарушения узнаются специальными ферментными системами, работающими по типу эксцизионной репарации (см. статью В.Н. Соифера “Репарация генетических повреждений”). Они проводят коррекцию неспаренных оснований в гетеродуплексе: удаляют неспаренное основание в одной цепи ДНК и застраивают образующуюся брешь по матрице другого аллеля в комплементарной цепи, тем самым превращая (конвертируя) один аллель в другой. Это явление было давно известно под названием “конверсия гена”, но теперь мы знаем, что в ее основе лежит коррекция гетеродуплекса. Схема конверсии гена на примере мейоза у дрожжей представлена на рис. 5. Из нее ясно, что если гетерозиготная клетка А/а вступает в мейоз, то в норме среди продуктов мейоза оба аллеля гена А будут представлены в равном соотношении: 2А : 2а. Однако если в районе хромосомы, где расположен ген А, произойдет кроссинговер, то сформируется гетеродуплекс А/а с локально неспаренными основаниями, что может привести к конверсии гена А: расщепление аллелей гена среди продуктов мейоза будет 3А : 1а или 1А : 3а. Расщепление по генам, расположенным вне участка кроссинговера (на рис. 5 не показаны), сохранит нормальное соотношение аллелей 2 : 2. Мы видели при разборе модели Холлидея, что содержащие гетеродуплекс продукты рекомбинации с кроссинговером и без кроссинговера по внешним генам равновероятны, иными словами, конверсия гена в мейозе может одинаково часто сопровождаться и не сопровождаться обменом по внешним генам. Этот факт был основным среди упомянутых выше генетических данных, опираясь на которые Холлидей создавал свою модель.

Модель Холлидея симметрична: первичные разрывы возникают одновременно в обоих гомологах и обмен цепями происходит синхронно. Однако имеются генетические данные об асимметричных обменах, полученные, в частности, на дрожжах. В этих случаях первичный разрыв возникает только в од-



**Рис. 5.** Сокращенная схема конверсии гена на примере дрожжей. Линии соответствуют цепям ДНК, две параллельные линии – хроматиде. У дрожжей, как и у других грибов-аскомицетов, продукты каждого мейоза какое-то время сохраняются вместе в сумке-аске (заклучены в окружность), что позволяет анализировать их отдельно от других мейозов: а – мейоз без кроссинговера; б – мейотический кроссинговер в участке гена А. Остальные пояснения даны в тексте

ном дуплексе, затем от точки разрыва отделяется одна цепь ДНК, которая внедряется в гомологичный дуплекс и в ходе последующей миграции ветвления вытесняет из него цепь той же полярности. После этого обмен превращается в симметричный. Пример такой реакции, но применительно к *E. coli* будет рассмотрен ниже.

Модель Холлидея в ее современном виде общепризнана и универсальна для прокариот и эукариот (и для половых, и для соматических клеток). Ее достоинством является тот факт, что она хорошо проверяется генетическими данными, и практически все ее этапы постепенно нашли экспериментальное подтверждение. Полухиазмы Холлидея хорошо видны под электронным микроскопом (см. рис. 4). Обнаружены специальные эндонуклеазы (их называют резолвазами), которые осуществляют разрешение полухиазмы, как это изображено на рис. 3, *г*. К настоящему времени такие резолвазы обнаружены у бактериофагов Т4 и Т7, *E. coli*, дрожжей и человека. У *E. coli* выявлены также белки, осуществляющие миграцию ветвления полухиазмы. Именно на примере *E. coli* как наиболее изученного в отношении рекомбинации объекта мы рассмотрим конкретные механизмы кроссинговера.

## РЕКОМБИНАЦИЯ У *E. COLI*: ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ

Клетки *E. coli* способны к обмену генетической информацией с помощью двух процессов, заменяющих

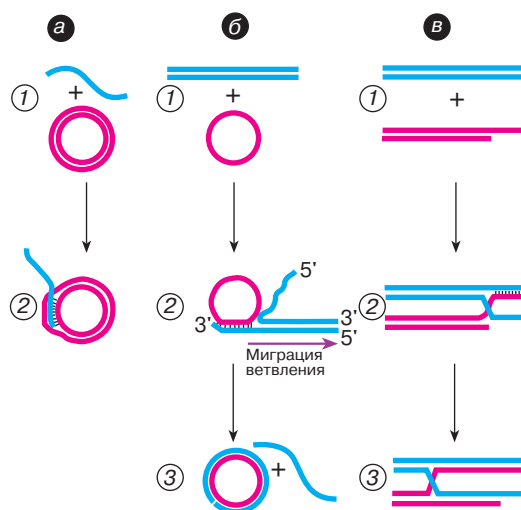
им половой: конъюгации и трансдукции. При конъюгации клетки разных половых типов вступают в контакт, и из клетки донора в клетку реципиента передается одна из двух цепей кольцевой ДНК (хромосомы или конъюгативной плазмиды, если последняя не интегрирована в хромосоме). При этом конъюгирующие пары бактериальных клеток постепенно расходятся из-за непрочной связи между ними, и перенос ДНК сразу прекращается. Поэтому реципиентные клетки никогда не получают от донора полную однонитевую кольцевую хромосомную ДНК, а только ее часть, которая сразу достраивается до линейного двуцепочечного фрагмента с так называемыми тупыми концами (у них нет выступающих одноцепочечных концов – “хвостов”). Размеры перенесенных фрагментов варьируют, чаще всего они достигают нескольких сот т.п.н. При трансдукции из клеток донора в клетку реципиента с помощью бактериофага (бактериального вируса) переносится двуцепочечный фрагмент бактериальной хромосомы, но в десятки раз меньшего размера, чем при конъюгации. Таким образом, с физической точки зрения генетический материал, передаваемый реципиентам при конъюгации и трансдукции, отличается только размерами. Далее донорный фрагмент должен заменить гомологичную часть хромосомы реципиента с помощью парных кроссинговеров, проходящих вблизи концов фрагмента (см. рис. 1, в).

Рассмотрим механизм самого кроссинговера у *E. coli*. На начальной стадии исследований в лаборатории А. Кларка в США был выделен и изучен набор мутантов с нарушениями рекомбинации (у них была подавлена способность давать рекомбинантное потомство при конъюгации и трансдукции). С помощью этих мутантов, названных *rec*, были установлены соответствующие гены, а затем выделены рекомбинационные белки, инактивированные у мутантов.

Самый главный белок RecA – продукт гена *recA*. Белок имеет небольшой размер (всего около 38 кД) и проявляет разнообразные активности. Этот белок участвует не только в рекомбинации, но и в репарации ДНК. Мы рассмотрим только его роль в рекомбинации. В условиях *in vitro* для проявления всех активностей белка RecA требуются в качестве кофакторов АТФ и одноцепочечная ДНК в любой форме, например дуплексная ДНК с концевыми (хвосты) или внутренними (бреши) одноцепочечными участками. Основное назначение белка RecA – приводить во взаимодействие одноцепочечную ДНК с гомологичным дуплексом. В зависимости от структуры ДНК-субстратов белок может проводить разные рекомбинационные реакции. Три из них показаны на рис. 6. Прежде чем рассматривать эти реакции, отметим некоторые общие закономерности функционирования RecA-белка.

Важнейшее свойство белка RecA определяется наличием у него двух сайтов связывания с ДНК.

Первый сайт используется для первичного связывания с ДНК: в присутствии АТФ белок всегда взаимодействует в этом сайте с одноцепочечной ДНК. Связывание белка носит кооперативный характер, то есть его молекулы собираются на ДНК по принципу “конец-в-конец”, образуя вокруг ДНК правозакрученную белковую спираль (не надо путать ее со спиралью самой ДНК). В результате возникает нитевидное образование – RecA-ДНК-филамент. Если одноцепочечная ДНК была в составе двуцепочечной молекулы (как хвост или брешь), то формирование филамента распространяется на дуплекс, что сопровождается гидролизом АТФ. В филаменте двуцепочечная ДНК изменяет свою конформацию. В отличие от обычной В-формы ДНК (где шаг спирали составляет 10,4 п.н.) на один виток спирали ДНК в филаменте приходится 18,6 п.н., в результате чего ДНК оказывается растянутой в 1,5 раза. Считается, что такое растяжение дуплекса необходимо



**Рис. 6.** Схемы трех рекомбинационных реакций, осуществляемых белком RecA *E. coli* *in vitro* (из: Smith G.R. // Ann. Rev. Genet. 1987. Vol. 21. P. 179–201, с изменениями). Линии соответствуют цепям ДНК. Вертикальными черточками на этапе 2 изображены водородные связи. Они даны для выделения участка вновь образованного гетеродуплекса в D-петле. RecA-ДНК-филамент на рисунке не показан: а – реакция между кольцевой двуцепочечной ДНК и гомологичной одноцепочечной ДНК. Для эффективной реакции кольцевая ДНК должна быть сверхспирализована, на рисунке это не показано. Одноцепочечная ДНК внедряется в кольцевой дуплекс в участке, гомологичном ее концу, и образует D-петлю; б – реакция между кольцевой одноцепочечной ДНК и гомологичным линейным дуплексом. На этапе 2 показаны интермедиат реакции с D-петлей и направление последующей миграции ветвления, которая приведет к появлению продуктов рекомбинации: кольцевого дуплекса с одноцепочечным разрывом и линейной одноцепочечной ДНК (этап 3); в – рекомбинация между гомологичными дуплексами, один из которых имеет одноцепочечный конец. Образование D-петли и затем полухиазмы Холлидея (этап 2), миграция полухиазмы влево (этап 3)

для его последующего взаимодействия с гомологичной одноцепочечной ДНК. Формирование филамента завершает подготовительную, пресинаптическую стадию кроссинговера.

Реакции, составляющие следующую, синаптическую стадию кроссинговера, происходят только внутри филаментов. При этом филаменты могут вступать в рекомбинацию только с “голой”, не находящейся в филаменте ДНК. Два филамента не рекомбинируют друг с другом. Взаимодействие филамента с голой ДНК осуществляется за счет второго сайта связывания RecA. Связывание с ДНК во втором сайте слабое. Из-за этого между филаментом и голой ДНК возникают лишь кратковременные контакты (соударения). Эти контакты становятся прочными только после встречи гомологичных последовательностей.

Нахождение гомологии связано с формированием гетеродуплекса. Обычно оно начинается с образования структуры, в которой задействованы три цепи ДНК и которая называется D-петлей (от англ. displacement loop – петля вытеснения). Это происходит следующим образом: одноцепочечная ДНК внедряется в дуплекс (рис. 6, а) и образует двойную спираль (гетеродуплекс) с одной, комплементарной ей цепью дуплекса, одновременно вытесняя вторую цепь. D-петля может быть закрытой, если в дуплекс внедряется одноцепочечный хвост (рис. 6, а), или открытой, если она формируется на конце линейного дуплекса (рис. 6, б и в).

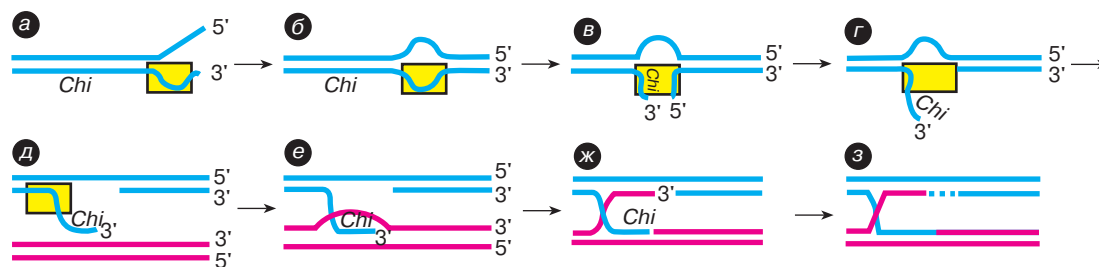
На следующем этапе – постсинапсисе гетеродуплекс удлиняется путем миграции ветвления, которую *in vitro* также может осуществлять белок RecA. В случае рекомбинации между одноцепочечной ДНК и дуплексом она происходит в определенном направлении, полярно, как показано на рис. 6, б. Эта полярность определяется активной (рекомбиногенной) ролью 3'-концевой одноцепочечной ДНК в реакции, катализируемой белком RecA. Миграция ветвления под действием RecA-белка сопровождается гидролизом АТФ, но происходит медленно, со скоростью несколько п.н./с. Таким образом, в условиях *in vitro* белок RecA способен осуществлять поиск гомологии, формировать синаптическую структуру на основе гетеродуплекса и производить обмен цепями между гомологами. Эти реакции стимулируются добавлением белка SSB, который выпрямляет одноцепочечную ДНК.

Мы рассмотрели реакции, катализируемые белком RecA *in vitro*. В условиях *in vivo*, то есть в бактериальной клетке, где вместе с RecA задействованы другие белки, распределение обязанностей может быть несколько иным. Например, в клетке белок RecA не проводит миграцию ветвления. Это более эффективно делают другие специальные белки. Надо отметить, что разнообразие белков, работающих вместе с RecA, отражает разнообразие путей рекомбинации. Еще в 1973 году А. Кларк описал у *E. coli*

три разных пути гомологичной рекомбинации, но ни один из них не функционирует без RecA-белка.

А теперь посмотрим, как осуществляется основной путь рекомбинации у *E. coli* – RecBCD. Главную роль здесь играет фермент RecBCD-нуклеаза, субъединицы которой кодируются генами *recB*, *recC* и *recD*. Фермент проявляет несколько активностей только в присутствии АТФ. RecBCD может гидролизовать одно- и двуцепочечную ДНК, притом с обоих концов, то есть работать как экзонуклеаза. Он имеет также хеликазную активность, то есть расплетает дуплекс ДНК, затрачивая на это энергию АТФ. Наконец, фермент работает как сайт-специфическая эндонуклеаза: расщепляет одноцепочечную ДНК около особой 8-нуклеотидной последовательности 5'-GCTGGTGG-3', называемой *Chi*-сайтом.

RecBCD-нуклеаза – один из самых ранних белков рекомбинации. Она готовит субстрат для белка RecA. Напомним, что при конъюгации и трансдукции в реципиентной клетке оказывается линейный дуплекс донорной ДНК с тупыми концами. Именно такая ДНК необходима для рекомбинации с реципиентной хромосомой с участием RecBCD. Ниже приводится схема работы фермента, основанная на экспериментальных данных и подтвержденная электронно-микроскопическими наблюдениями. Фермент атакует конец дуплекса и начинает расплетать его (рис. 7, а). Реакция асимметрична, что проявляется в особой роли цепи ДНК с 3'-концом. RecBCD удерживает его таким образом, что образуется одноцепочечная петля примерно в тысячу нуклеотидов длиной, тогда как 5'-цепь выступает в виде свободного хвоста. Продолжая расплетать дуплекс, RecBCD-нуклеаза сохраняет петлю в 3'-цепи и продвигает ее вдоль дуплекса. Поскольку после прохождения фермента комплементарные цепи ренатурируют (“схлопываются”), в 5'-цепи автоматически возникает вторая петля (рис. 7, б). Двойная петля продвигается вдоль дуплекса до тех пор, пока фермент не встретит *Chi*-сайт в 3'-цепи. Фермент должен подойти к *Chi*-сайту справа, с 3'-стороны. На расстоянии 4–6 нуклеотидов до него RecBCD разрывает 3'-цепь (рис. 7, в) (вспомните о постулированных Холлидеем особых последовательностях ДНК, в которых происходят первичные разрывы цепей). Дальнейшее расплетание дуплекса приводит к вытеснению рекомбиногенного одноцепочечного 3'-конца (рис. 7, г, д), который связывается с белком RecA. После этого происходит уже известная цепь событий. На 3'-конце сначала формируется филамент, затем образуется D-петля (закрытая, так как возникает в кольцевой хромосоме) (рис. 7, е). Затем D-петля разрезается с помощью одной из эндонуклеаз *E. coli*, что приводит к полухиазме Холлидея (рис. 7, ж). 5'-Концевая часть разорванной цепи ДНК, вероятно, удаляется несколько раньше (рис. 7, з) с помощью экзонуклеазной активности RecBCD. На этом участие белков RecA и RecBCD в рекомбинации, скорее всего, завершается. Далее



**Рис. 7.** Сокращенная схема рекомбинации с участием RecBCD-нуклеазы *E. coli* (из: Smith G.R. // Ann. Rev. Genet. 1987. Vol. 21. P. 179–201, с изменениями). Дуплексы ДНК представлены параллельными линиями. Синие линии – фрагмент донорной ДНК, красные линии – часть кольцевой хромосомы реципиентной клетки. Желтый прямоугольник изображает молекулу RecBCD-нуклеазы, пунктир – репаративный синтез бреши с помощью ДНК-полимеразы. Остальные пояснения даны в тексте

ДНК-полимераза и ДНК-лигаза должны залечить брешь и разрывы в цепях (рис. 7, з).

Последующие этапы, не представленные на рис. 7, – миграцию ветвления и разрешение полухиазмы осуществляют другие белки. Из них наиболее изучены RuvA, RuvB и RuvC – продукты генов *ruvA*, *ruvB* и *ruvC*. RuvA узнает крестообразную полухиазму и нацеливает на нее RuvB. Последний узнает комплекс RuvA–полухиазма и, используя энергию АТФ и работая как ДНК-хеликаза, осуществляет миграцию полухиазмы в том же направлении, что и RecA-белок *in vitro*, но гораздо эффективнее. Где-то здесь в игру вступает резолваза RuvC: она узнает комплекс RuvB–полухиазма, связывается с ним и в определенный момент разрешает полухиазму способом, описанным выше (рис. 3, з). На этом миграция полухиазмы прекращается.

На рис. 7 инициация рекомбинации для простоты изображена только на одном конце фрагмента донорной ДНК. В действительности же вся описанная последовательность реакций происходит одновременно с обоих концов донорного фрагмента, что обеспечивает парность обменов при рекомбинации с хромосомой реципиента и исключает ситуацию, изображенную на рис. 1, в'. Перечисленные выше белки далеко не исчерпывают список участников кроссинговера у *E. coli*. Сюда входят также различные белки, помогающие RecA, белки, участвующие в альтернативных путях рекомбинации, и белки общего метаболизма ДНК: ДНК-гираза, ДНК-полимераза, ДНК-лигаза и группа белков, осуществляющих коррекцию неспаренных оснований в рекомбинационном гетеродуплексе.

#### МОДЕЛЬ РЕКОМБИНАЦИИ НА ОСНОВЕ РЕПАРАЦИИ ДВУЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ ДНК

В последние годы получила развитие модель, предложенная еще в 1983 году Дж. Жостаком и др. для репарации двуцепочечных повреждений ДНК у дрожжей. Интерес к ней резко возрос после обнаружения специфических двуцепочечных разрывов в генах *ARG4* и *HIS4*, возникающих только в мейозе и совпадающих с сайтами инициации рекомбинации (вспомните о постулированных Холлидеем специ-

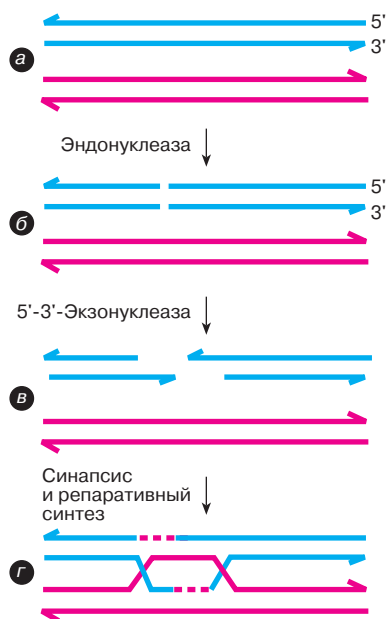
фических сайтах инициации кроссинговера). Разрывы сопровождалась деградацией 5'-концевых цепей с каждой стороны разрыва, что приводило к образованию одноцепочечных 3'-хвостов длиной около 600 п.н. Модель представлена на рис. 8. В 1994 году две группы исследователей из США выделили из мейотических клеток дрожжей структуры, состоящие из двух гомологичных дуплексов, удерживаемых вместе двумя полухиазмами Холлидея. Структуры точно соответствуют интермедиату модели, изображенному на рис. 8, з. В реакции *in vitro* они разрешаются с помощью резолвазы из *E. coli* на два дуплекса, либо кроссоверных, либо некроссоверных по внешним маркерам. Детали этого механизма применительно к условиям *in vitro* еще уточняются, однако он обнаружен пока только у дрожжей.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы рассмотрели механизмы гомологичной рекомбинации на примере двух хорошо изученных организмов: дрожжей и *E. coli*. В основных чертах описанные процессы, прежде всего те, что основаны на схеме Холлидея, характерны и для других организмов, в том числе высших эукариот. В пользу этого свидетельствуют участие структуры Холлидея и сходного набора белков в рекомбинации у представителей всех систематических групп организмов и эволюционный консерватизм белка RecA. Его гомологи обнаружены у бактерий, грибов, растений и животных, включая человека, хотя многие детали их функционирования еще не выяснены. В то же время механизмы рекомбинации у разных организмов могут существенно различаться в деталях. Так, описанная выше RecBCD-нуклеаза, поставляющая для рекомбинации одноцепочечную 3'-концевую ДНК, обнаружена только у бактерий. У других организмов рекомбиногенная одноцепочечная ДНК образуется другими способами.

Биологическое значение гомологичной рекомбинации огромно. Прежде всего она вносит большой вклад в лежащую в основе эволюции генетическую изменчивость, позволяющую организмам постоянно приспосабливаться к среде обитания. Преимущества перекомбинаций генов настолько





**Рис. 8.** Схема мейотической рекомбинации по механизму репарации двуцепочечных разрывов ДНК у дрожжей. Два гомологичных дуплекса ДНК (хроматиды) представлены парами параллельных линий (а). Специфическая эндонуклеаза вводит разрывы в обе цепи синего дуплекса (б). 5'-Концы цепей в точках разрывов гидролизуются 5'-3'-эксонуклеазой с образованием рекомбиногенных 3'-цепей (в), которые внедряются в красный дуплекс (г), где происходят репаративный синтез утраченных участков ДНК (пунктир) и лигирование концов. Остальные пояснения даны в тексте

велики, что рекомбинационные системы появились у вирусов и бактерий, которые размножаются вегетативно. У эукариот они достигли большего разнообразия и сложности, особенно в соматических клетках. Эктопическая рекомбинация приводит к перестройкам хромосом, с которыми (прежде всего с дупликациями) связывают эволюцию генетического аппарата. Считается, что дупликация участков хромосом обеспечили материал для дивергенции нуклеотидных последовательностей, приводящей к возникновению новых генов.

Однако биологическое значение гомологичной, и в том числе эктопической, рекомбинации нельзя свести к их роли в эволюции. Большую роль они играют и в разнообразных онтогенетических перестройках генетического материала, участвующих в регуляции работы генов. Например, конверсия гена (коррекция гетеродуплекса), которая в мейотических клетках является одним из этапов общего процесса кроссинговера, в соматических клетках эукариот и клетках бактерий может не сопровождаться кроссинговером по внешним генам и выступать как самостоятельное явление. Такая конверсия выполняет важные функции в онтогенезе бактерий, дрожжей, животных. Известно много примеров, когда определенный ген расположен в локусе, где он име-

ет собственный промотор и может функционировать, в то время как в других локусах находятся последовательности, в основном гомологичные этому гену, но заметно отличающиеся по нуклеотидному составу из-за накопившихся в них мутаций. Они лишены промотора и не могут выполнять функции генов. Эти “молчащие” последовательности могут вступать в синапсис с работающим геном и служить матрицей для его конверсии. Таким образом, работающий ген может менять свою нуклеотидную последовательность. Подобным способом клетки гомоталличных штаммов дрожжей меняют свой половой тип.

У некоторых патогенных микроорганизмов этот же механизм, позволяющий их клеткам менять свои поверхностные антигены, участвует в процессах, описанных ниже. Так, многие патогенные бактерии (спирохета *Borrelia bormsei*, гонококки и др.) и простейшие (африканские трипаномы), с одной стороны, и животные, в которых они паразитируют, — с другой, используют в борьбе друг против друга в сущности сходные приемы. Животные продуцируют в огромном ассортименте антитела, обеспечивающие им иммунитет<sup>1</sup>, а патогенные микроорганизмы в ответ на это образуют на своей поверхности все новые и новые антигены, позволяющие им уходить от иммунного ответа хозяйского организма. В основе данных процессов лежат рекомбинационные перестройки в локусах, кодирующих антигены (или антитела). Рекомбинационные перестройки включают одни и выключают другие гены либо создают новые гены. В этих сложных процессах участвуют разные типы рекомбинации, но гомологичная и эктопическая рекомбинации (и в том числе конверсия гена) играют здесь не последнюю роль. Помимо описанных процессов у бактерий и низших эукариот известны и другие рекомбинационные системы, участвующие в регуляции работы генов. Но это тема следующей статьи.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки: Пер. с англ. М.: Мир, 1994. Т. 1, ч. 2. С. 301–310.
2. Инге-Вецтов С. Г. Введение в молекулярную генетику. М.: Высш. шк., 1983. С. 120–136.
3. Льюин Б. Гены. Пер. с англ. М.: Мир, 1987. С. 443–453.

\* \* \*

Вадим Моисеевич Глазер, кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Автор более 100 публикаций в области генетики микроорганизмов и молекулярной генетики и двух учебно-методических пособий.

<sup>1</sup> См. статью: Абелев Г. И. Основы приобретенного иммунитета // Соросовский Образовательный журнал. 1996. № 5. С. 4–10.