

GENETIC  
RECOMBINATION  
WITHOUT HOMOLGY:  
PROCESSES CREATING  
GENOME  
REARRANGEMENTS

V. M. GLASER

*The article presents three types of genetic recombination are considered: site-specific recombination, illegitimate recombination and transposition. These types of recombination differ from each other by mechanisms of recombinational reactions and enzymes catalyzing these reactions. Their fundamental difference from homologous recombination is the absence of homology between recombining DNA molecules.*

*Рассмотрены три типа генетической рекомбинации: сайт-специфическая рекомбинация, транспозиция и незаконная рекомбинация. Каждый из перечисленных типов рекомбинации отличается от другого по механизмам рекомбинационных реакций и наборам катализирующих их ферментов. Их общее отличие от гомологичной рекомбинации проявляется при отсутствии гомологии между рекомбинирующими молекулами ДНК.*

© Глазер В.М., 1998

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ БЕЗ ГОМОЛОГИИ: ПРОЦЕССЫ, ВЕДУЩИЕ К ПЕРЕСТРОЙКАМ В ГЕНОМЕ

В. М. ГЛАЗЕР

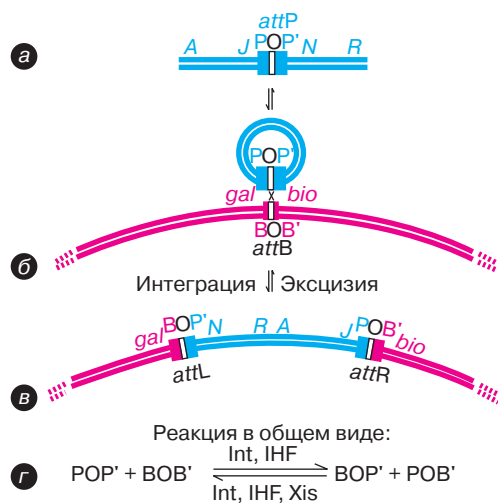
Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова

Предыдущая статья была посвящена механизмам генетической рекомбинации, совершающейся на основе гомологии между рекомбинирующими ДНК. Здесь будут рассмотрены процессы рекомбинации, либо использующие очень ограниченную гомологию между рекомбинирующими ДНК, либо вообще обходящиеся без нее. Они внесли существенный вклад в эволюцию генетического материала, но наиболее ярко их биологическое значение проявляется в онтогенетических перестройках геномов, играющих важную роль в жизнедеятельности вирусов, бактерий и эукариот. Эти рекомбинационные системы – сайт-специфическая рекомбинация, транспозиция и незаконная рекомбинация – в корне отличаются от гомологичной рекомбинации по механизмам и наборам контролирующих их генов.

### САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

Сайт-специфическая рекомбинация происходит между специфическими последовательностями ДНК в пределах очень коротких участков гомологии, обычно 15–30 п.н. Она широко распространена у прокариот и низших эукариот. Сайт-специфическая рекомбинация обеспечивает интеграцию (включение) ДНК умеренных фагов в хромосомы бактерий, инверсию (изменение ориентации) отдельных участков ДНК в хромосомах бактерий и бактериофагов и в так называемой 2-микронной плазмиде дрожжей, а также другие процессы, играющие важную роль в циклах развития фагов и бактерий. Редкий, если не единственный, но зато жизненно важный пример сайт-специфической рекомбинации у многоклеточных животных – перестройки в последовательностях ДНК, кодирующих иммуноглобулины, – белковые молекулы, распознающие тот или иной антиген при иммунном ответе у позвоночных.

Рассмотрим некоторые из самых известных примеров сайт-специфической рекомбинации. Наиболее изучена она у умеренного бактериофага лямбда. После инфекции в клетку *E. coli* линейная вирионная двуцепочечная ДНК фага (рис. 1, а) замыкается



**Рис. 1.** Схема сайт-специфической рекомбинации у фага лямбда. Линии соответствуют цепям ДНК, две параллельные линии – дуплексу. Синим цветом изображена ДНК фага, красным – часть кольцевой хромосомы *E. coli*. P, P' и B, B' – последовательности сайтов *attP* и *attB* соответственно, окружающие центральную часть (O). A, J, N и R – гены фага. Полустрелки, идущие вниз, указывают направление процесса интеграции фага; полустрелки, идущие вверх, – направление вырезания (эксцизии) профага. а – линейная (вирионная) ДНК фага; б – ДНК фага после инфекции в клетку *E. coli* замыкается в кольцо, и находящийся в ней сайт *attP* вступает в рекомбинацию с сайтом *attB* в хромосоме бактерии. Кроссинговер показан знаком X; в – продукт рекомбинации – профаг в составе хромосомы бактерии; г – запись процесса рекомбинации в общем виде. Остальные пояснения даны в тексте

в кольцо (рис. 1, б) за счет имеющихся на ее концах комплементарных одноцепочечных последовательностей. Последующее развитие фага может идти по пути интеграции в хромосому бактерии между генами *gal* и *bio* (рис. 1, в). Интеграция происходит путем рекомбинации между особыми *att* (attachment)-сайтами: *attP* в хромосоме фага и *attB* в хромосоме бактерии. Интегрированный фаг называется профагом. Он фланкирован рекомбинантными сайтами *attL* (левый) и *attR* (правый). Вырезание (эксцизия) профага из хромосомы происходит в обратной последовательности событий. Запись реакций в обобщенном виде представлена на рис. 1, г. Из нее видно, что в интегративной рекомбинации участвуют сайты *attP* и *attB*, продукт фагового гена *int* (интеграза) и белок IHF (Integration Host Factor) *E. coli*. Для эксцизии необходимы сайты *attL* и *attR*, те же белки и еще продукт фагового гена *xis*. Сайты *attP* и *attB* неравноценны. Первый устроен сложно. При размере около 270 п.н. он состоит из центральной части O и двух примыкающих к ней частей: P и P'. Внутри сайта *attP* располагаются участки связывания с интегразой и белками IHF и Xis. Сайт *attB* устроен проще. Его размер всего 23 п.н., гомология

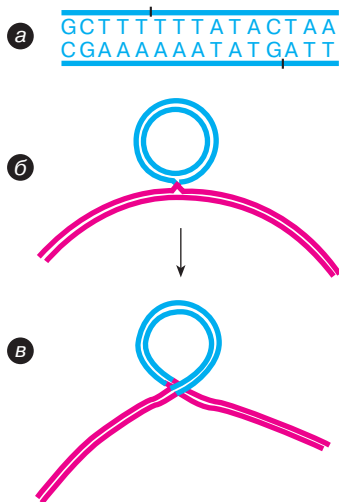
с *attP* ограничена центральной частью из 15 п.н., в которой имеются два сайта связывания с интегразой. Интеграза является топоизомеразой типа I<sup>1</sup>, но только сайт-специфической. В результате образования комплекса интегразы с *attP*-сайтом и белком IHF формируется сложно уложенная нуклеопротеидная структура, которая захватывает сайт *attB*. В этой структуре последовательности ДНК *att*-сайтов связываются за счет взаимодействий между субъединицами интегразы и затем подвергаются согласованному расщеплению.

Как и все топоизомеразы I, интеграза делает разрыв в одной цепи каждого дуплекса, и в месте разрыва образуются 3'-P и 5'-ОН-концы ДНК. Фермент ковалентно связывается с 3'-P-концом, благодаря чему энергия разорванной фосфодиэфирной связи сохраняется, и для последующего замыкания разрыва, осуществляемого тем же ферментом, не требуется дополнительной энергии. Этим топоизомеразы отличаются от ДНК-лигаз, использующих для сшивания концов цепей ДНК энергию, освобождающуюся за счет гидролиза соединений типа АТФ. Поэтому разрыв полинуклеотидной цепи, образуемый топоизомеразой, называют “временным” в отличие от фиксированных одноцепочечных разрывов, производимых эндонуклеазами. При этом интеграза может осуществлять рекомбинацию между *att*-сайтами путем замыкания фосфодиэфирной связи с 5'-ОН-концом из другого дуплекса, то есть путем обменов 5'-ОН-концами. Такая рекомбинация между дуплексами, не требующая дополнительной энергии, называется консервативной.

На рис. 2 изображены только основные детали сложного молекулярного процесса интегративной рекомбинации. В упрощенном виде его можно представить следующим образом: сначала интеграза производит обмен между двумя цепями одинаковой полярности. При этом разрыв и воссоединение цепей происходят между строго определенными нуклеотидами в центральной части *att*-сайтов (рис. 2, а). В результате возникает структура, физически соответствующая полухиазме Холлидея (рис. 2, б). Затем на расстоянии 7 п.н. происходит вторая пара обменов между двумя другими цепями, не участвовавшими в первом обмене. Вторая пара обменов приводит к интеграции фага (рис. 2, в); интегрированный профаг фланкирован рекомбинантными сайтами *attL* и *attR*, как это уже было показано на рис. 1, в. Предполагается, что для катализа этой реакции необходимы четыре субъединицы интегразы, связанные в *att*-сайтах.

Важно отметить, что все изученные ферменты, непосредственно осуществляющие сайт-специфическую рекомбинацию у фагов и бактерий, а также

<sup>1</sup> О топоизомеразах см. статью: Фаворова О.О. Сохранение ДНК в ряду поколений: репликация ДНК // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 4. С. 11–17.



**Рис. 2.** Схема двух основных этапов интегративной рекомбинации у фага лямбда: *а* – нуклеотидная последовательность *att*-сайтов в центральной части *O*. Вертикальные черточки указывают сайты разрывов, предшествующих обмену цепями между *attP* и *attB*; *б* – промежуточная структура, образовавшаяся после обмена между двумя цепями ДНК одинаковой полярности в *att*-сайтах. Физически она соответствует полухиазме Холлидея; *в* – продукт завершённой рекомбинации. Остальные пояснения даны в тексте

белок, катализирующий инверсию в 2-микронной плазмиде дрожжей, являются сайт-специфическими топоизомеразы I. По уровню гомологии их аминокислотных последовательностей и механизму катализируемых реакций их разделяют на две группы: представителями первой группы являются уже рассмотренная нами интегразы фага лямбда, интегразы других умеренных фагов и белок, катализирующий сайт-специфическую рекомбинацию в плазмиде дрожжей, ко второй относят инвертазы бактерий и фагов и некоторые другие ферменты сайт-специфической рекомбинации.

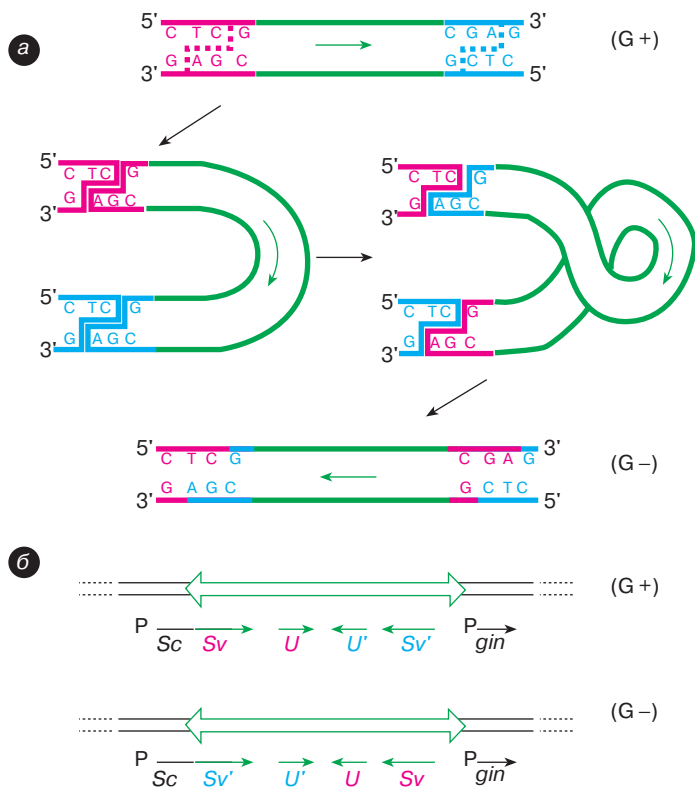
Сайт-специфическая рекомбинация, катализируемая ферментами второй группы, происходит по более простой схеме, чем в случае интеграз. Рассмотрим ее на примере инвертазы фага Mu. В центральной части своей хромосомы фаг содержит особый сегмент G размером около 3 т.п.н. Сегмент имеет на концах инвертированные (обращенные) повторы длиной около 30 п.н. В каждом повторе, в свою очередь, имеется специфический рекомбинационный сайт. Инвертаза проводит рекомбинацию между этими сайтами (рис. 3, *а*). Четыре субъединицы фермента, по одной субъединице на каждую цепь ДНК, делают “временные” разрывы в обеих цепях каждого рекомбинационного сайта, то есть одновременно расщепляют все четыре цепи, образуя 5'-Р и 3'-ОН-концы. При этом разрывы цепей в каждом дуплексе происходят на расстоянии 2 п.н., так что 3'-конец как бы выступает. Фермент ковалентно

связывается с 5'-Р-концами. Затем одна часть первого дуплекса меняется местами с такой же частью второго дуплекса, после чего восстанавливаются фосфодиэфирные связи во всех четырех цепях.

Приведенная реакция, как и большинство из процессов, осуществляемых инвертазами у бактерий кишечной группы и их фагов, входит в особую систему сайт-специфических инверсий ДНК, получающую название Din (от DNA inversions). Помимо фага Mu сайт-специфические инверсии обнаружены у умеренного фага P1 и энтеробактерий *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*. Инверсии специальных сегментов хромосом, ограниченных обращенными повторами ДНК длиной около 30 п.н., происходят с высокой частотой путем рекомбинации в этих повторах. Меняя ориентацию определенных генов относительно их промоторов, инверсии приводят к включению одних генов и выключению других. Это один из примеров регуляции работы генов путем специфических перестроек ДНК. Они имеют приспособительное значение. Например, у *S. typhimurium* инверсии сегмента H переключают гены *H1* и *H2*, кодирующие разные типы белка флагеллина, из которого построены жгутики, что позволяет этой патогенной для мышей бактерии менять поверхностный антиген и тем самым ускользать от действия иммунной системы хозяина. У фагов инверсии переключают гены, кодирующие разные белки хвостовых отростков, что приводит к смене хозяев – бактерий, в которых может размножаться фаг.

В качестве конкретного примера вернемся к системе инверсий G-сегмента у фага Mu (рис. 3, *б*). Сегмент содержит четыре гена: *U*, *U'*, *Sv* и *Sv'*. Два последних представлены в сегменте только своими варибельными частями, тогда как их общая константная часть *Sc* вместе с промотором P примыкает к сегменту слева. Справа от сегмента G расположен ген инвертазы *gin*. При одной ориентации сегмента (G+) транскрибируются гены *Sv* и *U*, при противоположной ориентации (G-) функционируют гены *Sv'* и *U'*. В первом случае фаг размножается на *E. coli* B, *E. coli* K12 и *S. typhimurium*, во втором – на *E. coli* C, *Citrobacter freundii*, *Shigella sonnei* и др. Следует особо отметить, что все работающие в системе Din инвертазы фагов и бактерий заменяют друг друга в рекомбинации *in vitro*. Это обусловлено их общим происхождением: инвертазы гомологичны между собой на 60–70% и их рекомбинационные сайты в обращенных повторах на концах инвертируемых сегментов также гомологичны.

Завершая описание сайт-специфической рекомбинации отметим ее принципиальные отличия от гомологичной рекомбинации. В случае последней молекулы ДНК узнают друг друга путем прямого сопоставления их последовательностей через посредство рекомбинации типа белка RecA. Для этого в ДНК вводятся специальные пресинаптические повреждения, высвобождающие одноцепочечные



**Рис. 3.** Схема сайт-специфической инверсии сегмента G в ДНК фага Ми: а – механизм реакции обмена цепями ДНК. Две линии изображают дуплекс ДНК. Инвертируемый сегмент показан зелеными линиями, два сайта в обращенных повторах на концах сегмента G, между которыми происходит обмен, выделены красным и синим цветом. Показана только часть нуклеотидной последовательности обращенных повторов, где происходит рекомбинация. Буквы А, G, С и Т обозначают реальные нуклеотиды в сайте обмена. Сайты разрывов обозначены ступенчатыми пунктирными линиями. Для наглядности “временные” разрывы цепей ДНК показаны сплошными ступенчатыми линиями. Четыре субъединицы инвертазы, осуществляющие рекомбинацию, на рисунке не показаны; б – переключение генов хвостового отростка фага Ми в зависимости от ориентации сегмента G. Сегмент G изображен зелеными линиями, треугольники представляют его концевые обращенные повторы. Стрелки под изображением ДНК указывают направления транскрипции генов, а Р – положение промоторов. Остальные пояснения даны в тексте

участки ДНК, что и лежит в основе узнавания гомологичных последовательностей. Напротив, при сайт-специфической рекомбинации главную роль в синапсисе играет взаимное узнавание белков, связанных с рекомбинационными сайтами. Эти сайты совсем короткие, и гомология между ними непосредственно для синапсиса несущественна. Она важна для связывания со специфическими белками и для обмена цепями между сайтами.

## ТРАНСПОЗИЦИИ

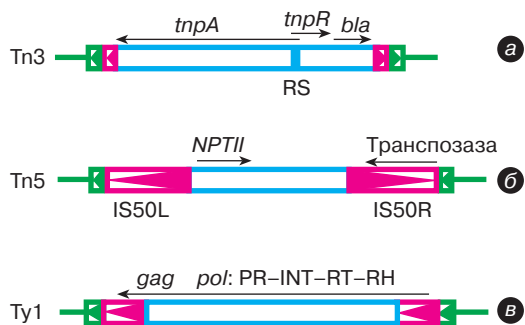
Рекомбинационные процессы еще одного типа – транспозиции лежат в основе перемещений подвижных генетических элементов. Подвижные элементы – это особые последовательности ДНК, способные, как это следует из их названия, к перемещениям из одного участка молекулы ДНК (хромосомы или плазмиды) в другой, или в другую молекулу в той же клетке, или даже в клетки другого организма. Они широко распространены как у прокариот, так и у эукариот и при этом отличаются высоким разнообразием. Подвижные элементы, как правило, не существуют автономно, и для них характерно нахождение в составе хромосом или плазмид. В большинстве своем подвижные элементы прокариот и эукариот построены по сходному плану и состоят из центральной части, фланкированной концевыми обращенными повторами (рис. 4).

Транспозиции осуществляются особыми белками, ген (или гены) которых в основном локализован

в самих подвижных элементах, в их центральной части. Главный белок транспозиции – транспозаза. Рекомбинация между подвижным элементом и той ДНК, в которую он будет встраиваться (ее называют ДНК-мишенью), происходит на уровне дуплексов, не имеющих, как и в случае сайт-специфической рекомбинации, пресинаптических фиксированных повреждений. Поскольку рекомбинация происходит точно по концам подвижного элемента, транспозиции можно рассматривать как сайт-специфический процесс, но только в отношении самого элемента, так как встраивание элементов в ДНК-мишень чаще всего происходит в случайные сайты. Важно отметить, что сколько-нибудь заметная гомология между подвижным элементом и ДНК-мишенью отсутствует.

Некоторые подвижные элементы бактерий содержат в центральной части также гены, не имеющие отношения к транспозиции, чаще всего это факторы устойчивости к антибиотикам, лекарственным веществам или ядам. Такие элементы при их открытии получили название транспозонов (Tn); к ним относятся представленные на рис. 4 Tn3 и Tn5. Позднее так стали называть все подвижные элементы. Подвижные элементы с короткими обращенными повторами (рис. 4, а) характерны для бактерий, растений и дрожифилы. Элементы с длинными обращенными повторами (рис. 4, б) описаны у бактерий. Эти длинные повторы, в свою очередь, представляют собой один из типов более просто





**Рис. 4.** Структурная организация некоторых подвижных элементов. Прямоугольники, ограниченные синими линиями, изображают центральные части элементов, красными – обращенные концевые повторы бактериальных подвижных элементов или длинные прямые концевые повторы ретротранспозона. Прямоугольники, ограниченные зелеными линиями, – прямые повторы ДНК-мишени, зеленые линии – часть ДНК-мишени, в которую встроен подвижный элемент. Направление красных и зеленых треугольников указывает ориентацию соответствующих повторов. Стрелки над подвижным элементом показывают направление транскрипции генов. Масштаб не соблюден. *а* – бактериальный транспозон Tn3. Размер около 5 т.п.н., обращенные концевые повторы по 38 п.н., прямые повторы ДНК-мишени по 5 п.н., *tnpA* – ген транспозазы, *tnpR* – ген резолвазы. Участки начала транскрипции этих генов перекрываются в рекомбинационном сайте RS (сайте разрешения коинтегратов для резолвазы), выделенном синим. *bla* – ген бета-лактамазы, определяющий устойчивость к антибиотикам пенициллинового ряда; *б* – бактериальный транспозон Tn5. Размер около 5,8 т.п.н., обращенные концевые повторы представлены подвижным элементом IS50 длиной 1531–1533 п.н. Левый повтор (IS50L) инактивирован в результате нонсенс-мутации, правый повтор (IS50R) кодирует транспозазу. *NPTII* – ген неомицинфосфотрансферазы II обеспечивает устойчивость к антибиотику канамицину. Прямые повторы ДНК-мишени по 9 п.н.; *в* – дрожжевой ретротранспозон Ty1. Размер около 5,9 т.п.н., прямые концевые повторы по 330 п.н., прямые повторы ДНК-мишени по 5 п.н. С центральной части элемента, включая значительную часть его концевых повторов, считается единый транскрипт. Ген *gag* кодирует структурный РНК-связывающий белок. Ген *pol* кодирует общий белок, который содержит в качестве доменов интегразу (INT), обратную транскриптазу (RT), РНКазу H (RH) и протеазу (PR). Последняя затем разрезает общий белок на отдельные ферменты. Остальные пояснения даны в тексте

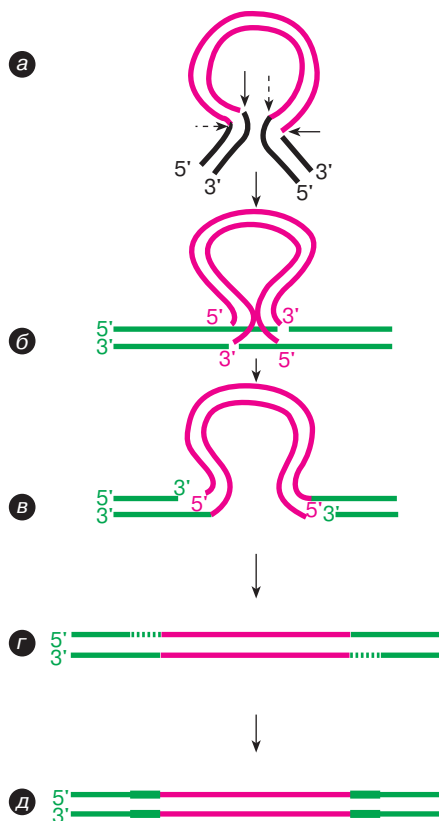
устроенных подвижных элементов, называемых IS (insertion sequences). В этих случаях центральная часть такого сложного транспозона содержит только посторонние гены, а гены транспозиции находятся в IS-элементах, причем один из них инактивирован одной или более мутациями. У эукариот (дрожжей, простейших, насекомых, позвоночных, высших растений) распространены подвижные элементы, получившие название ретротранспозонов (рис. 4, *в*). Структура ретротранспозонов соответствует ДНК-копиям геномов ретровирусов по-

звоночных, которые также являются подвижными элементами. В транспозициях ретротранспозонов задействованы ферментобратная транскриптаза и РНК-копия элемента в качестве интермедиата (см. ниже). Ретротранспозоны подразделяются на две группы. К первой относятся элементы с длинными прямыми повторами на концах. Вторую группу образуют элементы, не имеющие повторов на концах.

Обращенные концевые повторы абсолютно необходимы для транспозиции, поскольку именно их концы связываются транспозазой и по ним происходит рекомбинация. У умеренного фага Mu, обладающего всеми свойствами подвижного элемента, обращенные концевые повторы состоят всего из 2 п.н. У ретротранспозонов первой группы длинные прямые повторы также заканчиваются обращенными повторами из 2 п.н., но несколько дальше от концов элементов и у ретротранспозонов, и у фага Mu имеются дополнительные обращенные повторы.

Все мобильные элементы за некоторыми исключениями на обоих концах содержат еще и прямые повторы из нескольких нуклеотидов ДНК-мишени. Состав этих нуклеотидов варьирует, так как подвижные элементы внедряются в случайные сайты ДНК-мишени, но их число постоянно для каждого элемента. Чаще всего оно равно 5 или 9. Механизм образования прямых повторов будет разъяснен немного позже. Таковы общие представления о структуре подвижных элементов.

Структура подвижных элементов определяет механизмы их перемещений. Можно выделить три основных механизма рекомбинации при транспозициях: репликативная транспозиция, нерепликативная транспозиция и перемещение ретротранспозонов. Они будут рассмотрены чуть позже. А сначала отметим, что, хотя эти механизмы различаются в деталях, имеется общий принцип реакций транспозиции (рис. 5). Процесс происходит в несколько этапов. Сначала транспозаза (у ретротранспозонов ее называют интегразой) сводит вместе концы подвижного элемента и делает разрывы точно по этим концам, либо в обеих цепях, как в случае нерепликативной транспозиции, либо в одной из цепей, как при репликативной транспозиции и при интеграции ДНК ретротранспозонов (рис. 5, *а*). Затем транспозаза сводит в контакт концы элемента и дуплекс ДНК-мишени. При этом она делает в обеих цепях ДНК-мишени ступенчатые разрывы (рис. 5, *б*), отстоящие друг от друга на столько п.н., сколько их обнаруживается в прямом повторе ДНК-мишени у данного элемента. Следующий этап – обмен цепями, приводящий к рекомбинации между ДНК элемента и мишени. 3'-ОН-концы элемента соединяются с 5'-Р-концами мишени, оставляя за счет ступенчатости разрывов бреши между 5'-Р-концами элемента и 3'-ОН-концами мишени (рис. 5, *в*). Катализируемое транспозазой расщепление и замыкание концов цепей ДНК происходят без потери

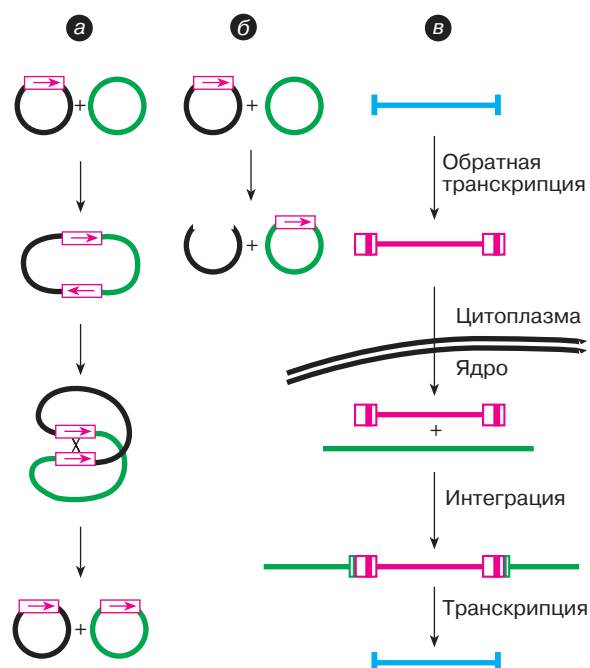


**Рис. 5.** Общая схема рекомбинационных реакций при транспозициях. Линии соответствуют цепям ДНК. Красные линии изображают подвижный элемент, черные линии – ДНК, окружающую подвижный элемент в сайте его первоначальной локализации, зеленые линии – ДНК-мишень. Сплошные стрелки на рис. 5, а указывают сайты обязательных разрывов цепей ДНК на концах подвижного элемента, пунктирные стрелки – сайты необязательных разрывов. Пунктир на рис. 5, г изображает репаративную репликацию в брешах ДНК-мишени, что приводит к образованию прямых повторов из нуклеотидов ДНК-мишени по бокам встроенного элемента. На рис. 5, д эти повторы выделены жирными линиями. Остальные пояснения даны в тексте

энергии фосфодиэфирной связи и не требуют АТФ, что напоминает консервативную сайт-специфическую рекомбинацию. Но сказанное не относится к брешам, которые на следующем этапе заполняются путем репаративной репликации ДНК по матрице ДНК-мишени (рис. 5, з). Репаративная репликация и легирование оставшегося после нее одноцепочечного разрыва требуют дополнительных затрат энергии. Обратим внимание на то, что заполнение брешей является причиной возникновения описанных выше прямых повторов ДНК-мишени на концах элемента (рис. 5, д). Таким образом, мы разобрали общую основу транспозиционной рекомбинации.

Теперь рассмотрим детали. Основные механизмы транспозиций изображены на рис. 6. Реплика-

тивная транспозиция (рис. 6, а) отличается тем, что подвижный элемент, перемещаясь в другую молекулу, оставляет свою копию в исходной ДНК. Это может произойти только за счет удвоения (репликации) элемента. При этом кольцевые ДНК донора и мишени сливаются, образуя коинтеграт, в котором последовательности обеих молекул разделены двумя копиями элемента, расположенными в одной ориентации. Вслед за этим происходит разрешение коинтеграта на исходные молекулы, каждая из которых содержит копию элемента. Последняя реакция осуществляется по механизму сайт-специфической рекомбинации ферментом резолвазой, которая



**Рис. 6.** Основные механизмы транспозиций. а – Схема репликативной транспозиции. Окружности изображают кольцевую двуцепочечную ДНК. Подвижный элемент представлен в виде красного прямоугольника, красная стрелка указывает ориентацию элемента. Черная окружность – ДНК с донорным элементом, зеленая окружность – ДНК-мишень. Знак X показывает сайт-специфический обмен между рекомбинационными сайтами подвижных элементов, осуществляемый резолвазой; б – схема нерепликативной транспозиции. Условные обозначения те же, что на а; в – упрощенная схема цикла транспозиции у ретротранспозонов. Синяя линия изображает РНК-копию ретротранспозона с короткими прямыми концевыми повторами, представленными в виде прямоугольников. Красная линия – двуцепочечная ДНК-копия ретротранспозона, но с длинными прямыми концевыми повторами (красные прямоугольники). Зеленая линия – ДНК-мишень (хромосома клетки хозяйского организма). Зеленые прямоугольники, примыкающие к ретротранспозону, – прямые повторы ДНК-мишени из 5 п.н. Масштаб не соблюден. Остальные пояснения даны в тексте

входит в ту же группу сайт-специфических топоизомераз, что и инвертазы. Но резолваза отличается тем, что использует имеющиеся внутри элементов рекомбинационные сайты, если они находятся в одинаковой ориентации. В предыдущей статье уже говорилось о том, что гомологичная рекомбинация между повторами ДНК, расположенными в одной ориентации, приводит к делеции материала, заключенного между повторами. Так и здесь сайт-специфическая рекомбинация между двумя прямыми повторами подвижного элемента приводит как бы к делеции из коинтеграта одной из плазмид, составляющих коинтеграт, вместе с одной копией подвижного элемента. Это и есть разрешение коинтеграта. Репликативная транспозиция – относительно редкий механизм. Он обнаружен у фага Mu и бактериальных транспозонов семейства Tn3 с короткими обращенными повторами.

Неконсервативная транспозиция (рис. 6, б) заключается в вырезании элемента и его перемещении в новое место. Этот механизм характерен для большинства подвижных элементов бактерий и эукариотических элементов с короткими обращенными повторами. Как уже указывалось, у ретро-транспозонов с длинными концевыми повторами транспозиция происходит по схеме, включающей РНК-интермедиат. В этом процессе участвуют специальные ферменты, кодируемые самими ретро-транспозонами (см. рис. 4, в). В их центральной части расположен ген *pol*, кодирующий несколько необходимых для транспозиции ферментов: интегразу, обратную транскриптазу и РНКазу H, которые первоначально образуются в виде общего белка, а потом нарезаются на отдельные белки под действием специальной протеазы, также кодируемой геном *pol*. Схема транспозиции дана на рис. 6, в. С геномной ДНК элемента транскрибируется РНК-копия, но уже с короткими концевыми прямыми повторами, с нее путем обратной транскрипции синтезируется ДНК-копия с длинными повторами, которая встраивается в новое место с помощью интегразы. Рекомбинация у ретроэлементов без концевых повторов менее изучена, но она также осуществляется через РНК-интермедиат.

## НЕЗАКОННАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

Незаконная рекомбинация – это сборная группа процессов, где рекомбинация происходит без гомологии между молекулами ДНК, и при этом без участия механизмов сайт-специфической рекомбинации или транспозиций. В качестве примеров можно привести захват ретровирусом некоторых клеточных генов при его эксцизии из хромосомы хозяйской клетки, а также интеграцию фрагментов ДНК, вводимых в клетки позвоночных с помощью микроинъекций. Механизмы незаконной рекомбинации малоизучены. Общим для них является соединение концов негомологичных молекул ДНК.

Впервые механизм одной из реакций незаконной рекомбинации был описан японским исследователем Х. Икедой с сотрудниками в 1982 году. В опыте *in vitro* эти авторы продемонстрировали рекомбинацию между полностью негомологичными ДНК плазмиды pBR322 и фага лямбда, катализируемую высокоочищенной топоизомеразой II (ДНК-гиразой) *E. coli*. Согласно модели, предложенной авторами, две молекулы гиразы, каждая из которых состоит из двух пар субъединиц, временно разрывают в обеих молекулах обе цепи ДНК, удерживая их концы. Затем они обмениваются парами субъединиц вместе с удерживаемыми концами разных ДНК-партнеров и сшивают концы дуплексов. Позднее Икеда показал такую рекомбинацию и *in vivo* в клетках *E. coli*. К настоящему времени накоплены данные об участии топоизомераз обоих типов в незаконной рекомбинации у бактерий и эукариот.

В последнее десятилетие у амфибий и млекопитающих обнаружены ферменты, связывающие двуцепочечные концы ДНК независимо от их гомологии. Природа этих белков до последнего времени оставалась неясной. Сенсационный прорыв в данной области возник в 1994–1995 годах в результате исследования мутантов грызунов, проявляющих повышенную по сравнению с нормальными особями чувствительность к ионизирующим излучениям. Известно, что ионизирующие излучения вызывают двуцепочечные разрывы ДНК, то есть разрывы хромосом, для залечивания которых в нормальной клетке существуют специальные системы репарации. У мутантов они нарушены. Кроме того, у мутантов оказалась подавленной и интеграция в хромосомы фрагментов ДНК, искусственно введенных в клетки. Это неудивительно, поскольку у млекопитающих в основе процессов как интеграции чужеродной ДНК, так и репарации двуцепочечных разрывов лежит соединение концов разорванных двуцепочечных ДНК, обходящееся без гомологии, то есть оба процесса осуществляются по механизму незаконной рекомбинации (в отличие от дрожжей и бактерий, у которых они основаны на гомологичной рекомбинации). Неожиданным оказался тот факт, что мутанты проявили неспособность к рекомбинационным перестройкам в кодирующих иммуноглобулины последовательностях ДНК, а это означает, что незаконная рекомбинация играет важную роль и в этих перестройках. Таким образом, было выяснено, что в рекомбинации иммуноглобулиновых последовательностей ДНК задействованы два разных механизма. Ранние этапы – образование сайт-специфических двуцепочечных разрывов происходят по типу сайт-специфической, а поздние – воссоединение концов разрывов – по механизму незаконной рекомбинации. Выявлен и фермент, ответственный за такую незаконную рекомбинацию: указанные выше радиочувствительные мутанты оказались дефектными по ДНК-зависимой протеинкиназе. Фермент активируется, связываясь со

свободными концами ДНК независимо от их происхождения, и соединяет эти концы.

Нетрудно заметить, что незаконная рекомбинация, подобно сайт-специфической рекомбинации и транспозициям, может приводить к хромосомным перестройкам. В живой клетке разрывы хромосом, являющиеся одним из источников незаконной рекомбинации, могут спонтанно возникать в ходе репликации, транскрипции и репарации ДНК. Однако нельзя исключить возможность того, что произвольное комбинирование разорванных концов эукариотической хромосомы может ограничиваться структурной организацией хроматина, фиксирующей эти концы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ: РЕКОМБИНАЦИОННЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ ГЕНОМОВ

Мы рассмотрели далеко не все примеры рекомбинационных систем, ведущих к перестройкам в генетическом материале. Их много, и их роль разнообразна. Как и в случае гомологичной рекомбинации, процессы, основанные на негомологичной рекомбинации, играют большую роль в эволюции, но их функции проявляются особенно значимо в онтогенезе как прокариотических, так и эукариотических организмов.

Сайт-специфическая рекомбинация играет ключевую роль в жизненных циклах умеренных бактериофагов. Умеренные фаги могут развиваться в клетках бактерий двумя способами: либо путем литического цикла, либо путем так называемой лизогенизации, то есть в качестве внутриклеточных паразитов, где репликация их генетического материала находится под контролем клетки. За это их и называют умеренными<sup>1</sup>. Многие умеренные фаги, такие, как лямбда, не могут существовать в лизогенизированной клетке в автономном виде. Их ДНК обязательно должна интегрировать в бактериальную хромосому и реплицироваться вместе с ней. А процесс интеграции невозможен без сайт-специфической рекомбинации, как, впрочем, и обратный процесс вырезания ДНК фага из хромосомы при индукции литического цикла, что тоже случается в жизни умеренного фага. У некоторых умеренных фагов и некоторых бактерий сайт-специфическая рекомбинация участвует в регуляции работы генов (сайт-специфические инверсии и т.д.).

Биологическая роль транспозиций и лежащих в их основе подвижных генетических элементов огромна. Подвижные элементы достигли большого разнообразия и распространились среди представителей всех систематических групп живого мира. У некоторых организмов они составляют существенную часть генетического материала: у дрозофилы и человека на их долю приходится, по оценкам раз-

<sup>1</sup> Подробнее об умеренных вирусах см. статью: *Агол В.И.* Разнообразие вирусов // Соросовский Образовательный журнал. 1997. № 4. С. 11–16.

ных исследователей, 5–10% геномной ДНК. Зачем нужно столько “лишней” ДНК, пока непонятно. В качестве частичного объяснения можно предполагать, что избыточная ДНК является материалом для эволюции. Полностью биологическая роль подвижных элементов будет выяснена нескоро.

Кратко перечислим несколько примеров генетических эффектов, вызываемых подвижными элементами. Так они могут встраиваться в кодирующие рамки генов. Нетрудно представить, что это приводит к полной инактивации генов и возникновению мутаций. Кроме того, подвижные элементы могут интегрировать в межгенные участки генома и изменять активность расположенных рядом генов, так как сами элементы содержат в своем составе сильные промоторы. Подвижные элементы склонны вызывать в районе их локализации хромосомные перестройки, преимущественно делеции. Следует особо отметить осуществляемый ими перенос генов устойчивости к антибиотикам, лекарственным препаратам и ядам от одной бактерии к другой. Такой перенос называют горизонтальным в отличие от вертикальной передачи генов в ряду поколений клеток при их размножении. Горизонтальный перенос генов создает серьезные проблемы для эпидемиологов.

Изучение биологического значения незаконной рекомбинации находится в начальной стадии. Укажем на ее участие в захвате ретровирусами онкогенов из хромосомы клетки организма хозяина, в восстановлении разорванных концов хромосом в клетках млекопитающих, в формировании генов иммуноглобулинов. В последнее время внимание исследователей все больше и больше привлекают так называемые запрограммированные рекомбинационные перестройки генетического материала, закономерно происходящие на определенных стадиях жизненного цикла многих организмов и, как правило, являющиеся одним из механизмов регуляции работы генов. Этой теме будет посвящена следующая статья.

## 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. 310–313, 318–324.
2. *Инге-Вечтомов С.Г.* Генетика с основами селекции. М.: Высш. шк., 1983. С. 336–346.
3. *Льюин Б.* Гены: Пер. с англ. М.: Мир, 1987. С. 453–476, 490–492.
4. *Хесин Р.В.* Непостоянство генома. М.: Мир, 1984. С. 9–52, 105–113, 228–236, 352, 376–378.

\* \* \*

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.