

Rekombinasi DNA

Penyusunan kembali informasi genetic dalam dan antara molekul DNA yang meliputi berbagai macam proses yang terletak secara kolektif dibawah rekombinasi genetic. Pengertian tentang bagaimana penyusunan kembali DNA terjadi menemukan penggunaan praktis seperti metode baru yang diteliti para ilmuan untuk mengubah genom berbagai macam organisme.

Peristiwa rekombinasi genetik terbagi menjadi tiga kelas umum. Rekombinasi genetic homologous melibatkan pertukaran genetic antara dua molekul DNA (atau segmen molekul yang sama) yang mendiami wilayah yang luas dengan susunan homologous. Susunan basa yang sebenarnya pada DNA tidak sesuai sepanjang susunan dua DNA yang sama. Daerah rekombinasi khusus berbeda dalam hal pertukaran yang hanya terjadi pada susunan DNA yang terdefinisi. Perubahan DNA adalah berbeda dalam hal perubahan ini melibatkan segment pendek DNA dengan kapasitas yang luar biasa untuk berpindah dari satu lokasi kromosom ke lokasi yang lain. “gen hopping” ini merupakan gen yang pertama kali diamati pada maizena oleh Barbara McClintock pada tahun 1950. Tambahan lagi tentang kelas terkarakterisasi ini, ada jarang yang lebar penyusunan kembali yang tidak biasa dimana tidak ada mekanisme dan tujuan yang diajukan. Kita hanya akan fokus pada satu dari tiga kelas yang disebut di atas.

Pebahasan lain dari mekanisme rekombinasi harus selalu menyertakan struktur DNA yang luar biasa. Pada rekombinasi genetic homologous, dua molekul DNA berinteraksi dan meluruskan susunannya yang sama pada beberapa tahapan reaksi. Proses pelurusan ini bisa melibatkan formasi DNA menengah barudima tiga atau bahkan empat strand dilepaskan. (lihat kembali struktur tiga strand H-DNA, lihat Gb. 12-22) Cabang struktur DNA juga ditemukan sebagai rekombinan menengah. Pertukaran informasi antara dua makromolekul helix besar sering melibatkan jalinan strand kompleks.

Fungsi dari sistem rekombinasi genetic bervariasi tergantung mekanisme. Pemeliharaan perbedaan genetic, sistem perbaikan DNA khusus, regulasi ekspresi gen tertentu, dan penyusunan kembali genetic yang deprogram selama perkembangan menunjukkan beberapa peranan yang disadari untuk peristiwa rekombinasi genetic. Untuk menjelaskan fungsinya, kita pertama harus menjelaskan reaksi rekombinasi.

Rekombinasi genetic Homologous memiliki Fungsi Ganda

Rekombinasi genetic homologous (juga disebut rekombinasi umum) dihubungkan secara kuat dengan divisi sel pada eukaryotik. Proses yang terjadi dalam frekuensi tinggi selama meiosis, proses yang mana sel germline dengan dua pasangan kromosom yang cocok (sel diploid) membagi untuk memproduksi satu set gamete—sel sperma atau ova pada eukaryotik yang lebih tinggi masing-masing gamete memiliki satu anggota untuk masing-masing pasangan kromosom (sel haploid). Proses meiosis digambarkan pada GB. 24-25. Pada bagan, meiosis dimulai dengan replikasi DNA pada sel germ sehingga masing-masing molekul DNA ada pada empat salinan. Sel kemudian berkembang sepanjang proses dua divisi sel meiotik yang mengurangi kandungan DNA pada level haploid pada masing-masing empat sel anang.

Setelah DNA direplikasi selama profase I (profase divisi meiotik pertama), hasil salinan DNA terasosiasi dengan sentromernya dan disebut sebagai kromatid saudar. Masing-masing set molekul DNA homologous disusun sebagai dua pasang kromatid. Informasi genetic ditukar antara kromatid genetic homologous

terdekat pada tahap meiosis dengan alat rekombinasi genetic homologous. Proses ini melibatkan kerusakan dan penggabungan kembali DNA. Pertukaran juga disebut pindah silang dan dapat diamati secara sitologi (Gb. 24-26). Pindah silang menghubungkan dua pasang kromatid saudara bersama-sama pada titik yang disebut chiasmata (tunggal, chiasma). Hal ini secara efektif menghubungkan keempat kromatid homologous bersama-sama, dan hubungan ini sangat esensial untuk segregasi kromosom yang tepat pada divisi sel meiotic berikutnya. Pendekatan awal, rekombinasi atau pindah silang dapat terjadi dengan kemungkinan yang sama pada hampir semua titik sepanjang kromosom homologous. Frekuensi rekombinasi pada daerah yang memisahkan dua titik pada kromosom sebanding dengan jarak antar titik. Fakta ini digunakan selama nenerapa decade untuk memetakan posisi relative dan jarak antara gen; rekombinasi homologous merupakan proses molekuler yang underpin banyak penerapan ilmiah genetic.

Pada bakteri yang tidak menjalani meiosis, rekombinasi genetic terjadi pada proses seperti konjugasi, perkawinan dimana kromosom DNA ditransfer antara antara dua sel bakteri yang berhubungan secara dekat, hal ini dapat terjadi dalam sel tunggal antara dua kromosom homologous, ada selama atau sesegera setelah replikasi.

Tipe rekomendasi ini menyediakan setidaknya-tidaknya tiga fungsi yang bisa diidentifikasi :(1) tipe rekombinasi ini berkontribusi terhadap perbedaan genetic pada populasi; (2) pada eukariot menyediakan penghubung sementara antara kromatid yang secara nyata mengoreksi urutan segregasi pada kromosom ke sel anang pada divisi sel meiotic pertama; dan (3) berkontribusi untuk memperbaiki beberapa tipe kerusakan DNA.

Fungsi pertama dan kedua sering menjadi bahan yang menarik bagi ilmuan untuk studi tentang sel, dan rekombinasi homologous sering dijelaskan sebagai sumber perbedaan genetic. Namun, fungsi perbaikan DNA merupakan peranan yang paling penting pada sel. Perbaikan DNA seperti yang dijelaskan disebut pada fakta bahwa luka DNA pada satu strand dapat diperbaiki secara akurat karena informasi genetic dijaga di dalam strand saling melengkapi yang tidak rusak. Pada tipe luka tertentu, seperti luka pada strand ganda, strand ganda tautan silang, luka yang ditinggalkan strand tunggal setelah replikasi (Gb. 24-27), strand komplementer rusak atau tidak ada. , ketika hal ini terjadi, informasi yang dibutuhkan untuk perbaikan DNA yang akurat harus berasal dari kromosom homologous yang terpisah dan perbaikan yang melibatkan kromosom homologous. Jenis luka ini umumnya berasal radiasi ionisasi dan reaksi oksidatif, dan perbaikannya mengoreksi produksi gameteukariot yang bisa hidup dan keberadaan bkateri setiap harinya. Perbaikan yang dimediasi oleh rekombinasi genetic homolog disebut perbaikan rekombinasi (recombinational repair), akan dijelskan detail kemudian pada bab ini.

Kontribusi penting untuk memahami rekombinasi homolog adalah model yang diajukan Robin Holliday pada tahun 1964, versi yang ditunjukkan pada Gb. 24-28. Ada empat cirri kunci dari model ini: (1) DNA homolog dibentangkan dengan mekanisme umum; (2) salah satu strand dari masing-masing DNA dirusak dan digabung dengan denga yang lain untuk membentuk struktur penyeberang (crossover) yang disebut Holliday intermediate; (3) daerah dimana strand molekul DNA yang berbeda diperbaiki disebut hetero duplex DNA, diperluas oleh cabang migrasi (Gb. 24-29); dan (4) dua strand Holliday intermediate dibelah dan yang rusak diperbaiki untuk membentuk produk rekombinan. Rekombinasi holog dapat bervariasi dalam berbagai detail dari satu species ke species yang lain, namun sebagian besar dari tahapannya umumnya terdiri dari beberapa bentuk. Holliday intermediate telah mengamati in vivo pada DNA bakteri dan bakteri

fage (Gb. 24-28b). perlu diperhatikan bahwa ada dua cara membelah atau “memecah” Holliday intermediate sehingga prosesnya conservative, yakni dua produk mengandung gen sama yang terhubung pada urutan linear yang sama seperti dalam substrat. Jika pembelahan dilakukan dengan satu cara, DNA yang mengapit daerah heteroduplex direkombinasi: jika pembelahan dilakukan dengan cara yang lain, DNA yang mengapit tidak direkombinasikan (Gb. 24-28a). hasil dari kedua cara tersebut diamati *in vivo* pada eukario dan prokariot.

Rekombinasi homolog seperti yang diilustrasikan pada gb 24-28 merupakan proses yang sangat rumit dengan konsekuensi molekuler halus. Untuk memahami bagaimana proses ini mempengaruhi perbedaan genetik, perlu diperhatikan homologous tidak berate identical (identik). Dua kromosom homolog yang direkombinasi bisa mengandung gen linear kesatuan yang sama, tetapi masing-masing kromosom bisa memiliki perbedaan susunan basa pada beberapa gen ini. Pada manusia, satu kromosom bisa mengandung gen normal untuk hemoglobin, sementara yang lain bisa mengandung gen hemoglobin dengan mutasi sickle sel. Perbedaan ini menunjukkan tidak ada yang tidak berubah pada sebuah atau dua pasangan basa diantara jutaan pasangan basa yang identik. Meskipun rekombinasi homolog tidak mengubah kesatuan linear gen, rekombinasi homolog dapat menentukan yang mana dari versi berbeda (atau allele) gen dihubungkan bersama dalam kromosom tunggal (Gb. 24-28).

Rekombinasi membutuhkan enzim spesifik

Enzim telah diisolasi pada prokariot dan eukariot yang menunjukkan satu atau lebih tahapan rekombinasi homolog. Proses identifikasi dan memahami enzim-enzim tersebut ditunjukkan oleh *E. coli*. Enzim rekombinasi penting dikode oleh gen *recA*, *B*, *C*, dan *D* dan oleh gen *ruvC*. Gen *rec B*, *C*, dan *D* mengkode enzim *RecBCD* yang dapat menginisiasi rekombinasi dengan melepaskan DNA dan kadang-kadang menyayat satu strand. Protei *RecA* mempromosikan semua tahapan sentral pada proses: pemasangan dua DNA, formasi Holliday intermediate, dan cabang imigrasi seperti yang dijelaskan berikut. Kelas baru nukleus yang menyayat secara spesifik Holliday intermediate juga diisolasi dari bakteri dan yeast. Nukleus tersebut sering disebut *resolvases*; *resolvase E. coli* merupakan protein *RuvC*.

Enzim *RecBCD* berikatan dengan DNA linear pada salah satu ujung dan menggunakan energi ATP untuk berpindah sepanjang helix, melepaskan DNA di depan dan melepaskannya kembali dibelakang (Gb. 24-30). Pelepasan kembali lebih lambat dari pelepasan sehingga gelembung strand tunggal segera terbentuk dan membesar. Strand tunggal dalam gelembung segera dipotong saat enzim bertemu susunan tertentu yang disebut *chi* ((5')GCTGGTGG(3')). Ada sekitar 1000 dari susunan tersebut pada genom *E. coli*, dan berpengaruh meningkatkan frekuensi rekombinasi pada daerah dimana rekombinasi itu terjadi. Susunan yang meningkatkan frekuensi rekombinasi diidentifikasi pada beberapa organisme.

Protein *RecA* tidak biasa terlibat dalam metabolisme DNA karena bentuk aktif enzim ini merupakan perintang, filament helix yang memasang secara kooperatif pada DNA dan mampu melibatkan monomer *RecA* (Gb. 24-31). Formasi filament ini secara normal terjadi pada DNA strand tunggal seperti yang diproduksi oleh enzim *RecBCD*. Filamen juga akan terbentuk pada DNA duplex dengan gap strand tunggal, dimana monomer *RecA* berikatan pertama kali dengan DNA strand tunggal dalam gap dan kemudian kumpulan filament menyelimuti dupleks tetangganya.

Paradigma *in vitro* yang berguna untuk aktivitas rekombinasi filament RecA adalah reaksi yang disebut pertukaran DNA strand (Gb. 24-32). DNA dalam filament dibentangkan dengan DNA duplex kedua, dan strand ditukar antar dua DNA untuk membentuk heteroduplex DNA. Pertukaran yang terjadi antara tingkatan 3 sampai 6 pasangan basa dan berkembang menjadi arah yang unik, 5'→3' yang berkaitan dengan DNA strand tunggal didalam filament. Seperti yang ditunjukkan Gb. 24-32, reaksi ini dapat melibatkan tiga sampai empat strand, dan pada kasus berikutnya struktur Holliday merupakan intermediate dalam proses.

Susunan yang lengkap dari setiap peristiwa seperti ditunjukkan oleh Gb. 24-33 memperkenalkan dua ciri tambahan dari protein RecA-memediasi tiga reaksi pertukaran strand. Pertama, jajan dua DNA bisa melibatkan dua formasi dari struktur DNA yang tidak biasa, dimana tiga strand dilepaskan. Detail struktur masih belum diketahui. Kedua, harena DNA merupakan struktur helix, pertukaran strand membutuhkan perintah rotasi untuk dua DNA yang berjajaran. Hal ini menimbulkan aksi gelondong (spooling) yang memindahkan titik cabang sepanjang helix. ATP dihidrolisis dengan protein RecA seperti reaksi ini berlangsung.

Ketika intermediate Holliday terbentuk, enzim yang terlibat dalam melengkapi rekombinasi termasuk topoisomerase, resolvase, dan nuclease yang lain, DNA polymerase I atau III, dan DNA ligase. Protein RuvC (Mr20.000) pada *E. coli* menyayat intermediate Holliday dengan perlakuan seperti pada Gb. 24-28a. banyak detail dari reaksi ini yang dilaksanakan oleh enzim rekombinasi dan koordinasi dari enzim ini belum banyak diketahui.

Rekombinasi Homolog merupakan jalur penting untuk perbaikan DNA

Rekombinasi menyediakan jalan untuk perbaikan DNA yang akurat ketika informasi susunan yang diperlukan tidak tersediadari strand yang berpasangan dengan strand yang rusak (lihat Gb. 24-27). Untuk mengilustrasikan peranan rekombinasi pada perbaikan DNA, kami akan memeriksa luka yang ditemukan selama replikasi normal dan tertinggal setelah tidak tereplikasi pada DNA strand tunggal (lihat Gb. 24-24, 24-27). Perbaikan luka disebut perbaikan postreplication, dan pada *E.coli*, proses ini membutuhkan protein RecA.

Jalur yang masuk akal untuk perbaikan postreplication ditunjukkan oleh Gb. 24-34. Luka pada strand DNA yang tidak berpasangan tidak dapat dihilangkan, karena hal ini akan meinggalakan patahan pada kedua strand DNA. , hasil yang mungkin letal bagi sel. Untuk menghindari kerusakan kromosom dan memungkinkan perbaikan, , daerah yang mengandung luka harus mendapatkan strand komplementer. Jalur rekombinasi membuat penggunaan DNA homolog pada cabang lain dari cabang replikasi. Protein RecA- memediasi reaksi pertukaran strand yang menjalankan perbaikan DNA dengan bantuan energy ATP hidrolisis. Ketika luka dibuat menjadi bagian duplex kerusakan dapat berangsur-angsur diperbaiki. Perbaikan luka pada tipe ini terlihat sebagai fungsi utama sistem rekombinasi homolog pada setiap sel.

Rekombinasi daerah spesifik menghasilkan penyusunan DNA kembali yang tepat

Kita sekarang beralih pada rekombinasi secara umum, yang dapat melibatkan dua susunan homolog, rekombinasi pada tipe berbeda yang terbatas untuk susunan khusus. Reaksi rekombinasi daerah spesifik terjadi hampir pada setiap sel, namun fungsinya dispesialisasi dan beragan dari satu spesies ke spesies lainnya. Fungsi ini termasuk fungsi regulasi ekspresi gen tertentu, promosi penyusunan kembali gen yang diprogram berikatan pada lingkaran replikasi beberapa viral dan DNA plasmid, seperti yang akan diilustrasikan kemudian. Sistem rekombinasi daerah spesifik terdiri atas enzim yang disebut rekombinase dan sebuah pendekan (20-200 pasangan basa, tergantung sistem) susunan DNA unik dimana rekombinase berperan (daerah rekombinasi). Beberapa sistem juga termasuk protein tambahan yang mengulangi pemilihan waktu atau hasil reaksi.

Dari studi *in vitro* pada lebih dari lusinan sistem rekombinasi daerah spesifik, beberapa prinsip muncul. Jalur reaksi pokok untuk banyak sistem ditunjukkan oleh Gb. 24-35. Rekombinase menyadari dan berikatan dengan masing-masing dari dua daerah rekombinasi pada molekul DNA yang berbedadalam DNA yang sama. Satu dari masing-masing strand DNA disayat pada titik khusus didalam daerah, dan rekombinase terhubung secara kovalen pada DNA pada daerah sayatan melalui ikatan pospodiester (kadang posposerin). Protein sementara-sambungan DNA menjaga ikatan pospodiester yang dihilangkan pada DNA yang luka, dan kofaktor energy tinggi seperti ATP tidak diperlukan pada tahapan berikutnya. Strand DNA yang terluka digabungkan kembali pada pasangan baru, dengan ikatan pospodiester baru yang dibentuk dari protein-sambungan DNA. Hasil dari proses kerusakan awal dan penggabungan ini adalah intermediate Holliday. Untuk melengkap reaksi, proses harus diulangi pada titik kedua dalam masing-masing dua daerah rekombinasi. Pada beberapa sistem, kedua strand dari masing-masing daerah rekombinasi bisa dipotong secara bersamaan dan digabungkan lagi pada pasangan baru tanpa Holliday intermediate. Pertukaran pada masing-masing kasus merupakan pertukaran timbale balik dan nyata sehingga daerah rekombinasi diregenerasi setelah reaksi. Kesimpulannya, rekombinase dapat dilihat sebagai daerah khusus endonuklease dan ligase pada satu paket.

Susunan daerah rekombinasi yang disadari oleh rekombinase asimetris secara parsial (nonpalindromic), dan dua daerah yang direkomendasikan dibentangkan pada orientasi yang sama untuk reaksi oleh rekombinase. Reaksi tersebut bisa memiliki beberapa hasil, tergantung pada lokasi terdekat dan orientasi daerah rekombinasi (Gb. 24-36). Jika kedua tempat pada molekul DNA yang sama, reaksi akan menghasilkan inverse dan delesi DNA diantara tempat tersebut, tergantung pada apakah tempat tersebut memiliki arah yang berlawanan atau sama, secara berurutan. Jika tempat berada pada DNA yang berbeda rekombinasi disebut sebagai intermolecular, dan reaksi insersi terjadi jika salah satu atau kedua DNA tersebut sirkuler. Beberapa sistem sangat khusus untuk satu reaksi (misalnya inversi). Dan tidak akan bertindak pada tempat yang salah orientasi.

Sistem rekombinasi tempat khusus pertama kali diidentifikasi dan diteliti *in vitro* dikode oleh bakteri fage λ . Ketika DNA fage λ memasuki sel *E. coli* kompleks dari seri peristiwa regulator terjadi bahwa memperlakukan DNA sebagai salah satu dari dua takdir; apakah DNA ini direplikasi dan digunakan untuk memproduksi bakteri fage lebih banyak (di satu sisi inang sel dihancurkan), atau DNA diintegrasikan kedalam inang kromosom dimana DNA bisa direplikasi secara pasif sepanjang kromosom inang untuk generasi banyak sel. Integrasi diselesaikan oleh rekombinase fage yang dikode yang disebut integrasi λ ,

berperan pada tempat rekombinasi (tempat penempelan sistem λ bakteri fage) pada fage DNA bakteri yang disebut attP dan attB, secara berturut-turut (Gb 24-37). Beberapa protein tambahan juga digunakan pada reaksi ini, beberapa dikode oleh bakteri fage dan sisanya dikode oleh sel inang bakteri. Perlu diperhatikan reaksi rekombinasi tempat khusus (Gb. 24-35) simetris secara kimia dalam hal ikatan kimia yang terjadi sebelum dan sesudah, dan reaksi ini harus memiliki konstan keseimbangan 1.0. Fungsi utama dari protein pelengkap pada integrasi λ adalah untuk mengubah keseimbangannya dengan membiarkan integrasi dan/atau mencegah reaksi berkebalikan (penghilangan). Mekanisme dimana reaksi ini diselesaikan belum diketahui secara detail. Saat DNA bakteri fage harus secepatnya dikeluarkan secepatnya dari kromosom (yang terjadi ketika sel diperlakukan pada stress lingkungan yang beragam), reaksi pengeluaran tempat khusus menggunakan protein pelengkap yang berbeda (Gb. 24-37)

Penggunaan rekombinasi tempat khusus untuk meregulasi ekspresi sel akan dibahas kemudian pada bab 27.

Gen Immunoglobulin dirakit dengan rekombinasi.

Contoh yang penting dari peristiwa rekombinasi terprogram yang terjadi selama perkembangan adalah generasi gen Immunoglobulin dari segmen gen yang dipisahkan pada genom. Immunoglobulin (atau antibody), diproduksi oleh B lymphocytes, merupakan prajurit dalam sistem imun vertebrata-molekul yang berkaitan dengan agen menular dan semua substansi asing bagi organisme. Mamalia seperti manusia mampu memproduksi jutaan antibody dengan perbedaan ikatan khusus. Namun, genom manusia mengandung hanya 100.000 gen. rekombinasi membiarkan organisme untuk memproduksi perbedaan yang luar biasa dari sejumlah kecil kapasitas DNA-coding.

Vertebrata umumnya memproduksi kelas ganda immunoglobulin. Untuk mengilustrasikan bagaimana keanekaragaman antibody digenerasi, kami akan fokus pada kelas immunoglobulin (IgG) pada manusia. Immunoglobulin terdiri atas dua cincin polipeptida berat dan dua cincin polipeptida ringan (Gb. 24-38a). masing-masing cincin memiliki daerah tidak tetap dengan susunan yang sangat berbeda dari satu immunoglobulin dengan immunoglobulin yang lainnya. Ada dua family berbeda dari cincin polipeptida ringan, yaitu kappa dan lambda, yang berbeda pada susunan daerah konstannya. Masing-masing dari tiga tipe cincin polipeptida tersebut (cincin berat, cincin ringan kappa, dan lambda), perbedaan dari daerah variabelnya digenerasi dengan mekanisme yang sama. Gen untuk polipeptida ini dibagi menjadi segmen dan tandan yang mengandung versi ganda dari masing-masing segmen yang ada pada genom. Satu versi dari masing-masing segmen digabungkan untuk membentuk gen lengkap.

Organisasi DNA yang mengkode cincin ringan kappa IgG manusia dan proses yang mana cincin ringan kappa dewasa digenerasi ditunjukkan oleh GB 24-38b. sel yang tidak terdiferensiasi, informasi yang dikode untuk cincin polipeptida ini dipisahkan menjadi tiga segmen. Segmen V (variable) mengkode residu 95 pasangan basa wilayah variable, segmen J (joining) mengkode residu 12 asam amino wilayah variable berikutnya, dan segmen C mengkode wilayah konstan. Ada sekitar 300 segmen V berbeda, 4 segmen J berbeda, dan 1 segmen C. seperti pada sel batang (stem) tulang sumsum membedakan untuk membentuk B limposit dewasa, satu V dan satu J dibawa secara bersama-sama oleh rekombinasi tempat khusus. Ini merupakan delesi DNA yang deprogram secara efektif, dan DNA yang terlibat dibuang. Ada $300 \times 4 = 1200$ kemungkinan kombinasi. Proses rekombinasi tidaklah senyata rekombinasi tempat khusus seperti yang

dijelaskan sebelumnya, dan beberapa variasi kombinasi terjadi pada susunan persimpangan V-J yang menambahkan faktor sekurangnya 2.5 pada total variasi yang mungkin, sehingga sekitar $2.5 \times 1200 = 3000$ kombinasi V-J yang berbeda dapat digenerasi. Penggabungan akhir kombinasi V-J ke wilayah C diselesaikan dengan reaksi penyambungan RNA setelah transkripsi (Gb. 24-38b). Penyambungan RNA akan dijelaskan pada bab berikutnya. Gen untuk cincin berat dan lambda cincin ringan dibentuk secara sama. Pada cincin berat, ada lebih banyak segmen gen dan lebih dari 5000 kemungkinan kombinasi. Karena semua cincin berat dapat berkombinasi dengan semua cincin ringan untuk menggenerasi immunoglobulin, ada sekurangnya 3000×5000 atau 1.5×10^7 kemungkinan IgG. Keberagaman lainnya digenerasi karena susunan V diperlakukan pada mutasi tinggi (mekanisme yang tidak diketahui) selama diferensiasi B-limfosit. Masing-masing B-limfosit dewasa memproduksi hanya satu antibody, tetapi cakupan antibody yang diproduksi oleh sel yang berbeda sangat banyak. Enzim yang mengkatalisasi penyusunan kembali gen ini belum diisolasi, tetapi susunan yang mengkoreksi proses penggabungan V-J yang sepertinya disadari oleh enzim yang telah teridentifikasi ini.

Proses rekombinasi ini membantu untuk mengilustrasikan prinsip bahwa rekombinasi tidak menghancurkan material genetik yang dipelihara oleh proses replikasi dan perbaikan. Di sini kita bisa lihat proses penyusunan yang nyata yang terjadi hanya pada sel-sel khusus (germ-line DNA tidak terpengaruh) dan memungkinkan organisme lebih efisien menggunakan sumber informasi genetik.

Genetic element yang dapat dipindahkan berpindah dari satu lokasi ke lokasi yang lain

Akhirnya, kita beralih pada pembahasannya mengenai elemen yang dapat berpindah atau transposon. Transposon merupakan DNA segmen, yang ditemukan hampir pada semua sel, yang berpindah atau "loncat" dari satu tempat di kromosom (tempat donor) ke tempat yang lain pada kromosom yang sama atau berbeda (tempat target). Tidak ada homology yang dibutuhkan untuk perpindahan, transposisi. Lokasi yang dipilih ditentukan secara acak. Karena insersi transposon merupakan gen esensial yang mungkin membunuh sel, peristiwa yang diregulasi secara ketat dan jarang terjadi (mungkin pada jutaan divisi sel).

Ada dua kelas transposon pada bakteri. Susunan insersi (transposon sederhana) mengandung hanya susunan yang dibutuhkan untuk transposisi dan gen untuk protein (transposase) yang mempromosikan proses tersebut. Transposon kompleks mengandung satu atau lebih gen disamping gen yang dibutuhkan untuk transposisi. Gen tambahan ini sering memberikan ketahanan untuk antibiotik. Penyebaran elemen ketahanan antibiotik melalui penyakit- penyebab populasi bakteri, dimediasi sebagian dengan transposisi, memberikan beberapa antibiotik yang tidak berguna (p.796).

Transposon bakteri bervariasi dalam hal struktur, tetapi sebagian besar memiliki pengulangan pendek pada dua ujung elemen yang bertindak sebagai tempat berikatan untuk transposase. Ketika transposisi terjadi, susunan pendek tempat target (5-10 pasangan basa) diduplikasi untuk membentuk tambahan pengulangan pendek yang mengikat masing-masing ujung transposon yang diinsersi (Gb. 24-39), pengulangan ujung pendek menunjukkan mekanisme pemotongan yang digunakan untuk memasukkan transposon ke dalam DNA di tempat yang baru.

Ada dua jalur umum transposisi pada bakteri (Gb. 24-40). Pada transposon sederhana atau langsung, pemotongan dilakukan pada masing-masing sisi transposon untuk menghilangkan transposon, dan

transposon berpindah ke lokasi baru, meninggalkan strand ganda yang rusak pada DNA dimana transposon berasal. Di tempat target, jalan pemotongan dibuat, transposon disambung kedalam DNA yang rusak, dan beberapa DNA replikasi dibutuhkan untuk menduplikasi susunan tempat target (Gb. 24-40a). pada ytransposisi replikatif, keseluruhan transposon direplikasi sehingga salinan ditinggalkan di lokasi donor (Gb. 24-40b). Sebuah intermediate pada reaksi berikutnya merupakan cointegrate, dimana wilayah donor dihubungkan secara kovalen dengan DNA pada tempat target. Untuk melengkapi salinan transposon yang ada pada intermediate, disusun dengan orientasi yang sama pada DNA. Intermediate ini dikonversi pada produk transposon yang diketahui karakteristiknya dengan baik dengan rekombinasi tempat khusus dimana rekombinase khusus mempromosikan reaksi delesi yang diperlukan.

Transposon juga ditemukan pada eukariot. transposon ini secara struktur sama dengan transposon bakteri, dan memakai mekanisme transposisi yang sama. Namun, pada beberapa kasus, mekanisme transposisi cukup berbeda dan cenderung melibatkan intermediate RNA. Transposon ini akan dijelaskan pada bab berikutnya, dimana kita melewati DNA metabolisme dan beralih pada pembahasan tentang RNA.

Ringkasan

Integritas struktur dan susunan nukleotida DNA sangat penting bagi sel. Hal ini ditunjukkan dengan kompleksitas dan kelebihan sistem enzim yang berperan pada replikasi, perbaikan, dan rekombinasi DNA.

Replikasi DNA berlangsung dengan keakuratan tinggi dan dalam pemilihan waktu yang tepat pada biakan sel. Replikasi adalah semikonservatif, dengan masing-masing strand berperan sebagai template untuk strand yang baru. Reaksi dimulai pada susunan pada DNA yang disebut origin, dan selalu dilakukan dengan dua arah dari titik origin. DNA disintesis dengan arah $5' \rightarrow 3'$ dengan DNA polymerase. Pada cabang replikasi, strand leading disintesis secara berkelanjutan dengan arah yang sama dengan perpindahan cabang. strand lagging disintesis tidak secara berkelanjutan. Keakuratan replikasi DNA dipelihara oleh (1) pemilihan basa oleh polymerase, (2) aktivitas eksonuklease proofreading $3' \rightarrow 5'$ yang merupakan bagian dari sebagian besar DNA polymerase, (3) sistem perbaikan khusus yang memperbaiki kesalahan pemasangan yang tertinggal setelah replikasi.

Sebagian besar sel memiliki beberapa DNA polymerase. Pada E. coli, DNA polymerase III merupakan enzim replikasi utama. DNA polymerase I bertanggung jawab atas fungsi khusus selama replikasi, rekombinasi, dan perbaikan. DNA polymerase II memiliki aktivitas replikasi khusus yang membiarkan enzim ini untuk mereplikasi luka DNA pada perbaikan DNA yang tidak bisa (error-prone). Replikasi kromosom E. coli melibatkan banyak enzim dan protein faktor yang diorganisasikan menjadi kompleks. Inisiasi replikasi memerlukan pengikatan protein DnaA ke origin, pemisahan strand, dan protein DnaB, DnaC untuk membuat dua cabang replikasi. Aksi DnaA diasosiasikan dengan membran E. coli dan diregulasi dengan aksi acidic phospholipid. Inisiasi merupakan fase satu-satunya yang diregulasi pada proses replikasi. Proses elongasi memiliki keperluan berbeda pada masing-masing strand. Strand DNA dipisahkan dengan helicase, dan hasil dari strand topologi dibebaskan dengan topoisomerase. DNA strand tunggal yang berikatan dengan protein mentabilkan strand yang dipisahkan. Pada sintesis lagging strand, kompleks protein primosom berpindah searah cabang dan meregulasi sintesis primer RNA dengan primase. Sintesis dari leading dan lagging strand

dengan DNA polymerase III dapat dilakukan secara bersama-sama. Primer RNA dihilangkan dan digantikan dengan DNA dengan DNA polymerase I, dan torehan ditutup dengan DNA ligase.

Pola replikasi yang sama terjadi pada eukaryotic sel, namun kromosom eukaryotic memiliki origin replikasi ganda. Beberapa DNA polymerase eukaryotic telah diidentifikasi.

Setiap sel juga memiliki sistem ganda dan kadang-kadang berlebih untuk perbaikan DNANYA. Perbaikan kesalahan pada *E. coli* dilaksanakan oleh undermethylation sementara susunan (5') GATC pada strand terbaru yang disintesis setelah replikasi. Sistem lain yang menyadari dan memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh lingkungan agen seperti radiasi dan alkylating agen, dan kerusakan yang disebabkan oleh reaksi spontan nukleotida. Beberapa sistem perbaikan menyadari dan menghilangkan basa yang rusak dan basa yang salah (contoh: urasil), meninggalkan tempat AP (apuric atau apyrimidinic) pada DNA. Kerusakan tersebut diperbaiki dengan menghilangkan dan mengganti segmen DNA yang mengandung daerah AP

Bacaan lebih lanjut

Umum

Kornberg, A. & Baker, T.A. (1991) *DNA Replication*, 2nd edn, W.H. Freeman and Company, New York.
ATI excellent primary source.

Kucherlapati, R. & Smith, G.R. (eds) (1988) *Genetic Recombination*, American Society of Microbiology, Washington, DC.

Excellent reviews on a wide assortment of recombination topics.

Richardson, C.C. & Lehman, I.R. (eds) (1990) *Molecular Mechanisms in DNA Replication and Recombination*, Alan R. Liss, Inc., New York. *A collection of a papers from a major symposium on the topic.*

Replikasi

Bramhill, D. & Kornberg, A. (1988) A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* **54**, 916-918.

Burgers, P.M.J. (1989) Eukaryotic DNA polymerases α and δ : conserved properties and interactions, from yeast to mammalian cells. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **37**, 235-280.

Campbell, J. (1988) Eukaryotic DNA replication: yeast bares its ARSs. *Trends Biochem. Sci.* **13**, 212-217.

Echols, H. & Goodman, M.F. (1991) Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 477-511.

Marians, K.J. (1992) Prokaryotic DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 673-719.

McHenry, C.S. (1991) DNA polymerase III holoenzyme. *J. Biol. Chem.* **266**, 19127-19130.

Radman, M. & Wagner, R. (1988) The high fidelity of DNA duplication. *Sci. Am.* **259** (August), 40-46.

Wang, T.S.-F. (1991) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 513-552.

Perbaikan

Friedberg, E.C. (1985) *DNA Repair*, W.H. Freeman and Company, New York.

Modrich, P. (1991) Mechanisms **and biological** effects of mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 229-253.

Sancar, A. & Sancar, G.B. (1988) DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 29-67.

Rekombinasi

Berg, D.E. & Howe, M.M. (eds) (1989) *Mobil*

DNA, American Society for Microbiology, Washington. DC.-

Review, covering many topics related to transposition.

Cox, M.M. & Lehman, I.R. (1987) Enzymes of genetic recombination-. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 229-262.

Craig, N.L. (1988) The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu. Rev. Genet.* **22**
77-105.

Landy, A. (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 913-949. ;

A thorough description of the protein-DNA complexes involved in this reaction. :

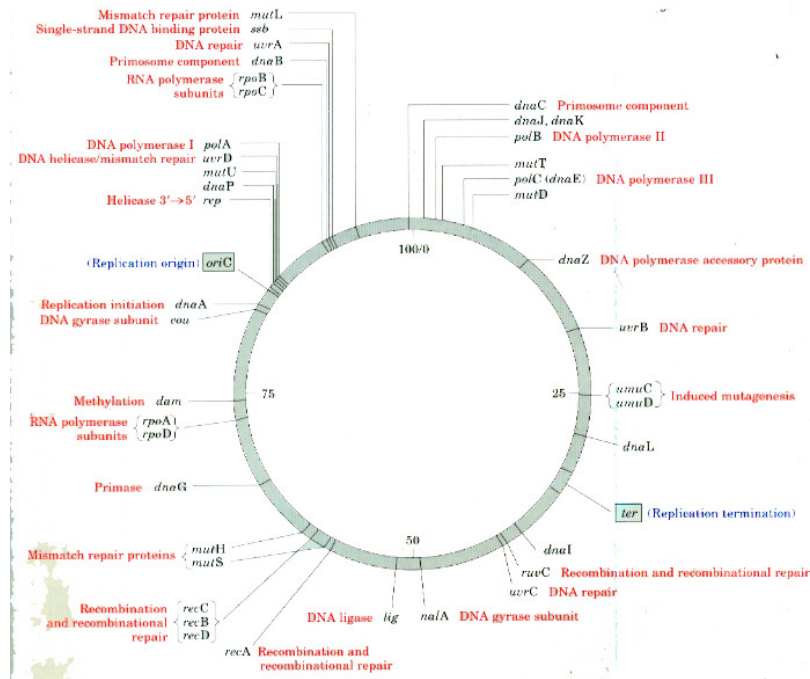
Mizuuchi, K. (1992) Transpositional recombination: insights from Mu and other elements. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 1011-1051.

Radding, C.M. (1991) Helical interactions in homologous pairing and strand exchange driven by RecA protein. *J. Biol. Chem.* **266**, 5355-5358. A good, short summary.

Roca, A.I. & Cox, M.M. (1990) The RecA protein structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**,
415-456.

Taylor, A.F. (1992) Movement and resolution of:

Holliday junctions by enzymes from *E. coli*. *Cell* **69**, 1063-1065.



Gb. 24-1. Pemetaan kromosom *E. coli*, menunjukkan posisi relative gen yang mengkode beberapa protein penting pada metabolisme DNA. Jumlah gen yang diketahui terlibat memberikan gambaran tentang rumitnya proses-proses tersebut. Angka 0 sampai 100 menunjukkan ukuran genetic yang disebut minute, dimana masing-masing minute cocok dengan 40.000 pasangan basa. Akronim yang terdiri dari tiga huruf umumnya menunjukkan beberapa aspek fungsi gen. Akronim tersebut adalah mut, mutagenesis; dna, dna replikasi; pol, DNA polymerase; rpo, RNA polymerase; uvr, UV- resisten; rec, rekombinasi; dam, DNA adenine methylation; lig, DNA ligase; cou, coumermycin resistance; nal, asam nalidixic resistance (coumermycin dan asam nalidixic menghalangi replikasi DNA dengan ikatan pada subunit DNA gyrase yang dikode oleh gen tersebut)

