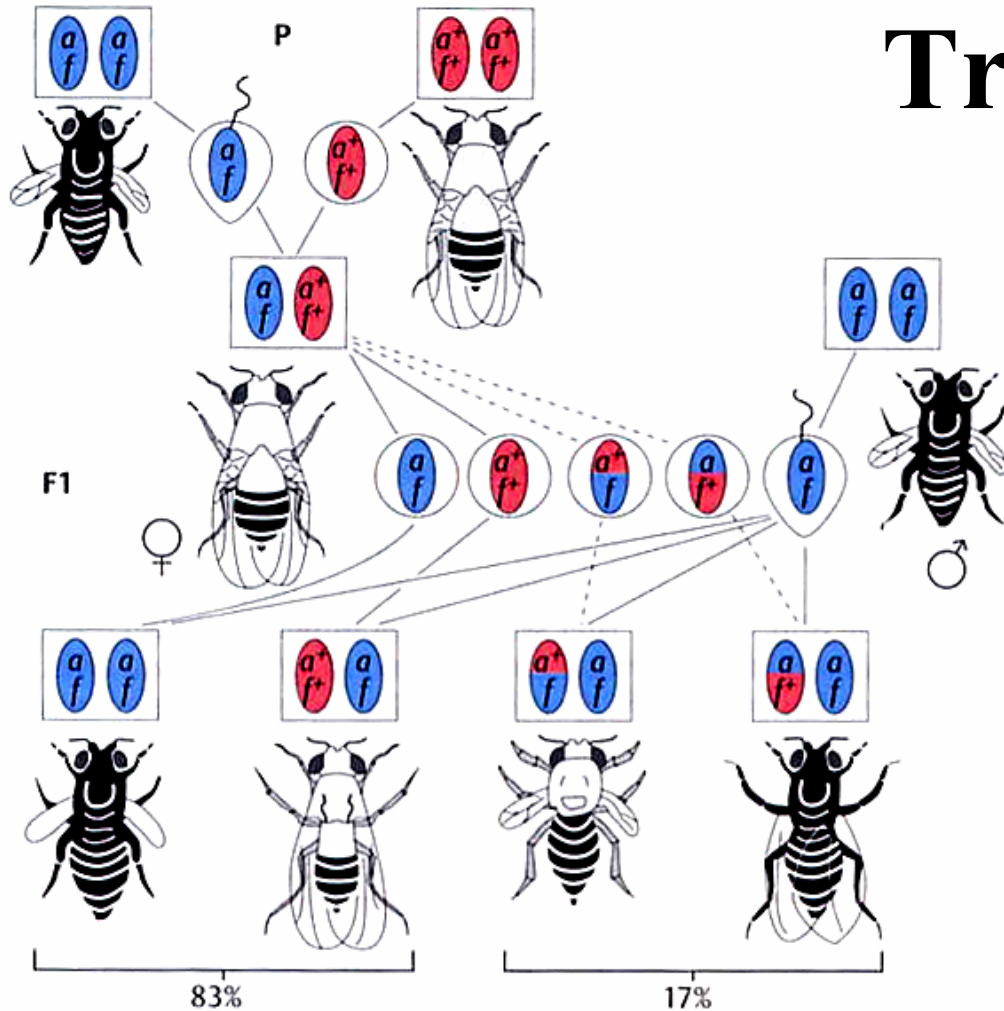


Rekombination und Transposition



Rekombination und Transposition

Vereinigung ursprünglich getrennter DNA-Moleküle

Homologe Rekombination:

- Verknüpfung von DNA-Abschnitten mit gleicher oder sehr ähnlicher Nucleotid-Sequenz

Nichthomologe Rekombination:

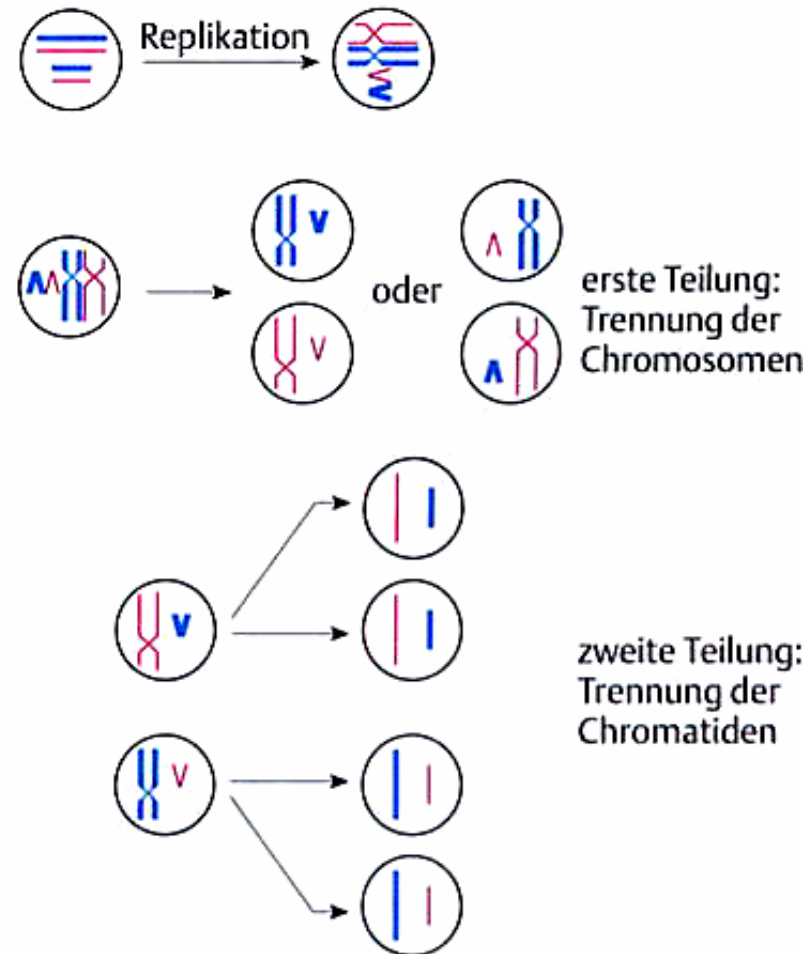
- Übereinstimmung der DNA-Sequenz ist keine Voraussetzung
- Auf wenigstens einem der beiden Rekombinationspartner ist eine Sequenz vorhanden welche die Rekombination einleitet

Rekombination und Transposition

Meiose, Homologe Rekombination:

Bedeutung der Meiose:

- Diploider Chromosomen-Satz wird auf einfachen reduziert
- Voraussetzung für sexuelle Vermehrung von Eukaryonten
- Mütterliches und väterliches Erbmateriale wird zu neuen Kombinationen zusammengestellt
- Austausch von Genen zwischen homologen Chromosomen bei der Rekombination



Rekombination und Transposition

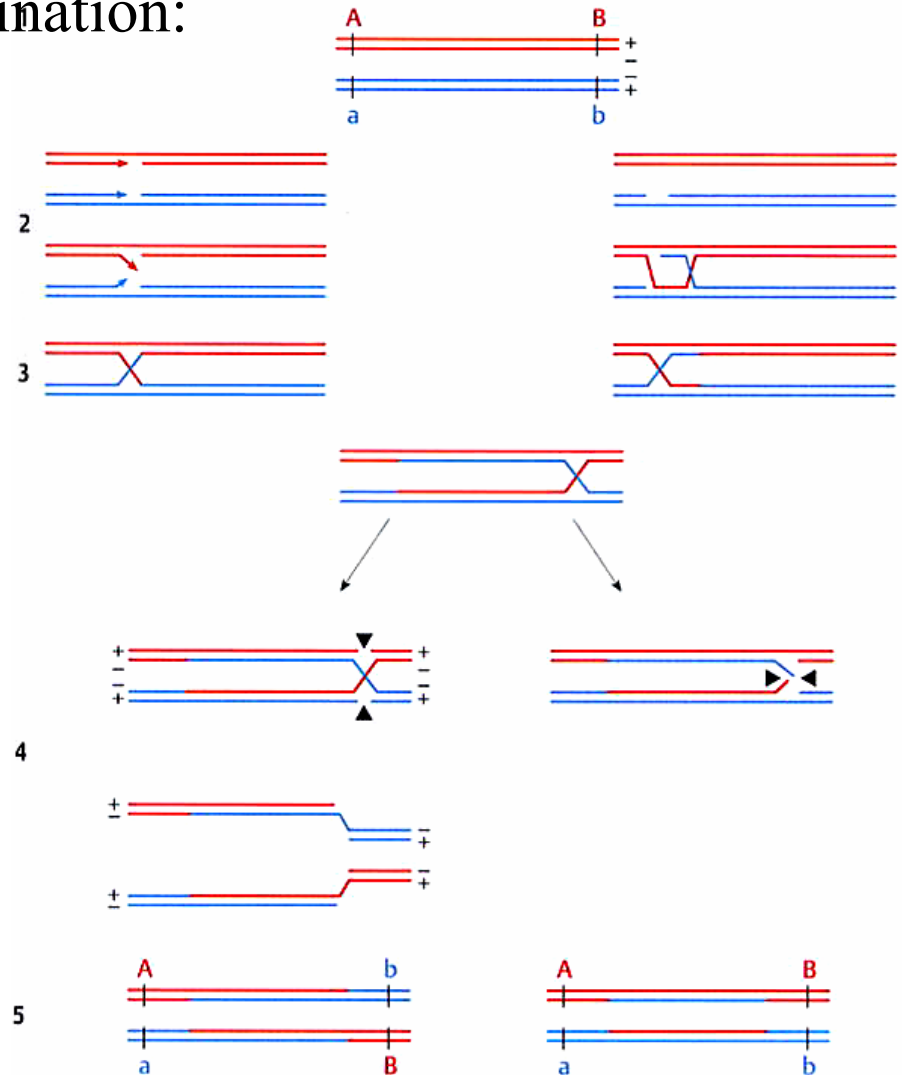
Molekularbiologie der Rekombination:

Voraussetzung ist das Vorkommen von 2 homologen DNA-Molekülen in der Zelle

Eukaryonten: Meiose

Bakterien:

Konjugation, Teile des Genoms werden vom Donor-Stamm in den Rezeptor-Stamm übertragen.



Rekombination und Transposition

Molekularbiologie der Rekombination:

Die DNA-Moleküle kommen in räumliche Nähe

Einleitung der Rekombination durch Strangbrüche, DNA-Enden oder Einzelstrangregionen



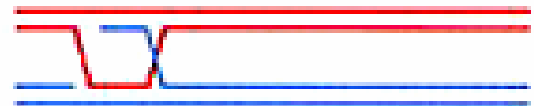
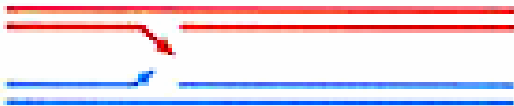
Rekombination und Transposition

Molekularbiologie der Rekombination:

Stränge des einen DNA-Moleküls gehen Basenpaarungen mit dem komplementären Partner-Molekül ein

Ausgehend von:

- Unterbrechungen zweier Stränge gleicher Polarität
- Einzelstranglücken
- Homologer Einzelstrang-DNA

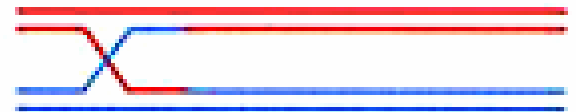
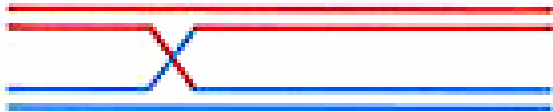


Rekombination und Transposition

Molekularbiologie der Rekombination:

Die entstandene Struktur wird durch kovalente Verknüpfung der überkreuzten Einzelstrang-DNA stabilisiert (**Holliday-Struktur**)

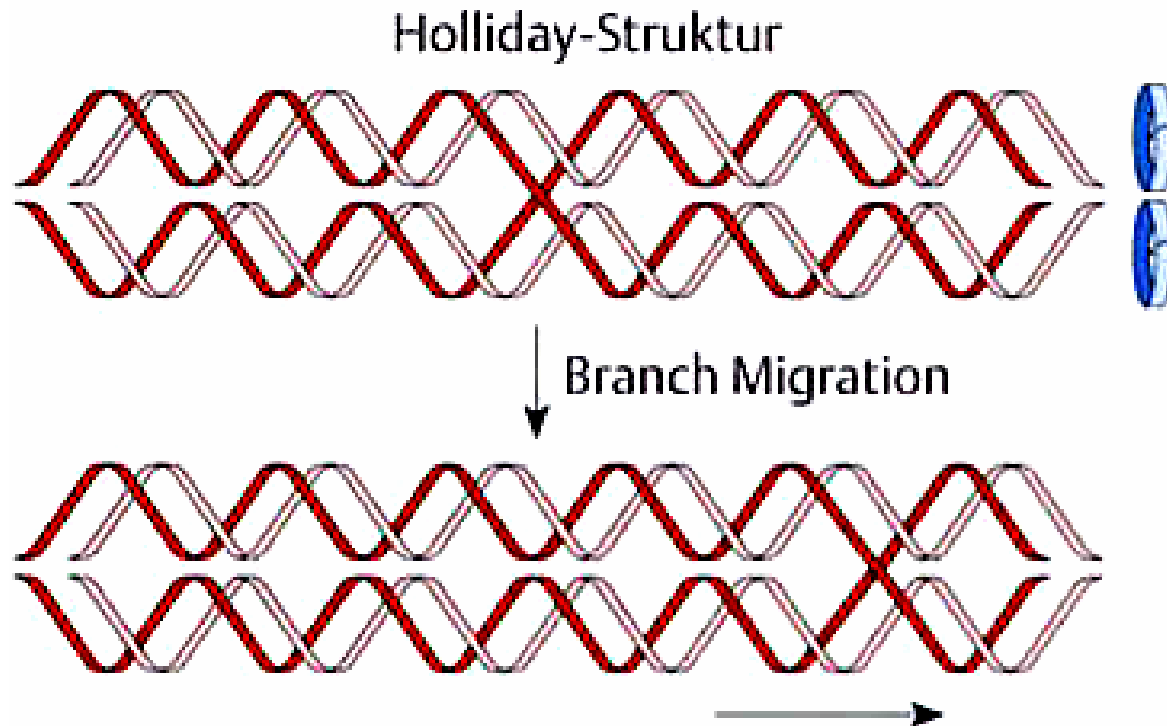
Stabil aber nicht statisch, bewegt sich nach rechts oder links entlang des Doppelstrangs (**Branch Migration**)



Rekombination und Transposition

Molekularbiologie der Rekombination:

Die **Holliday-Struktur** wird durch Drehen der beiden DNA-Moleküle und ständiges Öffnen und Schließen von Wasserstoffbrücken verschoben (***Branch Migration***)

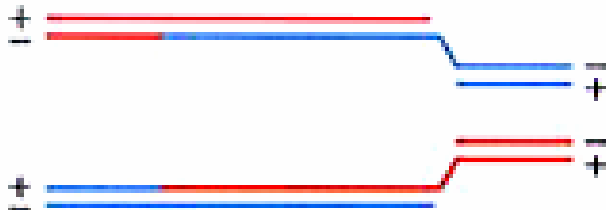
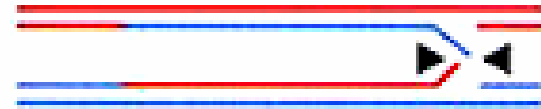
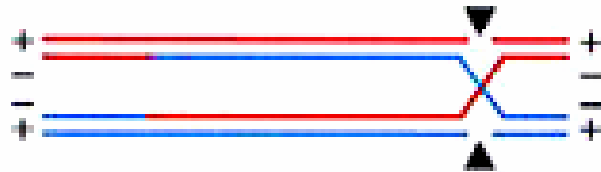


Rekombination und Transposition

Molekularbiologie der Rekombination:

Auflösung der Holliday-Struktur durch Enzyme die Überkreuzungsstellen erkennen und symmetrische Einzelstrangschritte einführen (Pfeile)

Schnitte erfolgen entweder in senkrechter oder waagrechter Richtung



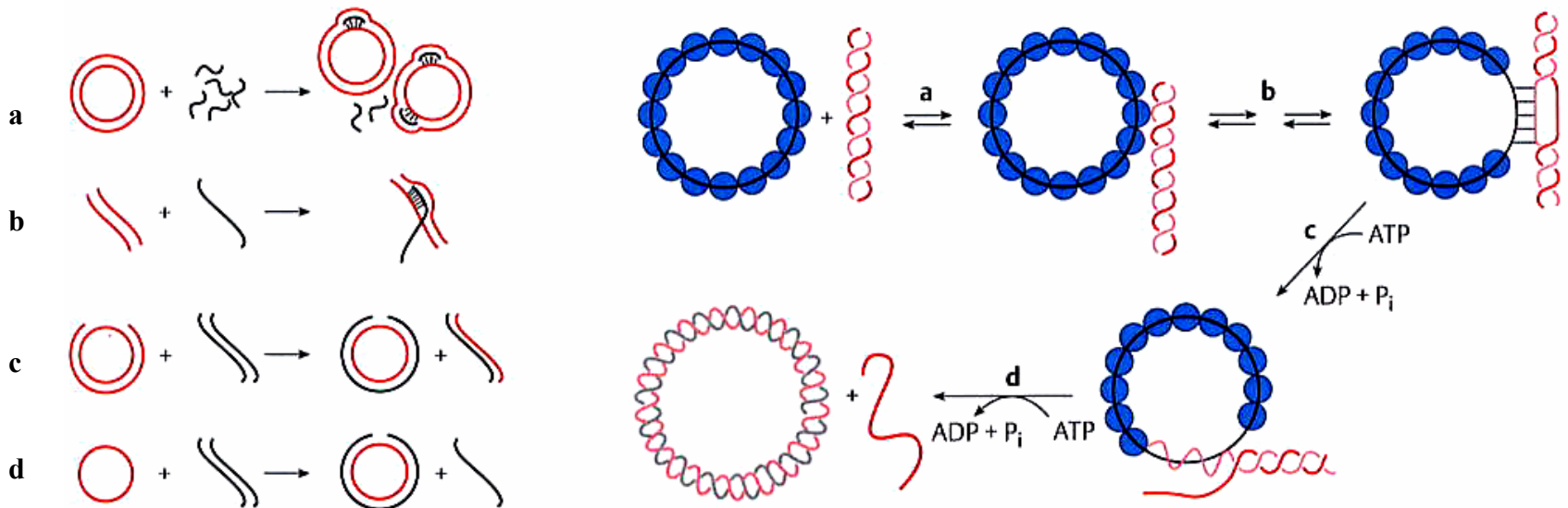
Rekombination und Transposition

Enzyme der Rekombination am Beispiel des *E. coli* *rec*-Systems:

Strangaustausch und das Rec A-Protein:

352 AS großes Protein das immer als Multimer auftritt.

- In Gegenwart von ATP bindet Rec A Einzelstrang-DNA oder einen Einzelstrangabschnitt von Doppelstrang-DNA, ein Protein bedeckt 2-4 Nucleotide
- Rec A sucht komplementären Abschnitt im Doppelstrang-DNA-Substrat und nimmt Kontakt auf
- Entwindung des Doppelstrangs, erste Basenpaarungen zwischen Einzelstrang und Empfängerstrang
- Einzelstrang windet sich um den Doppelstrang, Fortsetzen in definierter Richtung
- Rec A Protein ist im Verbund mit ATP stationär auf der DNA, Hydrolyse von ATP sorgt für Bewegung während des Strangaustausches.

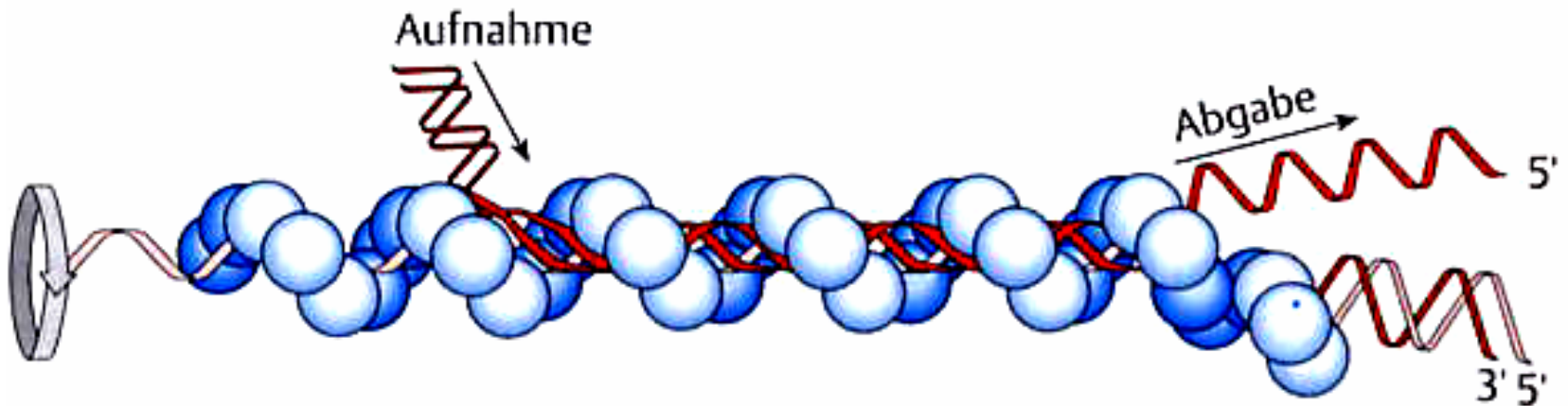


Rekombination und Transposition

Enzyme der Rekombination am Beispiel des *E. coli* *rec*-Systems:

Rec A vermittelter Strangaustausch:

Am linken Ende wird DNA in den Rec A-DNA-Komplex eingespult und rechts nach Partnertausch der Doppelstrang wieder entlassen



Rekombination und Transposition

Enzyme der Rekombination am Beispiel des *E. coli* *rec*-Systems:

Einzelstrang-Bereiche und das Rec BCD-Protein:

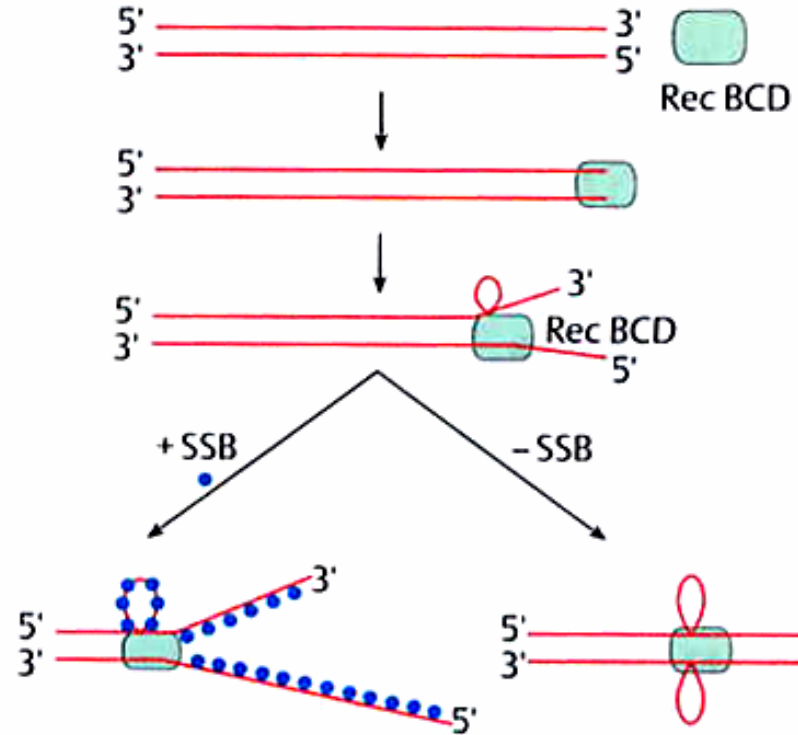
DNA-Entwindung durch Rec BCD

Rec BCD ist ein aus 3 Untereinheiten bestehendes Protein

Bei niedriger ATP und hoher Mg^{2+} Konzentration wirkt es als **Exonuclease** für Einzel- und Doppelstrang-DNA

Bei hoher ATP-Konzentration Aktivität einer **DNA-Helikase**

Das Enzym bewegt sich entlang des unteren DNA-Stranges schneller als entlang des oberen. Es entstehen Einzelstrang-Blasen. SSB-Proteine stabilisieren die Einzelstränge.



Rekombination und Transposition

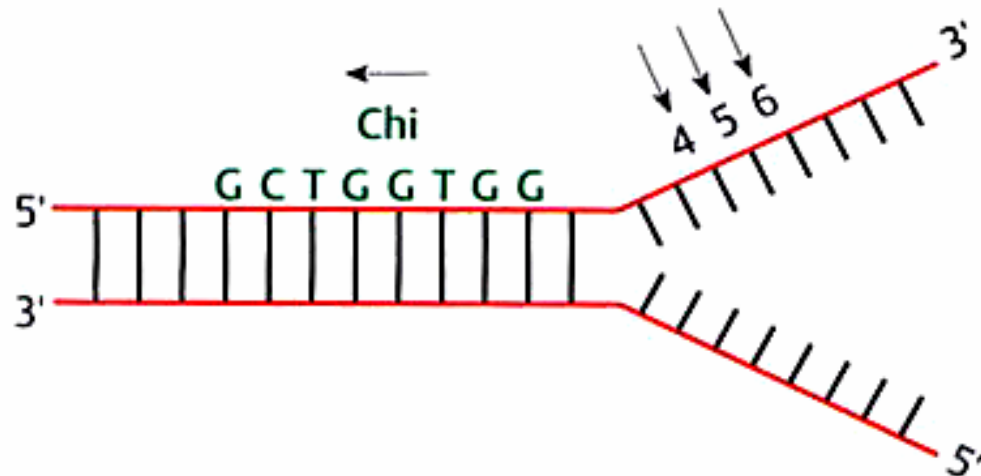
Enzyme der Rekombination am Beispiel des *E. coli* *rec*-Systems:

Chi-Sequenzen und das Rec BCD-Protein:

Rec BCD wirkt auch als Endonuclease. Geschnitten wird bevorzugt in entwundenen DNA-Bereichen unmittelbar vor einer Chi-Sequenz (GCTGGTGG).

Chi-Sequenzen finden sich etwa alle 5000bp auf dem *E. coli* Genom und sind bevorzugte Stellen der Rekombination (*hot spots*)

Annahme: an der Chi-Stelle geht Rec D verloren, Rec BC verliert dadurch seine Endonuclease-Aktivität, wirkt aber weiterhin als DNA-Helikase (Entwindung wird über viele 100 bzw. 1000 bp fortgesetzt)

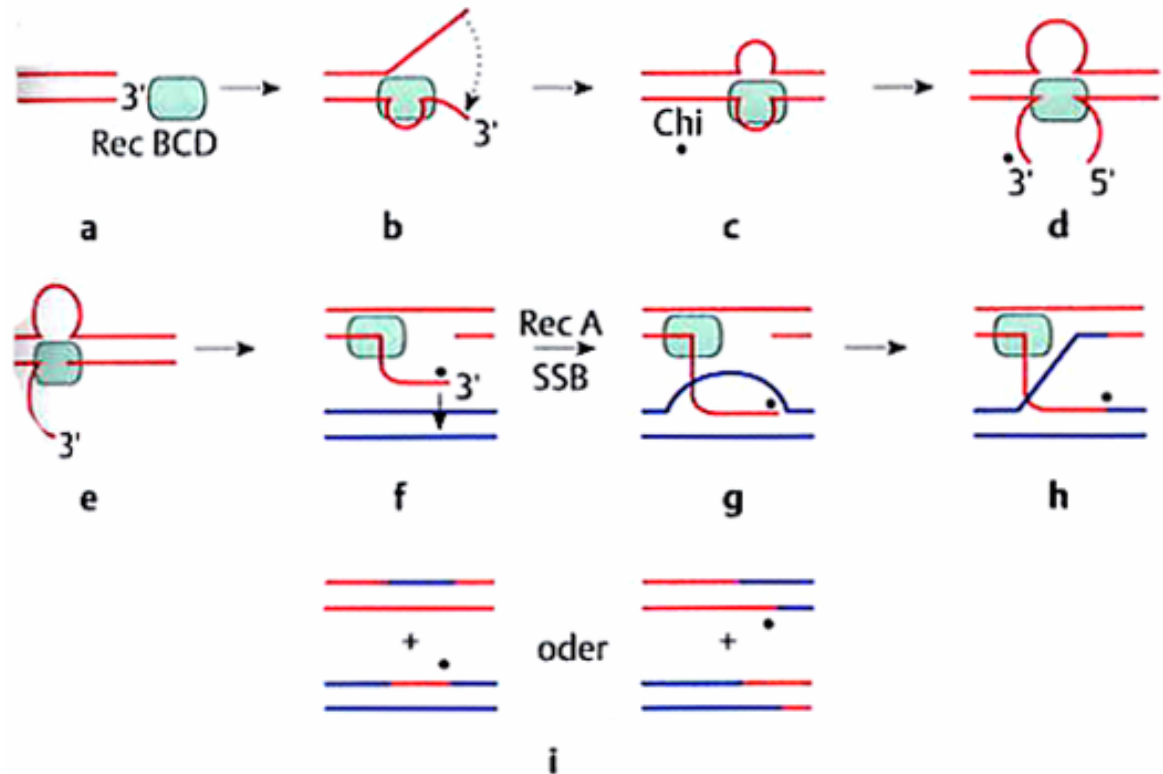


Rekombination und Transposition

Enzyme der Rekombination am Beispiel des *E. coli* *rec*-Systems:

Homologe Rekombination vermittelt durch Rec BCD und Rec A:

- a) Rec BCD bindet am Ende linearer DNA
- b-d) Entwindung bis zur Chi-Sequenz
- e) DNA-Strang wird geschnitten, Entwindung wird fortgesetzt
- f-g) SSP-Proteine stabilisieren die Struktur
- h) Kovalente Verknüpfung von DNA-Enden (Holliday-Struktur)
- i) Auflösung der Holliday-Struktur liefert rekombinierte DNA



Rekombination und Transposition

Enzyme der Rekombination am Beispiel des *E. coli rec*-Systems:

Branch Migration und das Ruv AB-Protein:

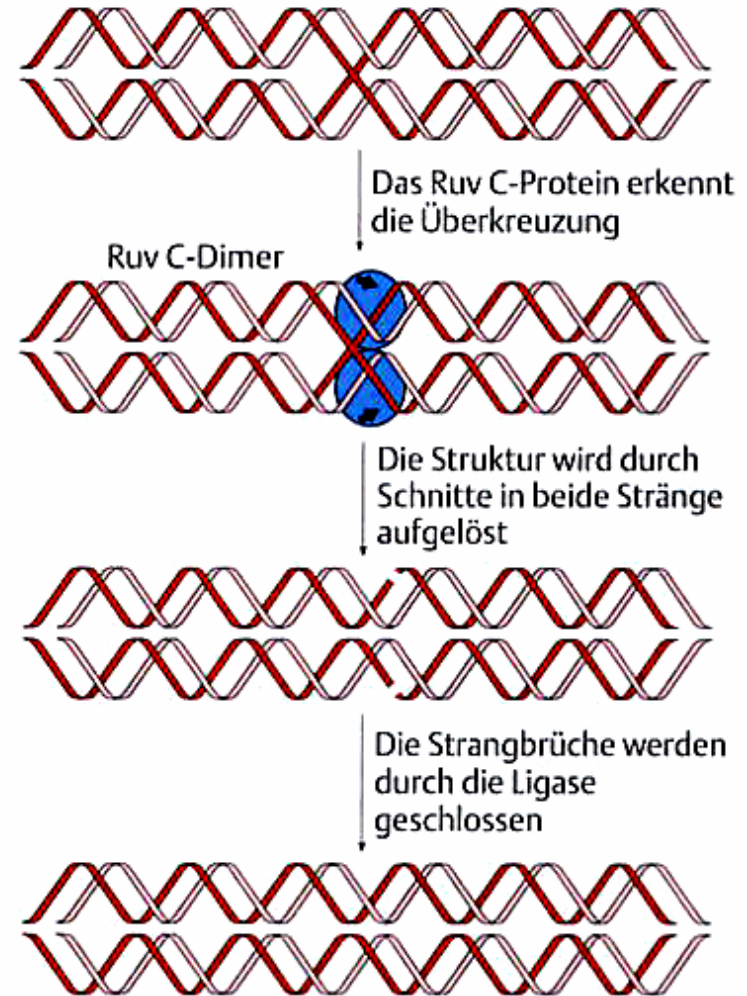
- Ruv A bindet als Tetramer an überkreuzte DNA (Holliday-Struktur)
- Eigentliche Wirkung gemeinsam mit Ruv B, wirkt als Hexamer
- Ruv AB treibt nach dem Binden an die Holliday-Struktur unter ATP-Verbrauch die *Branch Migration* voran
- Noch vorhandenes Rec A (Initiator des Strang-Austausches) fördert den Prozess
- Rec G kann an Holliday-Struktur binden und *Branch Migration* einleiten
- Rec G kann auch eine Rückwärtsbewegung bewirken; sind die Kreuzstränge der Holliday-Struktur noch nicht kovalent gebunden wird diese aufgelöst.

Rekombination und Transposition

Enzyme der Rekombination am Beispiel des *E. coli* *rec*-Systems:

Auflösung der Holliday-Struktur und das Ruv C-Protein:

- Spaltung der überkreuzten DNA- Stränge
- Ruv C bindet als Dimer an Holliday-Struktur
- Es entstehen begrenzte Einzelstrang-Regionen
- Diese werden in symmetrischer Weise geschnitten
- Entstandene Brüche werden durch Ligase verknüpft



Rekombination und Transposition

Gen-Konversion: Ereignisse im Heteroduplex-Bereich:

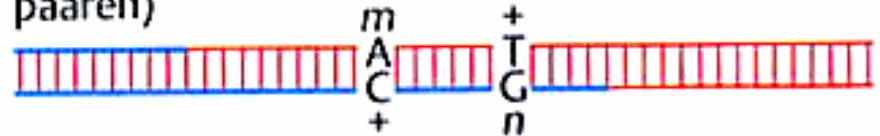
Genkonversion:

ist die Überführung eines Allels in ein anderes

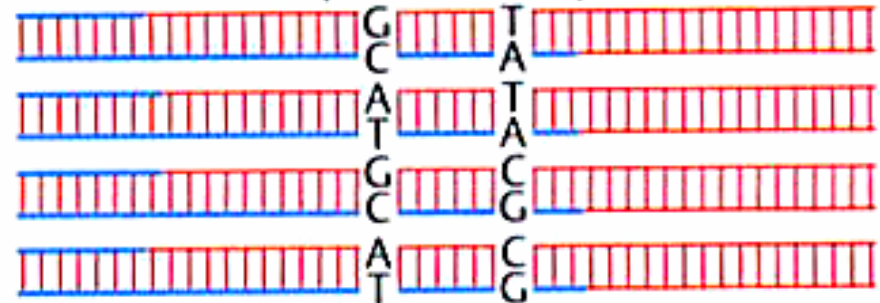
An der Heteroduplex (ein Strang der DNA mütterlich, einer väterlich) kommt es zu Fehlpaarungen (*Mismatches*), da die beiden Allele nicht vollständig identisch sind.

Reparaturmechanismen beheben diese Fehlpaarungen ohne Bevorzugung eines der beiden Stränge.

Heteroduplex-DNA (mit Mismatch-Nucleotidpaaren)



Genkonversion (Mismatch-Reparatur)



Rekombination und Transposition

Transposition und Integrative Rekombination:

Ein in einem Genom vorhandenes DNA-Element wird an eine andere Stelle im gleichen oder in einem anderen Genom versetzt (transponiert)

Bewegliche genetische Elemente bei Bakterien:

- Insertionssequenzen
- Transposons
- Transponierbare Bakteriophagen

Rekombination und Transposition

Insertions-Sequenzen (IS-Elemente):

- Bestandteile des bakteriellen Genoms, ca. 10 Kopien solcher Sequenzen im *E. coli* Genom
- Unter 10^7 Bakterien wird pro Generation ein IS-Element an eine andere Stelle übertragen, häufiger in der stationären Phase
- IS-Elemente sind 800-2000 bp lang und tragen an ihren Enden kurze gegenläufige Wiederholungen (*Inverted Repeats*)
- Der Zentrale Bereich enthält ORFs; kodieren für Proteine die für die Transposition verantwortlich sind (**Transposase**, Vorbereitung der Integration)
- Schneiden unmittelbar neben der Integrationsstelle, Einbau des IS-Elements an den Enden der Schnittstellen, DNA Reparatur, es entstehen gleichgerichtete Sequenzwiederholungen (*Direct Repeats*)

Bezeichnung	Größe [bp]	Inverted Repeats [bp]	Sequenz-Wiederholung am Integrationsort [bp]	Zahl der Kopien im <i>E. coli</i> -Genom
IS 1	768	20/23	9	6–10
IS 2	1327	32/41	5	4– 5
IS 5	1195	15/16	4	10–12
IS 10	1329	17/22	9	2

Rekombination und Transposition

Insertions-Sequenzen (IS-Elemente):

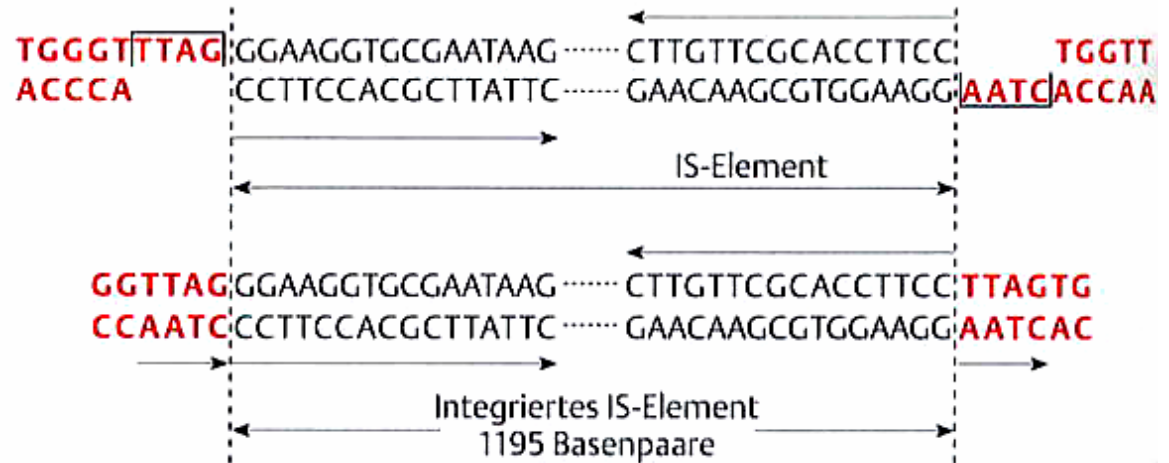
Schneiden neben der Integrationsstelle



Anlagern des IS-Elements



Schluss der Lücken durch
DNA-
Reparaturmechanismen,
Integriertes IS-Element
zwischen Direct Repeats



Rekombination und Transposition

Transposons:

Um ein vielfaches länger als IS-Elemente.

Zusätzlich zu den Transpositions-Genen genetische Funktionen kodiert.

Ermöglichen Überleben von Bakterien in für sie gefährlichen Umweltbedingungen, z.B.: **Antibiotikaresistenzen, Schwermetallresistenzen.**

Bezeichnung	ungefähre Größe [bp]	End- struktur	Resistenz gegen
Klasse I			
Tn 5	5700	IS 50	Kanamycin
Tn 9	2650	IS 1	Chloramphenicol
Tn 10	9300	IS 10	Tetracyclin
Klasse II			
Tn 3	5000	38 bp „repeat“	Ampicillin
Tn 501	8200	38 bp „repeat“	Quecksilber-Salze
Tn 1000 ($\gamma\delta$)	5700	35 bp „repeat“	-

Klasse I-Transposons:

von IS-Elementen eingerahmt, IS-Elemente übernehmen Transpositions-Aufgaben

Klasse II-Transposons:

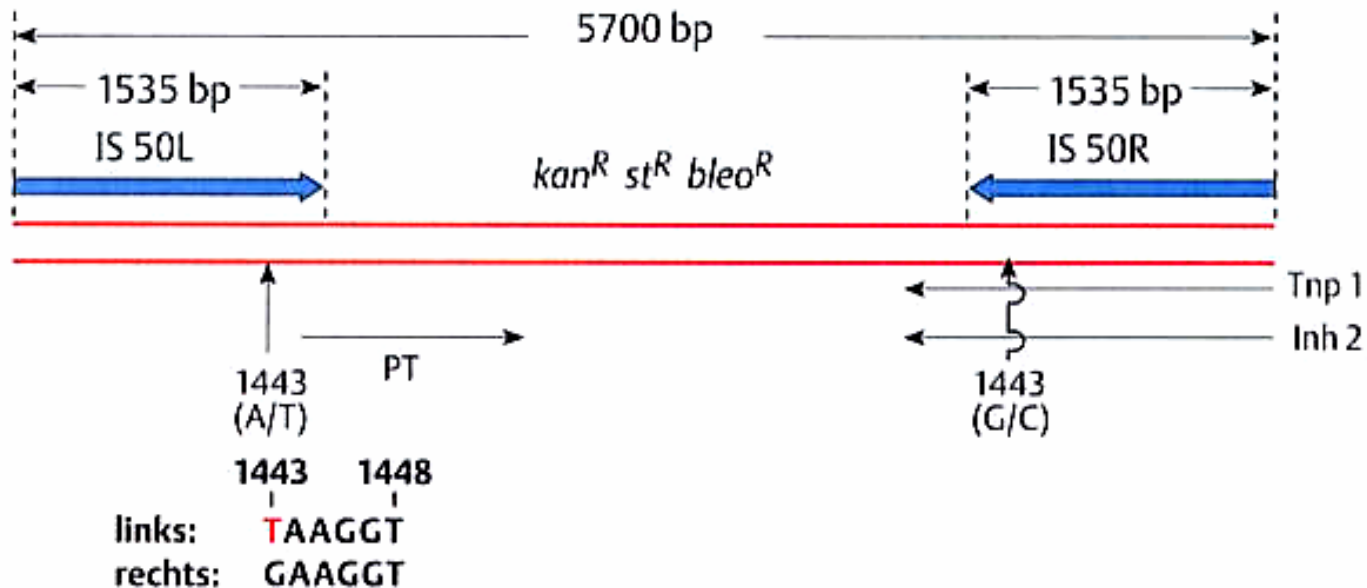
enthalten kurze Inverted Repeats an den Enden und Transpositions-Proteine im Zentrum

Rekombination und Transposition

Klasse I-Transposons, z.B.: Transposon Tn 5:

Tn5 ist von zwei gegenläufig angeordneten IS 50 Elementen flankiert. IS 50R (rechts) ist intakt und reguliert die Expression der Transposase. IS 50L (links) hat eine Punktmutation im Transposasegen die zu einem Stopcodon (TAA) führt.

Die entstandene Sequenz TAAGGT entspricht der -10 Region des Standard-Promotors, dieser steuert die Expression des Kanamycin-Resistenz-Gens.

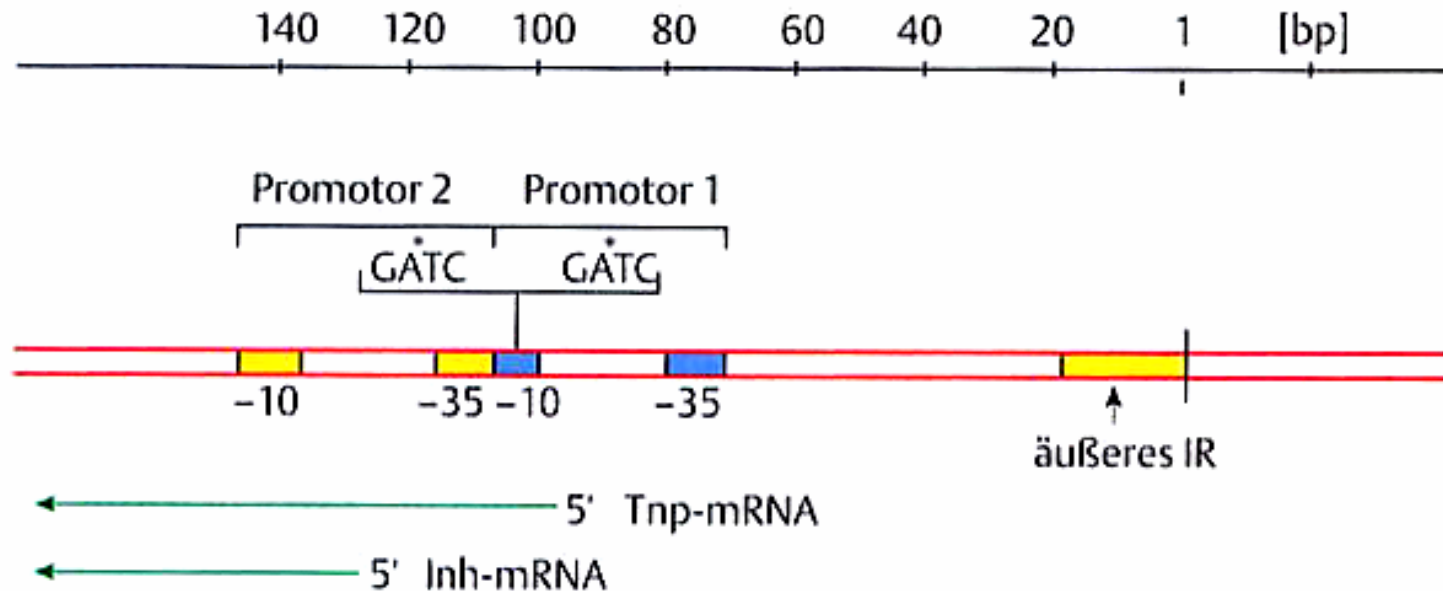


Rekombination und Transposition

Regulation der Transposition von Tn 5:

IS 50R besitzt 2 Promotoren zur Transkription des Transposase-Gens:

- Promotor 1 bildet ein längeres Transkript (Tnp), das Tnp-Protein wirkt als Transposase
- Promotor 2 bildet ein kürzeres Transkript (Inh), das Inh-Protein inhibiert die Transposition
- Im Normalfall entsteht wesentlich mehr Inh, da der Promotor für Tnp methyliert ist und dies die Anheftung der RNA-Polymerase erschwert.

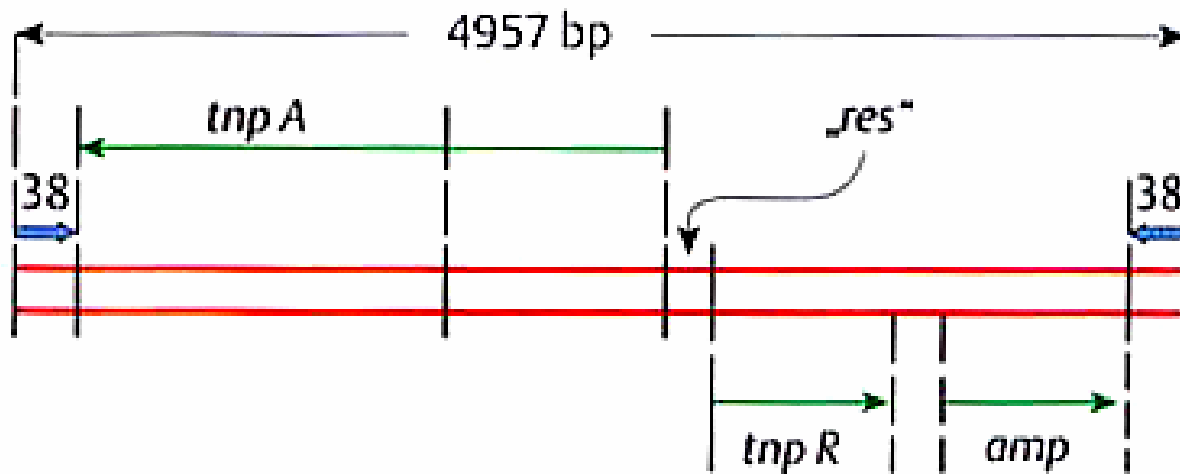


Rekombination und Transposition

Klasse II-Transposons, z.B.: Transposon Tn 3:

Inverted Repeats flankieren das Transposon, weitere Strukturen sind die Ampicillin-Resistenz (*amp*), das *tnp R*-Gen und das *tnp A*-Gen.

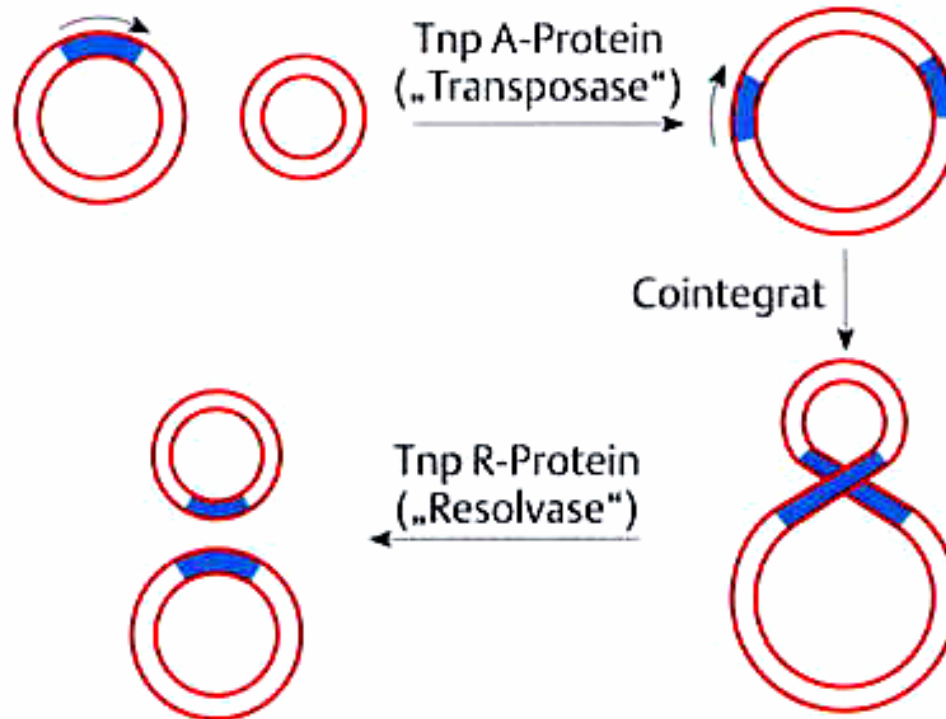
- Tnp R-Protein bindet an die *res*-Stellen zwischen *tnp A* und *tnp R* und verhindert so die Expression von *tnp A* (Transposase).
- Tnp A-Protein bindet an die Inverted Repeats und leitet so die Transposition ein. Vorübergehende Verknüpfung zwischen Donor- und Empfänger-DNA (Co-Integrat).
- Tnp R löst Co-Integrat durch eine konzertante Aktion von Schneiden und Wiederverknüpfen auf, **Resolvase** (ähnlich der Wirkung einer DNA-Topoisomerase)



Rekombination und Transposition

Klasse II-Transposons, z.B.: Transposon Tn 3:

Transposition über Co-Integratbildung:



Rekombination und Transposition

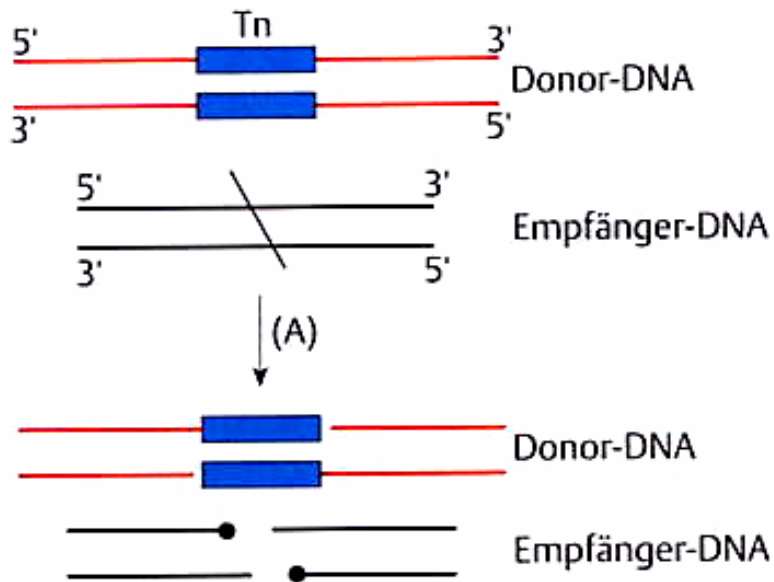
Transponierbare Bakteriophagen:

- Bakteriophage Mu, dessen DNA wird über Transposition vermehrt
- Phagen-DNA kann im Vergleich zu den anderen transponierten Elementen als extrachromosomale Einheit existieren
- Sie wird mit Strukturproteinen bedeckt und kann dann wie andere Bakteriophagen neue Bakterien-Zellen infizieren

Rekombination und Transposition

Mechanismen der Transposition:

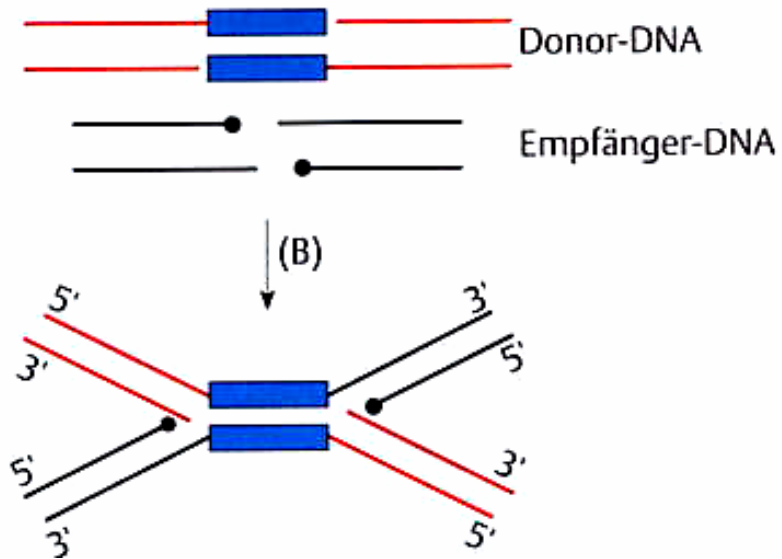
Voraussetzungen: aktive Transposase, intakte Inverted Repeats am Ende des Transposons oder der IS-Elemente



- Transposasen binden an die IR-Sequenzen im Transposon oder IS-Element und führen zum Schnitt am Ende jeder IR-Sequenz
- Die Ziel-DNA wird durch Einführen versetzter Schnitte geöffnet
- Spezifität: meist keine, manchmal AT-reiche Regionen bevorzugt, selten spezifische DNA-Sequenzen

Rekombination und Transposition

Mechanismen der Transposition:



- Enden der Transposons oder IS-Elemente werden an Empfänger-DNA geknüpft
- Donor- und Rezeptor-DNA sind zu einem Zwischenprodukt gekoppelt

Rekombination und Transposition

Mechanismen der Transposition:

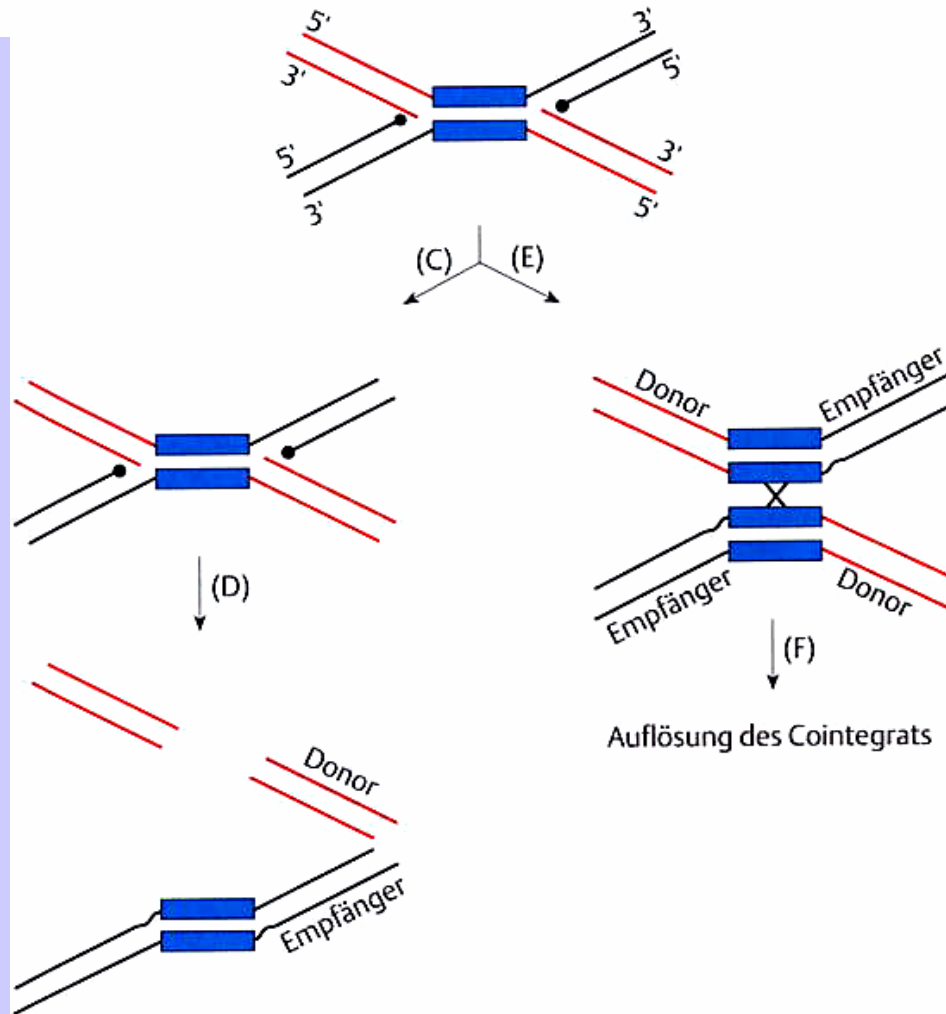
Schnitt- und Klebe-Weg:

Das Donor-Molekül wird abgetrennt, Transposition wird durch Auffüll-Synthese und kovalente Verknüpfung der DNA-Enden abgeschlossen

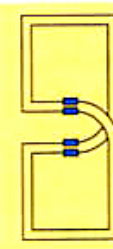
Replikativer Weg:

Freie 3'-OH Enden im Zwischenprodukt dienen als Primer für die DNA-Synthese.

Transposons oder IS-Elemente werden kopiert, Entstehung des Co-Integrats, Auflösung durch Resolvase

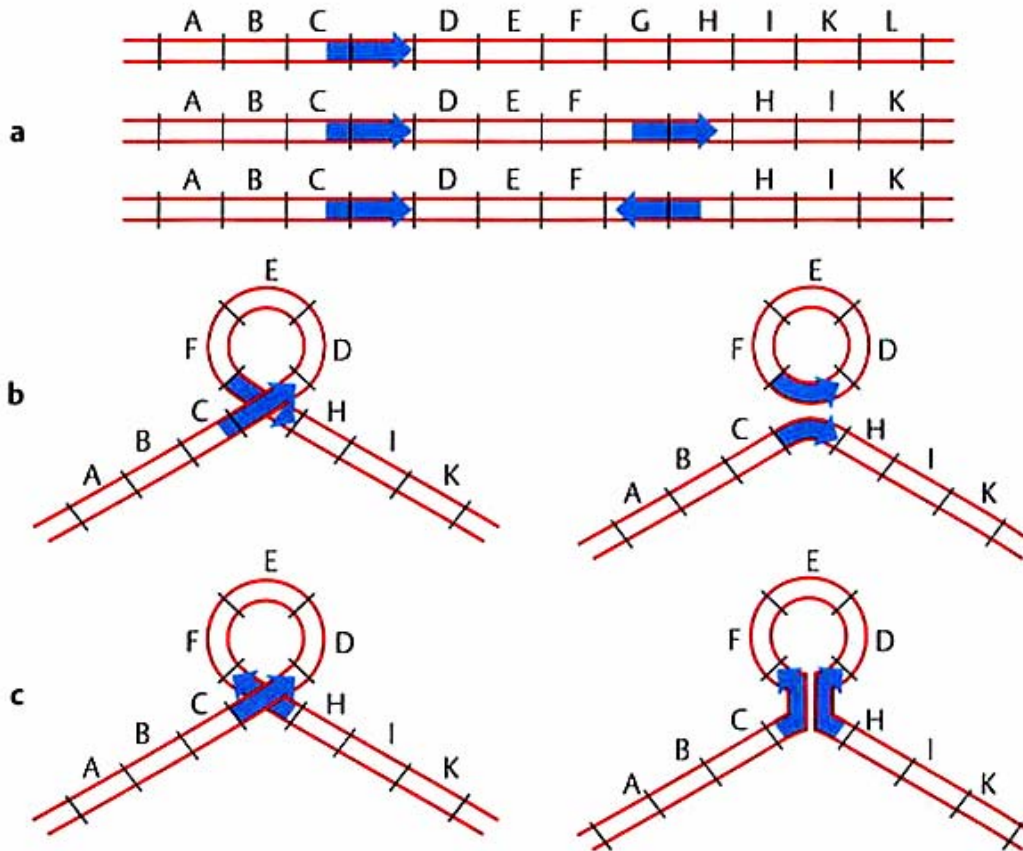


Cointegrat



Rekombination und Transposition

Konsequenz der Transposition – Umstrukturierungen im Genom



Schnitt-und Klebe-Weg hinterläßt Narben im Donor-Molekül, Gene können geschädigt oder zerstört werden

Mutationen durch **Insertionen** (a)

Ausbildung von **Deletionen** (b) oder **Inversionen** (c) je nach Co-Integrat-Bildung und dessen Auflösung

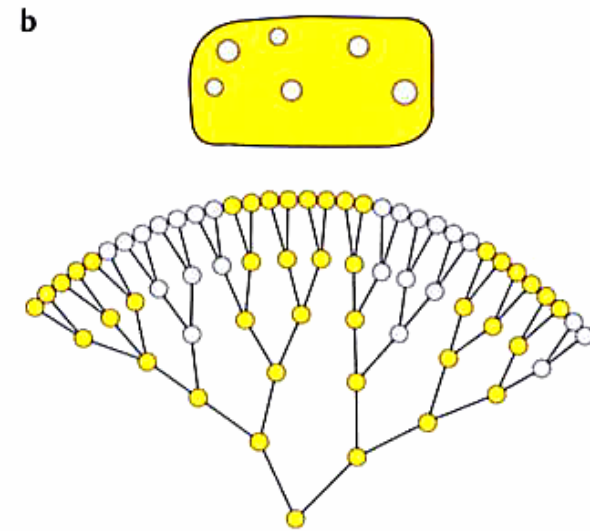
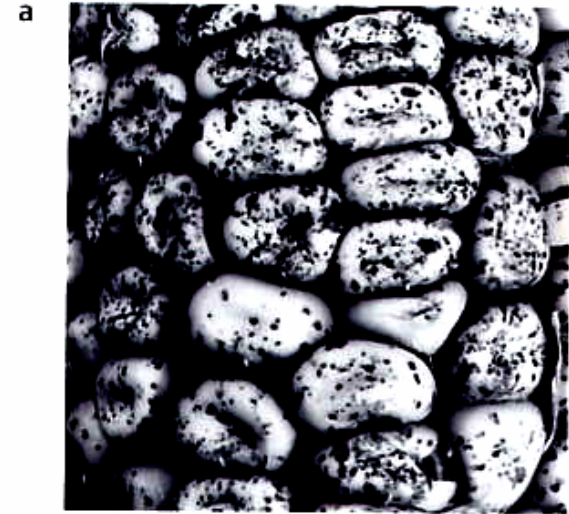
Rekombination und Transposition

Bewegliche genetische Elemente in Pflanzen:

Beispiel Maiskörner mit Spreckelung

Hervorgerufen durch die Ac-Ds Elemente

Während der Entwicklung des Maiskorns wird eine Mutation in einigen Zellen rückgängig gemacht

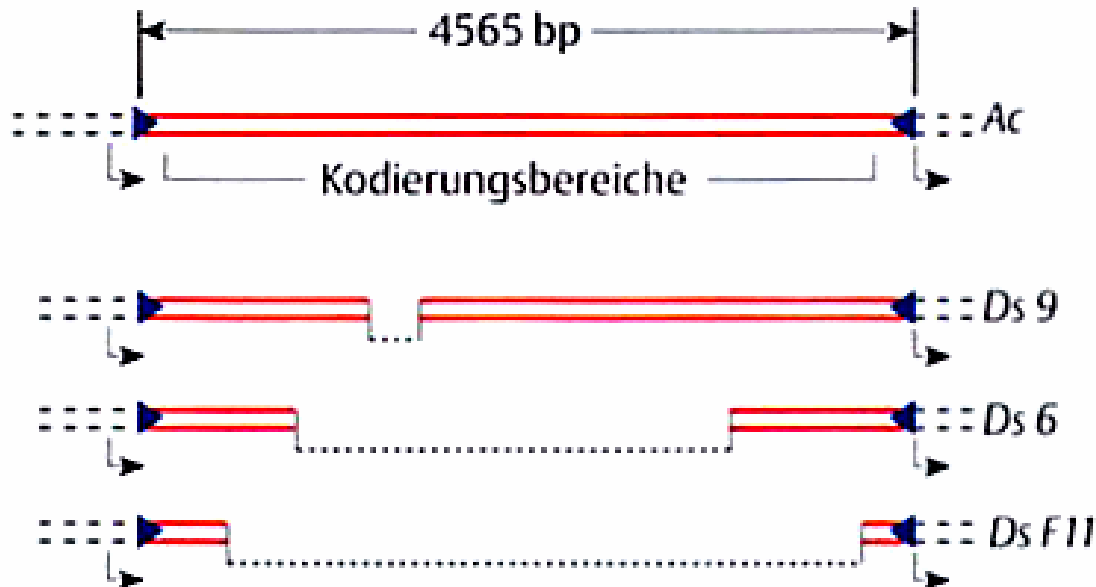


Rekombination und Transposition

Bewegliche genetische Elemente in Pflanzen:

Das Maigenom enthält ca. 10 **Ac-Elemente**, jedes ist wie ein typisches Transposon aufgebaut (Inverted Repeats, Leserahmen für Transpositionsproteine)

Ds-Elemente benötigen Ac-Elemente, da ihre inneren Kodierungsbereiche durch mehr oder weniger große Mutationen verloren gegangen sind.

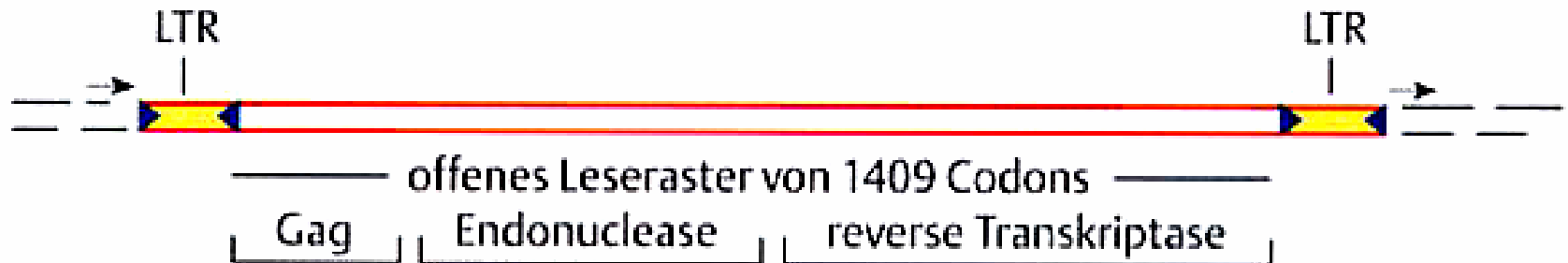


Rekombination und Transposition

Copia-Elemente in *Drosophila melanogaster*, Retrotransposons:

Bestehen aus 5000-7000 bp, eingerahmt von Direct Repeats von einigen 100 bp, diese tragen ihrerseits an ihren Enden kurze Inverted Repeats (ähnlich Klasse I Transposons)

- *Copia* wird in Form von RNA nach zwischengeschaltener Transkription übertragen
- Die *Copia* RNA dient als Matrize zur Synthese der DNA, die dann an anderen Stellen des Genoms integriert und Mutationen verursacht.
- Umkehr des normalen Flusses genetischer Information: **Reverse Transkriptase**



Rekombination und Transposition

Retroviren:

Weit verbreitet, menschliche Retroviren:

- HIV (*human immune deficiency virus*), AIDS Entstehung (*acquired immune deficiency syndrom*)
- HTLV I und II (*human T-cell leukemia virus*), seltene Form der Leukämie

Weitergabe:

- Horizontal durch Infektion
- Vertikal durch die Keimbahn

Rekombination und Transposition

Retroviren:

Enthalten als Genträger zwei identische RNA-Moleküle die eukaryontischer mRNA entsprechen (5' Methylguanin-Kappe, 3' Poly A).

Ca. 8000 Nucleotide, drei Genbereiche:

- *gag* (gruppenspezifisches Antigen)
- *pol* (RNA-abhängige DNA-Polymerase)
- *env* (Bestandteile der Virushülle)

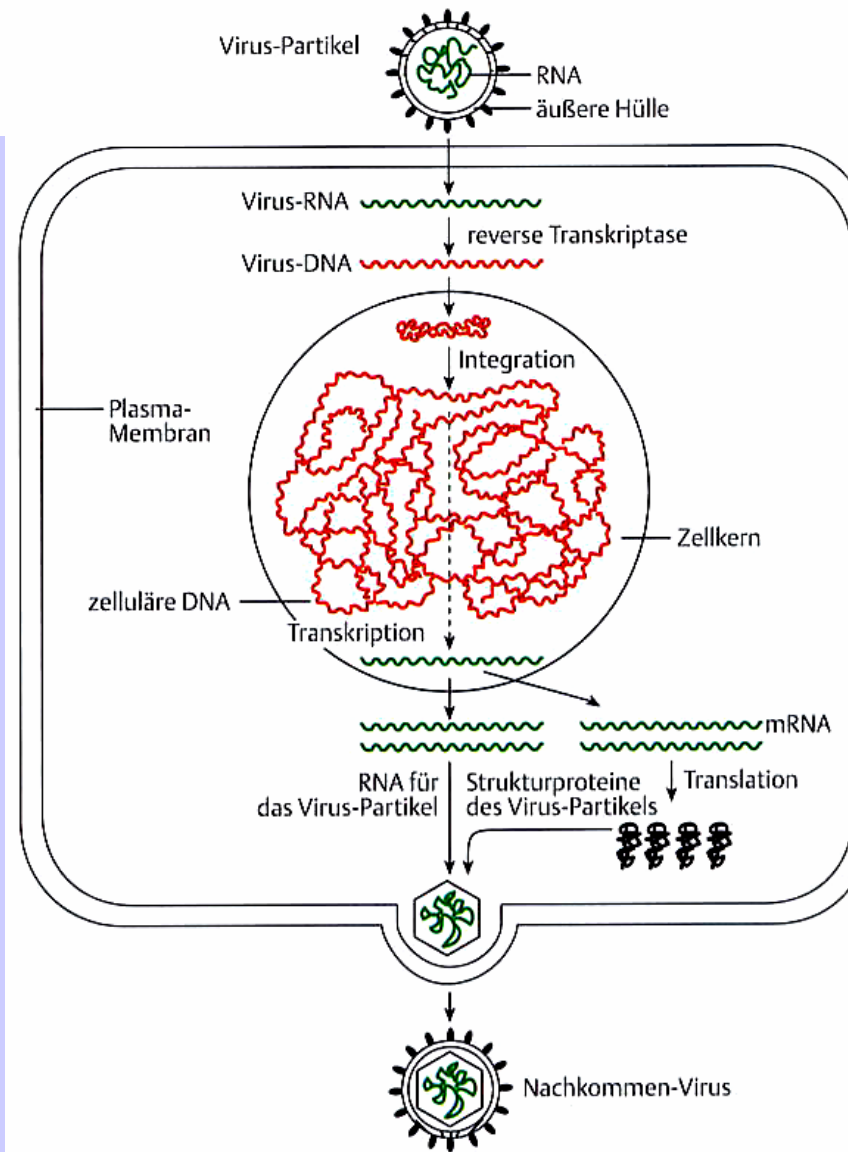
Virus RNA wird durch **reverse Transkriptase** (viral) in DNA übersetzt.

DNA gelangt in Zellkern und wird durch **Integrase** (viral) ins Wirtsgenom integriert.

Transkription erfolgt mit Wirtsgenom.

Gebildete RNA dient der Herstellung von Virusproteinen oder als Genom der Nachkommen-Viren.

Ausschleusung der verpackten Viren durch Knospung (Zytoplasma-Membran mit eingebauten Env-Proteinen).



Rekombination und Transposition

Retroviren:

Molekulare Genetik des Retrovirus:

Repeats (R) 70 Nucleotide 5' und 3'

Unique Sequences U3, U5

gag-Gene: Bausteine der inneren Virus-Struktur

pol-Gene: Protease, reverse Transkriptase (inkl. RNase H), Endonuclease (Integrase)

env-Gene: zwei Hüllproteine

