

GRUNDLAGEN DER MOLEKULARBIOLOGIE

Prof. Dr. Anne Müller



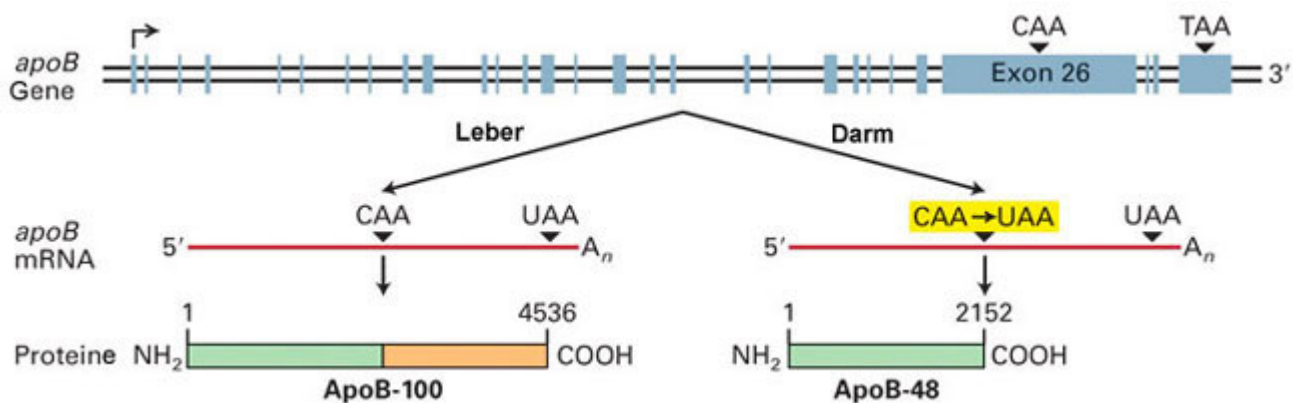
6 Genetische Vielfalt / Gen-Umordnungen

- 6.1 RNA-Editing
- 6.2 Alternatives Spleissen
- 6.3 Gen-Umordnungen

Wie kann die Zahl der Proteine erhöht werden, ohne längere DNA zu brauchen?

6.1 RNA-Editing (Sonderfall): Zwei Proteine aus einem mRNA-Molekül

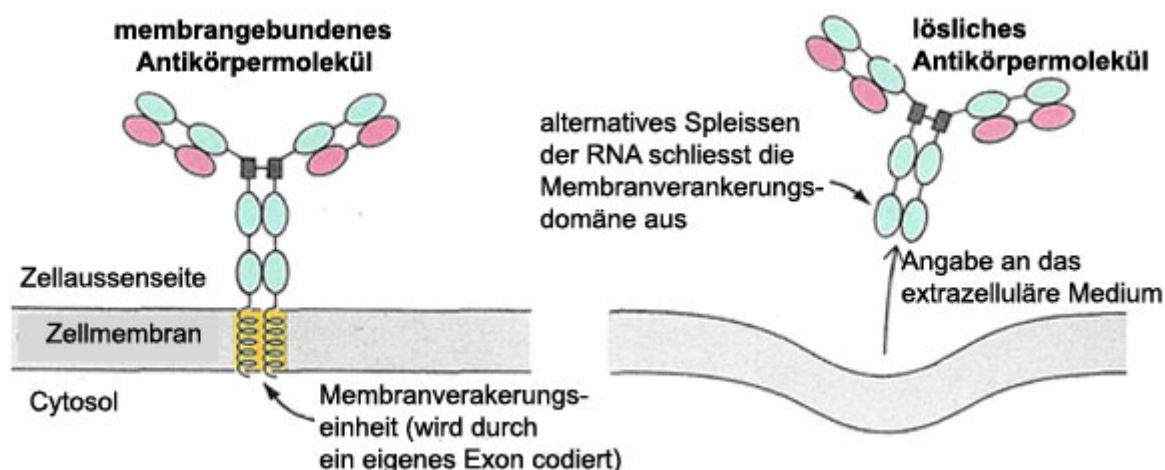
Gewebespezifische Modifizierung der Apolipoprotein-B-mRNA. In der Leber wird ein grösseres (100 kDa) Apolipoprotein-B produziert als im Dickdarm (48 kDa). Im Dickdarm wird eine Cytosin-Deaminase (ApoBEC) exprimiert, die spezifisch ein CAA-Codon in der Mitte der mRNA in UAA (Stop-Codon) umwandelt. Dadurch wird die Translation dieser mRNA im Dickdarm früher terminiert.



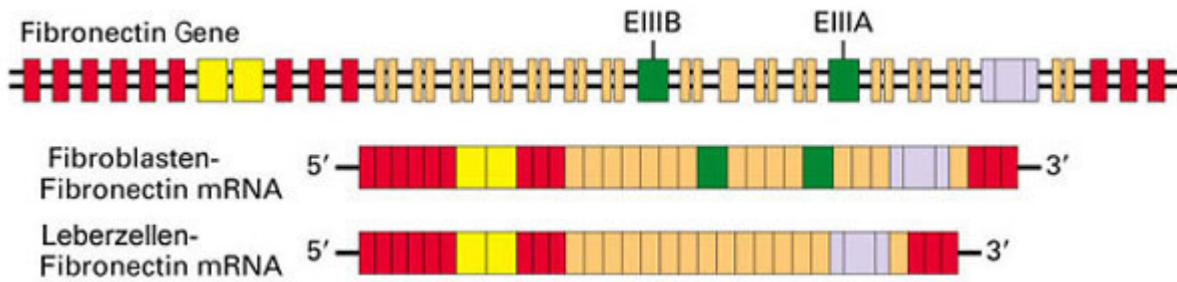
6.2 Alternatives Spleissen

Exone codieren oft für eine ganze Protein-Domäne (z.B. ATP-Bindung, Transmembran-Domäne usw.).

Beispiel 1: Prä-B-Zellen exprimieren Antikörper-Moleküle, die in der Plasmamembran verankert sind. Nach Antigen-Stimulierung der Zelle wird eine lösliche Form des Antikörpers exprimiert. Dies wird dadurch ermöglicht, dass das Exon, welches für die Transmembran-Domäne des Antikörpers codiert, während des Spleissens übersprungen wird.

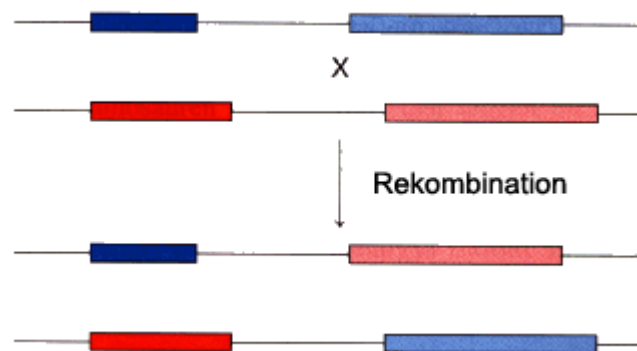


Beispiel 2: In Fibroblasten wird die Fibronectin-mRNA regelmässig gespleisst. In Hepatozyten sind Exone EIIIA und EIIIB übersprungen worden.



6.3 Gen-Umordnungen

(a) Exon-Shuffling: Wie oben bereits erwähnt, codieren Exone oft für eine ganze Protein-Domäne. Es ist wahrscheinlich, dass während der Evolution neue Proteine durch den gegenseitigen Austausch von Exonen entstanden sind. Aus zwei Genen, abc und ABC könnten z.B. Gene aBc und AbC (usw.) entstanden sein.



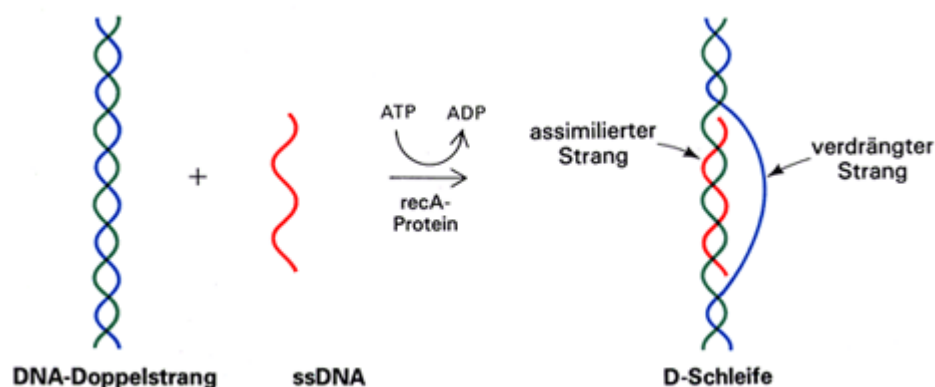
(b) Homologe Rekombination (HR): Findet in allen Organismen statt. Bei Bakterien während der Konjugation, in Eukaryoten während der Meiose und in Hefe bei der „mating type switching“. HR spielt eine wichtige Rolle auch beim Reparatur von Doppelstrangbrüchen.

In *E. coli* erfordert der Prozess doppelsträngige DNA (dsDNA), einzelsträngige DNA (ssDNA) mit Homologie zur dsDNA, die RecABCD und RuvABC Proteine, und ATP.

Die Paarung eines einzelsträngigen DNA-Moleküls (rot) mit dem komplementären Strang (grün) einer Doppelhelix wird vom *recA*-Protein katalysiert. Die entstehende Struktur wird D-Schleife genannt. ATP-Hydrolyse setzt das *recA*-Protein von der DNA frei.

RecB ist eine Helikase.

RecD ist eine Endonuklease, die die Einzelstrangbrüche generiert. Die DNA wird an κ -Stellen (GCTGGTGGNNN-NN) gespalten.



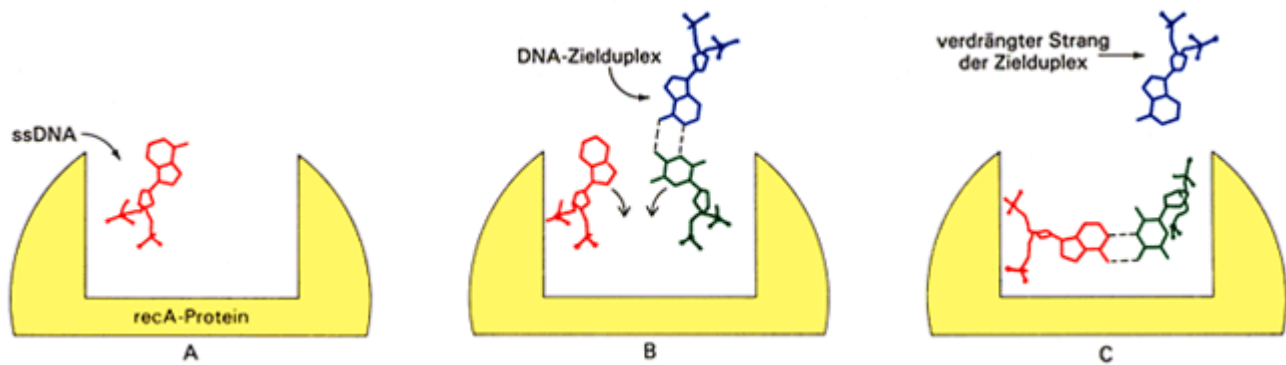
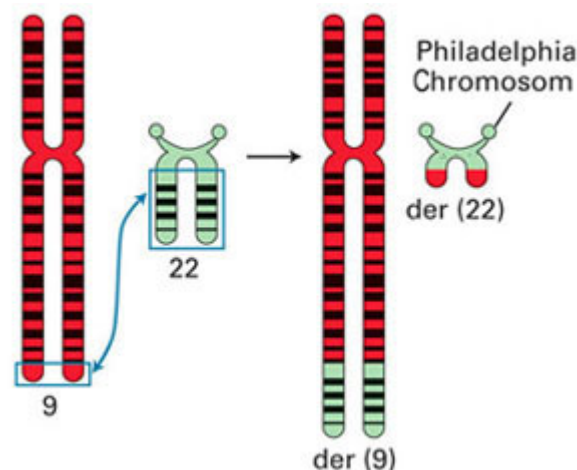


Bild: Die Bindung von ssDNA an RecA (A) führt zur Bindung doppelhelikaler DNA (B), die nach einer homologen Region abgetastet wird. Die eindringende ssDNA paart sich mit dem komplementären Strang der Zielduplex (C).

In den meisten Fällen von Chronischer Myeloide Leukämie (CML) haben die leukämischen Zellen eine reziproke Translokation zwischen einem Chromosom 9 und einem Chromosom 22 gemeinsam. Das Produkt dieser Translokation wird als t(9;22) bezeichnet. Das verkürzte Chromosom 22 wird "Philadelphia-Chromosom" genannt. Es enthält eine Aberration, in der die 5'-Sektion des BCR-Gens mit dem Proto-Onkogen c-Abl verknüpft ist.

Das Medikament Gleevec® inhibiert die Protein-Kinase-Aktivität von BCR.ABL, indem es an dessen ATP-Bindungsstelle bindet. Fast 90% der CML-Patienten, die mit diesem Medikament behandelt wurden, zeigten kein weiteres Fortschreiten der Krankheit.



Das Philadelphia-Chromosom, welches für Chronische Myeloide Leukämie (CML) zuständig ist, entsteht wahrscheinlich durch illegitime HR.

Strangbrüche, die durch DNA-Schaden (z.B. durch ionisierende Strahlung) entstehen, können HR auslösen, und, *vice versa*, werden Strangbrüche durch HR repariert. Deswegen sind Organismen, die keine HR besitzen, hoch empfindlich auf ionisierende Strahlung.

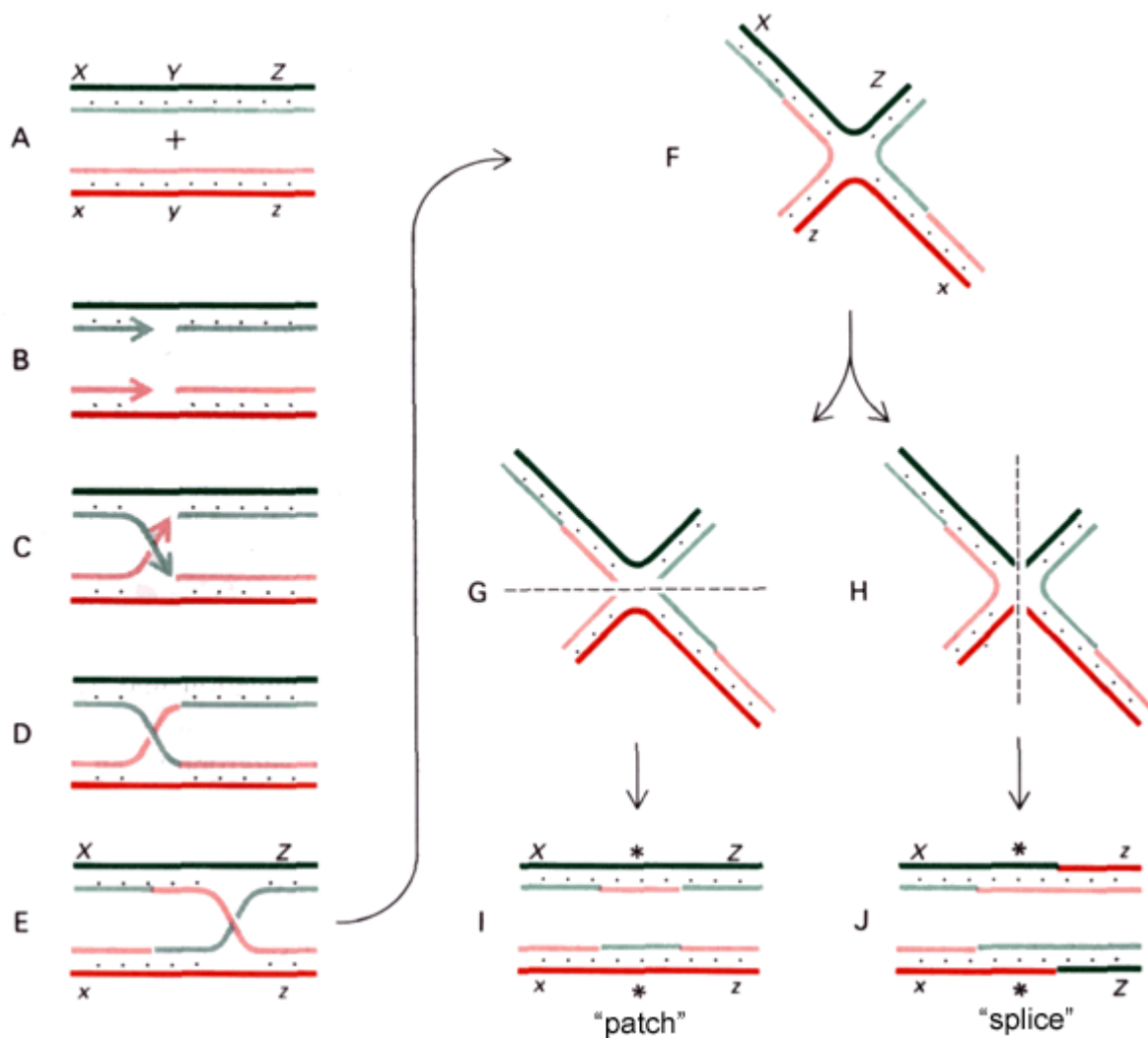


Bild: Robin Hollidays Modell der genetischen Rekombination. Ein Elterndoppelstrang ist grün dargestellt, der andere rot. Jeder dunklere Strang kann mit jedem hellen Basenpaare ausbilden und umgekehrt. X, Y und Z bezeichnen drei Gene; x, y und z sind Allele dazu. Die einzelnen Schritte sind Ausrichtung (A), Spaltung eines Stranges in jeder Doppelhelix (B), Eindringen (C), Neuverknüpfung (D) und Wanderung der Kreuzungsstelle (branch migration)(E). (F) ist eine andere Darstellung von (E). Wird die untere Doppelhelix aus (E) um 180° um ihre vertikale Achse gedreht, entsteht (F). (F) kann entlang der horizontalen oder der vertikalen Achse gespalten werden. Durch Neuverbindung der Stränge (G und H) erhält man zwei verschiedene Rekombinantenpaare (I und J). Regionen mit nur einem Strang von jedem Elterndoppelstrang, sogenannte Heteroduplexmoleküle, sind mit einem Stern markiert.

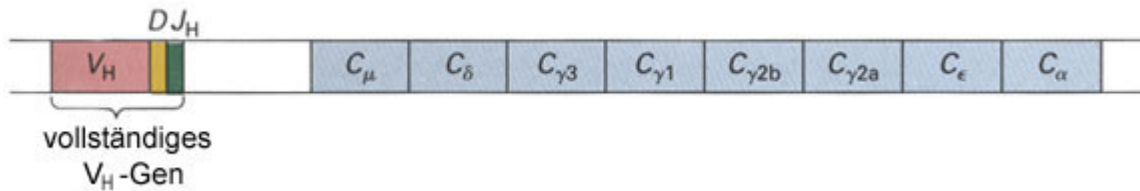
(c) **Ortsspezifische Rekombination:** Signal-Sequenzen und kurze Homologie-Regionen sind erforderlich.

Beispiel: VDJ-Rekombination

Die Vielfalt des Spektrums der Immunglobuline wird durch VDJ-Rekombination ermöglicht. Der H-Immunglobulin-Lokus des Menschen besitzt ~250 V-(variable), ~15 D-(diversity) und 4 J-(join) Regionen. Durch Rekombination können 45'000 unterschiedliche Ig-Moleküle entstehen.



Die Gene für die konstanten Regionen der μ -, δ -, γ -, ϵ - und α -Ketten liegen in der Keimbahn-DNA nebeneinander.



Ein vollständiges V_H-Gene entsteht durch die Verknüpfung von V-, D- und J-Segmenten in der Nähe des C-Gens für die μ-Kette.



Es gibt 2 Arten von Erkennungstellen für die Rekombination von V-, D- und J-Segmentgenen: solche mit 23-bp-Spacern und solche mit 12-bp-Spacern. Nur zwischen unterschiedlichen Typen kann eine Rekombination stattfinden, die von RAG1- and RAG2-Proteinen katalysiert wird.

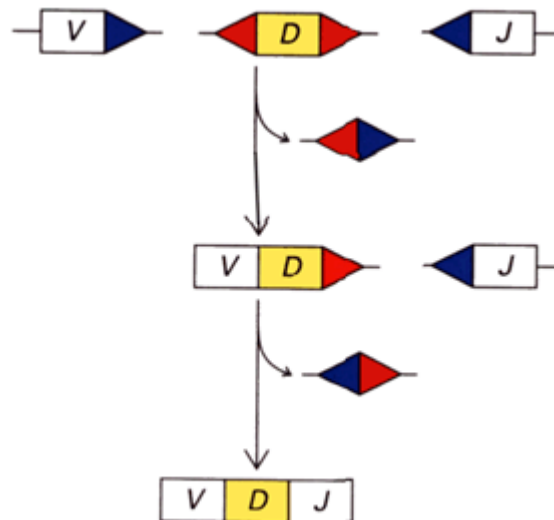
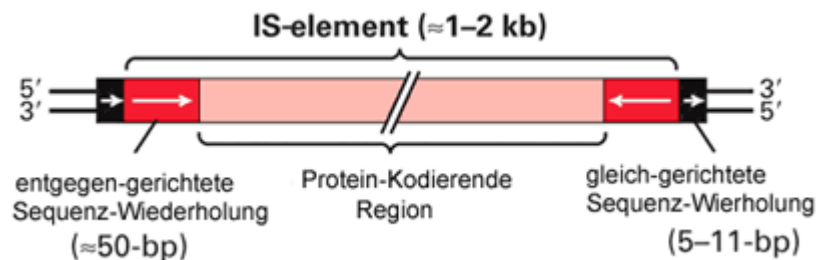
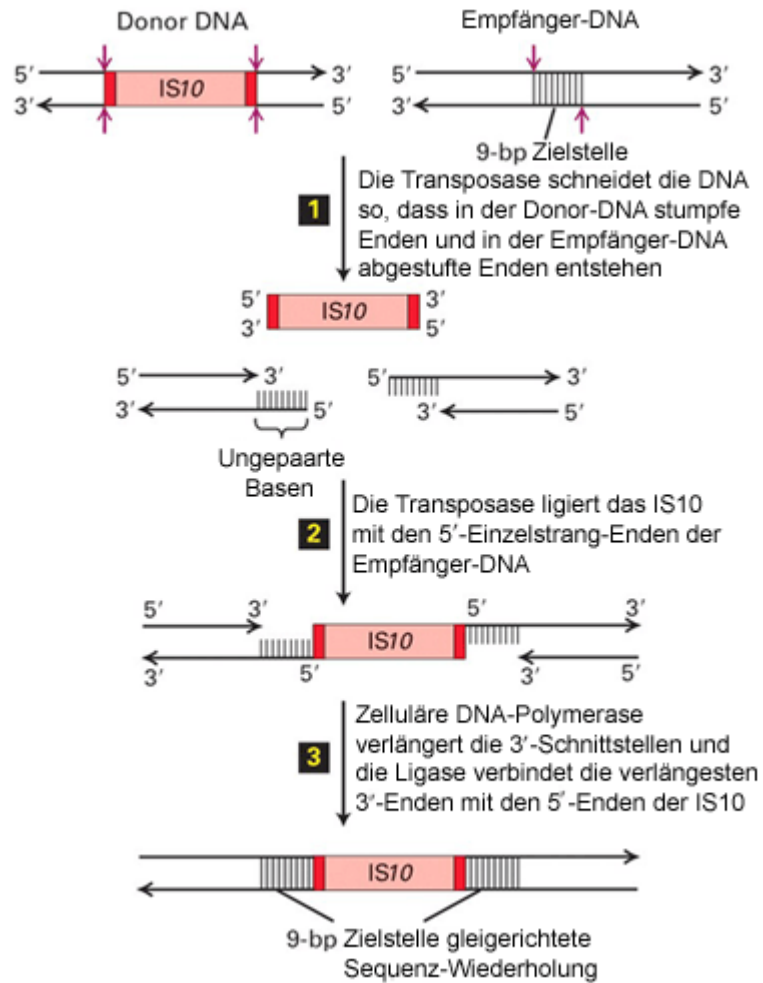


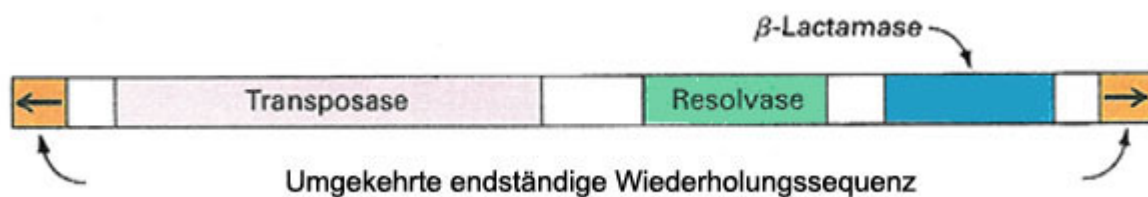
Bild: Die Verbindung von V-, D- und J-Segmentgenen erfolgt durch ortsspezifische Rekombination zwischen den zwei unterschiedlichen Typen von Erkennungssequenzen. Die 23-bp-Spacersequenz ist blau dargestellt, die 12-bp-Seqenz rot dargestellt.

(d) Transposone und Retrotransposone: Die durch Transposone vermittelte Verschiebung genetischer Elemente innerhalb des Genoms setzt keine Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Donor- und Akzeptorstelle voraus. Die bekanntesten Transposone sind die bakteriellen Insertionssequenzen (IS-Elemente). Jedes IS-Element codiert ausschliesslich für die Proteine, die es für seine eigene Transposition benötigt. An den Enden derartiger Elemente kommen invertierte Sequenzwiederholungen (inverted repeats) mit einer Länge von 15 bis 25 Basenpaaren vor. Bei Insertion ins Genom werden diese Sequenzen verdoppelt.

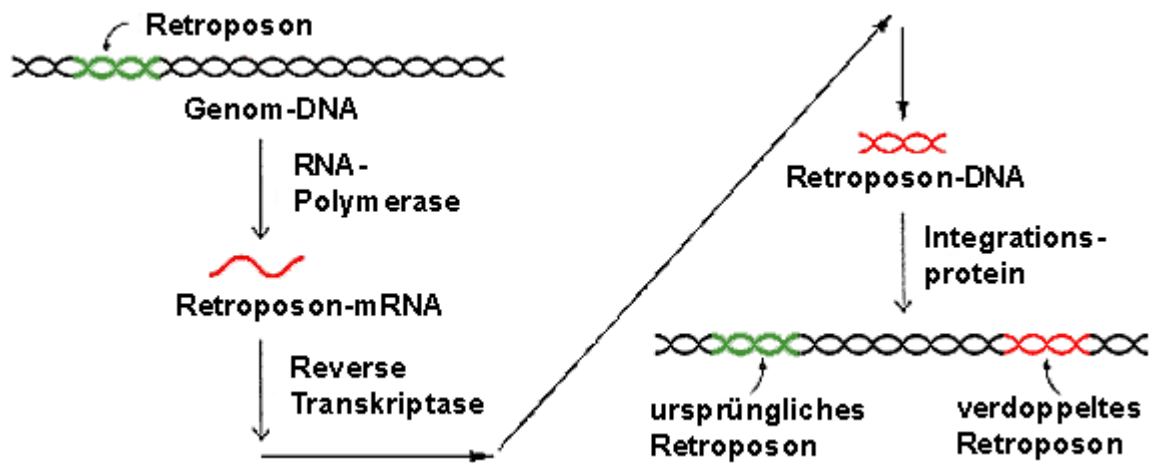




Einige bakterielle Transposone (Tn) enthalten ausser den für die Transposition wichtigen Genen (Transposase) auch Gene für Antibiotikaresistenzen, wie z.B die β -Laktamase.



Transposone, die eine RNA-Zwischenstufe benötigen, werden Retrotransposone genannt. Die wichtigsten Repräsentanten dieser Klasse sind die Retroviren.



Lernziele

- Prinzip des RNA-Editings kennen
- Prinzip des alternativen Spleissens kennen
- Homologe Rekombination: Hauptdarsteller in *E. coli* (RecA, RecBCD) und deren Aktivitäten kennen
- VDJ-Rekombination kennen (Hauptdarsteller und erforderliche Faktoren)
- Transposone und Retrotransposone: Mechanismus der Integration in bzw. des Ausschneidens aus der DNA des Wirtes verstehen