

Transposition und Rekombination

Rekombination ist die physische Trennung von DNA-Abschnitten und das anschliessende Wiederausammenfügen dieser Abschnitte in neuen Kombinationen. Rekombinationen finden besonders häufig durch sogenannte homologe Rekombination statt. Diese Form der Rekombination beruht darauf, dass sich die DNA-Doppelstränge zweier homologer DNA-Abschnitte in ihre Einzelstränge trennen und sich dann mit dem komplementären Einzelstrang des jeweils anderen DNA-Abschnitts paaren. Dieser Rekombinationsmechanismus bedingt also, dass die miteinander ausgetauschten DNA-Abschnitte homolog zueinander sind, also identische oder zumindest einander sehr ähnliche Sequenzen besitzen.

Beispiele für DNA-Translokationen die auf dieser klassischen homologen Rekombination beruhen sind Genduplikationen oder die Integration von Plasmid- oder Phagen DNA in ein Genom.

Es gibt aber auch Rekombinationsmechanismen bei denen die ausgetauschten DNA-Abschnitte nicht homolog zueinander sind. Eine besondere Form dieser nichthomologen Rekombinationsevents sind die Trennung und Wiederverknüpfung von DNA durch sogenannte Transposons. Der molekulare Mechanismus der es diesen Transposons erlaubt von einer Stelle in der DNA in eine andere zu „springen“ ist komplett unabhängig von der klassischen homologen Rekombination.

Die ersten dieser „springenden“ DNA-Elemente wurden in den 1950er Jahren durch Barbara McClintock bei ihren Untersuchungen an Mais entdeckt (Abbildung 13) und ca. 20 Jahre später auch in Bakterien identifiziert. Inzwischen ist bekannt dass Transposons in allen Lebewesen auftreten, auch im Menschen. Eine Untersuchung im Rahmen des Human Genome Project hat z.B. gezeigt, dass fast die Hälfte der menschlichen DNA-Sequenz auf Transposons zurückgeführt werden kann. Der Prozess durch den Transposons von einem Ort im Genom zu einem anderen „springen“ nennt sich Transposition (Abbildung 14) und die Enzyme, die diesen Prozess unterstützen, sind eine besondere Form von Rekombinasen, die als Transposasen bezeichnet werden. Die DNA-Sequenz des Transposons codiert dabei normalerweise für die für seine Bewegung notwendige Transposase. Dadurch ist sichergestellt, dass sich ein Transposon unabhängig von anderen DNA-Sequenzen fortbewegen kann. Diese Fähigkeit sich selber von einer Stelle

im Genom zu einer anderen zu verpflanzen, hat den Transposons den Namen „springende Gene“ eingebracht.

Obwohl Transposons in allen Organismen vorkommen ist ihre Funktion in Bakterien, wo sie eine wichtige Rolle in der Evolution spielen, besonders gut untersucht. Strenggenommen sind Transposons Parasiten ihrer Wirtszellen, aber Transposons können durchaus auch genetische Informationen enthalten, die für die Wirtszelle nützlich sind. Je mehr Sequenzdaten von unterschiedlichen Bakterien verfügbar werden desto klarer wird, dass Transposons mit einer gewissen Regelmässigkeit von einer Bakteriengattung auf eine andere überspringen. Dieser Transfer von Transposons zwischen unterschiedlichen Bakteriengattungen findet oftmals durch den Austausch von Plasmiden oder Phagen statt, in deren DNA sich die Transposons in ihrer ursprünglichen Wirtszelle verpflanzt haben.



Abbildung 13 : Barbara McClintock (1902-1992) durch ihre Arbeit an „springenden“ Genen revolutionierte sie das Feld der zellulären Genetik. Ihre Ideen wurden lange Zeit für zu radikal gehalten oder einfach ignoriert bis ihre Arbeiten dann in den sechziger Jahren von anderen Forschern repliziert wurden. 1983 erhielt McClintock für ihre Entdeckung der springenden Gene den Nobelpreis.

Übersicht über die Transposition

Unter dem Strich führt eine Transposition dazu, dass sich das Transposon am Ende des Prozesses an einer Stelle im Genom befindet an der es sich vorher nicht befand. Viele Transposons werden effektiv an einer Stelle des Genoms herausgeschnitten (Abbildung 15) und an einer anderen Stelle wieder eingesetzt (Abbildung 16). Andere Transposons hingegen kopieren sich selber und während das ursprüngliche Transposon weiterhin an der ursprünglichen Position im Genom verbleibt, wird die Kopie zusätzlich noch an einem neuen Ort im Genom eingesetzt. Unabhängig davon um welche Arten eines Transposons es sich handelt, wird die Transposon-DNA, die sich bereits vor dem Sprung im Genom befindet, als Donor-DNA und die DNA, in die das Transposon hineinspringt, als Empfänger-DNA bezeichnet. Im klassischen Transpositions-vorgang durchtrennt das Transposase-Enzym die DNA an den Flanken der Transposonsequenz und inseriert diesen herausgelösten DNA-Abschnitt in die Empfängersequenz. Die Details dieses Mechanismus hängen von der Art des Transposons

ab. Bei einigen Transposonarten wird die Transposon-DNA während der Transposition tatsächlich komplett von der umgebenden DNA getrennt. Bei anderen Transposonarten hingegen bleiben die unterschiedlichen DNA-Abschnitte während der gesamten Transposition miteinander verknüpft. Die Transposition ist genau reguliert und findet nur relative selten statt. Ein unkontrolliertes Transposon würde sich sehr schnell über das gesamte Genom der Wirtszelle verbreiten und so die Überlebenschancen der Wirtszelle (und somit seine eigenen Überlebenschancen) drastisch reduzieren. Transposons haben daher sehr ausgeklügelte Mechanismen um sicherzustellen, dass eine Transposition nur selten stattfindet und dass dabei die Wirtszelle nicht zerstört wird. Je nach Art des Transposons findet eine Transposition nur alle 10^3 bis 10^8 Zellteilungen statt. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmtes Transposon in ein Gen springt und dieses inaktiviert ist oft kaum höher als die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Gen durch eine andere Art von Mutation inaktiviert wird.

Transposition

Transposons sind mobile DNA Elemente die von einem Ort in der DNA zu einem anderen „springen“, also transposieren können. Dieser Prozess wird durch spezifische Enzyme, sogenannte Transposasen katalysiert. Diese Transposasen erkennen die terminal repeats genannten Sequenzabschnitte in der Transposon Sequenz, schneiden das Transposon inklusive dieser terminal repeats aus der DNA aus und fügen es an einem neuen DNA locus wieder ein. Die Transposase Enzyme die heute in den drei Domänen des Lebens (Bakterien, Archean und Eukaryoten) gefunden werden sind sich einander überraschend ähnlich. Dies deutet darauf hin das sowohl Transposase Gene als auch Transposons insgesamt immer wieder zwischen unterschiedlichen Spezies und sogar von einer Domäne in eine andere springen konnten.

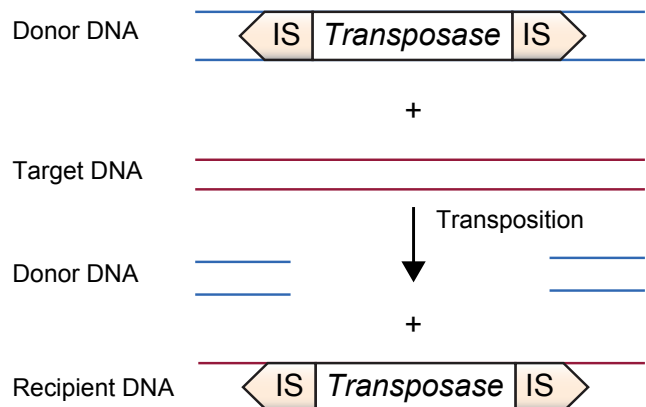


Abbildung 14: Überblick der Transposition.

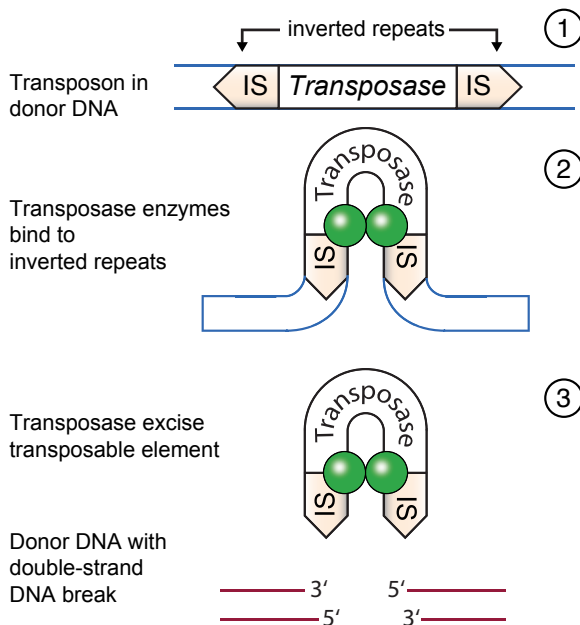


Abbildung 15: Transposon Excision:

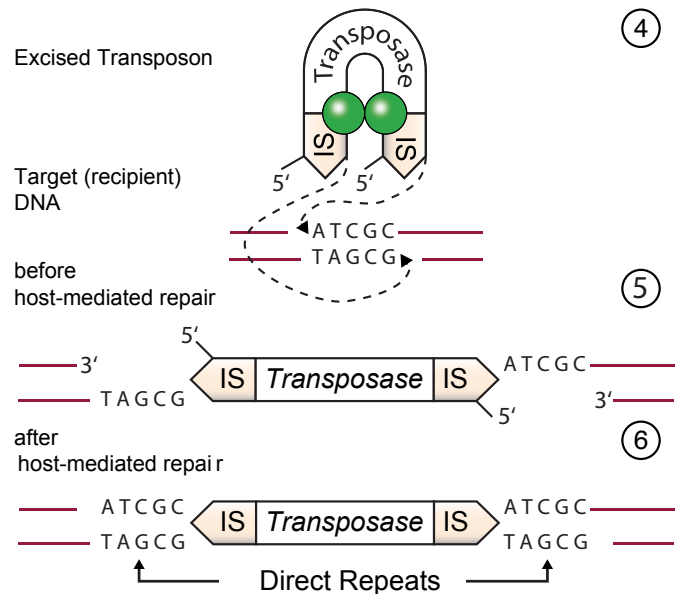


Abbildung 16: Transposon Insertion:

Schematischer Ablauf einer Transposition: Schritt 1: Die inverted repeat Sequenzen (IS) werden durch die im Transposon kodierten Transposase Enzyme (grün) erkannt. Schritt 2: Durch Anbinden der Transposase Enzyme an die inverted repeat Sequenzen und das dadurch unterstützte Paaren dieser Sequenzen formt sich eine „Synapse“. Schritt 3: Die Transposase Enzyme schneiden die Transposon Sequenz aus dem Doppelstrang der Donor-DNA. Schritt 4: Das Empfänger-DNA wird durchtrennt und es entstehen kurze Einzelstrangüberhänge. Schritt 5: Die Transposon Sequenz wird in die Empfänger DNA eingesetzt. Schritt 6: Die entstandenen Einzelstrangabschnitte werden durch DNA Polymerasen gefüllt wodurch kurze direct repeat Sequenzen an den Flanken des Transposons entstehen. Die Details des hier gezeigten Mechanismus sind von Transposon zu Transposon unterschiedlich. Z.B. entsteht nicht immer ein völlig vom Doppelstrang getrenntes Transposon und nicht immer entsteht ein Doppelstrangbruch in der DNA.

Die Transposon-Mutagenese

In der Transposon-Mutagenese werden Transposons als experimentelles Werkzeug benutzt. Bei dieser Art der Mutagenese lässt man Transposons per Zufall in das Genom eines Bakteriums springen (Abbildung 17). Das Gen in dem das Transposon landet wird dabei in der Regel unterbrochen, so dass das Genprodukt nicht mehr funktionsfähig ist. Der grosse Vorteil der Transposon-Mutagenese ist, dass das Gen welches durch das Transposon inaktiviert wurde, nun durch die Transposonsequenz markiert ist. Da die Sequenz des Transposons bekannt ist, kann man so mittels Klonierung

oder PCR und NGS-Methoden (Next-Generation Sequenzierungsmethoden) die das Transposon flankierenden Sequenzen bestimmen und so direkt das inaktivierte Gen identifizieren. Die Details der dabei verwendeten Methoden sind weiter unten im Detail beschrieben. In der Regel verwendet man für die Transposon-Mutagenese auch Transposons, die neben den für die Transposition notwendigen Enzymen ein selektierbares Gen enthält (z.B. ein Gen, das Resistenz gegen ein Antibiotikum vermittelt). Dies erlaubt dann die Selektion von Bakterien, in denen ein Transposon integriert wurde.

Nicht alle natürlich vorkommenden Transposons eignen sich gleich gut als Werkzeug für die Transposon-Mutagenese. Um für diesen Zweck nützlich zu sein, sollte das Transposon folgende Eigenschaften haben:

1. Die Transposition sollte mit relativ hoher Frequenz stattfinden. So erhält man viele Mutanten.
2. Das Transposon sollte keine besonders hohe Selektivität für die Empfänger-Sequenz aufweisen. So werden alle Gene der Wirtszelle mit etwa gleicher Wahrscheinlichkeit ausgeschaltet.
3. Das Transposon sollte ein selektierbares Gen enthalten. Dies ermöglicht die Selektion der mutierten Bakterien.
4. Das Transposon sollte zwischen vielen unterschiedlichen Bakterienarten transposieren. Dies ermöglicht die Nutzung in unterschiedlichen Bakterienarten.

Das Tn5 Transposon erfüllt alle diese Eigenschaften. Es transponiert mit hoher Frequenz, besitzt kaum Selektivität für die Empfängersequenz und ist in fast allen gram-negativen Bakterien aktiv. Darüber hinaus trägt Tn5 ein Gen für Kanamycin-Resistenz das in fast allen gram-negativen Bakterien exprimiert wird. Die Anwendung von Tn5 für die Transposon-Mutagenese von gram-negativen Bakterien mit *E. coli* als Donorstamm ist in Abbildung 17 schematisch dargestellt.

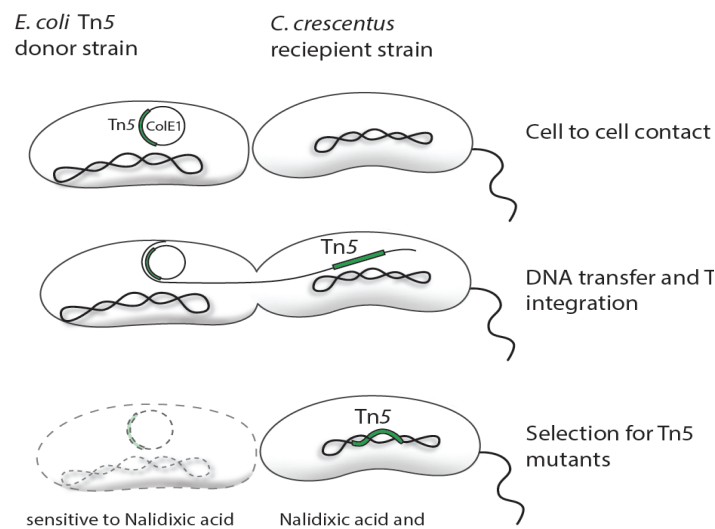


Abbildung 17: Mutagenese mit dem Tn5 Transposon. Gezeigt ist die Standardvorgehensweise für die Transposon Mutagenese eines gram-negativen Bakterienstamms. Die Donor-Bakterien (*E. coli*) enthalten ein ColE1-basiertes Plasmid das sich nur in *E. coli* vermehren kann. Durch Zell-zu-Zell Kontakt wird das Plasmid in das Empfänger-Bakterium (*C. crescentus*) übertragen. Das Tn5 Transposon mit dem darin enthaltenen Kanamycin-Resistenzgen springt in das Genom der Empfängerzelle und das ColE1 Plasmid geht verloren. Auf einem Wachstumsmedium das sowohl Nalidixinsäure (dies tötet die *E. coli* Zellen ab) und Kanamycin enthält wachsen dann nur solche Zellen in denen das Tn5 Transposon in das Genom der Empfängerzellen inseriert wurde. Empfängerzellen die kein Plasmid erhalten haben oder in denen das Transposon nicht vom Plasmid in das Genom gesprungen ist können sich nicht vermehren. Letzteres ist der Fall weil sich das Plasmid mit dem Kanamycin-Resistenzgen nur in *E. coli* repliziert und so von der Empfängerzelle nicht an den Nachwuchs weitergegeben werden kann.

Klassische in vivo Transposon-Mutagenese

In der klassischen in vivo Transposon-Mutagenese werden Transposons, die ein Resistenzgen enthalten, von einem Donorbakterium (zumeist *E. coli*) auf ein Empfängerbakterium (nicht *E. coli*) übertragen (Abbildung 17). Dazu wird das Transposon in ein spezielles Plasmid kloniert, das sich nur im Donorbakterium, aber nicht im Empfängerbakterium, vervielfältigen kann.

Dieses Plasmid wird dann z. B. durch Konjugation in das Donorbakterium eingeschleust. Dazu lässt man die Donor- und Empfängerbakterien gemeinsam im selben Medium wachsen was zur Ausbildung von Zell-Zell Kontakten führt, über welche das Plasmid vom Donorbakterium auf das Empfängerbakterium übertragen werden kann. Das Plasmid kann im Empfängerbakterium aber nicht vervielfältigt werden. Eine stabile Vererbung der Resistenz im Empfängerbakterium ist also nur dann möglich, wenn das Transposon mit dem in ihm enthaltenen Resistenzgen vom Plasmid in das Genom der Empfängerzelle springt.

Durch Selektion in einem antibiotikahaltigem Wachstumsmedium erhält man also eine Population von Empfängerzellen, die jeweils an unterschiedlichen Stelle in ihrem Genom ein Transposon enthalten und in denen das jeweilige vom Transposon getroffene Gen mit grösster Wahrscheinlichkeit inaktiviert ist. Durch Anwendung entsprechender Wachstumsbedingungen muss man nun nur noch die Donorbakterien entfernen.

So erhält man eine Population von Bakterien in denen jeweils ein Gen inaktiviert ist und dieses inaktivierte Gen durch die Sequenz des Transposons markiert ist. Die so erzeugte Population von

Mutanten kann nun nach Zellen gescreent werden, die den gewünschten Phänotyp aufweisen. Ist eine entsprechende Zelllinie identifiziert, kann man das in dieser Zelllinie inaktivierte Gen nun sehr leicht bestimmen, weil es ja durch das Transposon markiert ist.

Dazu fragmentiert man traditionell das Genom der im Screen identifizierten Zelllinien und kloniert diese Fragmente in sogenannten Cloning-Vektoren. Durch Selektion mit dem im Transposon codierten Resistenzgen kann man dann diejenigen Vektoren isolieren, in denen Transposon enthaltende Fragmente kloniert sind. Neben dem Transposon selber enthalten die im Vector klonierten Fragmente in der Regel auch noch die das Transposon flankierenden DNA-Sequenzen. Und genau diese flankierenden Sequenzen stammen ja von dem Gen, in welches das Transposon hinein gesprungen ist. Durch Sequenzieren der so isolierten Fragmente und die Art von Datenbanksuche die Sie bereits im Bioinformatikteil dieser Vorlesung kennen gelernt haben, kann man also das vom Transposon inaktivierte Gen sofort bestimmen. Man umgeht so den aufwendigen Mappingprozess, der zur Auffindung von konventionellen Mutationen (z.B. Punktmutationen) nötig ist.

Diese Vereinfachung ermöglicht es genetische Screens in einer Grössenordnung durchzuführen, die mit klassischen, auf Punktmutationen basierenden, Methoden unvorstellbar gewesen wären.

Transposon-Mutagenese und Next-Generation-Sequenzierung

In der oben beschriebenen Art und Weise wird die Transposon-Mutagenese jetzt seit einigen Jahrzehnten angewendet und ist vor allem durch ihre hohe Effizienz ein sehr wertvolles Werkzeug. Neuentwickelte Transposon-Konstrukte (Abbildung 18) in Kombination mit Next-Generation-Sequenzierungstechniken (NGS) haben nun die Effizienz der Transposon-Mutagenese abermals dramatisch gesteigert, so dass nun Hunderttausende Transposon-Mutanten in einem einzigen Experiment analysiert werden können.

In dieser neuen Variante der Transposon-Mutagenese wird die ursprünglich verwendete und noch recht arbeitsintensive Isolierung der Transposon-enthaltenden DNA-Fragmente mittels Klonierung und Antibiotika-Selektion (siehe oben) durch eine simple PCR-Reaktion ersetzt. In dieser PCR wird ein Teil des Transposons zusammen mit der flankierenden genomischen DNA selektiv amplifiziert (Abbildung 19 & 20). Das Problem bei diesem PCR-Schritt ist die Auswahl der Primer. Man kennt zwar die Sequenz des Transposons, kann also den ersten der PCR-Primer problemlos entwerfen. Die Sequenz der flankierenden DNA ist aber noch unbekannt, es ist ja genau die Sequenz die man in diesem Experiment bestimmen will. Als zweiten Primer verwendet man daher keinen spezifischen sondern einen „unspezifischen“ (engl. arbitrary) Primer. Ein solcher unspezifischer Primer besteht aus einer sorgfältig ausgewählten 5 Nucleotide

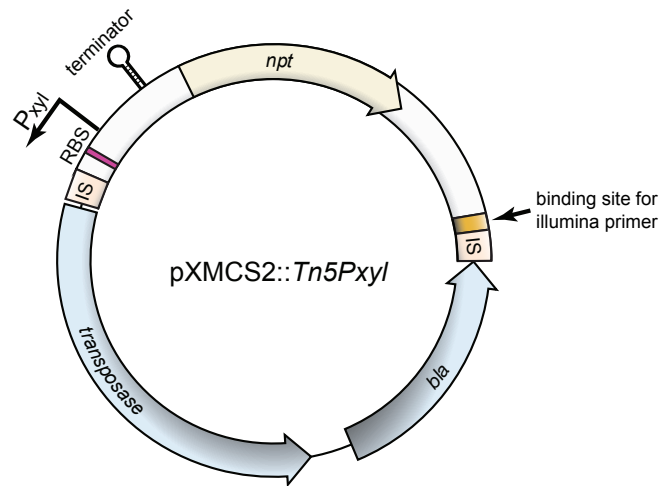


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Transposon-delivery Plasmids pXMCS2::Tn5PxyI. Im Gegensatz zu natürlichen Transposons liegt das für die Transposition notwendige Transposase Enzym ausserhalb der inverted repeats. Das Transposase Gen wird also nicht in das Empfänger-genom übertragen. Hingegen liegt das Gentamicin Resistenzgen zwischen den inverted repeats und wird so in das Empfänger-genom transferiert.

langen 5'-Sequenz (TGCGG), von der man weiss, dass sie in bakteriellen Genomen ca. alle 200 Basenpaare einmal auftritt. Diese Sequenz, die bei allen Primern gleich ist, wird gefolgt von einem 10 Nucleotide langen Abschnitt mit zufällig ausgewählten Nucleotiden, die bei jedem der Primermoleküle unterschiedlich ausfällt. Zusätzlich dazu enthält dieser Primer noch einen 5'-Sequenztag, der dann in einer zweiten PCR-Phase wichtig wird.

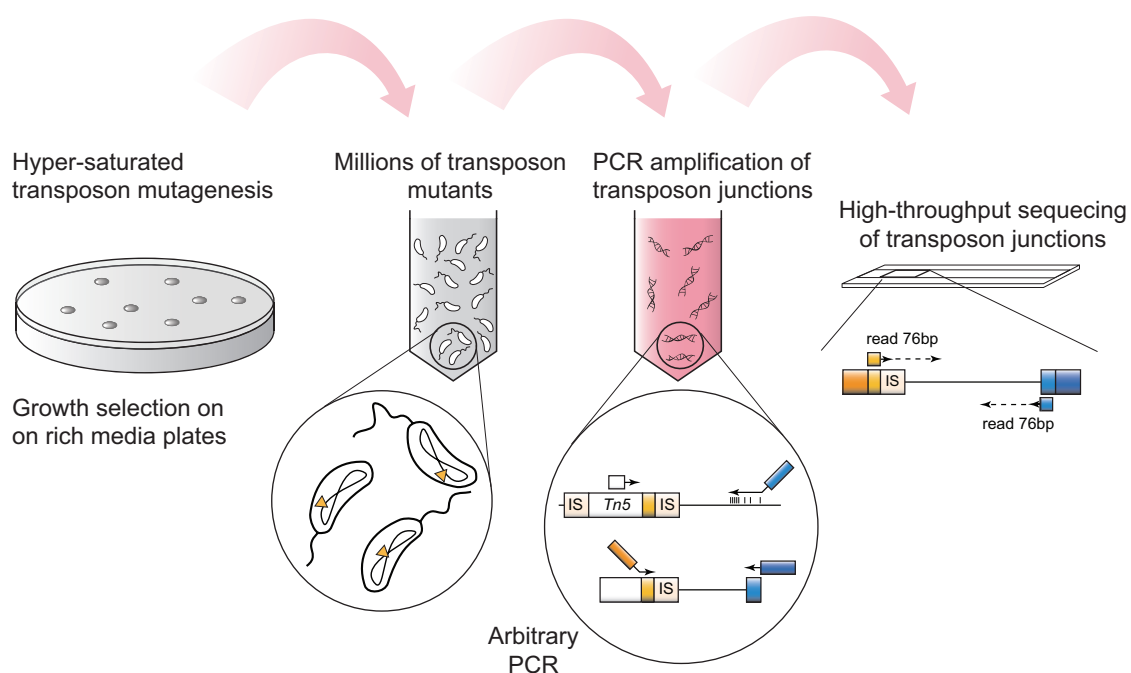


Abbildung 19: Schematische Abbildung einer modernen auf semiarbitrary PCR und Next-Generation Sequenzierungstechnologie basierenden Transposon-Mutagenese Strategie.

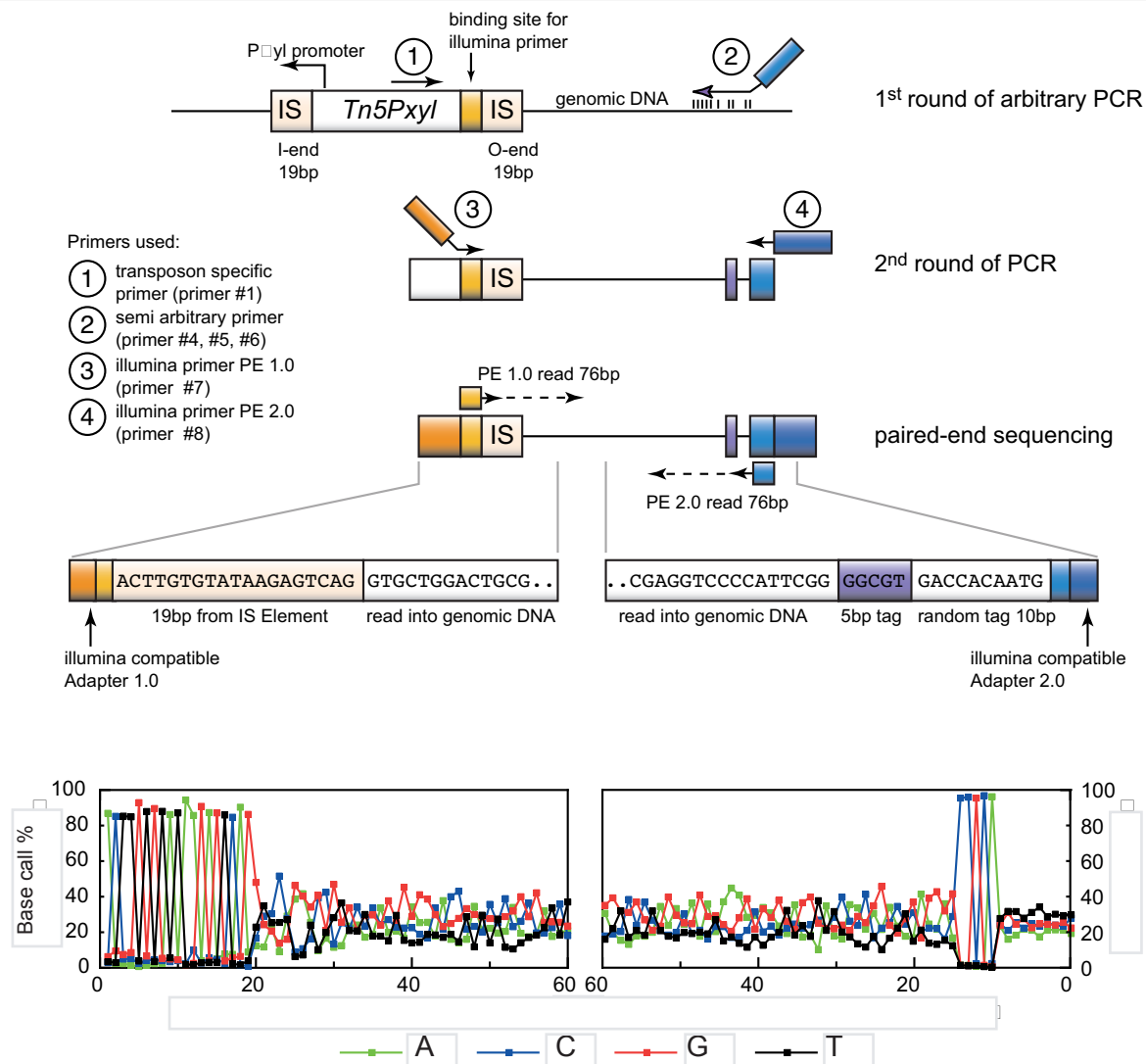


Abbildung 20: Schematische Darstellung der PCR- und Sequenzierschritte zur Bestimmung der die Transposons flankierenden DNA Sequenzen. Eine detaillierte Beschreibung des Prozesses findet sich im Haupttext.

Die gesamte PCR-Strategie ist in Abbildung 20 dargestellt. In der ersten Phase der PCR wird der unspezifische Primer (Primer 2) zusammen mit dem Transposon spezifischen Primer (Primer 1) verwendet. Diese erste PCR-Phase amplifiziert nur solche PCR-Produkte, die sowohl das Ende der Transposon-Sequenz, als auch einen kurzen Abschnitt der flankierenden genomischen DNA, enthalten. In der zweiten Phase der PCR verwendet man dann einen Primer (Primer 4), der den Sequenztag des in der ersten Phase verwendeten unspezifischen Primers 2 erkennt, zusammen mit einem Primer, der eine nahe am Ende des Transposon gelegene Sequenz erkennt. Die so erhaltenen PCR-Produkte werden dann durch NGS-Methoden sequenziert.

Diese PCR-Strategie mag auf dem Papier etwas kompliziert anmuten, ist in der Praxis aber denkbar einfach und effizient durchzuführen. Man entnimmt einfach eine Probe bakterieller Zellen aus einer Kolonie oder aus einer flüssigen Bakterienkultur und mischt diese direkt mit einem vorbereiteten PCR Cocktail. Die nachfolgenden PCR- und Sequenzierungsschritte sind stark parallelisiert und weitest-

gehend automatisiert. So ist es möglich, mehrere Hunderttausend Transposon Mutanten in einem einzigen Experiment zu kartieren. Dadurch wurde es möglich Transposon Mutanten für jedes nicht essenzielle Gen eines Organismus zu erzeugen. Solche mutant libraries stellen eine sehr wertvolle Ressource für genetische Experimente dar. Ausserdem kann man mit dieser neuen high-throughput Transposon-Mutagenese nicht nur viele isolierte Zelllinien analysieren, sondern auch gemischte Bakterienpopulationen untersuchen. In diesen Experimenten generiert man zunächst durch Transposon-Mutagenese eine Population von Zellen, in denen per Zufall inserierte Transposons in jeder Zelle ein oder mehrere Gene inaktivieren. Man erstellt dann mittels der oben beschriebenen high-throughput Methode ein Profil der in dieser Zellpopulation vorgefundenen inaktivierten Gene. Anschliessend lässt man dieselbe Zellpopulation unter speziellen Bedingungen wachsen, erstellt abermals ein Profil der inaktivierten Gene und vergleicht dieses zweite Profil mit dem ursprünglichen Profil.

Zum Beispiel könnte man eine solche Zellpopulation zunächst auf einem vollständigen Wachstumsmedium (engl. rich media) wachsen lassen und ein erstes Profil der inaktivierten Gene erstellen. Dann könnte man diese Zellpopulation in ein minimal Medium transferieren, das nur essenzielle Mineralien und eine einfache Kohlenstoffquelle enthält.

Zellen, in denen Gene, die für das Wachstum auf minimal Medium absolut notwendig sind, durch Transposons inaktiviert sind, könnten sich unter diesen Bedingungen nicht vermehren und würden deshalb aus der Population verschwinden. Wenn man dann von den überlebenden Zellen wieder ein Profil der inaktivierten Gene erstellen würde, könnte man also durch Vergleich mit dem ersten Profil all diejenigen Gene identifizieren, die für das Wachstum auf minimal Medium essentiell waren. Dieses Vorgehen kann relativ einfach auf eine ganze Reihe von Wachstumsbedingungen angewendet werden (z.B. Wachstum in einem Biofilm oder in einem infizierten Tier oder einer Pflanze).

Literaturverzeichnis:

Fachbücher:

L. Snyder et al. *Molecular Genetics of Bacteria*, 4th edition, 2013, ASM Press.

J.W. Dale, S.F. Park, *Molecular Genetics of Bacteria*, 5th edition, 2010, Wiley-Blackwell

M.T. Madigan et al. *Biology of Microorganisms*, 9th edition 2005, Prentice Hall International, Inc

Publikationen:

Weng, X., & Xiao, J. (2014). Spatial organization of transcription in bacterial cells. *Trends Genet.*, 30(7), 287–297. doi:10.1016/j.tig.2014.04.008

Shapiro, L., & Losick, R. (1997). Protein localization and cell fate in bacteria. *Science*, 276(5313), 712–718.

Shapiro, L. (2012). Life in a three-dimensional grid. *The Journal of biological chemistry* (Vol. 287, pp. 38289–38294). American Society for Biochemistry and Molecular Biology. doi:10.1074/jbc.X112.422337

Chisten, M., Kulasekara, H. D., Christen, B., Kulasekara, B. R., Hoffman, L. R., & Miller, S. I. (2010). Asymmetrical distribution of the second messenger c-di-GMP upon bacterial cell division. *Science*, 328(5983), 1295–1297. doi:10.1126/science.1188658

Christen, B., Abeliuk, E., Collier, J. M., Kalogeraki, V. S., Passarelli, B., Collier, J. A., et al. (2011). The essential genome of a bacterium. *Mol. Syst. Biol.*, 7(1), 528–528. doi:10.1038/msb.2011.58

Benders, G. A., Noskov, V. N., Denisova, E. A., Lartigue, C., Gibson, D. G., Assad-Garcia, N., et al. (2010). Cloning whole bacterial genomes in yeast. *Nucleic Acids Research*, 38(8), 2558–2569. doi:10.1093/nar/gkq119

Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. (2010). *Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome.*, 329(5987), 52–56. doi:10.1126/science.1190719