

# Reverse Transkription, Rekombination, Transposition

Hans-Georg Kräusslich, Abteilung Virologie  
<http://virology.hyg.uni-heidelberg.de>  
27.06.06

## Retro- und Pararetroviren

Reverse Transkription

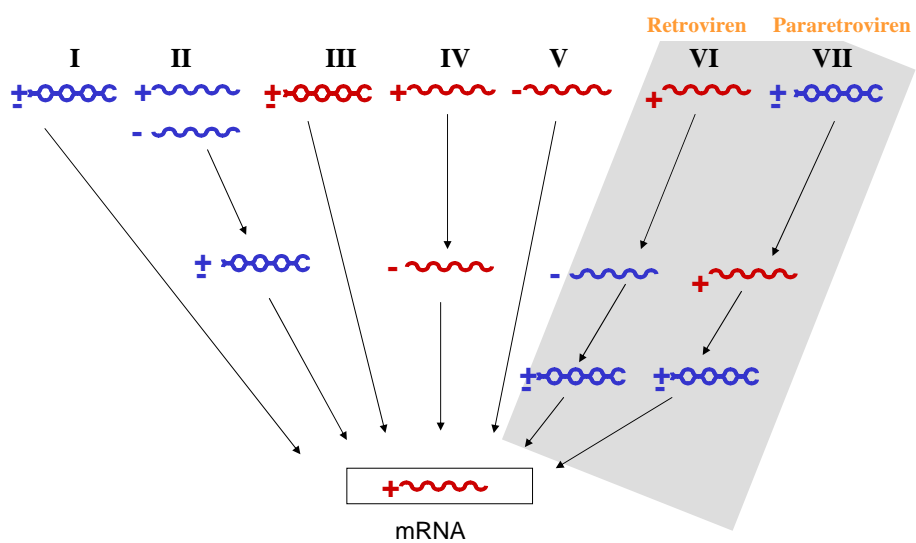
Integration

Rekombination

## Retroelemente

## Rekombination bei RNA-Viren

## Virale Replikationsstrategien („Baltimore-Schema“)



## Retro- und Pararetroviren

### Retroviren:

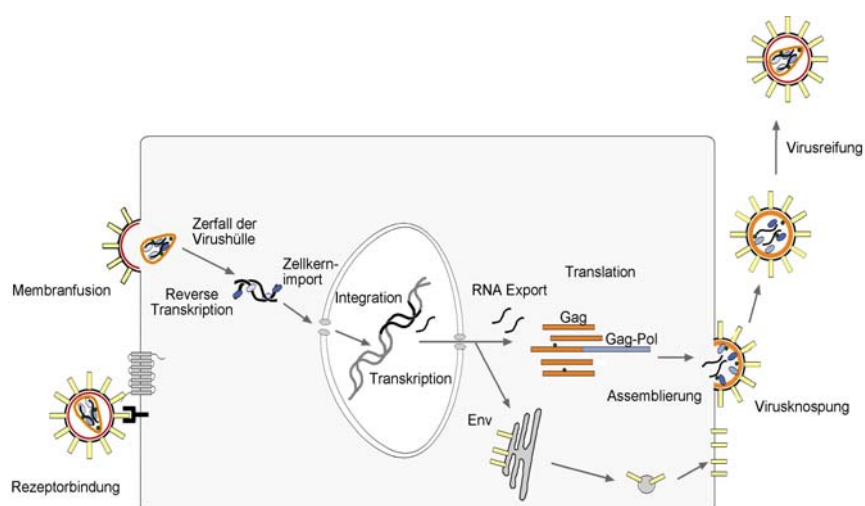
In einer Vielzahl von Wirtsorganismen, z.B.:

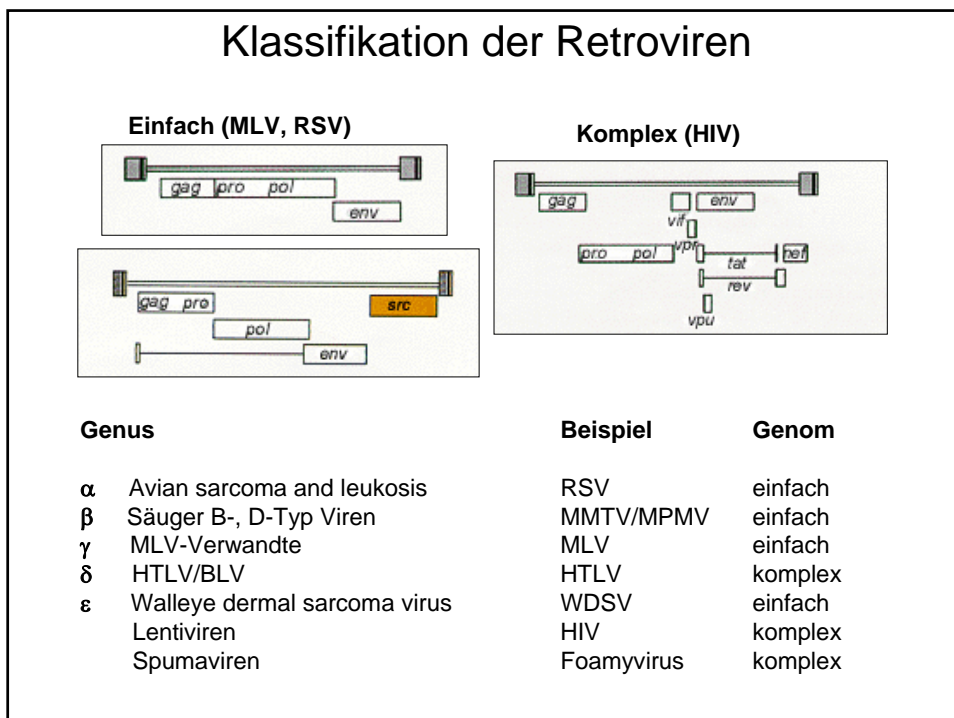
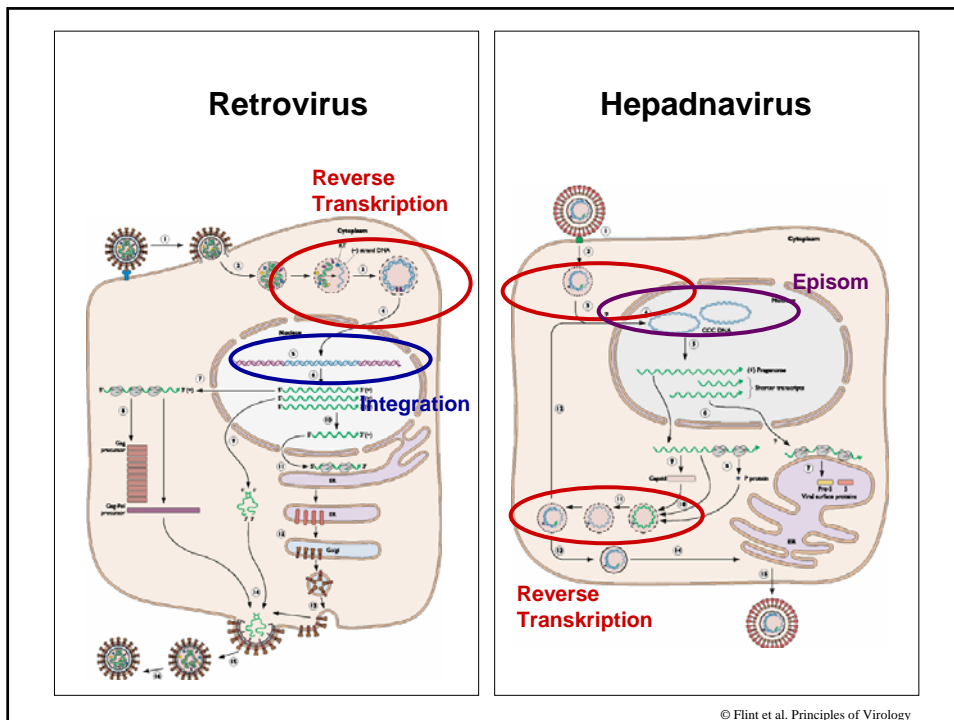
- Rous Sarkom Virus (Huhn)
- Mäuse Leukämie Virus (Maus)
- Mouse Mammary Tumor Virus (Maus)
- menschliche Retroviren (HIV und HTLV)
- Gypsy (Drosophila)
- endogene Retroviren (IAP, PERVs, HERVs)

### Pararetroviren:

- Hepadnaviren (HBV, DHBV)
- Caulimoviren

## Retroviraler Replikationszyklus (HIV)

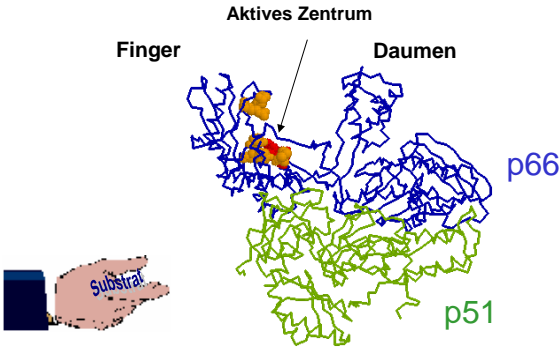




# HIV Reverse Transkriptase

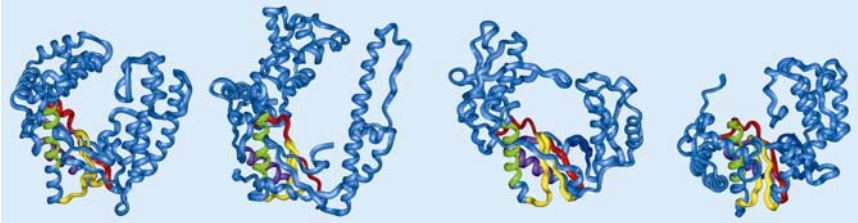
RT ist Teil des POL-Polyproteins

HIV-1 RT Heterodimer:



Polymerasen sind strukturell miteinander verwandt

Klenow      T7 RNAP      HIV-1 RT      3D<sup>pol</sup>



© Flint et al. Principles of Virology

Die aktiven Zentren der Polymerase und RNaseH im RT-Heterodimer sind räumlich voneinander entfernt:  
Versetzte Aktivität an der RNA-Matrize

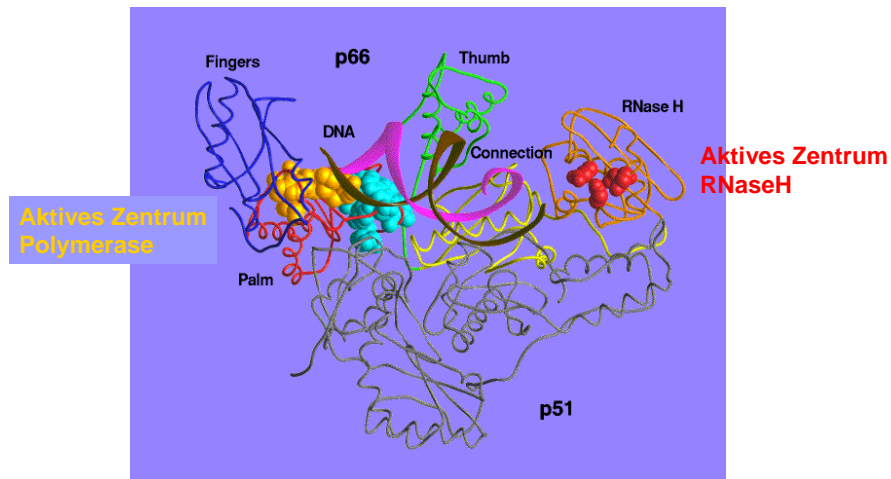
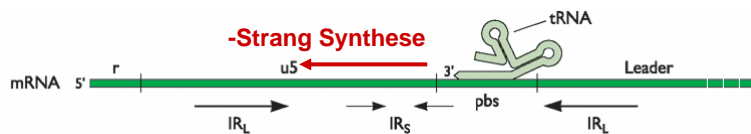


Bild: S. Hughes, NCI

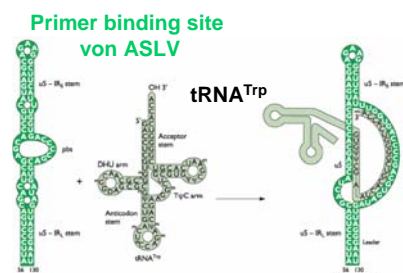
## Reverse Transkription ist Primer-abhängig

Retrovirale RT nutzen zelluläre tRNA als Primer

- Retroviren verpacken tRNA-Moleküle (ca. 100 Kopien; non-random)
- Die 3' terminalen 18 Basen einer bestimmten tRNA binden an das virale Genom

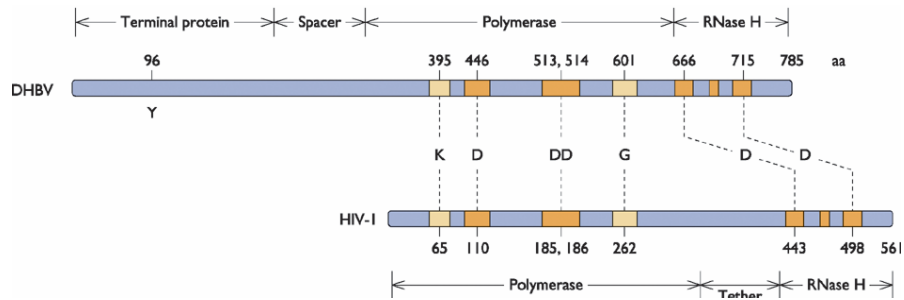


- Zur Bindung wird die tRNA-Struktur partiell entwunden (Beteiligung von NC?)
- Säuger-Retroviren: bevorzugt tRNA<sup>Pro</sup>, tRNA<sup>Lys3</sup>, tRNA<sup>Lys1,2</sup>



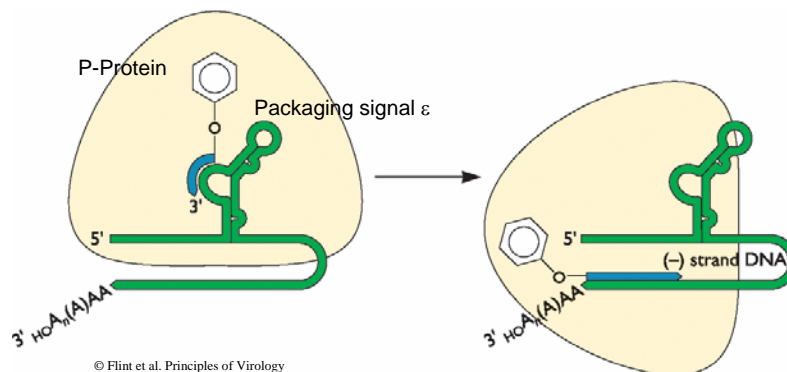
© Flint et al. Principles of Virology

## Vergleich der hepadnaviralen und retroviralen Polymerase



© Flint et al. Principles of Virology

Ein Tyrosinrest in der TP-Domäne des P-Proteins dient als Primer der reversen Transkription von Hepadnaviren



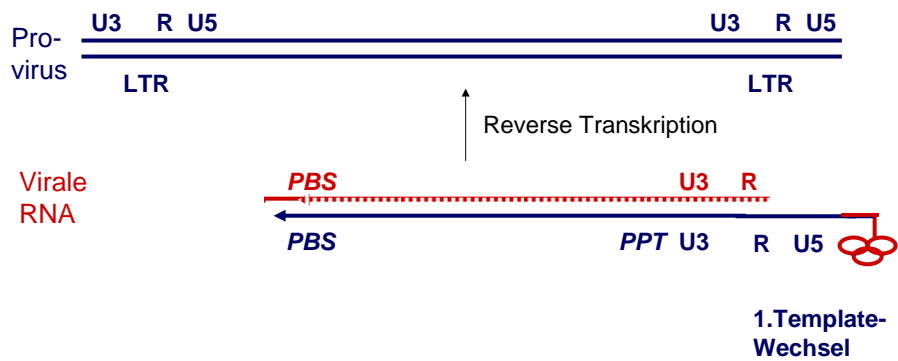
© Flint et al. Principles of Virology

Bindung des P-Proteins an das Verpackungssignal ist wichtig für Genomverpackung und für reverse Transkription

Das Terminale Protein bleibt kovalent am 5'-Ende des -Strangs gebunden

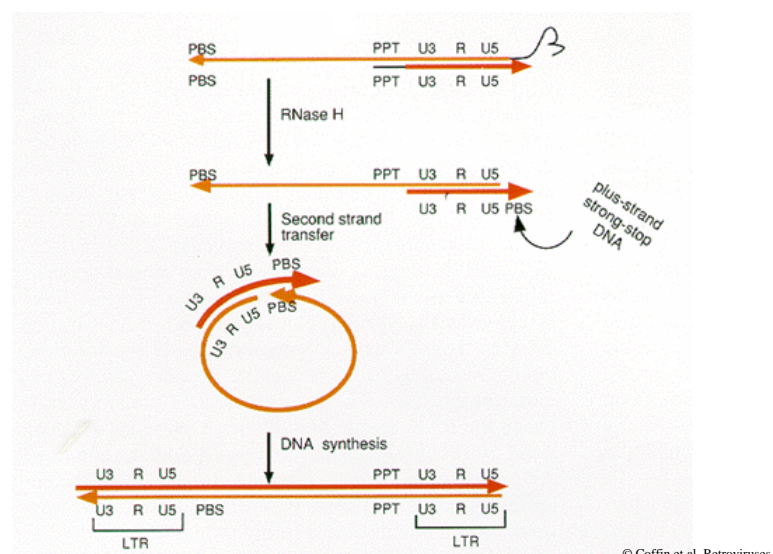
## Template-Wechsel bei der Reversen Transkription

### Minus-Strang



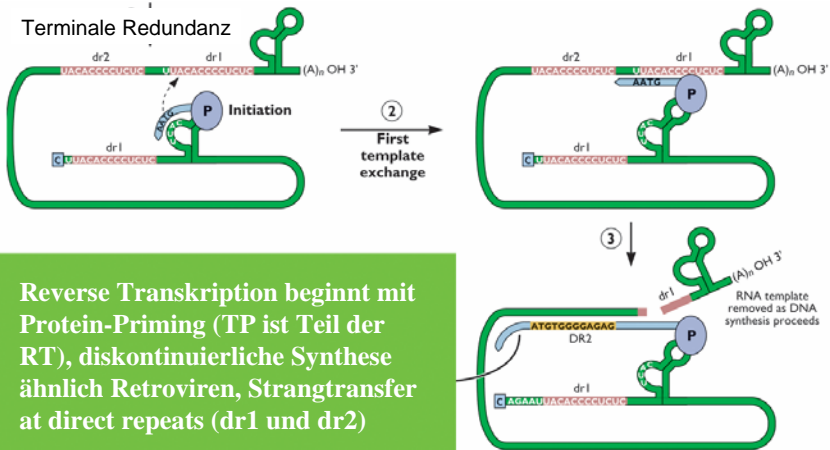
## Mechanismus der Reversen Transkription

### Plus-Strang-Synthese



## Hepadnavirus Reverse Transkription (I)

### Protein priming



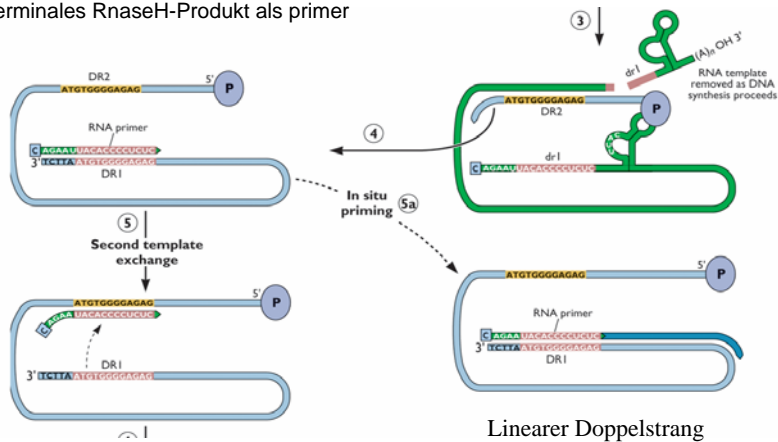
Reverse Transkription beginnt mit Protein-Priming (TP ist Teil der RT), diskontinuierliche Synthese ähnlich Retroviren, Strangtransfer at direct repeats (dr1 und dr2)

Abbau des templates durch RNaseH

© Flint et al. Principles of Virology

## Hepadnavirus Reverse Transkription (II)

### Terminales RnaseH-Produkt als primer



© Flint et al. Principles of Virology

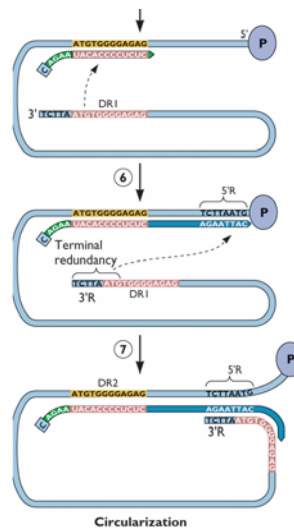


## Hepadnavirus Reverse Transkription (III)

Nach dem Strangtransfer des Plus-Strang-Primers wird bis zum 5' Ende der Matrize elongiert.

Dann erfolgt Strangtransfer vermittelt durch terminale Redundanzen (R)

Das Produkt ist eine zirkuläre DNA, die zunächst inkomplett bleibt und erst nach Infektion der Zielzelle komplettiert und kovalent geschlossen wird (cccDNA)



Adapted from Fig. 1 of J. W. Habig and D. D. Loeb, J. Virol. 76:

© Flint et al. Principles of Virology

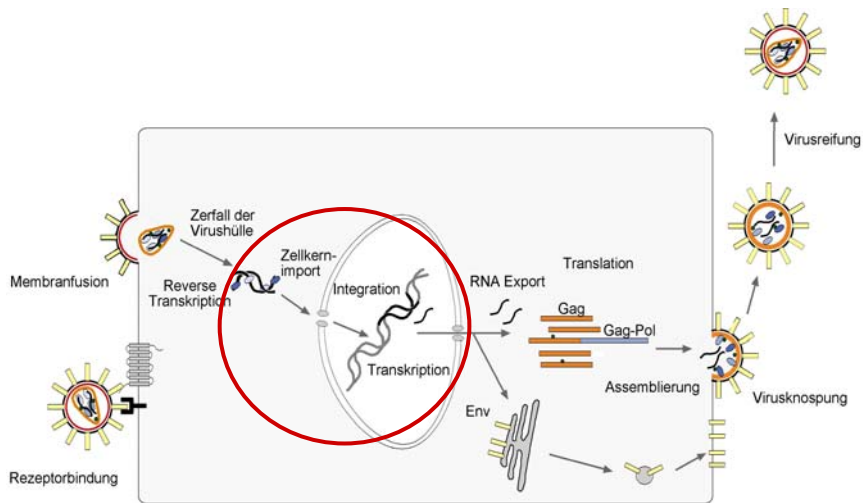
## Vergleich Reverse Transkription Retroviren - Hepadnaviren

### Gemeinsamkeiten:

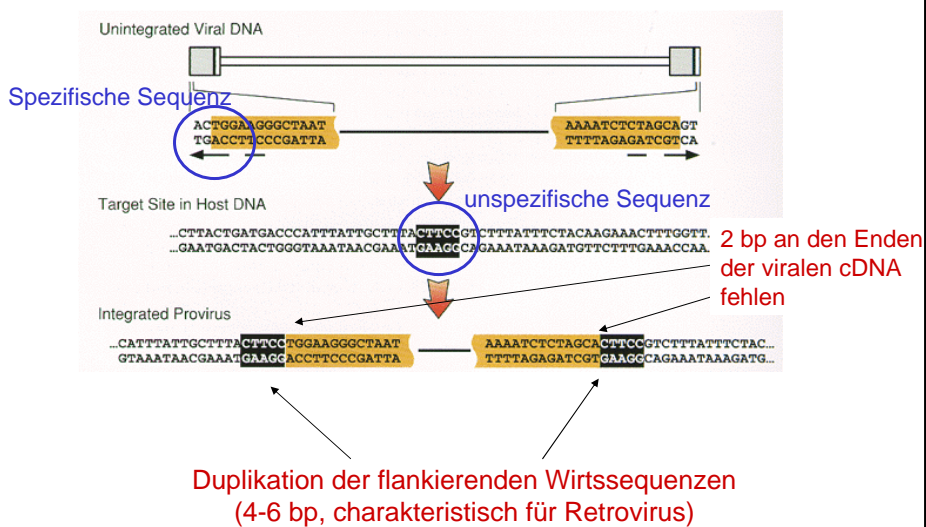
- Polymerase hat RT und RNaseH Aktivität
- Initiation der DNA-Synthese nahe dem 5'Ende des templates
- Transfer des naszierenden Strangs zu einer komplementären Sequenz am anderen Ende des Templates
- Rest des RNA templates dient als primer für die (-)Strang DNA Synthese
- Reverse Transkription findet innerhalb subviraler core-Partikel statt

	Retrovirus	Hepadnavirus
Genom im Partikel:	Überwiegend RNA	Unvollständige dsDNA
Reverse Transkription:	überwiegend nach Entry	vor der Partikelfreisetzung
(-)Strang primer:	tRNA	P-Protein
Endprodukt:	lineare dsDNA Provirus integriert im Wirtsgenom	zirkuläre dsDNA episomal im Zellkern

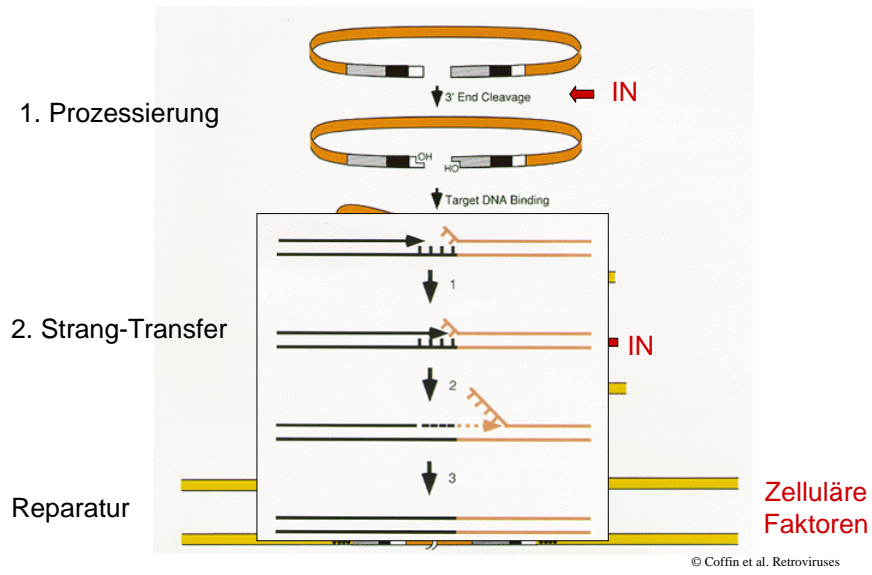
## Retroviraler Replikationszyklus (HIV) Integration



## Merkmale des integrierten Provirus



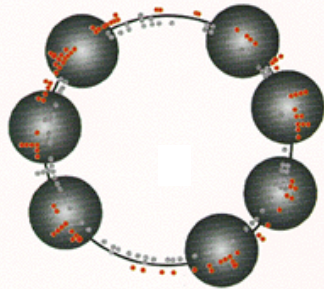
## Mechanismus der retroviralen Integration



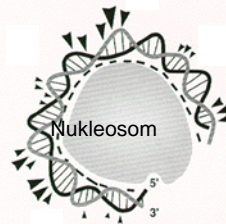
## Retrovirale Integration

- Retrovirale Genome integrieren in zelluläre Chromosomen
- Vermittelt durch IN und Enden der linearen viralen cDNA
- Sequenz-unspezifisch, aber beeinflusst durch nukleosomale Struktur
- Retrovirale Integration → Insertionsmutagenese mit möglichen pathogenen Folgen
  - Retrovirale Vektoren (franz. Gentherapie-Studie)!
  - Molekularbiologisches Werkzeug

## Nukleosomenstruktur beeinflusst Integrationspräferenz



**MLV-Integration in Minichromosom**  
MLV-Integration in nackte DNA  
(Pryciak et al., 1992)



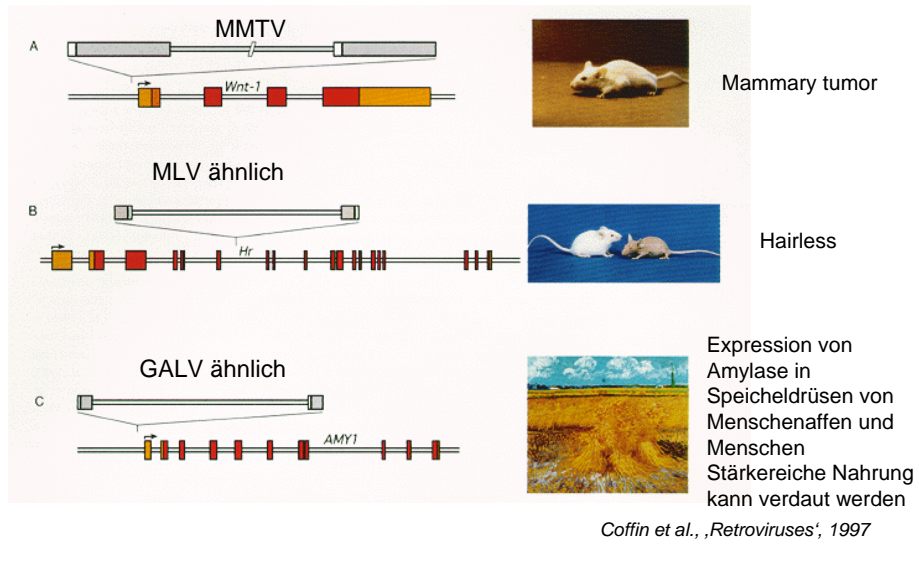
▶ HIV-Integration in vitro  
(Größe = Häufigkeit)  
(Pruss et al., 1994)

## Bevorzugung bestimmter Integrationsorte

(Bushman, Cell 2003)

LTR retrotransposons (Hefe)	Ty1	750 bp stromaufwärts von Pol-III Genen
	TY3	Transkriptionsstart von Pol-III Genen
	TY5	Heterochromatin an Telomeren
	Tf1	Stromaufwärts von Pol-II genen
Viren	HIV-1	Aktive Gene
	MLV	Promotoren von aktiven Genen
	AMV	Aktive Gene
Non-LTR Retrotransposon	LINE	Unspezifisch; Rearrangiert Integrationsort
DNA Transposon	Sleeping beauty	Vermeidet Alu-repeats

## Genetische Konsequenzen retroviraler Integration



## Parasitäre DNA-Elemente

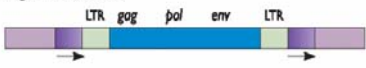
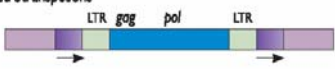



Ein großer Teil des eukaryontischen Genoms besteht aus Sequenzen, die sich von integrierten ‚Parasiten‘ ableiten

Bei Vertebraten sind das über 40% des Genoms

Der größte Teil entstand aus revers transkribierten Sequenzen

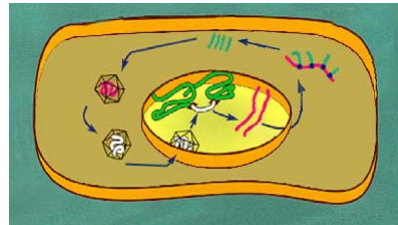
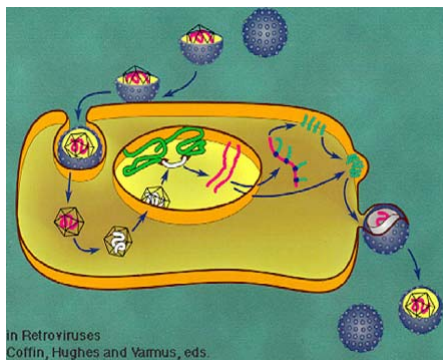
## Retroelemente im Eukaryontengenom

**Retroelemente machen ca. 5-10% des Säuger-genoms aus, weitere ca. 30% stammen von revers transkribierten Sequenzen ab**

	Merkmale	Beispiel	Kopien/Genom
<b>Endogenous retrovirus</b> 	RT, LTR, (Pol II Promotor), env	HERVs (Mensch) IAP (Maus)	1-100
<b>Retrotransposons</b> 	RT, LTR (Pol II Promotor)	Ty3 (Hefe)	$10^2$ - $10^4$
<b>LINEs</b> 	RT, internal Pro-motor, polyA	LINE1 (Mensch)	$10^4$ - $10^5$
<b>SINEs</b> 	Pol III Promotor, polyA	Alu (Mensch)	$10^5$ - $10^6$
<b>Processed pseudogenes</b> 	Kein Promotor, polyA	$\beta$ -Tubulin (Mensch)	1-100

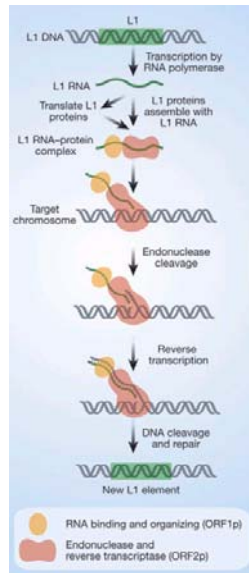
© Flint et al. Principles of Virology

## Lebenszyklus von Retrovirus und LTR-Retrotransposon



© Coffin et al. Retroviruses

## Retrotransposition des L1 Elements



Bushman, Nature 2004

## Mobile Elemente im menschlichen Genom

### 1. Transposon (Mariner)



### 2. Autonome Retrotransposons

#### LTR-tragende (HERV-K)

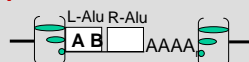


#### Non-LTR/Poly(A) (L1)

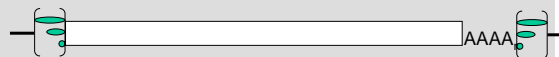


### 3. Nicht- Autonome Retrotransposons

#### Alu



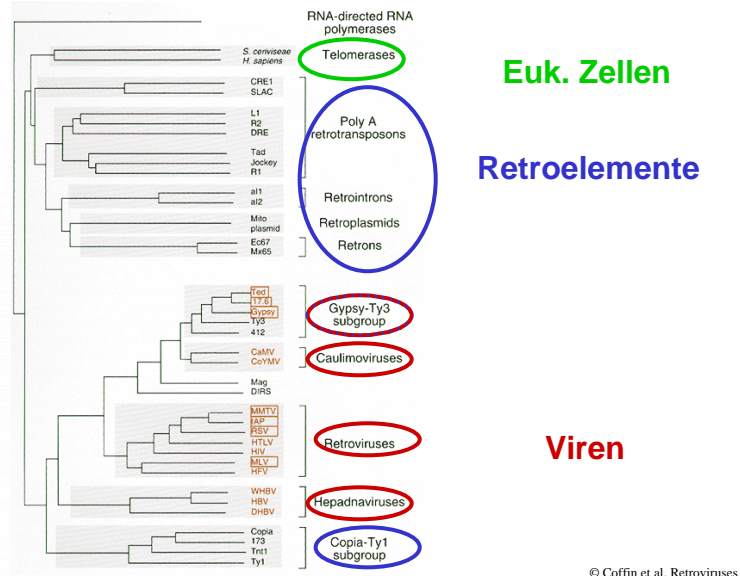
#### Prozessierte Pseudogene



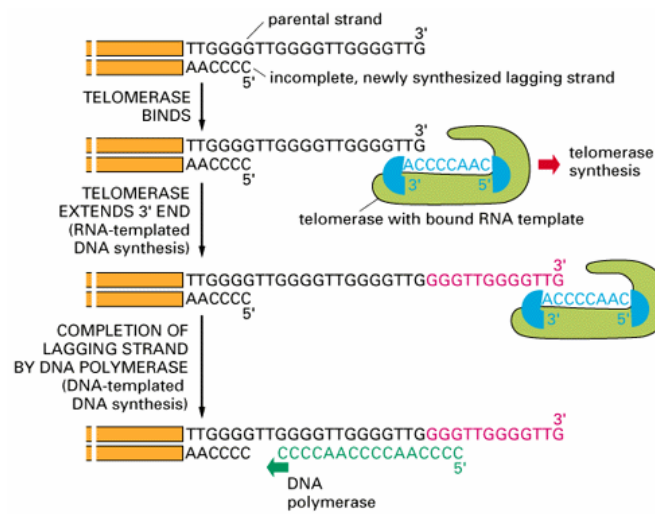
#### Retrovirales Provirus M-MuLV



## Verwandtschaft viraler und nicht-viraler RT



## Telomer-Replikation



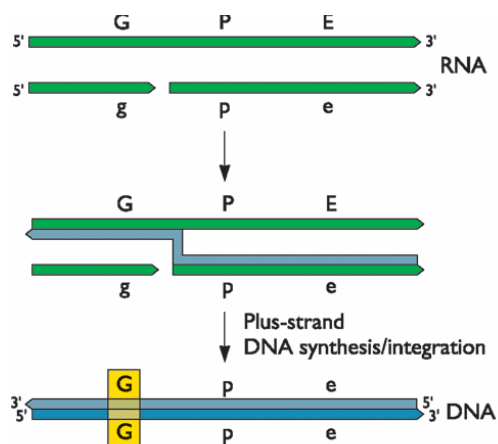


# RNA Rekombination

## Rekombination während der –Strang Synthese (copy-choice)

Heterozygotes  
Virusgenom

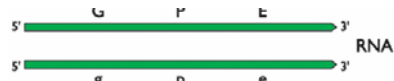
**-Strang Synthese an einem  
Template**  
**> Wechsel zum 2. Template**  
(bei Strangbruch, Pause  
oder zufällig)



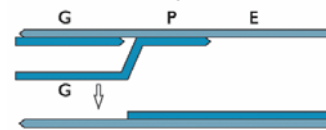
© Flint et al. Principles of Virology

## Rekombination während der +Strang Synthese (strand assimilation)

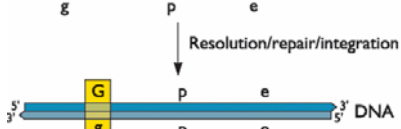
Heterozygotes Virusgenom



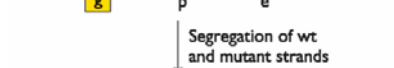
Synthese von 2 -Strängen



Strand displacement während der +Strang Synthese

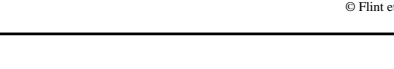


Verdrängter +Strang bindet an -Strang vom anderen template



➤ Doppelstrang mit Heteroduplex-Regionen

Resolution/repair/integration

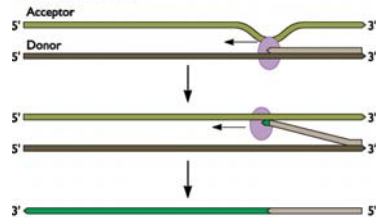


Segregation of wt and mutant strands

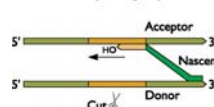
© Flint et al. Principles of Virology

## RNA-Rekombination (copy-choice)

### RNA recombination

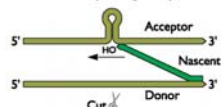


### Class 1: Base pairing dependent

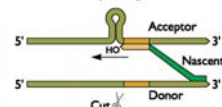


RNA-dependent RNA-polymerase  
internal pausing/termination  
or RNA breakage

### Class 2: Base pairing independent



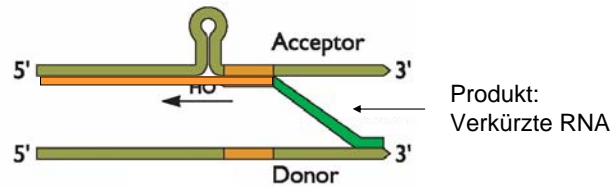
### Class 3: Base pairing assisted



© Flint et al. Principles of Virology

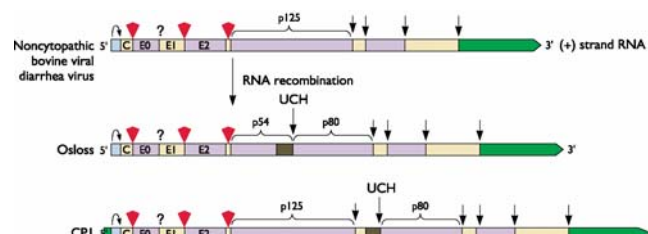
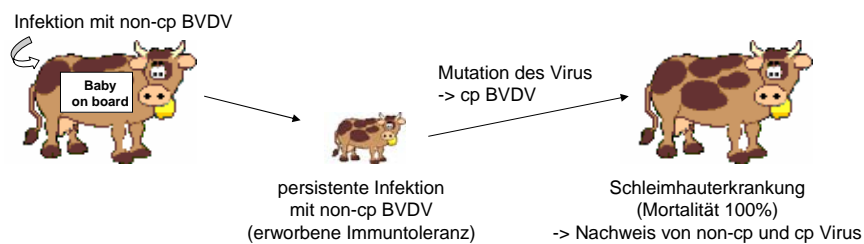
## Defective interfering RNAs

Durch Rekombination können RNAs mit Deletionen entstehen



- Kürzere RNA kann schneller replizieren
- Kompetiert mit dem Genom um RNA-Synthese Maschinerie (Akkumulation)
- Kann in Partikel verpackt werden, wenn fehlende Proteine durch vollständiges Helfervirus zur Verfügung gestellt werden
  
- Defekte interferierende Viren akkumulieren während der Replikation von (-) und (+)Strang RNA Viren  
Voraussetzung: hohe m.o.i. (= in vitro)
- Rolle in der Pathogenese?

## Die Pathogenität des BVDV ist assoziiert mit der Produktion des NS3-Proteins durch rekombinante cp Viren



© Flint et al. Principles of Virology

## RNA-Rekombination

- Rekombination erhöht die **genetische Vielfalt**
- **homolog** oder **nicht-homolog**  
Insertion zellulärer Sequenzen möglich
- erfordert Infektion mit **zwei oder mehr Viren**  
Ausnahme: Retroviren (**diploides** Genom erhöht Rekombinationsfrequenz)
- Mechanismus: **copy-choice**  
besonders in Regionen verlangsamer Polymerisation