

DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese (Koch)

Allgemeines:

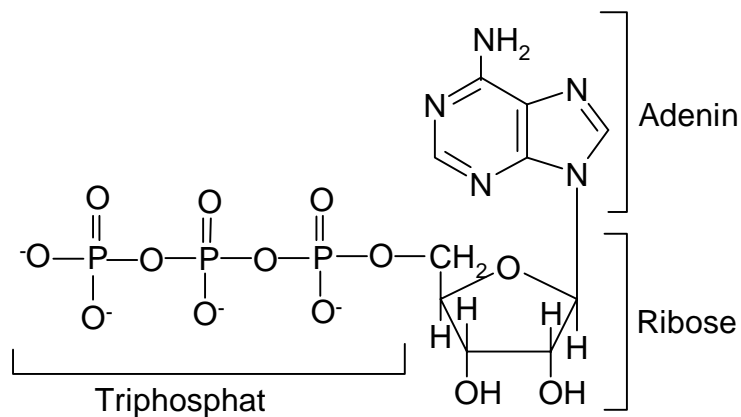
Es ist bekannt, dass aus der **DNA** durch **Transkription** die **RNA** und aus dieser durch **Translation Protein** wird. Durch **Replikation** wird die DNA verdoppelt.

Sowohl DNA als auch RNA bestehen aus **Nukleinsäuren**, die demnach das **genetische Material** darstellen. Den Beweis dazu lieferte *Avery 1944* durch den **Pneumokokken-Versuch**.

Dabei benutzte er **virulente S-Stämme** und **avirulente R-Stämme**. Zum Beweis, dass die DNA der Erbträger ist, versetzte er R-Stämme mit toten S-Stämmen, die biochemisch gereinigt wurden, wodurch die DNA freigelegt wurde. Durch Aufnahme der DNA wurden die R-Stämme ebenfalls virulent, was durch Impfen von Mäusen bewiesen wurde.

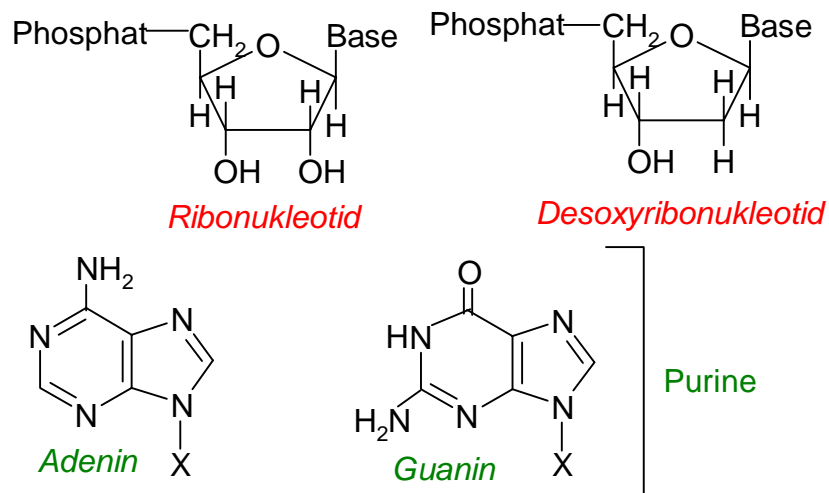
Außerdem fanden *A. D. Hershey* und *Martha Chase 1952* heraus, dass Bakteriophagen die DNA und nicht Proteine an ihre Nachkommen weitergeben.

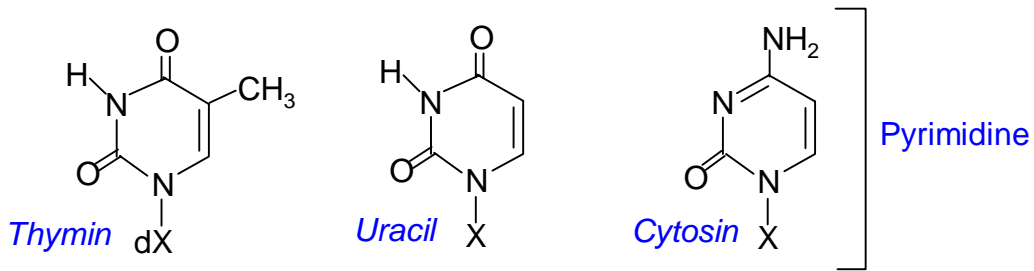
Die Bausteine von DNA und RNA sind **Nukleotide**, die aus **Nukleosiden (= Zucker + Base)** und **Phosphat** bestehen. Als Beispiel sei hier mal das ATP gezeichnet, wie es in der RNA vorliegt, wo beim Bindungsaufbau zwei Phosphatgruppen abgespalten werden:



DNA und RNA unterscheiden sich im Zucker (Ribose und Desoxyribose) und darin, dass in der DNA **Thymin statt Uracil** vorliegt.

Hier einige Formeln:



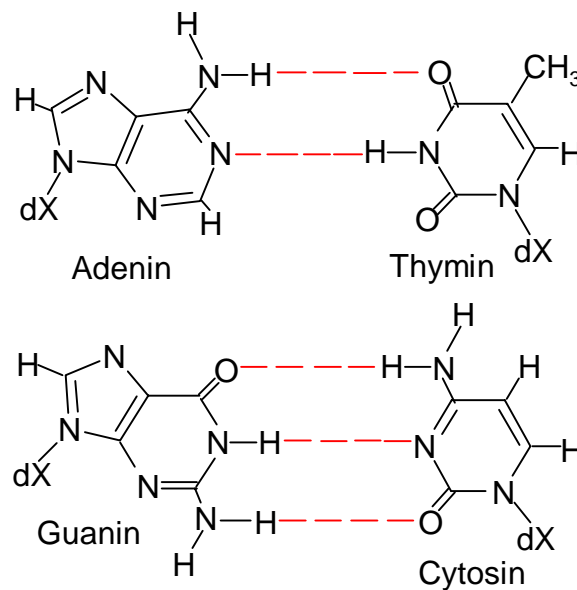


Verknüpft sind die Nucleotide über ihre Zuckerreste mit **Phosphodiesterbindungen**, und zwar die 5'-Phosphatgruppe mit der 3'-OH-Gruppe, wodurch auch die Orientierung von 5' zu 3' entsteht.

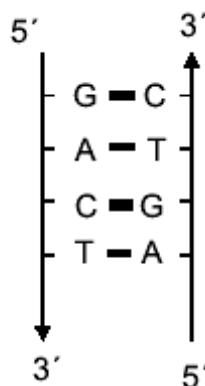
Abb. 1: DNA-Ausschnitt aus dem Skript

Die DNA:

In der DNA (auch in doppelsträngiger RNA) bilden die einzelnen Nucleotide **Paare**. Dabei verbinden sich Adenin und Thymin über zwei, Cytosin und Guanin über drei **Wasserstoffbrückenbindungen**.



Durch diese Paarung kommt es zu **zwei komplementären Strängen**, wodurch ein Strang immer über den anderen synthetisiert werden kann. Daher kommt auch die **semi-konservative Verdopplung**.



Die Doppelhelix (B-Helix):

Bei der **Doppelhelix** handelt es sich um eine **rechtshändige Helix** mit etwa 10 Basenpaaren pro Helixwindung. Dabei liegen die Basenpaare fast senkrecht zur Helixachse, was der Helix Stabilität verleiht. Die Sequenz hat dabei keinen Einfluss auf die Struktur.

Das **Zucker-Phosphat-Gerüst** als äußere Wendel der gegenläufigen Stränge ist **negativ geladen**.

Durch diese Struktur entsteht eine **major- und eine minor-groove**, über die die Basenpaare von außen zugänglich sind.

Die Replikation:

Durch die Struktur der DNA wird die semi-konservative Verdopplung zur DNA-Replikation vorgegeben. Dass es nicht nach dem konservativen Schema geht, wird durch den Versuch von *Meselson und Stahl 1958* bewiesen. Dabei markierten sie die DNA mit **schwerem Stickstoff** ^{15}N , im Organismus wird der **leichte** ^{14}N verwendet. Durch **Gleichgewichtszentrifugation** im CsCl-Gradienten überprüften sie ihre Ergebnisse. Bei dieser Methode ist die Sedimentationsgeschwindigkeit v proportional zum Dichteunterschied zwischen Medium und dem sedimentierenden Partikel. Der leichtere Stickstoff hat eine geringere Dichte als der schwere Stickstoff.

Aus **E.coli-Zellen** wurde die DNA isoliert, mit schwerem Stickstoff versetzt und wieder in Zellen transformiert. Diese Zellen wurden dann auf **Nährmedium mit leichtem Stickstoff** gegeben und bebrütet. In regelmäßigen Abständen wurden Proben genommen und die DNA analysiert:

Bei der ersten Zentrifugation mit nur mit ^{15}N versetzter DNA wurde eine so genannte schwere Bande erhalten. Bei der zweiten Zentrifugation bekam man eine etwas leichtere Bande, aber nicht an der Stelle, wo eigentlich der leichte Stickstoff sein sollte. Bei allen weiteren Zentrifugationen erhielt man zwei Banden: eine halbschwere und eine leichte, wobei die leichte Bande immer dicker wurde.

Abb. 2: Meselson-Stahl Ergebnisse (Skript)

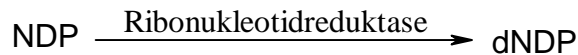
Damit war der konservative Mechanismus ausgeschlossen, da hier bereits nach einer Generation immer eine schwere und eine leichte Bande hätte entstehen müssen.

Es blieb noch die Alternative der **zufälligen Aufteilung** von alten und neuen Nukleotiden. Dies wurde durch eine **Zentrifugation von hitzedenaturierter halbschwerer DNA** aus oben genanntem Versuch ausgeschlossen. Bei zufälliger Aufteilung der Nukleotide hätte eine halbschwere Bande auftreten müssen, erhalten wurden aber zwei Banden, eine leichte und eine schwere.

Die DNA-Replikation verläuft in drei Phasen: **Initiation, Elongation und Termination**. Ein **Replikon** bezeichnet eine individuell regulierte Einheit der Replikation, das vom *ori* und einem nicht eindeutig definierten Terminus begrenzt wird.

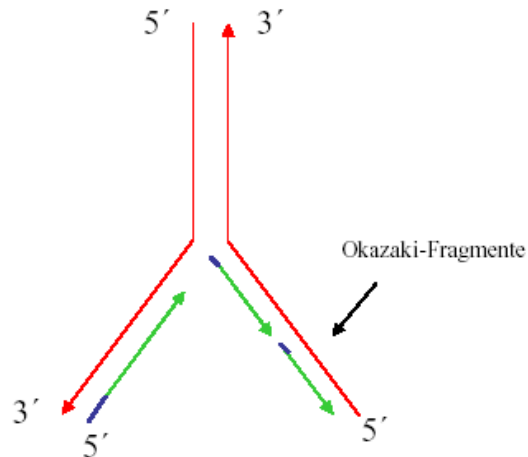
Katalysiert wird die Replikation durch **DNA-Polymerasen**, die allerdings nur vorhandene Ketten polymerisieren können. Dadurch sind **RNA-Primer** nötig, um die **Matrize** zu kopieren. Durch **Abspaltung von Pyrophosphat (PP_i)** von den dNTPs erhält die DNA-Polymerase die Energie, um die Phosphodiesterbindungen zu knüpfen. Das Pyrophosphat wird dann noch in zwei P_i gespalten, wodurch auch nochmal Energie frei wird.

Die **Desoxynukleotide** (= dNTPs) werden von der **Ribonukleotidreduktase**, einem **allosterischen Enzym**, aus **Ribonukleotiddiphosphaten** synthetisiert.



Kurzform:

- DNA-Polymerasen können nur vorhandene Stücke verlängern → Primer nötig
- DNA-Polymerasen synthetisieren immer nur **vom 5'- zum 3'-Ende**
- Die beiden Stränge werden gegenläufig synthetisiert → **Okazaki-Fragmente**



Die verschiedenen Enzyme der Replikation:

- Helicase → Entwindung der Helix
- RNA-Primase → Synthese der Primer
- DNA-Polymerase III → Replikation
- DNA-Polymerase I + RNase H → Entfernen der Primer und Füllen der Lücken
- DNA-Ligase → Verknüpfen der DNA-Fragmente
- Telomerase (bei Eukaryonten) → Replikation der Chromosomenenden
- Außerdem: Topoisomerasen (Verhinderung der Torsionsspannung) u.a.

Die DNA-Polymerasen:

Abb. 3: Polymerase-Struktur aus dem Skript

Finger und **Daumen** umgeben die DNA, die **Palm-Region** bildet das **katalytische Zentrum**. Daran ist die **Exonuklease** gebunden, die für das **Korrekturlesen** zuständig ist. Dabei unterscheidet man die **3'-5'-Exonuklease** und die **5'-3'-Exonuklease**, die in dieser Reihenfolge an die **Polymerase I** gebunden sind. Die 3'-5'-Exonuklease erkennt falsch gepaarte Basen und korrigiert diese. Die **5'-3'-Exonuklease**, die deutlich von den anderen aktiven Zentren entfernt liegt, kann freie oder 5'-phosphorylierte Enden abbauen, die aber in einer doppelhelikalen Region liegen müssen. Dadurch kann sie, wenn man von einem Einzelstrangbruch ausgeht, vom 3'-OH-Ende einen neuen Strang synthetisieren und den alten verdrängen. Sie ist damit **für die Primerentfernung** zuständig.

Durch die Exonuklease-Aktivität geht die Fehlerrate um das 100-1000 fache nach unten.

Die **DNA-Polymerase III** übernimmt die **eigentliche Replikation**, da sie im Gegensatz zur Polymerase I 10 000 Nukleotide auf einen Satz synthetisieren kann, die Polymerase I schafft nur 20. *Dadurch wird die Geschwindigkeit erheblich erhöht!* Bei der Polymerase III handelt es sich um ein **multimeres (pentameres) Enzym**, das keine 5'-3'-Exonuklease besitzt.

Die einzelnen Untereinheiten sind:

α -Untereinheit: Polymerisation

ϵ -Untereinheit: 3'-5'-Exonuklease-Aktivität

τ -Untereinheit: Dimerisierung (dadurch werden beide Stränge gleichmäßig synthetisiert)
 γ -Komplex und β -Untereinheit: Prozessivität, durch festes Umschließen der DNA

Abb. 4: Polymerase schematisch (Skript)

Alle Proteine, die sich in der Replikationsgabel befinden, werden als **Replisom** bezeichnet. Der **β -Ring** ist ein **Hexagon** aus zwei Untereinheiten, wobei insgesamt 12 symmetrische α -Helices die DNA umgeben.

Abb. 5: Beta-Ring (Skript)

Die **τ -Untereinheit** bindet den γ -Komplex und **dimerisiert die beiden Polymerasen**, um die Synthese an beiden Strängen zu koordinieren. Dabei bildet der eine Strang, der nicht kontinuierlich repliziert werden kann, eine Schleife. Außerdem binden Helicase und Primase an die τ -Untereinheit.

Abb. 6: Schleifenbildung bei Elongation (Skript)

Es gibt verschiedene Helicasen mit unterschiedlichen Aufgaben: für die Replikation wird die **Helicase DnaB** benutzt, die aus einem **Hexamer** besteht, das **an einen Strang gebunden** ist. Durch **ATP-Verbrauch** (daher ist die Helicase auch eine ATPase) wird der Doppelstrang aufgeschmolzen.

Weitere Helicasen sind:

- traI: bei Übertragung (Konjugation) von Einzelstrang-DNA bei Bakterien
- uvrD: Reparatur
- RecQ, RuvA: Rekombination

Um den **Einzelstrang** nach Entwindung durch die Helicase zu **stabilisieren**, binden **Einzelstrangbindeproteine** kooperativ daran. Bei **E.coli** ist das **SSB** (single strand binding protein), bei **Eukaryonten** ist dies **RPA**. Diese Proteine sind **essentielle Proteine!**

Den **Start der Synthese bei E.coli** am Einzelstrang macht die **Primase DnaG**, die eine spezielle RNA-Polymerase ist. Es werden 10-30 RNA-Nukleotide synthetisiert, wobei SSB den Primase-DNA-Kontakt stabilisieren. Der γ -Komplex erkennt das 3'-Ende des Primers, verdrängt die Primase und ersetzt sie durch den Ring und damit durch die Polymerase III. Damit kann die Elongation stattfinden. Am Ende wird der Ring und die Polymerase wieder gelöst.

Bei Eukaryonten ist die Primase ein Teil der **Polymerase α** , wobei die Primase und die Polymerase **jeweils aus 2 Untereinheiten** bestehen. Die Primase macht die ersten 8 Nukleotide, danach übernimmt die Polymerase α mit den nächsten 20 Nukleotiden. Dann wird die Replikation von der Polymerase α an die Polymerase δ übergeben.

Die **Polymerase I** und die **RNAse H** (nur bei Eukaryonten) **schneiden die RNA-Primer raus** und die Polymerase I füllt dann die Lücken. Die Verknüpfung der Fragmente übernimmt dann die DNA-Ligase, die ihre Energie für die Phosphodiesterbindungen über die Aktivierung des 5'-Endes. Als Cofaktoren dienen beim Menschen ATP, bei E.coli NAD.

Die Reaktion mit ATP ist unten (auf der nächsten Seite) dargestellt:

Abb. 7: Ligasereaktion mit ATP (Skript)

Zusammenfassung der einzelnen Enzyme bei E.coli und Eukaryonten:

<i>Funktion</i>	<i>Helicase</i>	<i>Einzelstrangbindende Proteine</i>	<i>Primase</i>	<i>β-Klemme</i>	<i>clamp-loader</i>	<i>Replikase</i>
E.coli	DnaB	SSB	DnaG	β ₂	γ-Komplex	Polymerase III
Eukaryonten (Mensch/Hefe)	MCM-Proteine (nicht homolog)	RPA (3 UE) (SSB nicht homolog)	Polymerase α / Primase (4 UE)	PCNA (3 UE)	RCF	Polymerase δ (3-4 UE)

Man bezeichnet die Vorgänge an der Replikationsgabel als **konserviert**, die beteiligten Proteine sind aber **nicht unbedingt homolog** zueinander.

Die verschiedenen Polymerasen bei E.coli und Eukaryonten:

E.coli: Polymerase I: Reparatur / Primer-Entfernung (440/Zelle)
 Polymerase III: Replikase (20/Zelle)
 Polymerasen II, IV, V: Reparatur-Polymerasen

Eukaryonten: Polymerase α: Primase
 Polymerase δ: Replikation
 Polymerase ε: Mitochondrielle Polymerase
 Polymerasen γ, β: Reparatur

→ Die Verteilung der Aufgaben ist vergleichbar

Die Replikation der DNA-Enden:

Bei der Replikation der DNA tritt ein Problem auf: das 3'-Ende kann nicht so einfach repliziert werden, da kein Primer / Template vorhanden ist. Dieses Problem tritt aber nur bei Eukaryonten auf, da Prokaryonten eine ringförmige DNA haben.

Die Lösung des Problems wird durch die Telomerase gelöst, die eine RNA-abhängige DNA-Polymerase ist. Sie enthält ein etwa 150 Nukleotide großes RNA-Molekül, das als Template für die Verlängerung des 3'-Endes dient. Da die Telomerregion repetitive Sequenzen (z.B. (TTGGGG)_n) enthält, funktioniert das auch.

Abb. 8: Telomerase-Aktivität (Skript)

Die Telomerase wird allerdings hauptsächlich in der Keimbahn exprimiert und verwendet, in somatischen Zellen werden die Telomere mangels Telomerase immer kürzer. Dadurch kann auch Krebs entstehen, wenn Telomerase trotzdem exprimiert wird, wodurch die Zellen unsterblich werden.

Beginn der Replikation / der ori (origin of replication):

Die Replikation startet an den so genannten **oris**. Bakterien mit ihrem ringförmigen Chromosom haben nur einen ori; hier fängt die Replikation bidirektional an und hört am anderen Ende des Rings auf. Eukaryonten haben aufgrund ihrer linearen Chromosomen mehrere ori-Stellen.

Der Replikationsursprung **oriC bei E.coli** umfasst 13bp lange **AT-reiche Sequenzen**, die jeweils mit den **Nukleotiden GATC** anfangen. Bei der Kontrolle des Replikationsbeginns

spielt auch die **Methylierung des Adenins** in diesen Sequenzen eine Rolle. Dazu kommen vier 9bp lange Sequenzen, an denen das **DnaA-Protein** bindet. An dieses Protein bindet dann die **Helicase DnaB**, die für die **Entwindung der Helix** nötig ist. Durch Bindung an das Protein wird von der DnaB der **DnaC-Komplex** gelöst, der in freier Lösung die Helicase-Aktivität von DnaB unterbindet. Danach kann die Primase ihre Aktivität beginnen.

Weitere Replikons in Prokaryonten sind die **Plasmide ColE1** und **F**, die jeweils ihre eigene Initiationskontrolle besitzen, und vollkommen voneinander unabhängig sind.

Eukaryonten haben mehrere origins, die so genannten ARS-Elemente (= autonomously replicating sequence). Zwischen ihnen liegen etwa 10 000 – 200 000 Nukleotide. An die ARS-Elemente ist jeweils ein Multiproteinkomplex ORC (= origin recognition complex) ständig gebunden. Zu Beginn der S-Phase wird durch Cyclin-abhängige Kinasen der Komplex aktiviert und die Replikation kann starten. Da alle origins gleich sind, muss die Replikation koordiniert werden, um eine gleichmäßige Verdopplung zu garantieren. Daher ist der Zellteilungszyklus bei Eukaryonten völlig anders reguliert als bei Bakterien; es ist eine Trennung von S- und M-Phase nötig.

Topologie der DNA und Topoisomerasen:

In der Natur liegt die DNA nicht mit freien Enden vor, die eukaryontische DNA ist mit ihren Chromosomenenden an die Kernmatrix fixiert, so dass scheinbar zirkuläre DNA vorliegt. Dadurch kann die Doppelhelix sich aber nicht mehr frei im Raum drehen, wodurch Supercoil-Strukturen entstehen. Dreht sich die rechtshändige Helix, so wie sie in der Natur vorkommt, in der umgekehrten Richtung um ihre Achse, dann ist sie negativ superspiralisiert; in der gleichen Orientierung ist sie positiv superspiralisiert. Die natürlich vorkommende negative Superspiralisierung geht mit einer Reduktion der Gesamtzahl der Windungen einher, wodurch das Molekül der Torsionsspannung ausweichen kann. Wenn ausreichend negative Superspiralisierungen vorhanden sind, wird das Öffnen der DNA-Helix erleichtert, das bedeutet, dass die negative Superspiralisierung das Gleichgewicht einer Strukturveränderung beeinflussen kann. Dadurch könnten im lebenden Organismus Übergänge möglich sein, die in einem entspannten Molekül nicht möglich wären.

Natürliche DNA ist negativ superhelikal und zu 5-7% partiell entwunden, was durch Wechselwirkungen der DNA mit Proteinen (z.B. Nukleosomen) zu erklären ist.

Die Gesamtzahl der Superspiralisierungen wird in der „**linking number**“ **L** (= Verwindungszahl) angegeben. Eine linksgewundene Superhelix erhält ein negatives Vorzeichen, eine rechtsgewundene Superhelix ein positives. Die Verwindungszahl **L** berechnet sich aus der Anzahl der Windungen der Watson-Crick-Helix **T** (= „**twisting number**“) – durch die Anzahl der Basenpaare/Drehung festgelegt – und der Windungszahl der Superhelix **W** (= „**writhing number**“), die der Anzahl der Drehungen der Doppelhelix im Raum entspricht:

$$\Delta L = \Delta W + \Delta T$$

Wird die Verwindungszahl reduziert, geht dies mit einer negativen Superspiralisierung und/oder Entdrillung der Doppelhelix einher. Eine Erhöhung der Verwindungszahl wird durch die Abnahme negativer Superspiralisierung und/oder der Überdrillung der Doppelhelix erreicht.

Verändert werden kann die Verwindungszahl in einem doppelsträngigen DNA-Molekül nur durch **Strangbrüche**, wodurch **L eine unveränderliche Größe** in einem bestimmten, geschlossenen DNA-Molekül ist, verändert werden können nur **T** und **W**.

Als **Topoisomere** bezeichnet man DNA-Moleküle, die sich nur in ihrer Verwindungszahl **L** unterscheiden. Sie können nur durch Strangbruch mindestens eines Stranges ineinander überführt werden. Dazu werden in lebenden Organismen **Topoisomerasen** benötigt, die die Verwindungszahl um einen bestimmten ganzzahligen Wert verändern. Die Topoisomerasen vom **Typ I** verändern durch **Einzelstrangbrüche** die Verwindungszahl um den Betrag 1, der **Typ II** durch einen **transienten Doppelstrangbruch** um den Betrag 2. Die Topoisomerasen II

benötigen allerdings ATP für die Spaltung. *(Keine Garantie!! Koch und Seyffert sagen da Unterschiedliches!)*

In Bakterien gibt es spezielle Topoisomerasen II, die DNA-Gyrase, die negative Supercoils in die DNA einfügt.

Topoisomerasen helfen auch bei der Replikation, indem sie die Spannung, die durch die Entwindung der Helix entsteht, durch Strangbrüche abbauen.

Der Mechanismus der Topoisomerase I:

Abb. 9: Mechanismus Topoisom. 1 (Skript)

Mechanismus der Topoisomerase II:

Abb. 10: Topoisomerase 2 (Skript)

Der Doppelstrang läuft durch das Enzym, wodurch er durch ATP-Verbrauch seine Konformation ändert.

(Besser erklären kann ich's leider nicht! Hab nichts Weiteres darüber gefunden.)

Probleme der DNA-Topologie:

- Bei der Replikation ist keine Trennung der Stränge möglich, da sie verknüpft sind
- Die Entwindung der DNA bei der Replikation müssen die Topoisomerasen I und II übernehmen
- Die DNA ist auf Histonen zu Nukleosomen kondensiert

Weitere Enzyme, die kovalente Enzym-DNA Zwischenprodukte machen und einen ähnlichen Mechanismus wie die Topoisomerasen haben, sind Integrasen (z.B. von Bakteriophagen und Viren), Rekombinasen, Transposasen und Resolvasen.

DNA-Reparatur:

Die Reparatur der DNA ist wichtig, da die Replikation nicht genau ist und innere und äußere Einflüsse Mutationen hervorrufen. Mutationen sind ungeplante Veränderungen des genetischen Materials.

Die Polymerasen haben eine Genauigkeit von 10^{-4} , d.h. sie machen einen Fehler pro 10 000 Nukleotide. Durch das Proofreading der Exonuklease wird das auf 10^{-7} reduziert, durch postreplikative Reparatur wird eine Genauigkeit von 10^{-10} erreicht.

Beispiele für Mutationen:

Chromosomenmutationen: Verlust oder zusätzliche Chromosomen (Aneu- bzw. Polyploidie)
Deletion
Inversion
Translokationen von Chromosomenstücken

Gen-/Punktmutationen: Basenaustausch (Missense = Änderung der AS-Abfolge, Nonsense = Abbruch)
Basenverlust oder Insertion
Frameshift-Mutation (Rasterverschiebung)

Einige Schlagwörter für die Phänotypen:

- **Stille Mutationen:** ohne Phänotyp, keine Auswirkung auf AS-Abfolge
- **Nullmutationen** (Loss of function)
- **conditional** (z.B. Temperatursensitivität)

- dominant/rezessiv
- letal
- **Auxotrophie** (best. essentielle Nährstoffe können nicht mehr hergestellt werden und müssen von außen zugeführt werden)
- **Reversion** (= Rückmutation)
- **Suppression** (eine Mutation, die den Phänotyp einer anderen Mutation unterdrückt)

Entstehung von Mutationen:

spontan: durch Replikationsfehler, Desaminierung, Depurinierung, Depyrimidinierung

chemisch: durch Veränderung von Basen, salpetrige Säure, Bisulfit, alkylierende Agenzien (DMS, EMS, MMS, ENG), Interkalierung bestimmter Stoffe (z.B. Benzpyren)

physikalisch: Ionisierende Strahlen, direkt oder indirekt über Generierung von reaktiven Radikalen (z.B. Deletionen, OH-Radikal)
UV-Strahlung: Thymindimere

Chemische Mutagene:

1. **Brom:** Durch Bromierung des Uracils (*Bromuracil*), das ein Thymin-Analogon darstellt, kommt es zur Stabilisierung der falschen tautomeren Form und somit zu einer Fehlpaarung (chemische Modifikation des Uracils)

Abb. 11: Bromuracil mit Guanin (Skript)

2. **Alkylierende Reagenzien:** (z.B. EMS) Durch Alkylierung des Guanins sind nur noch zwei Wasserstoffbrückenbindungen möglich, und es kommt zu einer Paarung mit Thymin

Abb. 12: Alkylierte Basen (Skript)

3. **Desaminierung:** (z.B. spontan oder durch salpetrige Säure) Durch Desaminierung von Cytosin wird dieses in Uracil umgewandelt, das dann mit Adenin paart.

Abb. 13: Desaminierung von Basen (Skript)

Induktion von Mutationen:

UV-Strahlen: Durch die Strahlung werden z.B. die Thymidin-Seitengruppen aktiviert, die dann Reaktionen mit benachbarten Basenresten eingehen. Dadurch kommt es zu einer Ringbildung oder zu Thymidin-Cytosin Addukten. Die DNA-Struktur wird dadurch verzerrt und die Replikation verhindert (Strangabbruch)

Abb. 14: Thymindimer (Skript)

Interkalierung: Bestimmte Substanzen (Ethidiumbromid, Benzpyren), die flache Ringssysteme mit den Abmessungen eines Basenpaares haben, interkalieren in der DNA und stören somit den Replikationsprozess. Es kann zu Nukleotidverlust oder Einfügen von Nukleotiden kommen.

Reparatursysteme:

Es gibt verschiedene Mechanismen zur Reparatur der DNA:

- **Direkte Reparatur** des Schadens durch Photoreaktivierung oder Alkyltransferasen (z.B. O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase)
- **Entfernung der geschädigten Base** oder Nukleotids durch DNA-Glykosylasen, Excisionsreparatur (uvrABC) oder Mismatch-Reparatur

- **Fehlerbehaftete Reparatur (Error-prone):** SOS-Reparatur durch Trans-lesions Polymerasen, Rekombinationsreparatur

Direkte Reparatur:

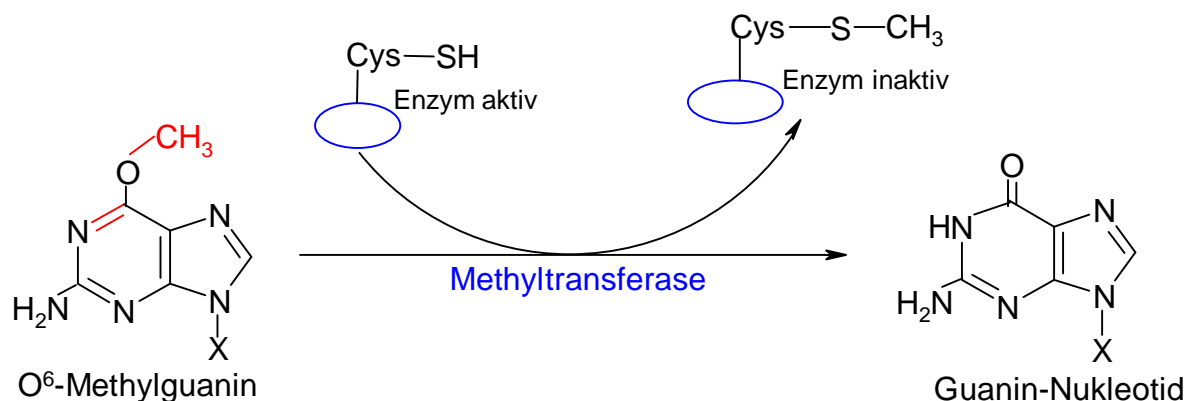
- Photoreaktivierung:

Diese Reparaturmethode gibt es sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten. Das Enzym **Photolyase** erkennt Pyrimidindimere (z.B. Thymindimere) in der DNA und katalysiert die Trennungsreaktion durch **Absorption von sichtbarem Licht**. Es entstehen dann wieder zwei unbeschädigte Pyrimidine. Die Anregungsenergie wird auf FADH übertragen, wodurch ein FADH-Radikal entsteht, das dann wieder zu FADH regeneriert wird.

Abb. 15: Photolyase-Reaktion (Skript)

- Alkyltransferasen (z.B. O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase MGMT):

Durch Methylierung des Guanins entsteht O⁶-Methylguanin, was eher selten passiert, aber durch die prämutagene Eigenschaft von großer Bedeutung ist. Das Enzym **MGMT** überträgt die Methylgruppe auf einen Cysteinrest im aktiven Zentrum. Die humane MGMT ist ein Protein aus 208 Aminosäuren, das auch als **Selbstmord-Enzym** bezeichnet wird, da es durch die Übertragung der Methylgruppe inaktiviert wird und somit nur eine Reaktion durchführen kann.



Entfernung der geschädigten Base / Nukleotids:

- DNA-Glykosylasen:

Die Glykosylasen (z.B. Uracil-DNA-Glykosylase) hydrolysieren die glykosidische Bindung und entfernen so die jeweilige Base. Es entsteht eine AP-Site (Apurinic, Apyrimidinic). Durch Reparatur-Polymerasen und die Ligase wird die Lücke mit der richtigen Base wieder gefüllt.

- Excisionsreparatur:

An dieser Reparatur sind die Enzyme uvrA-uvrD beteiligt. Die Reparatur läuft in sechs Schritten ab:

1. uvrA und uvrB bilden einen Komplex uvrAB
2. Der Komplex erkennt die fehlerhafte Stelle und markiert sie durch Helixveränderungen
3. Durch ATP-Spaltung verlässt uvrA den Komplex, uvrB bleibt an der DNA gebunden
4. uvrC (= Endonuklease) bindet an uvrB und die DNA wird etwas vor und hinter der Fehlerstelle geschnitten
5. uvrC und das herausgeschnittene Fragment verlassen den Komplex, uvrD (= Helicase) bindet an das freie OH-Ende (5'-Ende)
6. Die DNA-Polymerase I und die Ligase synthetisieren den geschnittenen Strang, uvrB und uvrD verlassen die DNA

Abb. 16: Excisionsreparatur (Skript)

- Mismatch-Reparatur:

Mit diesem Mechanismus werden Fehlpaarungen repariert, die sonst zu Mutationen führen könnten. Aber auch bei kleinen Insertions- oder Deletionsfehlpaarungen von bis zu acht Nukleotiden und bei Fehlern durch chemische Agenzien spielt diese Art der Reparatur eine wichtige Rolle.

Bei Eukaryonten erfolgt die Erkennung der Fehlpaarung oder auch einzelner ungepaarter Basen durch den MutS α -Komplex, der aus zwei Proteineinheiten besteht. Insertionen und Deletionen, die eine Ausstülpung der Einzelstränge bewirken, werden vom MutS β -Komplex – einem ebenfalls aus zwei Proteineinheiten bestehenden Enzym. Nach der Erkennung bindet MutL α – auch aus zwei Proteinen bestehender Komplex – und entfernt die fehlerhafte Basenpaarung. Die Unterscheidung zwischen fehlerhaftem und intaktem Strang wird wahrscheinlich (Mechanismus ist noch nicht ganz aufgeklärt) über den nahen Replikationsapparat bewerkstelligt, da einige Enzyme daraus daran beteiligt sind, z.B. Polymerase δ/γ , RPA, PCNA, RCF und die Exonuklease.

Nach Entfernung der Fehlpaarung wird der Strang neu synthetisiert.

Diese Reparaturmethode ist konserviert, auch MutS und MutL sind konservierte Proteine, d.h. der Ablauf ist bei Pro- und Eukaryonten gleich. Lediglich die Erkennung wird bei Prokaryonten durch Methylierung der DNA-Stränge anders bewerkstelligt.

Fehlerbehaftete Reparatur (Error-prone):

Bei der **SOS-Reparatur** (wenn sonst nichts hilft) können bestimmte Stücke der DNA nicht repliziert werden. Es kommt zu einer „Induktion“ von Genen und/oder Proteinen für die Reparatur.

Bei der **postreplikativen Rekombinationsreparatur** wird der vollständig replizierbare DNA-Strang wiederhergestellt, indem die Information vom Schwester-Strang eingesetzt wird, es kommt zur Rekombination, d.h. dies ist keine wirkliche Reparatur. Das fehlende Stück im Schwester-Strang wird dann wieder neu synthetisiert.

Bei der **Error-prone-Reparatur** (der eigentlichen SOS-Reparatur) lesen spezielle DNA-Polymerasen über die Fehlerstelle hinweg und setzen dort bevorzugt Adenin ein, was oft selbst die Ursache für Mutationen ist. Das bedeutet, im schlimmsten Fall werden Mutationen in Kauf genommen.

Abb. 17: SOS-Reparatur (Skript)

Mechanismus der Induktion von Reparatur-Enzymen (beim SOS-System von Bakterien):

Oft werden Promotoren von Reparatur-Genen durch den LexA-Repressor am Operon blockiert. Das sind beispielsweise Gene von:

- *dinA* = Polymerase II
- *uvrAB* = Exzisionsreparaturgen
- *uvrD* = Excisionsreparatur
- *umuC* / *umuD* = Polymerase V
- *dinB* = Polymerase IV

Weitere Reparaturgene sind: *recA* = Rekombinationsprotein

sfIA = Inhibitor der Zellteilung

Die Replikationsblockade führt zu einzelsträngigen DNA-Stücken, woran das *recA*-Protein bindet. Dadurch wird LexA autokatalytisch gespalten, die Promotoren können von der RNA-Polymerase erkannt und die Gene transkribiert werden.

(Besser kann ich's leider nicht erklären, da ich sonst nirgendwo was gefunden hab.)

Die RNA:

Allgemeines:

Die RNA-Synthese läuft wie die DNA-Replikation von 5' nach 3'; es gibt keine speziellen Initiationsenzyme und keine spezielle Helicase; es werden NTPs statt dNTPs und Uracil statt Thymin eingebaut; es ist kein Primer nötig. Für die Transkription ist bei Prokaryonten nur ein Enzym, bei Eukaryonten drei verschiedene Enzyme (je nach RNA-Klasse) zuständig. Außerdem gibt es kein proof-reading und keine Reparatur, stattdessen wird die RNA posttranskriptionell modifiziert und prozessiert.

Die RNA-Polymerasen bei Pro- und Eukaryonten:

Prokaryonten: Nur eine Polymerase (= Holoenzym) für alle RNA-Klassen, aus mehreren Untereinheiten ($\alpha_2\beta\beta'$ = Core-Enzym) und dem σ -Faktor, der für die Initiation der Transkription entscheidend ist. Nach der Initiation dissoziiert der σ -Faktor wieder ab. An der β -Untereinheit werden die Phosphodiesterbindungen geknüpft. (Eigentlich gibt es mehrere σ -Faktoren: σ^{70} ist der normale Faktor, σ^{54} arbeitet anscheinend bei Hitzeschock (?), weitere Sigmafaktoren arbeiten bei N-Mangel oder anderen besonderen Verhältnissen.)

Eukaryonten: Die drei RNA-Polymerasen sind große Proteinkomplexe und für unterschiedliche RNAs zuständig:

- Polymerase I: Synthese der rRNA (18 S, 28 S und 5,8 S RNA-Einheiten)
- Polymerase II: Synthese der mRNA
- Polymerase III: tRNA, 5 S rRNA und andere kleinere RNAs

(Zum Aufbau der Ribosomen gibt es in der Proteinsynthese mehr.)

Die Polymerasen der Eukaryonten bestehen aus zwei sehr großen Untereinheiten, die Ähnlichkeit mit der β -Untereinheit bzw. der β' -Untereinheit haben.

Isoliert zeigen die Polymerasen keine Aktivität, sondern müssen erst einen Komplex von Transkriptionsfaktoren binden, bevor sie aktiv werden können.

Die Polymerase II hat zudem eine C-terminale Domäne (= CTD), die bei Beginn der Transkription phosphoryliert wird, und an die mehrere Proteine für die weitere Prozessierung der mRNA binden.

Die Transkription bei Prokaryonten:

Initiation:

Das Core-Enzym allein kann die Initiationsstellen nicht erkennen, weshalb es mit schwacher Affinität an den DNA-Strang ohne Strangspezifität bindet und dort locker entlanggleitet bis es auf einen Promotor trifft. Der σ -Faktor erhöht die Affinität zur Promotorregion um das 10^4 -fache und ermöglicht dadurch eine feste Bindung an den Promotor. Ebenso ist der σ -Faktor für die Strangspezifität zuständig, da nur ein DNA-Strang (der codogene Strang) abgelesen wird. Der komplementäre (= codierende) Strang entspricht der RNA-Sequenz.

Nach der Bindung der Polymerase wird die Helix partiell entwunden, wobei kurze RNA-Fragmente an der entwundenen DNA-Sequenz synthetisiert werden. Nach zwei bis neun Ribonukleotiden dissoziiert der σ -Faktor ab und die eigentliche RNA-Synthese kann beginnen.

Die kurzen RNA-Fragmente werden wieder freigesetzt und abgebaut.

Die Promotorregionen:

Als Transkriptionsstart bezeichnet man das erste transkribierte Nukleotid (+1-Region). In den Bereichen davor, die nicht transkribiert werden, finden sich oft charakteristische Sequenzen, die an der Bindung des Initiationskomplexes beteiligt sind. Diese Sequenzen werden auch als **Consensus-Sequenzen** bezeichnet. 10 bzw. 35 Nukleotide innerhalb der Promotorregion vor dem Transkriptionsstart (-10- bzw. -35-Region) liegen jeweils sechs Basen lange Sequenzen,

die für die Polymerase-Bindung wichtig sind. Die dazugehörige Consensussequenz besteht aus den dort am häufigsten vorkommenden Basen (z.B. -35-Region: TTGACA/TTTACA an verschiedenen Genen ergibt die Consensus-Sequenz TTGACA)

Je ähnlicher die Promotorsequenz der Consensus-Sequenz ist, desto effizienter ist der Promotor.

Abb. 18: E.coli-Promotor (Seyffert, Abb. 5-4, S. 63)

Elongation:

Während der Elongation bilden DNA, RNA und Enzym die Transkriptionsblase, die bei E.coli 17 Basenpaare umfasst. Es entsteht ein DNA-RNA-Hybrid von 12 Nukleotiden Länge, die RNA wird aber bei Fortschreiten der Transkription vom anderen (codierenden) DNA-Strang verdrängt und die Helix wird wieder ausgebildet. Die Polymerasen, die Elongationsfaktoren benötigen, arbeiten zwar hochprozessiv, aber nicht mit einer konstanten Geschwindigkeit, d.h., dass einige Stücke schneller als andere transkribiert werden.

Termination:

Am Ende einer Transkriptionseinheit befindet sich der Terminator, der in manchen Fällen einen ρ (rho)-Faktor benötigt, in den meisten Fällen aber nicht.

→ faktorunabhängige Termination:

Es werden zunächst G-C-reiche Sequenzen (Verlangsamung der Transkription) transkribiert, die palindromisch angeordnet sind, danach folgt auf der DNA eine PolyA-Sequenz, die als PolyU in die RNA geschrieben wird. Wenn die palindromischen G-C-Bereiche transkribiert sind, bilden sie eine Terminationsschleife, wodurch es zu einem etwa einminütigen Stopp der Polymerase kommt. Die schwachen A-U-Wechselwirkungen können den Transkriptionskomplex nicht halten, was eine Ablösung der RNA und der Polymerase zur Folge hat.

Abb. 19: Termination ohne Faktor (Seyffert, Abb. 5-6, S. 65)

→ faktorabhängige Termination:

Obwohl die faktorabhängige Termination nur sehr selten ist, ist der ρ -Faktor für die Zelle essenziell. In den ρ -terminierten Transkripten gibt es keine Consensussequenzen oder A-T-reiche Bereiche. Außerdem ist diese Art der Transkription ATP-abhängig.

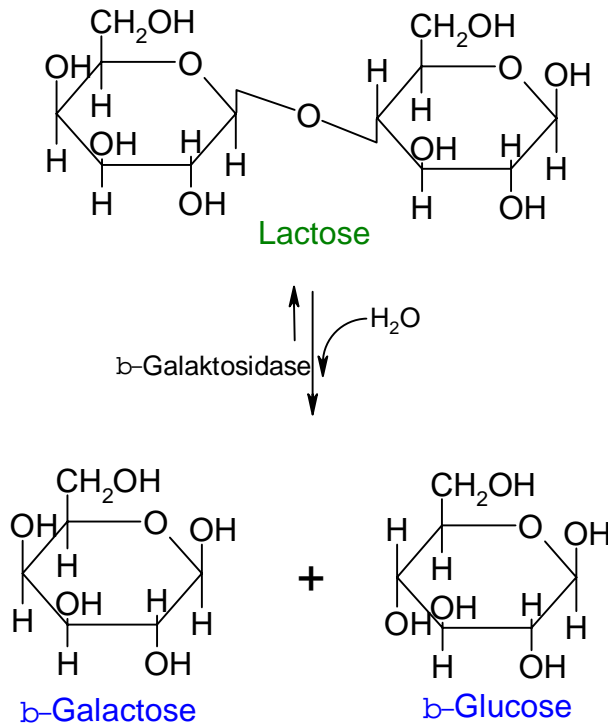
Das ρ -Protein bindet an die synthetisierte RNA und wandert durch ATP-Spaltung zur Polymerase und zieht den Strang aus dem Komplex. Danach dissoziiert die Polymerase von der DNA. Die Aktivierung des Faktors erfolgt, wenn die Polymerase in der Nähe des 3'-Endes des Transkriptes stoppt.

Wahrscheinlich (nach Seyffert noch nicht sicher) bindet der Faktor direkt an der Polymerase und katalysiert die Dissoziation der RNA und der Polymerase.

Abb. 20: Faktorabhängige Termination (Seyffert, Abb. 5-7, S. 65)

Die Steuerung der Genexpression (Jacob-Monod-Modell):

1961 veröffentlichten Jacob und Monod ihre Ergebnisse, die sie am lac-Operon gewonnen hatten. Vorausgegangen war die Beobachtung, dass bei Anwesenheit von Lactose die β -Galaktosidase-Menge induziert wird.



Das Operon:

Gene, die Proteine für einen Stoffwechselweg codieren, werden als **Operon** zusammengefasst und auch als **Strukturgene** bezeichnet. Diese Gene werden von einem Promotor aus transkribiert, wodurch eine **polycistronische** (= mehrere Gene umfassende) **mRNA** entsteht. Durch das Produkt eines Regulatorgens wird ihre Expression reguliert.

Das Operon-System der Prokaryonten ermöglicht somit eine koordinierte Regulation / Expression von Genen.

Das lac-Operon:

Das lac-Operon ist aus drei Genen zusammengesetzt:

- **lacZ** codiert für die **β-Galactosidase**, die β-Galaktoside hydrolysiert (z.B. Lactose zu Galaktose und Glucose)
- **lacY** codiert für das Enzym **β-Galaktosid-Permease**, das die Aufnahme von Lactose in die Zelle katalysiert
- **lacA** codiert für eine **Transacetylase**, die die Acetylierung der Hydroxylgruppe am C₆-Atom eines Thiogalactosids katalysiert. Sie wird für die Lactoseverwertung nicht benötigt, die Funktion ist noch nicht bekannt.

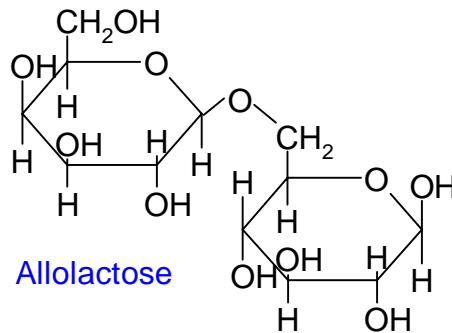
Begrenzt wird das lac-Operon durch Promotor, Operator und Terminator. Das Regulatorgen lacI ist in einer eigenen Transkriptionseinheit direkt vor dem lac-Operon.

Abb. 21: Aufbau des lac-Operons (Skript)

Regulation des lac-Operons:

Ist keine Lactose vorhanden, bindet der Repressor (Genprodukt von lacI) an den Operator, wodurch die RNA-Polymerase nicht an den Promotor binden kann (sterische Hinderung).

Sobald Lactose durch die β-Galaktosid-Permease in die Zelle geschleust wird, wird sie von vorhandener β-Galactosidase in Allolactose umgewandelt.



Die Allolactose bindet an den Repressor und fungiert als dessen allosterischer Inhibitor. Der Repressor kann dadurch nicht mehr an den Operator binden und die RNA-Polymerase kann das Operon ablesen. Die Transkription und Translation von lacZ dauert etwa 2-3 Minuten, danach kann eine erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität beobachtet werden. Sobald keine Allolactose mehr vorhanden ist, wird das Operon wieder reprimiert. Dadurch, dass die mRNA des lac-Operons sehr instabil ist, werden schon nach kurzer Zeit keine Proteine mehr gebildet. Allerdings ist die β -Galactosidase stabiler und kann somit noch einige Zeit aktiv bleiben.

Der Repressor des lac-Operons:

Der Repressor ist ein **Tetramer** aus vier identischen Untereinheiten, die aus **je 3 Domänen** (DNA-Bindedomäne, Core-Domäne und Tetramerisierungsdomäne) besteht. Er bindet an eine palindromische Sequenz des Operators. Die Dissoziationskonstante für diese Sequenzen liegt bei 10^{-13} , das ist 10^6 -fach besser als an anderen Sequenzen.

Die DNA-Bindedomäne besteht aus drei kurzen **α -Helices**, wobei die ersten beiden ein so genanntes **Helix-Turn-Helix-Motiv** ausbilden. Die Helices 2 und 3 lagern sich in die große Furche der DNA ein und stellen so die spezifische Bindung zum Operator her. Durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäure-Seitenketten und den Basenpaaren der DNA wird die Operator-Sequenz spezifisch erkannt.

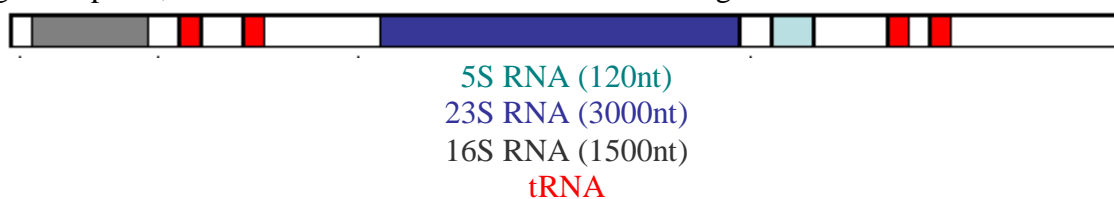
Weitere Beispiele der Expressionskontrolle bei prokaryontischen Genen:

- Lac-Repressor (siehe oben; Induktor = Substrat inaktiviert den Repressor)
- λ -Repressor (Regulation der Vermehrung des λ -Phagen)
- LexA-Repressor (siehe SOS-Reparatur der DNA)
- trp-Repressor (Regulation der Tryptophan-Synthese; trp als Corepressor = Repressor wird durch Tryptophan aktiviert)

Posttranskriptionelle Modifikationen = Prozessierung der RNA-Moleküle:

Von den verschiedenen RNA-Molekülen müssen nur die rRNA und die tRNA, die so genannten stabilen RNAs, prozessiert werden, die mRNA ist sofort nach der Transkription fertig für die Translation und wird noch während der Transkription bereits von den Ribosomen abgelesen.

Für die rRNA gibt es sieben codierende Operons, die mit rrnA-G bezeichnet werden. Sie liegen verstreut im prokaryontischen Chromosom. Die Gene liegen jeweils in der gleichen Reihenfolge 16S, 23S und 5S hintereinander. Zwischen den ersten beiden Genen (16S und 23S) liegt ein Spacer, in dem codierende Bereiche für tRNAs liegen.



Die rRNA-Bereiche bilden Haarnadelschleifen, die die RNasen erkennen. So schneidet die Ribonuklease III die 16S und die 23S rRNA heraus, die danach noch weiter für das Ribosom

prozessiert werden müssen. Die 5S rRNA wird auch herausgeschnitten, aber wahrscheinlich von einem anderen Enzym. (*war nicht herauszufinden*)

Die tRNAs werden durch die Ribonuclease P und die RNase D ausgeschnitten. Dabei ist die Ribonuclease P für das 5'-Ende, die RNase D für das 3'-Ende zuständig.

Die Ribonuclease P erkennt dabei die bereits in der Vorläufer-RNA existierende Tertiärstruktur. Dieses Enzym war auch das erste, bei dem man einen RNA-Anteil entdeckte, der für die katalytische Aktivität zuständig ist. (*Sidney Altman in den 70er Jahren*)

Die RNase D hydrolysiert am freien 3'-Ende einzelne Nukleotide heraus, bis sie an die tRNA-typische Sequenz CCA gelangt. Dabei wird wohl auch die Tertiärstruktur erkannt.

Weitere RNasen sind RNase E, RNase F, RNase M16 und RNase M23.

Abb. 22: Schnittstellen der RNasen (Skript)

Die Transkription bei Eukaryonten:

Unterschiede zu bakteriellen Genen:

Bei höheren Eukaryonten gibt es keine Operons, die codierenden Bereiche der Gene (Exons) sind durch Introns unterbrochen und es gibt für die unterschiedlichen RNA-Klassen drei verschiedene Enzyme (RNA-Polymerasen I-III; siehe *Allgemeines*), die im Nukleolus organisiert sind. Gegenüber α -Amanitin (= Gift des Grünen Knollenblätterpilzes) reagieren die Polymerasen unterschiedlich. Polymerase I (rRNA-Synthese) wird nicht gehemmt, ist also insensitiv gegenüber dem Gift. Polymerase III (tRNA-Synthese) ist nur gegenüber hohen Konzentrationen sensitiv, was von Art zu Art verschieden ist. Sensitiv gegen das Gift ist die Polymerase II (mRNA-Synthese!), wodurch der Elongationsprozess durch Bindung des Gifts an das Enzym inhibiert wird.

Initiation:

Für die Initiation sind mehrere Transkriptionsfaktoren nötig, bei denen man die generellen und die spezifischen Faktoren unterscheidet. Die generellen Faktoren sind für den Aufbau des Transkriptionskomplexes am Promotor nötig, die spezifischen Faktoren sind für die Regulation der Promotor-Aktivität zuständig.

Abb. 23: Initiationskomplex bei Eukaryonten (Seyffert, Abb. 9-7, S. 137)

Das Heranführen der Polymerase II an den Promotor macht das TBP-Protein (mit TAF-Untereinheit) durch Wechselwirkung mit dem TFIIB-Faktor und dem restlichen Transkriptions-Holoenzym. Über die noch nicht phosphorylierte CTD (= C-terminale Domäne) wird die Verbindung zwischen TBP-Protein und Polymerase II hergestellt. Beim ersten synthetisierten Nukleotid wird die CTD phosphoryliert, was die Bindung zum Promotor löst, und die Transkription kann beginnen. Die Phosphorylierung wird durch die Kinase-Untereinheit des TFIIF-Faktors bewerkstelligt.

Die Promotorregion:

Für jede Polymerase gibt es eigene Promotoren, wobei die Promotorregion für Polymerase I in den verschiedenen Organismen unterschiedlich ist, weshalb dies nicht weiter behandelt wird.

Polymerase II-Promotoren sind dagegen konserviert, d.h. in allen Organismen gleich. In vielen Promotoren finden sich A-T-reiche Sequenzen, die als TATA-Box bezeichnet werden. Kurz vor dem Transkriptionsstart findet sich noch eine Initiationsregion (INR) und häufig ein Downstream-Promotor-Element (DPE). Es sind nicht immer alle drei Bereiche gleichzeitig vorhanden, wenn z.B. die TATA-Box fehlt ist die INR stärker ausgeprägt.

Ein Stück vor der TATA-Box existiert noch eine Upstream-Activating-Sequence (UAS), die auch als Enhancer bezeichnet wird.

Die Polymerase III-Promotoren liegen hinter dem Transkriptionsstart, werden also mittranskribiert. Bei tRNAs gibt es eine A- und eine B-Box, die durch spezifische Transkriptionsfaktoren erkannt werden.

Abb. 24: Promotorregionen Eukaryonten (Seyffert, Abb. 5-5, S. 64)

Elongation:

Die Elongation erfolgt nach dem so genannten Raupenmodell, sie wurde aber nicht in der Vorlesung besprochen.

Termination:

Die Termination bei Eukaryonten ist nur für die Polymerasen I und III bekannt, wobei der Mechanismus der Polymerase I wohl sehr artspezifisch ist. Die Polymerase III beendet ihre Transkription an einem Stück von mindestens vier Thyminnukleotiden.

Bei der Polymerase II gibt es anscheinend kein spezifisches Terminationssignal. Bestimmt wird das Ende eines Transkripts durch die Polyadenylierung am 3'-Ende, die Polymerase synthetisiert aber noch etwa 100 Nukleotide weiter und dissoziiert dann ab.

Prozessierung der RNA-Transkripte:

rRNA:

rRNA-Gene liegen in 100-600 (vielen) Kopien vor und werden von der Polymerase I transkribiert. Zunächst werden die Transkripte z.B. durch Methylribose modifiziert, und es entstehen die prä-rRNAs, die dann wie bei den Prokaryonten durch die RNase III geschnitten werden. Die 5S rRNA wird von der Polymerase III transkribiert.

Abb. 25: Prozessierung rRNA (Skript)

tRNA:

Die Gene für die tRNAs und die 5S rRNA werden von der Polymerase III exprimiert, wobei aber keine lange prä-rRNA entsteht, sondern die Gene werden einzeln abgelesen.

Prozessiert wird die tRNA in vier Schritten:

- Spaltung am 5'-Ende durch ein der RNase P ähnliches Enzym
- Anhängen der CCA-Sequenz am 3'-Ende, wo die Aminosäuren gebunden werden
- bei einigen tRNAs müssen Introns durch spezielle Nukleasen und eine RNA-Ligase entfernt werden (Mechanismus anders als beim Spleißen der mRNA)
- Modifizierung von etwa 10% der Nukleotide

mRNA:

→ Polyadenylierung:

Der lange (100-200 nt) PolyA-Schwanz am 3'-Ende der mRNA ist nicht auf der DNA codiert sondern wird durch die matrizenunabhängige PolyA-Polymerase katalysiert. Vorher wird durch eine Nuklease das 3'-Ende generiert, vermutet wird, dass beide Enzyme in einem Komplex zusammenhängen. Einige Nukleotide vor der Polyadenylierung findet sich bei allen Eukaryonten eine Consensus-Sequenz (AAUAAA), die wohl als Erkennungssequenz für die Nuklease dient.

An der Polyadenylierung sind wohl auch noch andere Faktoren beteiligt, diese sind aber noch nicht identifiziert.

→ Capping:

Kurz nach Beginn der Transkription wird an das 5'-Ende eine Cap-Struktur angehängt, wovon nur die mitochondriale und die Chloroplasten mRNA ausgeschlossen ist. Dabei wird zunächst durch eine Phosphatase ein Phosphatrest am 5'-Ende entfernt und anschließend ein GMP an das freie 5'-Nukleotid in umgekehrter Orientierung – also 5'-5'-Bindung – ange-

hängt, was durch das Enzym Guanyl-Transferase katalysiert wird. Es entsteht also eine 5'-5'-Triphosphatbindung. Danach wird das Guanosin durch eine Methyltransferase am 7-N-Atom methyliert. Durch weitere Methylierungen an den ersten transkribierten Nukleotiden entstehen verschiedene Cap-Strukturen, wobei immer am 2'-C-Atom der Ribose methyliert wird. Je nach Anzahl der Methylierungen werden die unterschiedlichen Caps unterschieden: bei Cap1 wird nur an der ersten Ribose nach der 5'-5'-Bindung methyliert, bei Cap2 auch an der zweiten Ribose. Mit Ausnahme der Einzeller kommt Cap1 in den meisten eukaryontischen Zellen vor, in 15% der Fälle wird Cap2 (? Bin mir nicht ganz sicher, ob ich das aus dem Seyffert richtig interpretiert hab?) gebildet.

Die drei beteiligten Enzyme des Cappings hängen direkt an der CTD, womit gewährleistet wird, dass das Capping direkt nach Transkriptionsbeginn erfolgt.

Die Cap-Strukturen schützen die mRNA vor Phosphatasen und Nukleasen und spielen auch beim Spleißen eine Rolle.

Abb. 26: Cap-Strukturen (Seyffert, Abb. 5-11, S. 67)

→ Spleißen:

Aufgrund der Intronsequenzen in eukaryontischen Genen muss die prä-mRNA gespleißt werden. Dabei wird die Orientierung (5'-3') wie auf der DNA beibehalten.

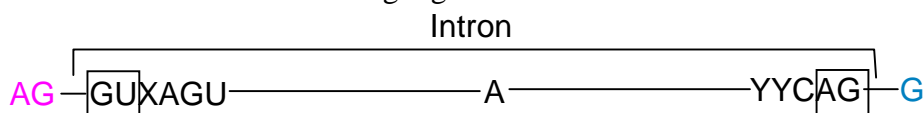
Die Introns haben in den verschiedenen Genen unterschiedliche Anteile: der Rekordhalter ist das Dystrophin-Gen mit 99% Intron-Anteil in 79 Abschnitten. Beim Ovalbumin-Gen bleiben von 7700bp lediglich 1872 Nukleotide übrig.

Der Spleißvorgang und das Spleißosom:

Als Spleißosom wird der gesamte Komplex aus Proteinen, kleinen RNAs und mRNA während dem Spleißvorgang bezeichnet. Die Intron-Exon-Struktur besteht aus der 5'-splice-site, der 3'-splice-site und der Verzweigungsstelle, der branch-site, im Intron.

Abb. 27: Intron-Exon-Struktur (Skript)

Die jeweiligen Bereiche haben bestimmte Consensus-Sequenzen, durch die die Schleifenbildung erfolgen kann. Wichtig bei diesen Sequenzen sind die Basen GU am 5'-Anfang und AG am 3'-Ende des Introns. An der Verzweigungsstelle ist ein Adenin besonders wichtig.



X = Purin

Y = Pyrimidin

Beim Spleißvorgang greift zunächst die 2'-OH-Gruppe des Adenins in der Verzweigungsstelle die Phosphodiesterbindung am Exonende nukleophil an. Dadurch wird das Guanin mit dem Uracil über eine 2'-5'-Phosphodiesterbindung an das Adenin gebunden, wodurch eine Lassostruktur (engl. lariat) entsteht.

Abb. 28: 2'-5'-Bindung A-G (Skript)

Nun ist die OH-Gruppe am 3'-Ende des Exons frei, die dann wiederum die Phosphatbindung am Intronende nukleophil angreift, wodurch das Intron herausgeschnitten wird und die Exons miteinander verbunden werden. Insgesamt werden also zwei Umesterungen vorgenommen.

Abb. 29: Umesterungen (Skript)

Für diese Reaktionen werden aber so genannte snRNPs (= small nuclear ribonucleoprotein particle) benötigt, die aus Proteinen und den kleinen nukleären snRNAs U1, U2, U4, U5 und U6 bestehen, wobei U1-U5 von der Polymerase II und U6 von der Polymerase III transkribiert werden.

U1 bindet komplementär an die 5'-splice-site, U2 an die Verzweigungsstelle, wodurch dann die Bindung zwischen Verzweigungsstelle und 5'-splice-site hergestellt wird und die primäre Schleife entsteht. Die verbundenen restlichen snRNPs (U4, U5 und U6) binden dann auch an die Schleife, wobei U5 sowohl an das 5'- als auch das 3'-Ende bindet und somit die Schleife stabilisiert. U4 wird von U2 verdrängt, das an U6 bindet, welches U1 an dessen Bindestelle ersetzt. Damit sind U1 und U4 nicht mehr an den Reaktionen beteiligt, sie bleiben aber am Spleißosom gebunden; U2 und U6 katalysieren die Umesterungsreaktionen. Nach dem Verbinden der beiden Exons verlassen die snRNPs und das Intron als Lassostruktur die mRNA. Die snRNPs und die Lassostruktur werden dann noch voneinander getrennt, die snRNPs finden sich dann für die nächste Spleißreaktion wieder zusammen.

Abb. 30: Spleißzyklus (Skript)

Für das Spleißen wird zwar ATP verbraucht, dieses wird aber nicht für die Umesterungsreaktionen benötigt, sondern um das Spleißosom aufzubauen und dessen Umlagerungen während dem Spleißen zu ermöglichen.

Das Spleißen erfolgt meistens geordnet in 5'-3'-Richtung, es gibt aber auch Beispiele, wo Exons übersprungen werden (= alternatives Spleißen). Damit ist das differenzielle Spleißen gemeint, bei dem in verschiedenen Geweben verschiedene Proteinvarianten erreicht werden, Bsp.: Tropomyosin in Muskel, Fibroblasten oder Gehirn.

In der 26S rRNA von Tetrahymena (= Ciliat) wurde 1986 das Selbstspleißen entdeckt, bei dem die katalytische Funktion vom Intron selbst ausgeht. Dabei wird zunächst ein 414 Nukleotide langes Intronstück herausgeschnitten, das dann zwei weitere Spleißschritte katalysiert, wobei es 19 Nukleotide verliert.

Später wurden diese Selbstspleiß-Mechanismen auch in T4-Phagen und einigen Mitochondrien- und Chloroplastengen gefunden. Beim Selbstspleißen werden zwei Typen unterschieden: die Gruppe I verwendet ein freies Guanin-Nukleotid, das die Bindung an der 5'-splice-site löst, die freie OH-Gruppe am ersten Exon greift dann wieder die 3'-splice-site an, wodurch das Intron herausgeschnitten wird und die Exons miteinander verknüpft werden. Das Intron schließt sich zu einem Ring, wobei das Guanin wieder abgespaltet wird.

Abb. 31: Selbstspleißen Gruppe I (Seyffert, Abb. 5-15, S. 70)

Der Mechanismus der Gruppe II (einige mRNAs, tRNAs, rRNAs von Mitochondrien, Chloroplasten in Pflanzen und niederen Eukaryonten) funktioniert wie die Reaktion am Spleißosom nur ohne snRNPs, weshalb vermutet wird das dies der Vorläufer des Splicosomes ist.

Aber dieses Selbstspleißen der Gruppe II ist in gewissem Maße reversibel, d.h. die herausgeschnittenen Introns können sich, auch an anderen Positionen, wieder einbauen.

Abb. 32: Übersicht Spleißtypen (Skript)

→ Editieren:

Beim Editieren wird die Sequenz der mRNA verändert. Entdeckt wurde dies bei der mitochondrialen mRNA in Trypanosomen, bei denen die mRNA-Sequenz des Gens für die Cytochrom-Oxidase nicht mit der DNA-Sequenz übereinstimmt. Dies führte wiederum zur Entdeckung der guideRNAs (gRNAs), die als Template für die Prozessierung benutzt werden. Diese Form der Editierung wird vor allem in Mitochondrien der Pflanzen durchgeführt, bei Säugetieren wurde eine andere Variante entdeckt, bei der nur einzelne Nukleotide verändert werden und nur Proteine beteiligt sind.

Editieren durch gRNAs:

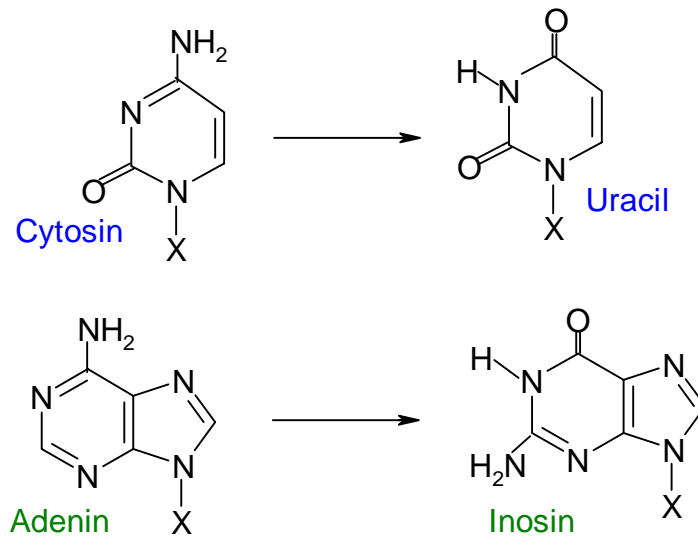
Die guideRNAs binden zum Teil komplementär an eine bestimmte Sequenz der mRNA, geben somit die Editierungsstelle und die entstehende Sequenz vor. Die nicht paarenden Se-

quenzen der gRNA dienen als Vorgabe, wo noch Uracil – von der gRNA mitgebracht - eingebaut wird.

Abb. 33: Editieren durch gRNAs (Skript)

Editieren einzelner Nukleotide:

Bei dieser Variante des Editierens werden einzelne Nukleotide ausgetauscht, Cytosin zu Uracil und Adenin zu Inosin, das mit Cytosin paart.

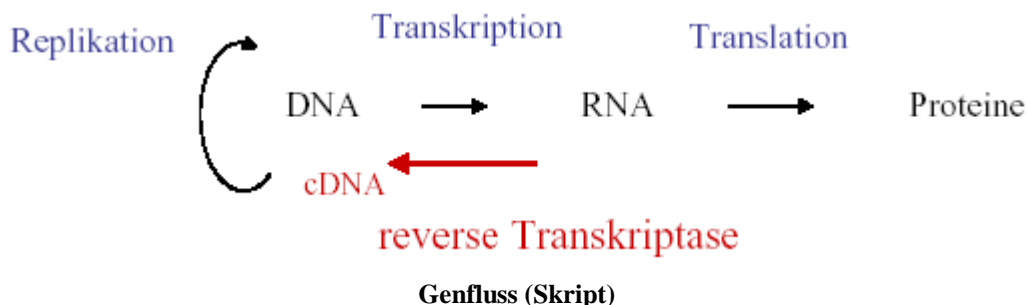


Dabei wird für den Glutamatrezeptor das Adenin zu Inosin umgewandelt, für das Apolipoprotein B wird Cytosin zu Uracil. Bei letzterer Umwandlung steuert ein Proteinkomplex eine Desaminase zur richtigen Stelle.

Abb. 34: Editieren beim Apo-B-Lipoprotein (Skript)

Von der RNA zum Gen (die reverse Transkriptase):

Retroviren, die RNA als Überträger der genetischen Information benutzen, brauchen ein bestimmtes Enzym, um die RNA in DNA umzuschreiben. Dieses Enzym ist die reverse Transkriptase, die auch in der Gentechnik verwendet wird, um intronfreie Gene zu erhalten



In vivo bindet ein Primer an die einsträngige RNA, wodurch die reverse Transkriptase ein Stück umschreiben kann. Daraufhin bringt die RNase H den Primer ans 3'-Ende, wo dann die weitere Reaktion stattfinden kann. Ist ein DNA-Strang vollständig synthetisiert, baut die RNase H die RNA ab und der zweite Strang wird synthetisiert, wobei der Primer wieder vom 5'- ans 3'-Ende springt.

Abb. 35: reverse Transkriptase-Reaktion (Skript)

In der Gentechnik wird diese Reaktion genutzt, um intronfreie Gene zu erhalten. So wird aus der Zelle mittels oligodT-Sequenzen die mRNA isoliert, die dann mittels reverser Transkriptase in cDNA (= copyDNA) umgeschrieben wird. Meist wird die Reaktion der reversen Transkriptase mit der PCR-Methode durchgeführt. Die cDNA kann man dann in bakterielle Vektoren einbauen und dort exprimieren lassen, oder mit verschiedenen Restriktionsenzymen schneiden und per Gelelektrophorese und „Southern Blot“ analysieren.

Die Proteine:

Der genetische Code:

Der genetische Code ist ein degenerierter Triplet-Code. Durch die vier verschiedenen Basen, die in allen Varianten kombiniert werden können, ergeben sich 64 Triplets, wobei AUG das Startcodon (Methionin) und die drei Triplets UAA, UAG, UGA die Stopcodons sind. Degeneriert bedeutet, dass die 61 verbleibenden Codons für 20 Aminosäuren codieren und somit mehrere Codons der gleichen Aminosäure entsprechen.

Abb. 36: Der genetische Code (Skript)

Die Wobble-Hypothese:

Wenn es 61 verschiedene Codons für 20 Aminosäuren gibt, müsste es eigentlich 61 verschiedene tRNAs geben. Aber in vielen tRNAs wurden etwa 32 verschiedene Anticodons gefunden, so dass eine tRNA mehr als ein Codon erkennt. Somit ist die dritte Position (= Wobble-Position) variabel, sie erlaubt mehrere verschiedene Basenpaarungen. Meist ist hier ein Inosin gebunden, das mit mehreren verschiedenen Basen paaren kann.

Abb. 37: Wobble-Modell (Seyffert, S. 75, Abb. 6-4)

Als Isoakzeptor-tRNAs werden zwei verschiedene tRNAs bezeichnet, die synonyme Codons erkennen und somit die gleiche Aminosäure akzeptieren.

Der genetische Code ist bis auf wenige Abweichungen universell. Abweichungen gibt es zum Beispiel bei der Interpretation der Stop-Codons: so codiert z.B. in Mitochondrien das Codon UGA für Trypsin.

Die Aufklärung des genetischen Codes:

Das Problem war, dass man zwar mRNA, tRNA und Ribosomen kannte, aber nicht wusste, wie die Proteinsequenz durch die mRNA determiniert wird.

In zellfreien Extrakten konnte man die Translation studieren, so wie *M. Nirenberg 1964*, der zunächst mit Polynukleotiden die Codons AAA, UUU, GGG und CCC entschlüsselte. Danach wurden die verschiedenen Nukleotide kombiniert, und die herauskommenden Polypeptide analysiert. Auf diese Weise wurde mit der Zeit der gesamte genetische Code entschlüsselt.

Beteiligte Komponenten:

Das Ribosom:

Das Ribosom ist ein Komplex aus Proteinen und RNA, das aus zwei Untereinheiten besteht. Diese sind bei Pro- und Eukaryonten verschieden aufgebaut:

→ Prokaryonten (70S Ribosom):

kleine Untereinheit (30S):

- 16S rRNA
- 21 Proteine

große Untereinheit (50S):

- 23S + 5S rRNA
- 21 Proteine

→ Eukaryonten (80S Ribosom):

kleine Untereinheit (40S):

- 18S rRNA
- 33 Proteine

große Untereinheit (60S):

- 28S + 5S + 5,8S rRNA
- 49 Proteine

Der RNA-Anteil bildet ein stabiles Gerüst, an das die Proteine gebunden sind. Durch Aufklärung der dreidimensionalen Molekularstruktur im Jahr 2000 ist auch klar geworden, dass die RNA für die Katalyse der Reaktionen zuständig ist, die Proteine haben eher stabilisierende Funktion. Gebunden sind Proteine und RNA des Ribosoms (= Ribozym) lediglich durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, kovalente Bindungen konnten nicht nachgewiesen werden.

Die Ribosomen bilden eine „Mikroumgebung“ für die Reaktionen der Translation und besitzen mehrere Bindestellen für mRNA, tRNA und Translationsfaktoren.

Die tRNAs:

Für die Proteinsynthese muss der genetische Code in eine Aminosäuresequenz übersetzt werden. Dabei dienen die tRNAs als Adaptor, wie dies F. Crick 1955 in seiner Adaptor-Hypothese ausdrückte: am einen Ende tragen die tRNAs das Anticodon zur mRNA-Sequenz, am anderen Ende binden sie die dem Codon entsprechende Aminosäure.

Insgesamt gibt es vier verschiedene tRNAs: die Initiations-tRNA, Aminoacyl(AA)-tRNA, Peptidyl(PP)-tRNA und deacylierte tRNA. Initiations- und Aminoacyl-tRNA liegen an Carrier-Proteinen gebunden vor, die deacylierte tRNA wird vom Elongationsfaktor G vom Ribosom entfernt und bildet somit dessen Substrat. Die PP-tRNA liegt nur ans Ribosom gebunden vor.

Die Struktur der tRNAs ist komplex, die meisten Moleküle weisen aber die Kleeblattstruktur auf. Sieht man jedoch genau hin, erkennt man ein L-förmiges Molekül, das aus zwei senkrecht zueinander stehenden Helices besteht. Die längere Helix endet dabei mit der Anticodon-Schleife, die kürzere mit der CCA-Sequenz an die die Aminosäuren binden. Im Knick der L-Struktur befindet sich die D-(= Dihydrouridin)-Schleife und die T ψ C-Schleife, wobei ψ für Pseudouridin steht.

Abb. 38: tRNA-Struktur (Seyffert, S. 76, Abb. 6-5)

Die Bindung der Aminosäuren an die tRNAs:

Zwischen Aminosäure und tRNA wird eine energiereiche Bindung ausgebildet, wobei ein Aminosäure-Adenylat als Zwischenprodukt entsteht.

Abb. 39: Beladung der tRNA (Seyffert, S. 78, Abb. 6-6)

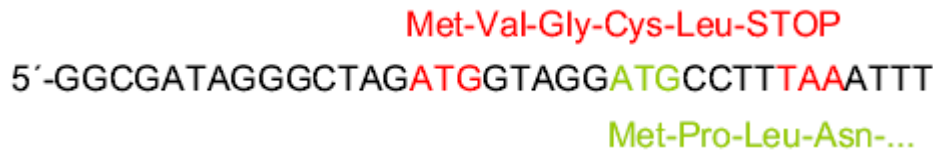
Für diese Reaktion sind die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen nötig, die sicherstellen, dass jede tRNA mit der richtigen Aminosäure beladen wird. Dabei entsteht die Esterbindung zwischen der Carboxylgruppe der Aminogruppe und der 2'- oder 3'-OH-Gruppe des Adensins der CCA-Sequenz.

Die Synthetasen besitzen zwei Bindestellen, eine spezifische für eine bestimmte Aminosäure und eine für die tRNA. Dies ist wichtig, da es durch eine falsche Beladung zu einem fehlerhaften Protein kommen würde. Die tRNAs werden meist durch das Anticodon erkannt, indem die Synthetase die komplementäre Sequenz besitzt. Manchmal dient auch die gesamte Sequenz des tRNA-Akzeptorarms zur Erkennung. Die Esterbindungen sind reversibel, so lange das Pyrophosphat noch nicht gespalten wurde. Somit können falsche Aminosäuren wieder abgespalten werden. Die Aminosäuren werden durch die genaue Passform zum aktiven Zentrum erkannt. Zu große Aminosäuren passen nicht ins aktive Zentrum und werden somit auch nicht mit der tRNA verbunden. Zu kleine Zwischenprodukte, die mit zu kleinen Aminosäuren gebildet wurden, werden im Hydrolysezentrum der Synthetase wieder hydrolysiert und somit zerstört.

Abb. 40: Beladung tRNA (Seyffert, Abb. 6-7, S. 78)

Initiation:

Das erste Problem der Initiation ist, wo die Translation überhaupt starten soll, da es verschiedene Möglichkeiten gibt, mit dem Triplet-Code zu beginnen:



Beginn der Translation (Skript)

Das bedeutet, dass der Leserahmen (= open reading frame) erst bestimmt werden muss, was durch das Ribosom geschieht. Die Translation beginnt an einem AUG-Startcodon, das für Methionin codiert. Durch das Startcodon AUG beginnen alle Proteine mit der Aminosäure Methionin, das bei Prokaryonten formyliert ist, wodurch die Polymerisationsrichtung vorgegeben wird. Die Formylgruppe wird später wieder abgespalten. Bei Eukaryonten wird normalerweise das gesamte Methionin entfernt.

Bei Prokaryonten erkennt das Ribosom eine bestimmte Sequenz vor dem Startcodon, woran die kleine Untereinheit komplementär bindet. Diese Sequenz wird Shine-Delgarno-Sequenz genannt.



Die Initiations-tRNA, die als einzige allein an die kleine Untereinheit binden kann, erkennt somit direkt das Startcodon. Allerdings sind auch noch einige Initiationsfaktoren nötig, um die Translation starten zu können.

Bei Eukaryonten gibt es keine spezielle Sequenz für das Ribosom, da die mRNA monocistronisch aufgebaut ist und nur für ein Protein codiert. Hier erkennt der Komplex aus Initiationsfaktoren, Initiations-tRNA und kleiner ribosomaler Untereinheit die Cap-Struktur und gleitet an der mRNA entlang bis das Triplet AUG gefunden ist, wo die Proteinsynthese beginnen kann. Liegt das AUG-Codon in einem ungünstigen Sequenzkontext, wird die mRNA weiter abgescannt und das nächste AUG-Codon zum Translationsstart benutzt.

Die Initiationsfaktoren IF 1-3 binden an die kleine ribosomale Untereinheit, IF 2 hat zusätzlich ein GTP gebunden. Diese drei Initiationsfaktoren haben unterschiedliche Aufgaben:

IF 1: blockiert die Aminoacylstelle (A-Stelle) der ribosomalen Untereinheit, wo die beladenen tRNAs binden.

IF 2: stimuliert die Bindung von Initiator-tRNA mit Methionin an die Peptidyl-tRNA-Stelle (P-Stelle), an der die Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren geknüpft werden.

IF 3: inhibiert die Bindung der 50S-Untereinheit

Ist die Startsequenz gefunden, bindet dieser Komplex an die mRNA, wobei die Initiationsfaktoren durch Zusammenwirken die Initiator-tRNA an die richtige Stelle dirigieren. Ist dies geschehen, dissoziiert IF 3 ab und die große Untereinheit kann binden, die dann die GTP-Spaltung bewirkt. Daraufhin dissoziieren auch IF 1 und IF 2 ab, und die Translation kann beginnen.

Abb. 41: Initiationskomplex (Skript)

Elongation:

Der Elongationsfaktor EF-Tu-GTP bindet an das 3'-Ende der Aminoacyl-tRNA und führt diese an die A-Stelle des Ribosoms. An der P-Stelle ist bereits eine tRNA mit einer Aminosäure gebunden. Die Bindung an die mRNA führt zur GTP-Spaltung, der Elongationsfaktor EF-Ts (Austauschfaktor) regeneriert EF-Tu-GTP. Somit kommt es zur Peptidbindung, wobei

die Kette von der Peptidyl-tRNA auf die Aminoacyl-tRNA übertragen wird. Danach muss der Komplex mit den tRNAs um eine Codonlänge verschoben werden, was durch die Translokation geschieht. Daran ist der Elongationsfaktor EF-G-GTP beteiligt, mit dessen Hilfe (GTP-Spaltung) die tRNA an der E-Stelle entlassen wird. Dadurch rückt der Komplex ein Codon weiter.

Das Zustandekommen der Peptidbindung:

Die Aminosäuren sind jeweils an ein Adenin gebunden. Im Ribosom greift der Aminostickstoff der kommenden Aminosäure, das C-Atom der Säuregruppe der ersten Aminosäure an. Dabei entsteht an der Ribose des Adenins ein negativ geladenes Sauerstoffatom, das sich ein Proton aus der angreifenden Aminogruppe holt. Die erste tRNA kann somit vom Ribosom abdissoziieren, die zweite tRNA bleibt am Ribosom gebunden bis die nächste Aminosäure angreift.

Abb. 42: Elongationszyklus (Seyffert, Abb. 6-11, S. 82)

Termination:

Sobald der Translationskomplex ein Stopcodon (UAA, UGA, UAG) erreicht, kommt er zum Stillstand, da keine passende tRNA zur Verfügung steht. Die Terminationsfaktoren nehmen dann die Bindestelle ein, was die Aktivierung eines Wassermoleküls zur Folge hat. Dieses greift die Bindung zwischen tRNA und Peptid nukleophil an und setzt somit die Peptidkette frei. Danach dissoziieren mRNA und Ribosom, das in seine Untereinheiten zerfällt, auseinander.

Die Terminationsfaktoren bestehen nur aus Protein, sehen aber trotzdem fast genauso aus wie eine tRNA. Dies ist ein Fall von molekularer Mimikry.