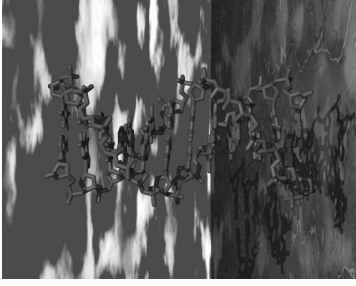


EML-BIORUNDE DNA/RNA II



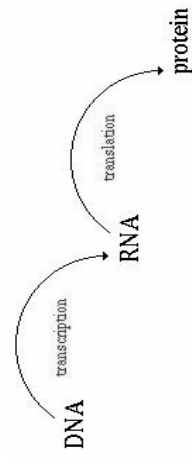
Outline

- Fluss der genetischen Information
- Der genetische Code
- Replikation und Fehlerkorrektur
- Transkription
 - Unterschiede DNA \leftrightarrow RNA
 - Posttranskriptionale Veränderungen

Zentrales Dogma der Biochemie

- Der Fluss der genetischen Information verläuft von der DNA zur RNA zum Protein.

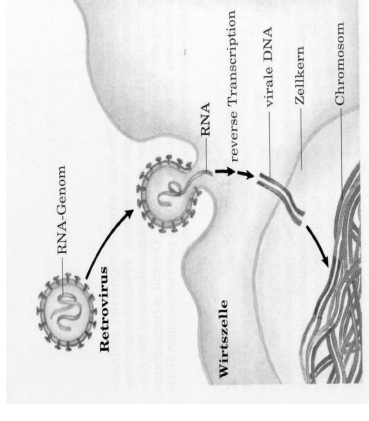
Zentrales Dogma der Biochemie



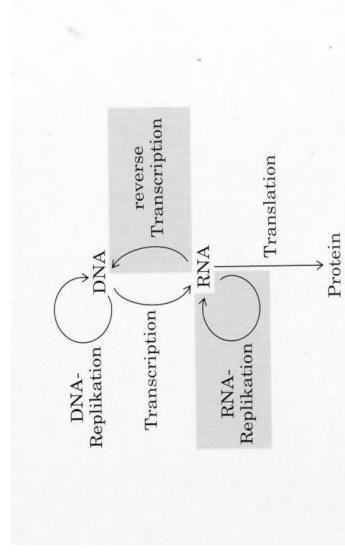
Zentrales Dogma der Biochemie

- Der Fluss der genetischen Information verläuft von der DNA zur RNA zum Protein.
- Zumindest bis 1964, als zum ersten mal die Hypothese aufkam (Howard Temin), dass RNA Viren DNA aus ihrer RNA bilden können.
- Als dann 1970 Temin und Baltimore tatsächlich das verantwortliche Enzym (Reverse Transkriptase) fanden, mussten die Lehrbücher umgeschrieben werden.

Zyklus eines Retrovirus



Erweitertes Dogma



Der genetische Code

- der genetische Code besteht aus Nukleinsäure Triplets.
- alle Organismen benutzen denselben genetischen Code. (Zumindest fast!)
- Der genetische Code einzelner Tiergruppen unterscheidet sich leicht. (Es gibt ca. 15 unterschiedliche Codetabellen)
- Selbst die Mitochondrien benutzen einen etwas anderen genetischen Code als der Zellkern.

Tabelle für den genetischen Code

	U	C	A	G	
U	Phe Leu Leu	Ser Ser Ser	Tyr Tyr Stop	Cys Cys Stop	start
C	Leu Leu Leu	Pro Pro Pro	His His Gln	Arg Arg Arg	nonpolar
A	Ile Ile Met	Thr Thr Thr	Asn Lys Lys	Ser Arg Arg	aromatic
G	Val Val Val	Ala Ala Ala	ASP ASP Glu	Gly Gly Gly	containsulfur
					polar
					positive
					negative
					stop

Replikation

- Die Verdopplung der DNA bezeichnet man als Replikation
- 1955 Arthur Kronenberg et al. suchen Enzym zur DNA Synthese
 - Enzym schnell gefunden
 - 10 Jahre bis zur vollständigen Isolierung und Charakterisierung (100 Kg E. coli -> 500 mg Enzym)
 - Enzym wurde DNA Polymerase genannt

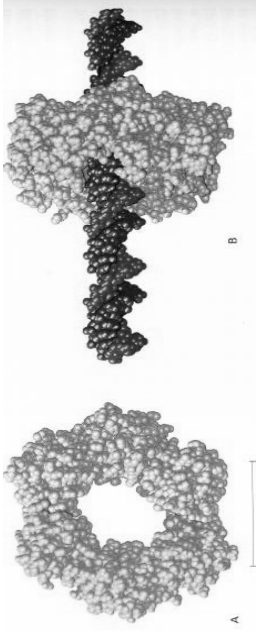
Funktion der DNA Polymerase

- DNA Polymerase war das erste bekannte matrisenabhängige Enzym.
- DNA-Pol synthetisiert ausgehend von einer DNA Doppelhelix eine identische Kopie derselben.
- DNA-Pol hängt kontinuierlich Nukleotide an das 3'-Ende des neuen DNA Stranges. Man sagt, DNA wird in 5'-3'-Richtung synthetisiert.
- DNA-Pol ist nicht das einzige Enzym, das für die DNA Verdopplung benötigt wird.

Replikation

- Technische Daten der DNA Polymerase III:
 - hängt ca. 1000 Nukleotide pro Sekunde an
 - synthetisiert beide Stränge gleichzeitig in 5'-3'-Richtung
 - entfernt falsch angehängte Nukleotide
 - Fehlerhäufigkeit von 10⁻⁷

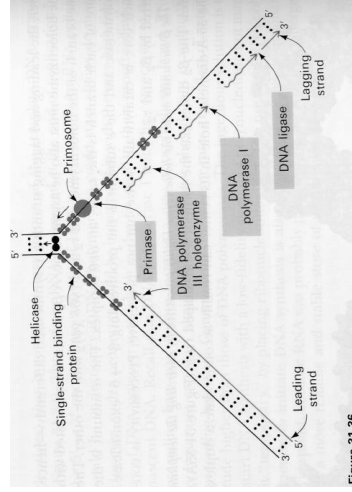
DNA Polymerase III



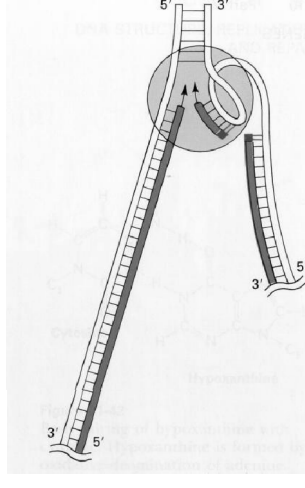
Replikation

- DNA Helikase bindet an den Replikationsursprung und entwindet ein Stück DNA.
- 'Single strand binding protein' bindet an die entwundene DNA und hindert sie so daran, sich wieder zusammenzulagern.
- Primase synthetisiert ein kurzes Stück RNA an der entwundenen Stelle, welches der DNA-Pol als Start dient.
- DNA-Pol synthetisiert komplementäre DNA an beide Einzelstränge.

Replikationsgabel



Replikationsgabel



Replikation ist semikonservativ

- Da die neu synthetisierten DNA Stränge jeweils einen alten und einen neuen Strang enthalten, bezeichnet man die Replikation als einen semikonservativen Prozess

DNA Polymerasen

- DNA Polymerase I:
 - zuerst entdeckt (Kronenberg, s.o.)
 - entfernt den Primer und füllt Lücken bei der Replikation
- nur 1/10 der Grösse der RNA Polymerase III
- zusätzlicher Reparaturmechanismus

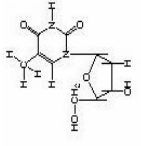
DNA Polymerasen

- DNA Polymerase II:
 - wichtig für die Reparatur der DNA
- DNA Polymerase III:
 - Replikation der DNA (s.o.)

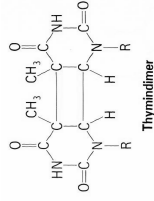
Ursachen von Mutationen

- Fehlerhafte Replikation
- spontane chemische Veränderungen der DNA
- chemische Veränderungen der DNA durch äussere Einflüsse
 - Strahlung (UV, Radioaktivität)
 - chemische Mutagene
 - direkte Veränderungen an der DNA
 - Einlagerung in die DNA → falsche Basenpaarung → fehlerhafte Replikation

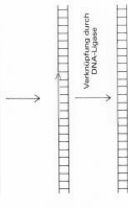
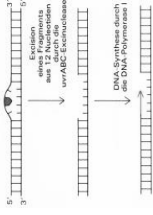
Thymindimere durch UV



Thymine



Thymindimer

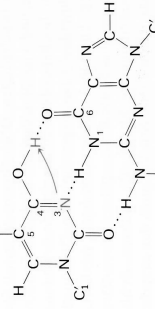


31.45 Die Reparatur eines DNA-Brechens mit einem Thymindimer durch aufeinanderfolgende Einwirkung einer spezifischen Exonuclease (Exonuclease III), einer DNA-Polymerase III (DNA-Polymerase III) und einer DNA-Ligase. Das Thymindimer ist blau dargestellt. (Quelle: Molecular Biology of the Cell, 6. Auflage, Garland Science, © 2015, S. 83)

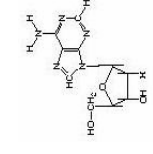
chemische Mutagenese

- Thymidinanalogon wird statt Thymin in DNA eingebaut
- paart gelegentlich mit Guanin anstatt mit Adenin

selteneres Tautomer des 5-Bromouracils



Adenintautomer



Adenine



31.46 Die Paarung des selteneren Adenintautomers mit Thymin statt mit Thymin. Das Thymindimer entsteht durch Veresterung eines Protons von der Aminogruppe an C-2 (N.V.).

Fehlerrate der Replikation

- Fehlerrate bei der Replikation durch DNA Polymerase III: 10^{-7}
- \rightarrow theoretisch ca. 400 Fehler bei der Replikation des menschlichen Genoms, aber
- Fehlerrate nach der Korrektur durch verschiedene Reparatursysteme: 10^{-10}
- \rightarrow nur noch ca. 0.3 Fehler bei der Replikation des menschlichen Genoms

Replikation in Eukaryonten

- zwei DNA Polymerasen zur Replikation der Kern DNA
- zwei DNA Polymerasen zur Reparatur der Kern DNA
- eine DNA Polymerase zur Replikation der Mitochondrien DNA
- DNA Polymerasen können lineare DNA nicht vollständig synthetisieren → Telomerase muss Ende anhängen

Telomerase

- Eukaryontische DNA Polymerasen können weder 3'–5' replizieren noch DNA Ketten ohne Primer (s.o.) beginnen → an einem neu synthetisierten Strang einer replizierten DNA fehlt ein Stück am 5'–Ende
- Damit die DNA nicht immer kürzer wird, muss das 5'–Ende von einem anderen Enzym, der Telomerase, ergänzt werden.
- Die Telomerase hängt mehrere hundert Wiederholungen einer spezifischen Sequenz an das 5'–Ende eines DNA Stranges (Telomer).

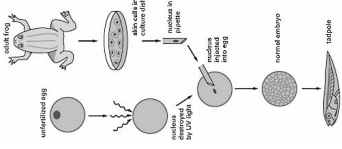
Telomerase

- Telomerase ist nur in Keimzellen, Krebszellen und in Zellen asexuell fortpflanzungsfähigen Organismen (z.B. Hefe) aktiv.
- Telomerase wird in den meisten Zellen von sich sexuell fortpflanzenden Organismen zu einem bestimmten Zeitpunkt abgeschaltet.
- → Das geklonte Schaf Dolly ist genetisch gesehen so alt, wie ihre Mutter!

Was ist Klonen?

- Man nimmt eine Eizelle und zerstört deren Zellkern
- Man entnimmt einer Zelle eines Tieres **derselben Tierart** den Zellkern und transferiert ihn in die Eizelle ohne Zellkern.
- Man erhält eine Eizelle mit den genetischen Eigenschaften des ausgewachsenen Tieres von dem der Zellkern entnommen wurde, d.h.
- → die Telomere sind bereits verkürzt

Klonen



Replikationsgeschwindigkeit

- Prokaryonten (Mycoplasma)
 - 760000 Basen / 1000 Basen/sek = 760 sek = 13 min
- Eukaryonten (Mensch)
 - 3 000 000 000 Basen / 1000 Basen/sek = 3 000 000 sek = 50 000 min = 833 Stunden = 35 Tage (Eine einzige Polymerase ist viel zu langsam! ->)
 - Viele DNA Polymerasen replizieren die DNA gleichzeitig
 - Noch nicht ganz fertig replizierte DNA wird an den replizierten Stellen gleich erneut repliziert.

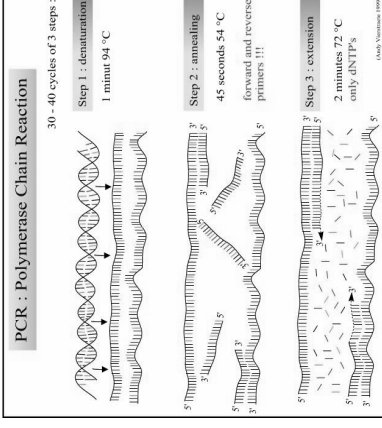
Polymerasekettenreaktion (PCR)

- 1984 von Kary Mullis entwickelt
- wichtige Methode zur Vielfältigung spezifischer DNA Sequenzen
- sehr empfindlich: 10 Tuberkelbakterien können unter einer Million menschlicher Zellen aufgespürt werden
- Anwendung in der medizinischen Diagnostik, Forensik und der molekularen Evolution

Polymerasekettenreaktion (PCR)

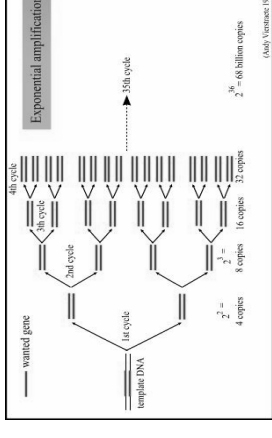
- eine PCR besteht im wesentlichen aus mehreren Wiederholungen folgender drei Schritte:
 - Trennung der beiden Stränge durch Hitze
 - Anlagerung der Primer an den Anfang des zu replizierenden Stücks auf jedem Strang
 - Synthese des komplementären Stranges durch DNA Polymerase I

PCR



PCR Amplifizierung

Da jedes neue DNA Stück in der nächsten Runde wieder als Matrize dient, verläuft das Wachstum exponentiell.



medizinische Diagnostik

- der Erfolg einer Krebstherapie kann bestimmt werden, indem man nach Genen sucht, die spezifisch für Krebszellen sind.
- ist das Gen bekannt, das für eine bestimmte Krankheit verantwortlich ist, kann man eine Person auf dieses Gen testen
- HIV Viren sind schon nachweisbar, bevor eine Immunreaktion eingestzt hat

Forensik

- eine Haarwurzel oder eine Samenzelle enthält genug DNA, um einen Täter anhand eines DNA-Vergleichs eindeutig zu identifizieren
- Man benutzt für diesen Vergleich oft den Bereich des Genoms, der für Immunproteine (Antigene) codiert. Dieser Bereich ist für jedes Individuum einzigartig und nur unter nahen Verwandten sehr ähnlich (→ Organtransplantation)

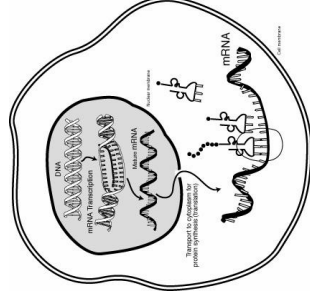
molekulare Evolution



molekulare Evolution

- Gene von 2400 Jahre alten Mumien, 30 Mio. Jahre alten Termiten und anderen fossilen Funden wurde bereits analysiert.
- Analyse gibt Einblicke in die Evolution dieser Tier- und Pflanzenarten
- Bis jetzt wurden keine vollständigen fossilen Genome wieder hergestellt
- Selbst wenn ein vollständiges Genom wieder hergestellt werden kann, ist eine Klonierung nicht unbedingt möglich! (Dino Eizellen sind zur Zeit etwas knapp!)

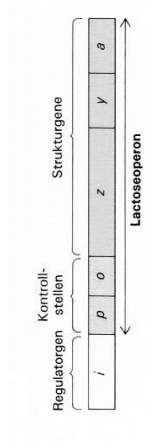
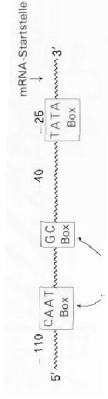
Von DNA zu RNA



Genstruktur in Prokaryonten

- Gene sind in sogenannten Operons organisiert.
- Operonstruktur:
 - zwei oder mehr stromaufwärts liegende aktivierende Sequenzen
 - TATA-Box als Erkennungsstelle für den Transkriptionskomplex
 - eigentliche kodierende Sequenz
 - meist werden mehrere Proteine in einem Operon kodiert

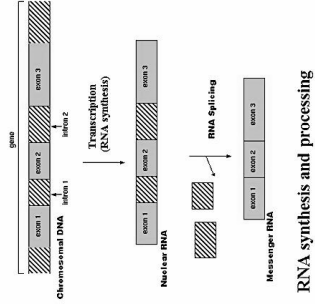
Operonstruktur



Genstruktur in Eukaryonten

- besitzen ebenfalls Operons mit regulatorische Sequenzen und einer TATA-Box
- kodierende Sequenz wird durch nicht kodierende DNA Stücke unterbrochen: Exon-Intron-Struktur

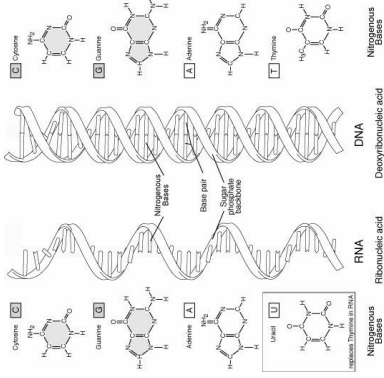
Intron-Exon-Struktur



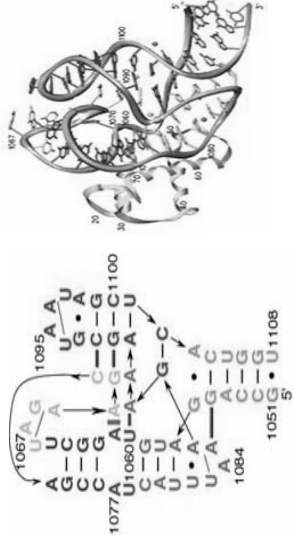
Unterschiede DNA <-> RNA

- RNA liegt meist als Einzelstrang vor
- RNA Einzelstränge falten zu komplexen dreidimensionalen Strukturen (ähnlich Proteinen)
- RNA besteht aus Ribonukleinsäuren
- RNA besitzt Uracil anstelle von Thymin
- RNA kann als Enzym wirken

Unterschiede DNA <-> RNA



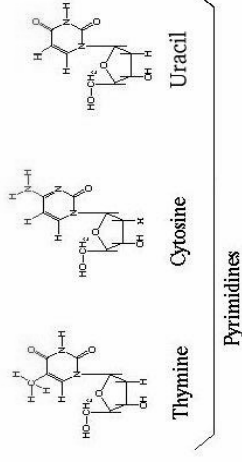
RNA Struktur



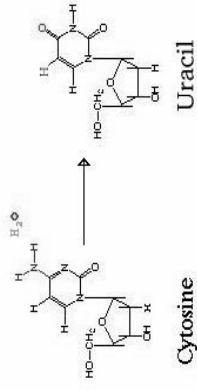
Warum besitzt DNA T anstatt U?

- die Produktion von Thymin aus Thymin kostet die Zelle viel Energie
- Uracil speichert dieselbe Information wie Thymin
- Warum investiert die Zelle also so viel Energie in die Produktion von Thymin?

Strukturformeln der Pyrimidine



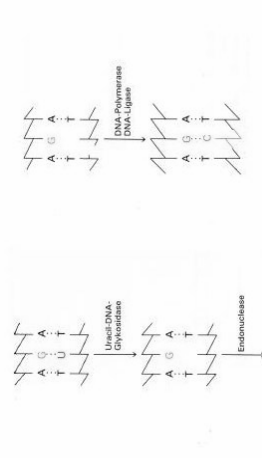
Spontane Desaminierung von Cytidin



Reparatur von Uracil in DNA

- Thymidin desaminiert häufig spontan zu Uracil
- Die Zelle erkennt, dass Uracil nicht in die DNA gehört und entfernt es.
- DNA Polymerase füllt die Lücke wieder auf.

Reparatur von Uracil in DNA



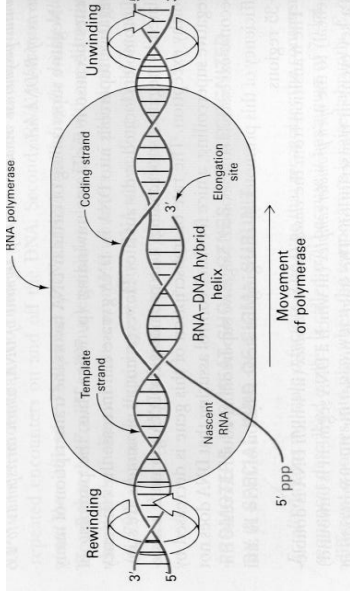
Transkription

- Als Transkription bezeichnet man die RNA-Synthese auf Basis einer DNA Matrize

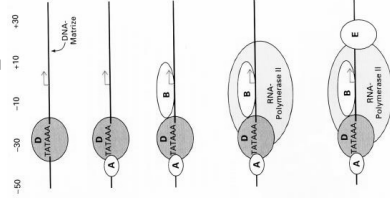
Mechanismus der Transkription

- verschieden Proteine erkennen die TATA-Box und andere Regulatorsequenzen und binden daran.
- Bindung kann Transkription initiieren oder auch verhindern
- Proteine werden von RNA Polymerase erkannt und diese bindet.
- Transkription beginnt

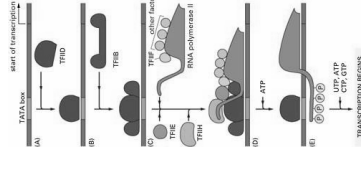
Transkription



Transkription



Transkription



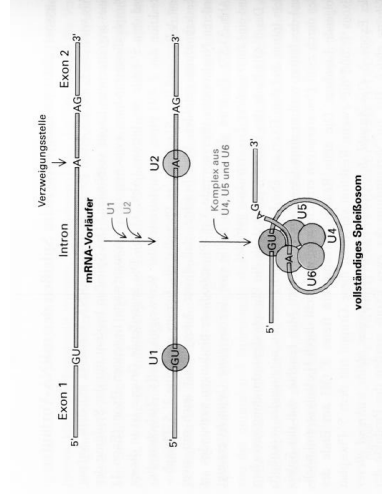
RNA Typen

- mRNA: Messenger-RNA dient als Blaupause für die Synthese von Proteinen
- tRNA: Transfer-RNA liefert Aminosäurebausteine an die Ribosomen zur Proteinsynthese
- rRNA: Ribosomale RNA bildet zusammen mit verschiedenen Proteinen die Ribosomen
- snRNA: small nuklear RNA befindet sich im Zellkern, die Funktion ist nicht genau bekannt

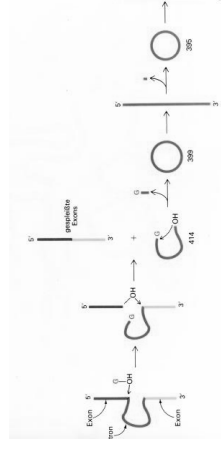
Spleissen

- frisch transkribierte mRNA in Eukaryonten besitzt noch Introns.
- Introns werden durch das sogenannte Spleissen entfernt.
- Die meisten mRNAs werden durch Spleisosomen prozessiert. Spleisosomen sind Komplexe aus Proteinen und RNA.
- Manche mRNAs sind jedoch in der Lage, sich selbst zu spleissen.

Spleisosom



Selbstspleissen



alternatives Spleissen

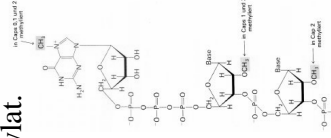
- dieselbe mRNA kann je nach Zelle und Umweltbedingungen unterschiedlich gespleisst werden.
- Aus derselben mRNA können unterschiedliche Proteine gebildet werden.
- -> aus der fertigen mRNA kann man nicht unbedingt die Sequenz der entsprechenden DNA ableiten!

Posttranskriptional Modifikationen

- Spleissen
- Capping
- Polyadenylylation
- RNA Editing
- ...

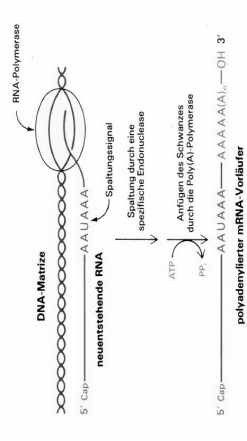
Capping

- Noch während der Transkription erhält die mRNA ein 7-Methylguanylat.



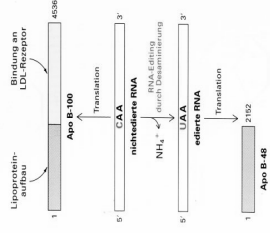
Polyadenylylierung

- die meisten mRNAs werden im Anschluss an ihre Synthese gespalten und erhalten einen Poly-A-Schwanz.



RNA Editing

- chemische Veränderungen an einzelnen Basen in der fertigen mRNA führen zu einer Veränderung der Kodierung.



Zusammenfassung

- Der Fluss der genetischen Information geht von DNA über RNA zum Protein.
- Reversetranskriptase aus Retroviren (AIDS) macht aus RNA wieder DNA
- Die Verdopplung der DNA in einer Zelle wird Replikation genannt.
- Die Replikation ist sehr genau und die Zelle besitzt viele Mechanismen, um Fehler in der DNA zu erkennen und zu reparieren.

Zusammenfassung

- Die Synthese von RNA aus DNA bezeichnet man als Transkription, die Synthese von Protein aus mRNA als Translation.
- RNA wird nach der Synthese in mehreren Schritten chemisch verändert (Spleissen, Capping, Polyadenylylation, ...)