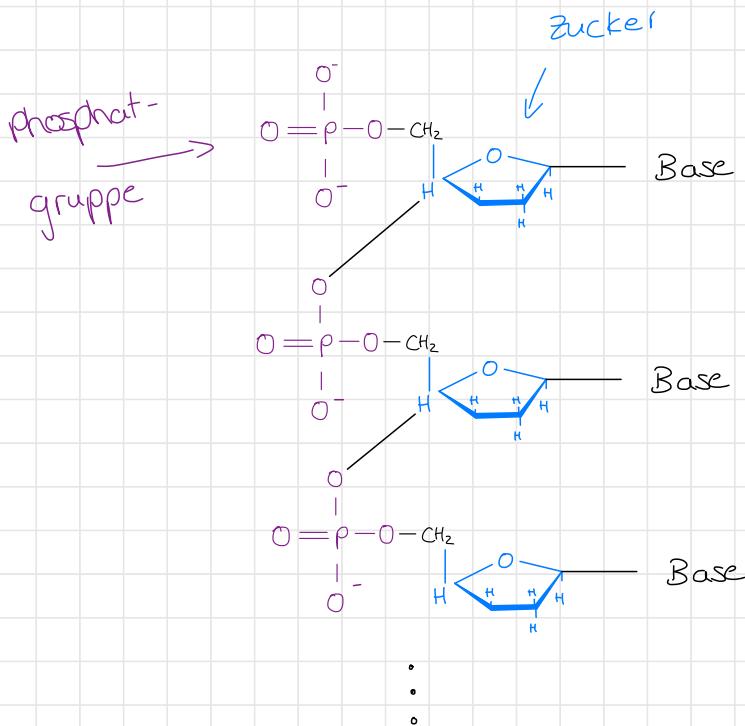


# I. DNA Struktur

Rausgewählt: Transposition

## Zusammensetzung

- DNA = Polymer
- Monomere = Nukleotide
  - = Phosphatgruppe
  - + Pentosezucker (Desoxyribose)
  - + stickstoffhaltige Base
    - Thymin
    - Adenin
    - Cytosin
    - Guanin

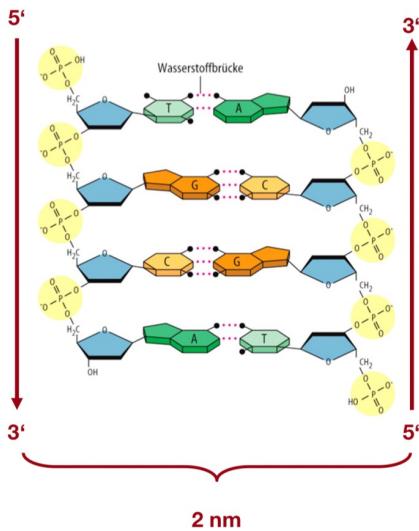


## Eigenschaften Doppelhelix

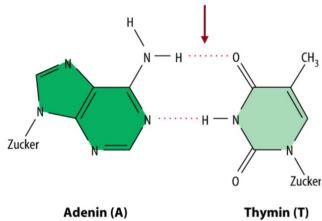
- besteht aus 2 Polynukleotiden
  - Basen auf Innenseite
  - Wechselwirkung Polynukleotide: Wasserstoffbrücken zw. Basen
  - Polynukleotide antiparallel
  - 2 Furchen: große, kleine
  - rechtsgewunden
  - 1 Windung  $\approx$  10,5 BP
  - verschiedene Konformationen möglich (zB B-DNA, A-DNA, Z-DNA)

## Basenpaarung

- Wasserstoffbrücken = schwache elektrostatische Kräfte
  - Paar = Purin + Pyrimidin

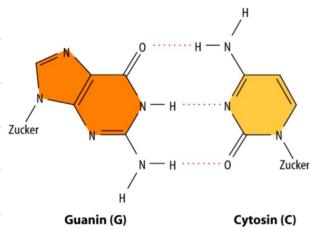


> AT - Paar:



- Adenin + Thymin  
2 Wasserstoffbrücken

## > CG - Paar:



Cytosin + Guanin

3 Wasserstoffbrücken

## Base flipping

- DNA - Backbone flexibel
  - Base kann nach außen gedreht werden = "flipped base"
  - => Substrat für Methylasen, Reparatur - Enzyme
- energetisch unaufwendig

## DNA Furchen

- kleine Furche  $\approx 12 \text{ \AA}$  ( $1,2 \text{ nm}$ )
- große Furche  $\approx 22 \text{ \AA}$  ( $2,2 \text{ nm}$ )

## große Furche

- eindeutige Erkennung der Basenpaare möglich
- => sequenzspezifische Bindung von Proteinen

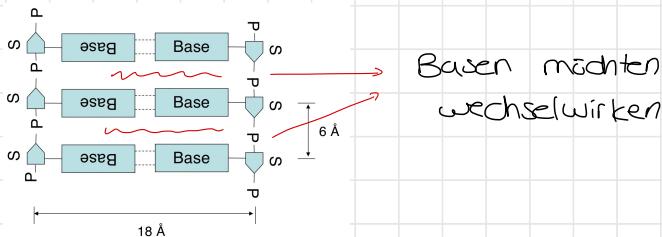
## kleine Furche

- Interaktion mit Nukleosomen

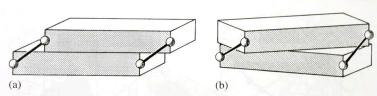
## Geometrie Nukleotide

Grundprinzip: DNA bildet thermodynamisch stabilste Konformation

Nukleotide  $\approx$  Sprossen einer Leiter



=> Stacking interactions = Verschiebung  $\leftrightarrow$  + Drehung ↗

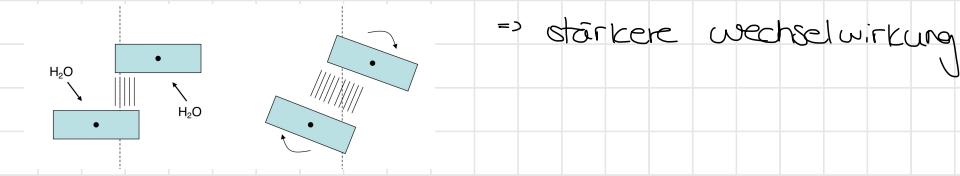


=> größere Interaktionsfläche durch Drehung um 32° ↑

- > thermodynamisch am stabilsten Limit durch Bindung
- > Doppelhelix - Struktur

## Propellertwist

- durch Zucker - Phosphat - Backbone: Basen verdreht verankert



## Watson-Crick Clash

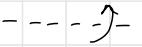
- beim Übergang von Pyrimidin (C/T) zu Purin (G/A)

Abstand zwischen Leitersprossen fix

=> kann nicht eingehalten werden ↗

=> "ausweichen" durch

- Twist 

- Roll  20°

- Slide  - 2 Å

=> B-DNA keine perfekte Helix:

- Konformation abh. von Sequenz
- Furchengrößen variieren
- Periodizität ändert sich

=> gezieltes Formen möglich

- Wechsel AT-reich / GC-reich = Krümmung

ZB: gebogene DNA für RNA-Polymerase  
→ höhere Affinität

· Wicklung der DNA um Nukleosome (Kompaktierung)

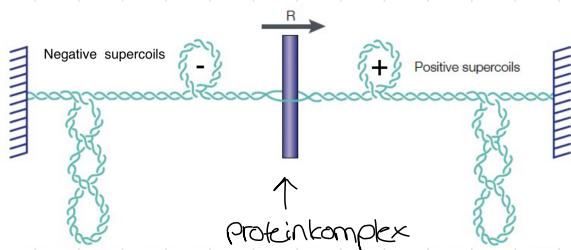
## Supercoils

· Verdrehung der DNA = Spannung

→ Entspannung durch Supercoils

Wicklung (zB um Nukleosome)

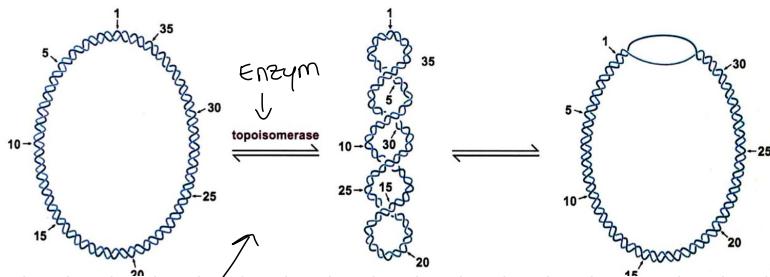
· Transkription erzeugt positive + negative lokale Superhelikalität



→ Auflösung durch Topoisomerasen / Einzelstrangbrüche durch DNaseI

## Prokaryoten:

negatives Supercoil = weniger  
↓ Windungen



Aufwärts entgegen  
der Federspannung

## II. DNA - Replikation

- Herstellung vollständiger Kopie aller Gene
- hohe Genauigkeit (1 Fehler pro 1 Mrd Nukleotide)
- semi-konservative Verdopplung  
= Trennung der Strände, alt = Matrize  $\rightarrow$  bekommt neuen Partner = 

### Replikationsautomat

wichtigste Proteine:

- Helikasen : Entwindung Doppelhelix
- SBB-Proteine : Stabilisierung der geöffneten Doppelhelix
- Topoisomerasen : Abbau Superhelikalität
- Primasen : Synthese RNA-Primer für Start
- DNA-Polymerasen : DNA-Synthese, Korrekturlesen
- Ligasen : Verknüpfung von Einzelsträngen

### Topoisomerasen

• Abbau der Superhelikalität vor der Replikationsgabel

#### Typ I:

- verändern Linking number in Stufen von 1
- 4 katalytische Bereiche
- schneidet einen der Strände und führt anderen durch die Lücke

- geschnittene DNA - Enden bleiben mit Topo verbunden
- Energieiche Bindung "gespeichert"
- am Ende damit wieder zusammenführen

## Typ II

- Verändern Linking number in Stufen von 2
- ATP - abhängig
- schneidet Doppelstrang und führt anderen Doppelstrang durch die Lücke
- ? nur Bakterien kennen negative Supercoils einführen  
(mittels Gyrase)
  - nötig zur Replikation

## Helikasen

- entwinden die Doppelhelix unter ATP - Verbrauch

## Aufbau

- hexamere, ringförmige Protinkomplexe
  - 6 Untereinheiten
  - binden an ssDNA
- ss = single-strand DNA

## Mechanismus

- alle Untereinheiten berühren DNA über "Haarnadel" - Struktur
- 6 identische Untereinheiten:
  - je 2 gegenüberliegende arbeiten zusammen

- 3 Zustände:
- 1) ATP gebunden
  - 2) ADP gebunden
  - 3) ADP freigesetzt

- ≈ 6 - Beiniges Insekt :
- |                           |               |
|---------------------------|---------------|
| 2 Beine ziehen            | } Oszillation |
| 2 Beine positionieren neu |               |
| 2 Beine in der Luft       |               |

=> DNA wird durch die Mitte gezogen

## SSB - Proteine

SSB = single-strand-binding = Einzelstrang-bindend

- binden entstehende Einzelstränge
- verhindern sofortiges Verschließen
- kooperative Bindung  
= Bindung eines Proteins fördert Bindung weiterer

## Primasen

Problem: DNA-Polymerase + Einzelstrang + Nukleotide reichen nicht  
→ DNA-Polymerase braucht Startmolekül = Primer

Leitstrang: kontinuierliche Synthese (5' - 3' - Richtung)  
→ braucht nur einmal einen Primer

Folgestrang: diskontinuierliche Okazaki-Fragmente  
→ braucht je Fragment neuen Primer

## Bakterien

### Primer-Synthese:

- durch Primase
  - Ecoli: DnaG = Primase, höhere Prozessivität durch Assoziation mit Helikase
  - Startpräferenz bei GTA-Sequenzen
- Primase erzeugt Primer, Pol-III setzt an Primer an und arbeitet weiter

## Primer - Entfernung:

### 1. RNase H:

· baut alle Primer - Nukleotide bis auf erstes ab

### 2. 5'-Exonuklease entfernt erstes Nukleotid

### 3. Pol I füllt Lücke in 5' - 3' - Richtung auf

### 4. Ligase versiegelt Bruch

! Pol I nur für kurze Sequenzen

Pol III macht Hauptarbeit (= Synthetisiert lange Sequenzen)

## Eukaryonten

### Primer - Synthese:

· Primase assoziiert mit DNA-Polymerase Pol $\alpha$

### 1. Primase erzeugt Primer - Sequenz

### 2. Pol $\alpha$ synthetisiert die ersten 100-200 bp

### 3. Pol $\alpha$ + Primase entfernt, Pol $\epsilon$ / Pol $\delta$ übernehmen $\rightarrow$ synthetisieren fertig

## Primer - Entfernung

### 1. Verdrängungssynthese durch Pol $\delta$

= Pol $\delta$  synthetisiert Primer - Bereich neu

$\Rightarrow$  Primer steht als Einzelstrang ab

### 2. RPA (Replication Protein A) bindet an Primer - Einzelstrang

### 3. Endonuklease Dna2 spaltet Primer - 5' - Ende von DNA ab

### 4. weitere Endonukleasen entfernen verbleibenden Überhang

## Ligasen

- Schließen Phosphodiester-Bindungen zwischen 5'P und 3'OH  
→ verbinden Okazaki-Fragmente

- Kofaktoren:
  - Bakterien: NAD
  - Eukaryonten: ATP

## DNA-Polymerasen

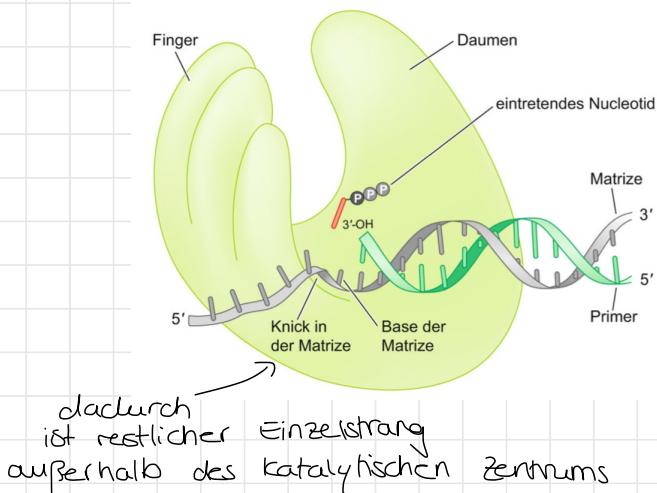
! arbeiten IMMER in 5'-3'-Richtung

- knüpfen neue Nukleotide an freie 3'-Enden
- benötigt Energie
  - durch Anknüpfen entsteht freies P-P
  - Pyrophosphatase spaltet P-P in 2Pi (Hydrolyse)
  - Energie wird frei
  - treibt Prozess voran

## Prokaryonten

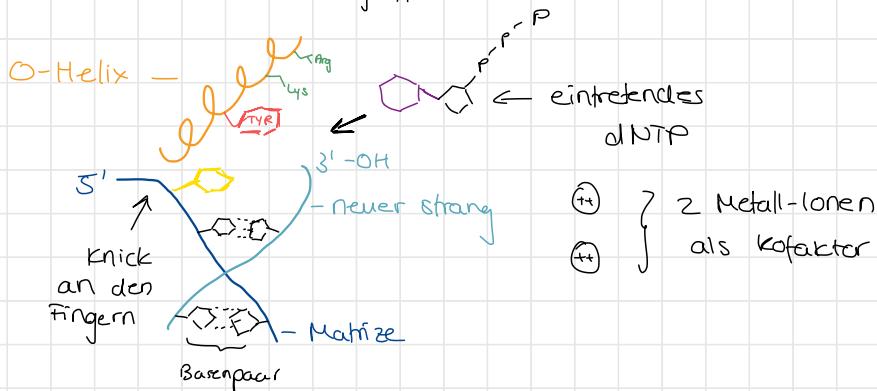
### Polymerase III

- Struktur  $\alpha$  Hand



## Funktionsweise

1. O-Helix der Pol-III geöffnet



2. Falls eintretendes dNTP korrekt (= korrekte Paarung):
  - O-Helix klappt noch unten (Konformationsänderung)
  - Lys, Arg positiv geladen → assoziieren mit P-P von dNTP  
→ Phosphodiester-Bindung
  - Tyr hält dNTP auf richtiger Höhe

## Kofaktoren:

- 2 Metall-Ionen ( $\text{Mg}^{++}$ ) A, B

## Basenpaarung:

- Komplementäre Base: OH vom Templat, P der neuen Base haben richtigen Abstand  
→ Bindung
- nicht komplementäre Base: OH + P können nicht wechselwirken  
→ Abstand zu groß
- kein gezieltes Aussuchen des dNTPs → ausprobieren
- diskriminatorische Aminosäure der Pol III verhindert rNTP Bindung

← RNA

## Proofreading

· Pol III hat 3' - 5' Exonukleaseaktivität

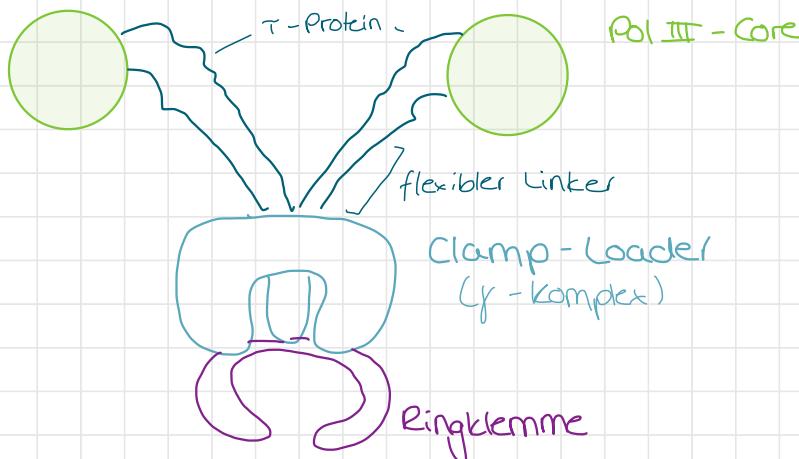
· falsche Base eingebaut:

1. DNA Synthese langsamer (stoppen)
2. Umlagern: Einzelstrang nach Exonuklease-Domäne
3. Exonuklease der falschen Base (+ Nachbar)
4. Umlagern: Einzelstrang nach Synthese-Domäne
5. Fortsetzen der Synthese

! nicht alle Pol III haben Proofreading, zB T<sub>AQ</sub>-Pol hat keine  
Thermus aquaticus Bakterium

## Aufbau

Pol III - Holoenzym = 2 Pol III - Cores als Dimer  
+ Clamp Loader  
+ Ringklemme



## Ringklemme

(Pro- + Eukaryonten)

- erhöht Prozessivität der DNA-Polymerasen
- → hält DNA-Pol an der DNA
- nur für Haupt-Pols gedacht (Pol II / Pol δ, Pol ε)

Aufbau:



## Clamp Loader

- löst Ringklemme auf DNA
  - ATP-Verbrauch
  - Ecoli:  $\gamma$ -Komplex
- Eukaryonten: RF-C = replication factor C

1. Clamp Loader bindet ATP
2. bindet Ringklemme  
→ Ringklemme öffnet
3. Clamp Loader führt an DNA
4. ATP Hydrolyse ( $ATP \rightarrow ADP + P_i$ )  
→ Klemme schließt  
→ Clamp Loader löst sich ab

# Replikation

## Replisom

= alle Enzyme an der Replikationsgabel:

- Primasen
- Topoisomerasen
- Polymerasen
- Helikasen
- SBB - Proteine

## E. coli

- Helikase entwindet DNA kontinuierlich
- SBB - Proteine binden Einzelstränge
- Leitstrang: ein Pol-III Core des Holoenzyms arbeitet kontinuierlich
- Folgestrang: Okazaki-Fragmente
  - nächster Primer wird vorbereitet während Ok.-Frag. beendet wird
  - Primase löst sich
  - Pol - III löst sich von DNA, Ringklemme
  - neue Ringklemme wird an DNA geladen
  - Pol - II bindet an Ringklemme
  - Synthese
  - ... repeat

→ durch Pol-III-Holoenzym: Folge- & Leitstrang Pols sind verbinden

# Regulation

## Replikator

- = DNA - Bereich an dem die Replikation beginnen kann
- besteht aus
  - mehreren Initiator-Bindestellen
  - AT-reichen Regionen (einfachere DNA-Entwurfung)
  - Startposition der DNA-Synthese

## Prokaryoten

### Initiation

durch Bindung Initiator-Proteinkomplex an Replikator

### Initiator-Proteine

- binden an DNA an Replikator-Stelle
- separieren DNA-Stränge
- rekrutieren Replikationsproteine (Helikassen, ...)

### Ablauf Beispiel E. coli

Initiator = DnaA

Replikator = oriC Region

1. DnaA assoziiert mit ATP
2. DnaA-ATP bindet an 9mer-Repeatsequenz von oriC
3. DnaA-ATP 13mer  
⇒ Strangtrennung im Bereich des 13mers
4. DnaA-ATP rekrutiert Helicase + Helicase-Loader
5. Helikase rekrutiert Primase
6. Entfernung von DnaA
7. Rekrutierung PolIII-Holoenzym + Synthese

→ DnaA-ATP wird während Prozess zu DNA-ADP

- ATP-ADP Austausch langsam

⇒ Regulation der Initiation über ATP Menge

## Koordination in E. coli

- durch Dam Methylase + SeqA

### Dam Methylase

- = DNA Adenin Methylase
- erkennt GATC - Sequenz
- methyliert Adenin zu Methyl-Adenin

1. Normalzustand = DNA vor Replikation : alle GATC methyliert  
= DNA vollständig methyliert
  2. nach Replikation : DNA hemimethyliert  
= alter Strang methyliert,  
neuer unmethyliert
  3. SeqA bindet an hemimethylierte Bereiche  
⇒ inhibiert Dam - Methylase, DnaA  
⇒ inhibiert Methylierung und Re-Initiation
  4. Mit der Zeit baut sich SeqA ab  
⇒ Dam - Methylase bindet + methyliert
  5. DnaA kann binden + Re-Initiation
- 
- schnellwachsende E. coli : erneute Replikation beginnt vor Ende der Zellteilung

### Termination

- ter - Sequenzen = Replikationsterminatoren
  - binden Tus - Proteine = verhindern Replikation
- Ring - Chromosomen verkettet nach Replikation (Catenane) 
- ⇒ topo II kann trennen

## Eukaryonten

- DNA muss genau 1 mal repliziert werden während S-Phase
  - unreplizierte Regionen = Chromosomenbrüche
  - mehrfache Replikation = Kopiezahleffekte (z.B. Trisomien)
- mehrere Origins of Replication

## Zellzyklus

1. M-Phase = Mitose - Phase
2. G1-Phase
3. S-Phase = DNA Replikation
4. G2-Phase

## Mitosis Promoting Factor (MPF)

- Konzentration konstant
- Aktivität abh. von Cyclin-Konzentration

## Aufbau

- Cyclin-abhängige Kinase (Cdk) + Cyclin
- Cdk phosphoryliert Cycline
- ohne Cyclin ist MPF inaktiv

## Funktionsweise

1. mitotisches Cyclin bindet inaktives Cdk  
= MPF  
=> Initiation der Mitose
  2. Cyclin wird instabil, zerfällt  
=> Cdk inaktiv
  3. G1-Cyclin bindet inaktives Cdk  
= Start-Kinase  
=> Initiation der DNA-Replikation
  4. Cyclin zerfällt => Cdk inaktiv
- F  
...  
Repeat

## Initiation der Replikation

### pre-RC

= Prä-Replikations Komplex

- Bildung in G1-Phase
- Aktivierung in S-Phase

1. Origin Recognition Complex (ORC) = 6 Proteine

→ während Zellzyklus immer an Replikator gebunden

2. Cdc6, Cdt1 = Helikase-Loader = Schutzgruppen die Initiation verhindern

→ Bindung an ORC in G1

3. Mcm2-7 Komplex = Helikase

→ Bindung an Cdc6 + Cdt1 in G1

### Aktivierung

in S-Phase

durch 2 Proteinkinasen: Cdk, Ddk

→ entfernen Cdc6, Cdt1

⇒ Rekrutierung Pol ε, Pol δ

⇒ Pol α / Primase

⇒ Ringklemme, Clamp-Loader

⇒ Synthese

- ohne Cdc6 kann keine erneute Initiation erfolgen

⇒ Replikation inhibiert Initiation

## Telomere

= Chromosomen-Enden

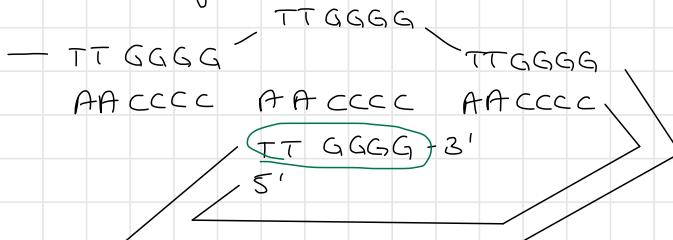
Problem: Primer des Leitstrangs kann nicht ersetzt werden

(weil der Primer dafür fehlt → Pol kann nicht arbeiten)

⇒ Leitstrang wird verkürzt

Lösung: Repeat - Struktur im Telomer (100-1000x)  
= G - reiche Sequenz im überhängenden Einzelstrang

→ Stabilisierung durch t-loop



## Verlängerung

- Telomer - Verlängerung durch Reverse - Transkription durch Telomerase

Telomerase = Proteinkomplex mit RNA - Template

1. Telomerase bindet an freies Telomer - Ende (3' - Ende)  
→ RNA - Template steht über
2. Reverse - Transkriptase (= DNA - Polymerase die RNA - Template synthetisiert DNA nutzt)
3. Translokation: Telomerase hüpfst ein Stück weiter  
→ RNA - Template steht über
4. Repeat

## Shelterin - Komplex

- = Reparaturenzyme
- kontrolliert:
  - Telomerstruktur
  - Bildung der t-loops
  - Telomerase - Aktivität
  - verhindert Erkennung durch Reparaturenzyme / homologe Rekomb.

### III. Rekombination

- Rekombination während der Zellteilung durch Cross Over

#### Cross - Over

- Austausch genetischer Info zwischen homologen Chromosomen durch Überkreuzungsstruktur
- Cross - Over = molekulare Mechanismus
- Chiasmata = zellbiol. sichtbare Überkreuzung

#### Genkonversion

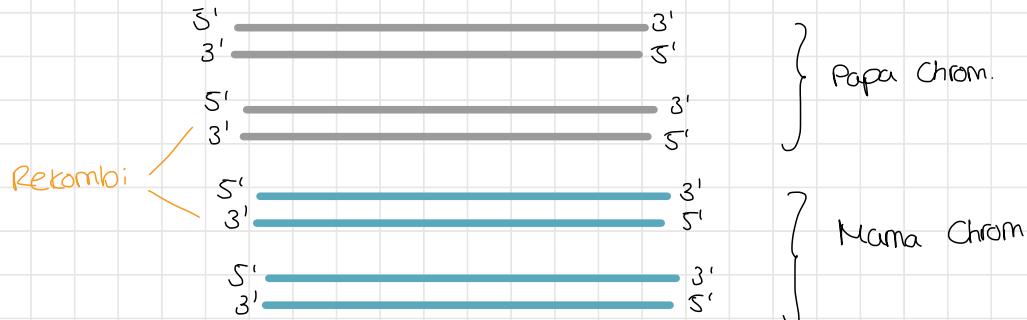
- = Abweichung der Allel-Häufigkeiten durch Rekombination während der Meiose

z.B. Ascii Tetradsen: erwartet = 4:4

Genkonv. = 5:3 / 6:2 in  $\approx 1\%$  der Fälle

#### Mismatch - Reparaturen

- durch Rekombination können Heteroduplex - Regionen entstehen



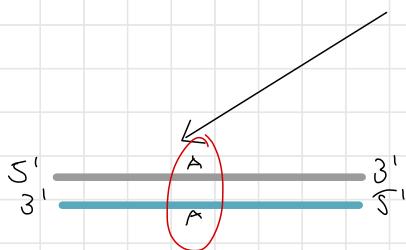
=>



=)

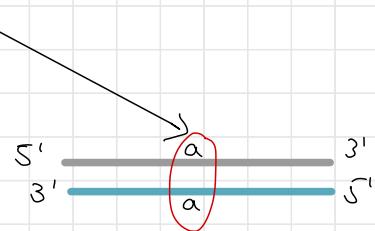
## Fehlerpaarungsreparatur

- Zelle weiß nicht ob A oder a korrekt
- eins wird zufällig ausgewählt als Template



AAAa

Genotypen  
Gameten

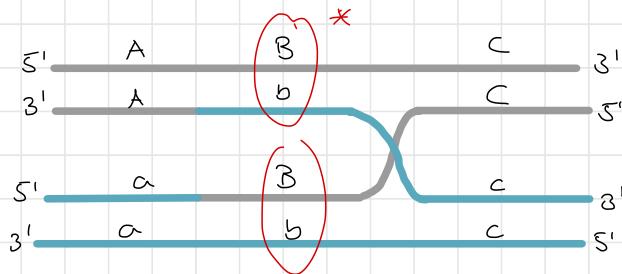


Aaaa

→ A:a Verhältnis verschiebt sich  
= Genkonversion

## Holliday-Modell

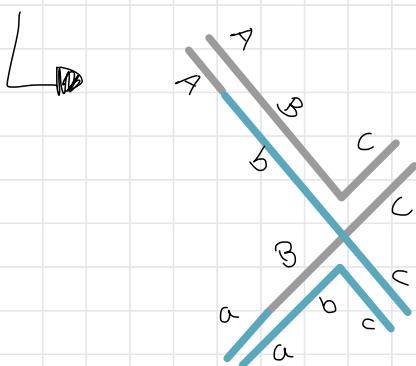
### Holliday-Struktur



Überkreuzungsstruktur

\* Mismatches

→ werden dann entweder zu B oder b repariert



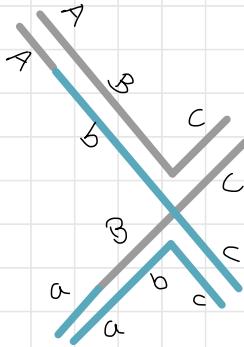
## Branch - Migration

Holliday - Junction durch RuvA - RuvB - Komplex entlang der Chromosomen bewegt

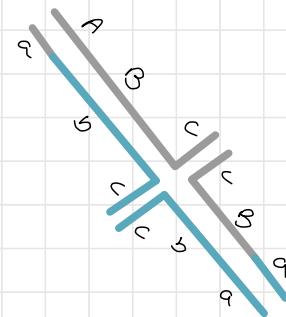
### RuvA - RuvB - Komplex

= ATP - abhängiger Motor

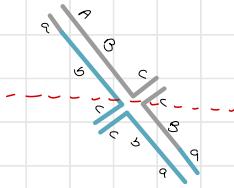
## Auflösung der Holliday - Junctions



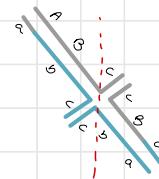
→ Drehung ?



→ Ruv-C schneidet entweder



oder



⇒



## Ruv C

Endonuclease

- bindet als Dimer
- schneidet präferiert an 5' - A/T T T G/C  
→ Branch Migration bis Sequenz erreicht

## Initiation

Doppelstrangbruchmodell

- homologe rekomb. ausgelöst durch Doppelstrangbrüche (DSB)

1. DSB in einem der homologen DNA - Moleküle  
→ anderes bleibt intakt
2. gebrochene Fragmente werden teilweise abgebaut  
→ einzelstr. 3'-Enden
3. Stranginvasion: ein 3'-Ende dringt in unversehrtes homologes DNA - Molekül ein (RecA)
4. zweite Stranginvasion + DNA - Synthese
5. Branch Migration
6. Ergebnis: Zwischenprodukt mit 2 Holliday - Junctions

## Rekombinationsproteine

### RecBCD (*E. coli*)

Endonukleaseaktivität → schneidet beide Stränge einer dsDNA

RecB = 3'-5' Helikase, Nuklease

RecD = 5'-3' Helikase, Nuklease

RecC = erkennt X-Site

1. RecBCD bindet an DSB-Ende

2. RecBCD wandert entlang der DNA

- RecB + RecD schneiden

3. RecC erkennt X-Site

=> Konformationsänderung RecBCD

=> Änderung Nukleasen:

- RecB (3'-5' Strang) schneidet nicht mehr

- RecD (5'-3' Strang) schneidet häufiger

=> 3'-Überhang

4. RecBCD rekrutiert RecA (Stranginvasion)

### X-Sites

- erhöhen Rekomb.-Häufigkeit in Nachbarschaft
- Wert fällt mit zunehmendem Abstand von der X-Site

### RecA (*E. coli*)

• zentrale Rolle bei Homologie-Findung

• bindet an ssDNA

• assoziieren miteinander zu RecA-Filament

↳ RecA rekrutiert weitere RecA

• Filamentwachstum in 5'-3'-Richtung

• aktiv in Gegenwart von ATP

## Homologiesuche

- 2 Bindungsstellen
  - primär: bindet ssDNA Strang
  - sekundäre: schnelle, transiente, schwache, sequenzunabh. Bindung von dsDNA
- => dsDNA schnell auf Homologie gescannt

## Proteine Ecoli - Eukaryonten

Rekomb. schritt	E.coli Enzym	Euk. Enzym
· Paarung homolog. DNA, Stranginvasion	RecA Protein	Rad51 Dcm1 (Meiose)
· Einführung DSB	— *	Spo11 (Meiose)
· DNA Prozessierung zur 3'-ssDNA Erzeugung	RecBCD	MRX Protein
· Zusammenbau Strang austauschproteine	RecBCD RecFOR	Rad52 Rad59
· Erkennung Holliday - Strukturen + Branch Migration	RuvAB Komplex	unbekannt
· Auflösung Holliday - Strukturen	RuvC	ungeklärt

\* Hauptquelle für DSB bei E.coli:

- DNA Schäden
- Versagen der Replikationsgabel

## Rekombi Meiose (Eukaryonten)

- homologe Rekombi = Voraussetzung für Paarung homol. Chrom.

### Spo11

- erzeugt DSBs während Meiose
- 2 Untereinheiten

1. Jede Untereinheit schneidet einen Strang  
- Schnitt um 2 Nukleotide versetzt

2. kovalente Bindung Untereinheit - 5' ssDNA-Ende

### HREX Komplex

= HRE11, Rad50, Xrs2

3. Prozessiert 5'-Ende des DSB (5'-3' - Resektion)

= Abbau + SPO11 Entfernung

=> Überhängende 3'-Enden ( $\geq 1\text{kb}$ )

### Dmc1, Rad51

= Homologe zu RecA

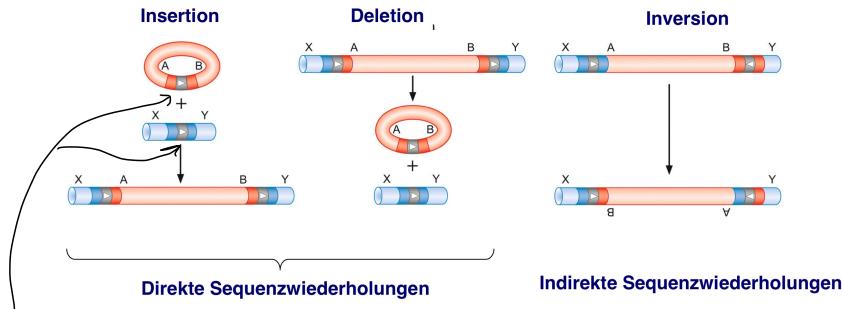
· Rad51 : Mitose & Meiose

· Dmc1 : Meiose

4. Stranginvasion durch Dmc1, Rad51

# Sequenzspezifische Rekombination

## Formen



Rekombinationsbereich,

2 umliegende Bereiche = Bindestellen-Erkennungsseq. für  
Rekombinase-Proteine

- Erkennungsseq. sind symmetrisch links & rechts unterschiedlich rot & blau

## Rekombinasen

1. Rekombinasen binden alle 4 Erkennungsseq.
  - binden an Phosphat
  - = Protein-DNA-Intermediate
  - speichert Energie der gespaltenen Phosphodiester-Bindung
2. Rekombination = Austausch je 1 blau + rot
  - schließen der Bindung mit gespeicherter Energie

## Serin-Rekombinasen

- führen 2 DSBS ein (beide DNAstrände werden gebrochen)  
= alle 4 Stränge
- Austausch der Partner + Verschließen

## Tyrosin-Rekombinasen

- schneiden erst einen Doppelstrang (je 1 rot, 1 blau)  
→ Austausch
- = Holliday-Struktur
- schneiden zweiten Doppelstrang  
→ Austausch

### Beispiele:

#### Cre - Rekombinase aus Bakteriophage P1

- häufig benutzt in Genetik zur Gendelletion in Mammalia  
= „Flößen“
- zu deleterender Bereich flankiert von lox-Sites
- ⇒ lox-sites ziehen Cre an
- ⇒ gezielte Rekombinase - Steuerung
- Cre / lox braucht keine Kofaktoren

#### $\lambda$ -Integrase

- gezielte Integration der Phagen-DNA in Wirtsgenom:
  - att - Stellen (attachment) in Phage und Bakterium
    - attP (Phage):
      - $\lambda$  - core (bindet 2  $\lambda$  - Integrasen)
      - Bindestellen Hilfsproteine
    - attB (Bakt.): nur  $\lambda$  - core - Bindestelle

· Integration benötigt  $\lambda$  - Int, IHF (Integration Host Factor)

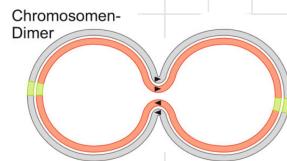
↑  
induziert starke DNA - Krümmung  
⇒ ermöglicht  $\lambda$  - Int - Bindungen

## Hin-Rekombinase in *Salmonella typhimurium*

- Hin/hix: DNA Inversion
  - Flagellengene umschalten
  - = Täuscht Immunsystem
- Zur Inversion benötigt: Hin Rekombinase, FIS (Factor for Inversion Stimulation)

## XerCD-Rekombinase

Problem: Dimerbildung durch Rekombi während Replikation zirkulärer DNA



→ Monomerisierung durch XerCD

- Kofaktor FtsK

· falls Dimer: bei Schließen der Teilungsebene bindet FtsK an Dimer

=> aktiviert XerD

## IV. Transposition

### Transposons

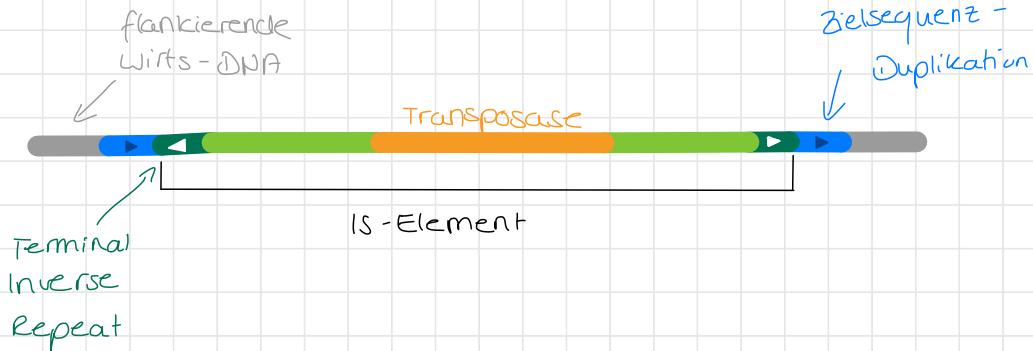
- = mobile DNA - Elemente
  - selfish - DNA = DNA mit dem Selbstzweck der Replikation
  - Hauptvorteil: flexibles Genom = schnelle Umstrukturierung  
= dynamische Evolution
  - Nachteil: i.d.R. hochmutagen
- ändern spontan ihre Lage im Chromosom  
= Transposition

### Arten

- DNA - Transposons
  - = terminal - inverted - repeats (= Rekombinationsstellen)
    - + Transposase - Gen
- Virus - ähnliche Retro - Transposons, Retroviren
  - = long - terminal - repeats
    - + Integrase - Gen
    - + Reverse - Transkriptase - Gen
- Poly - A Retrotransposons
  - = untranslated - regions
    - + ORF 1 - Gen (bindet RNA)
    - + ORF 2 - Gen (Rev. - Transk. + Endonuclease)

## Insertionssequenz

= IS-Element

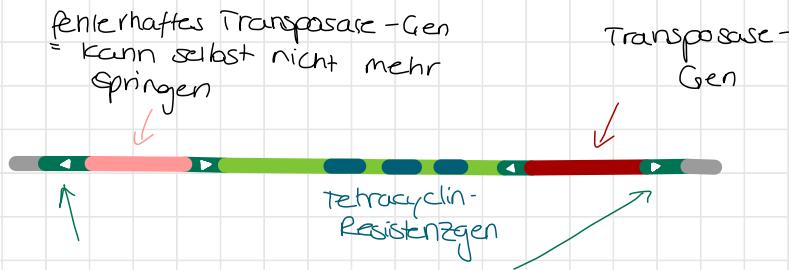


## Zielsequenz-Duplikation

- 2-30bp lange verdoppelte Sequenzen
  - erzeugt während Rekombination
  - bleibt im Genom auch wenn Transposon rauspringt  
=> Mutationen
- (Open-Reading-Frame-Shift bei Protein-codierenden Sequenzen (Triplets))

## Zusammengesetzte Transposons

zB Tn10



die beiden werden als  
Rekomb. Stellen von der  
Transposase erkannt  
=> habe 1 großes Transposon  
=> Antibiotika-Resistenz wird mobil

## Transpositionsmechanismen

- replikativ = Kopien an alter + neuer Position
- konservativ = Excision an alter Position  
Insertion neuer

## Voraussetzungen für Transposition

- Terminal Inverted Repeats
- Transposase
- ggf. Wirkfaktoren

## Konservative Transposition

= Cut & Paste - Mechanismus

### Mechanismus

1. Transposase bindet an beide terminal inverted repeats (Transposon-Enden)
2. Spaltung der DNA-Stränge
3. Spaltung der Ziel-DNA: Staggered-cut  
= überhängende Enden
4. Bindung Transposon-3'-Enden an freie Ziel-5'-Enden  
= DNA-Strangtransfer
5. DNA-Reparatursynthese zum Füllen der Lücken  
zw. Ziel-3'-OH-Enden und Transp.-5'-P-Enden  
=> Repeats der Zielsequenz

## nichttransferierter Strang

• 3'-Enden des Transposons werden zunächst nicht mit Ziel-DNA verknüpft

→ versch. Mechanismen zum Schneiden

## replikative Transposition

### Mechanismus

1. Transposase bindet an beide terminal inverted repeats
2. Transpose erzeugt Einzelstrangbrüche an 3'-Enden des Transposons
3. Strangtransfer: Verknüpfung Transposon-3'-Enden mit Ziel-S'-Enden

=> erzeugte Struktur = Replikationsgabel

=> Rekrutierung DNA-Replisom

- freies 3'-OH-Ende = Primer

4. Replikation über Transposon

=> doppelte Replikation des Transposons

=> Cointegrat mit 2 Transposons

5. Cointegrat auflösen durch seq. spez. Rekombination (Serin-Rekombinasen)

## Regulation

je nach Transposon andere Mechanismen

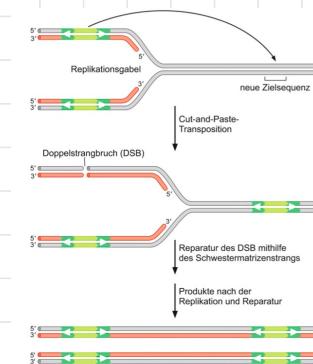
z. B.:

- IS1: geringe Expression der Transposase durch frameshifting
- Tn3: Repressor
- Tn10: Regulation durch antisense- RNA
- Tn10: Kopplung an DNA-Replikation
- Tn7: ortsspez. Transposition

## Kopplung an Replikation

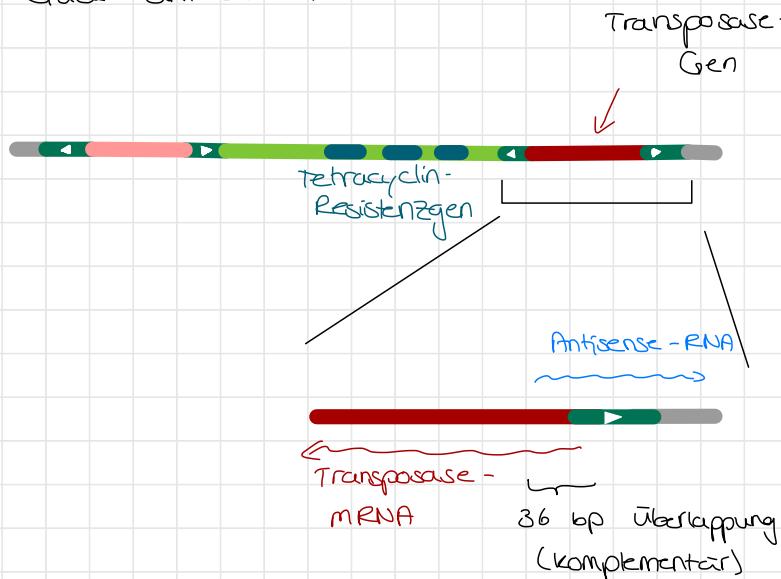
Tn10

- springt bevorzugt nach Durchgang der Repl. gabel
- nur 1 Kopie Springt
  - Transpos. durch hemimethylierte DNA aktiviert
  - einer der hemim. Promotoren der Transposase ca. 1000 mal aktiver
- DSB hinter der Repl. gabel
  - ⇒ bei Reparatur wird Transposon-Gen als Matrise genommen
- Transposon ist vor Repl. gabel gesprungen
  - ⇒ bei Repl. wird nochmal repliziert
- Ergebnis ist repliziertes Transposon, Mechanismus aber konservativ



## Antisense - RNA

Tn10: rechtes (intaktes) Transposase - Gen hat kleines Stück antisense - RNA



=> bei hoher Anzahl Tn10:

Transposase mRNA : Antisense - RNA - Paarungen häufig  
=> Bindung blockiert Transposase - mRNA

## Beispiele

### Eukaryonten

- DNA - Transposons
  - Tc1 / Mariner
  - P- Element
  - Ac / Ds - Element
  
- Retrotransposons
  - Retrovirale Transposons
  - Non - LTR Transposons

## Ac/ Ds - Elemente

- im Mais

Ac:

- aktive Transposase
- keine terminal inverted repeats
- => kann nicht springen (braucht beides!)

Ds:

- inaktive Transposase
- terminal inverted repeats
- => können durch andere Transposase aktiviert werden  
→ nutzt Ac-Transposase

## P-Element

- in Drosophila

Hybrid-Dysgenese:

Ei-Zelle mit  
P-Elementen

X

Spermium  
ohne

Ei-Zelle  
ohne

X

Spermium  
mit

P-Elemente  
springen nicht

P-Elemente  
springen  
= Mutationen

- Transposase-Gen nur in Keimbahnzellen exprimiert
- In Ei- und Spermienzellen: Repressor verhindert Transkription des Transposase-Gens
- Spermien haben weniger Zytoplasma => Repressor-Nenge ausreichend im Spermium, aber nicht in Zygote

# Tomaten - Pathogene - Experiment

- AVR<sub>X</sub> = Pathogen (AVR<sub>9</sub>, AVR<sub>4</sub>)
- CF<sub>X</sub> = Resistenzgen (CF<sub>9</sub>, CF<sub>4</sub>)

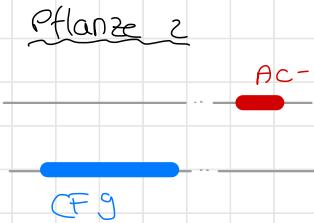
→ Falls CF<sub>X</sub> - Pflanze von AVR<sub>X</sub> befallen:

lokale Produktion von Toxinen

=> Pathogen & lokale Zellen sterben  
(Pflanze insg. bleibt gesund)

## Experiment:

- AVR<sub>X</sub> in Pflanzengenom einbringen  
=> Pflanze erzeugt in allen Zellen Pathogen
- => CF<sub>X</sub> - Pflanze bekämpft alle Zellen => stirbt
- DS-Elemente, Ac-Elemente aus Mais in Pflanzen geben



X Kreuzung



=> Pflanze 3 hat jetzt Ac und DS  
=> DS-Transposon kann springen

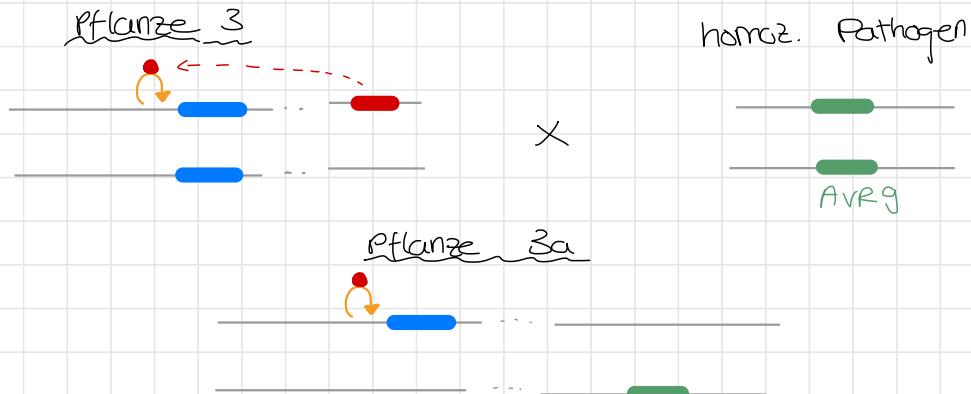
2 Möglichkeiten:

a) Ds - Element springt in Cf9 - Gen  
(= Cf9 kaputt)

b) Ds - Element springt nicht in Cf9 - Gen

→ Prüfe durch Paarung mit homozygoter Pflanze mit Pathogen

a)

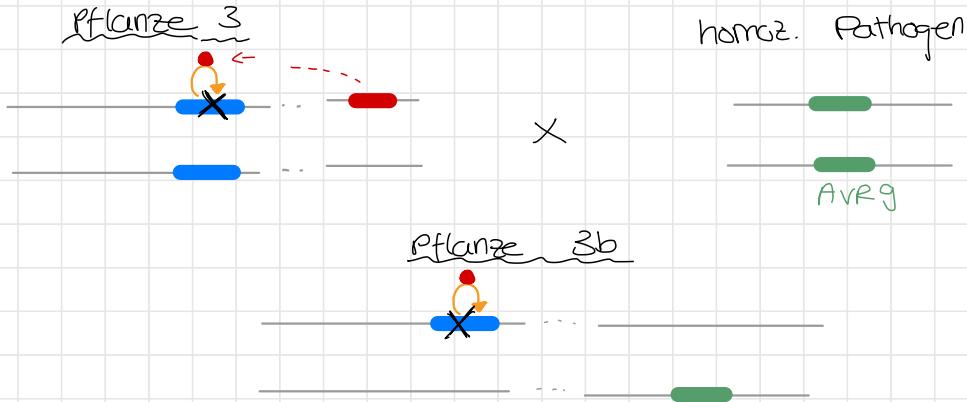


⇒ AVR9 und Cf9 aktiv

= Selbstmord

⇒ Pflanze 3a stirbt

b)



=> AVR9 aktiv, CFG kaputt (=inaktiv)  
=> Pflanze zB überlebt

## Retrotransposons

- verwandt mit Retroviren
    - Unterschied: Retroviren haben GAG, POL, ENV Strukturproteine  
Retrotrans GAG, POL → kein ENV

## Mechanismus

- Transposition über Reverse-Transkription transponierbares Element



LTR = long Terminal Repeat

1. Transkription : RNA - Kopie \*
  2. Reverse Transkription durch Reverse Transcriptase  
= cDNA
  3. Integration der cDNA durch Integrase  
→ Mechanismus analog zu DNA-Transposons

\* Problem: produzierte RNA ist kürzer als DNA die integriert werden soll  
↓  
→ U3 - Bereich keine fehlt  
U5 hinten

Lösung: RNA - Ausgangsprodukt:



1. PBS → Primer - Bindestelle bindet  
3' - tRNA - Primer - Überhang
2. Reverse Transkriptase: mit tRNA - Primer wird  
kurzes DNA - Stück synthetisiert
3. RNase H baut RNA ab wo RNA / DNA - Hybrid  
ist  
⇒ Primer - DNA mit t - RNA gebunden wird  
freigesetzt  

The diagram shows a horizontal line with tick marks R, US, and ... + - tRNA. The region between US and the plus sign is labeled with three dots (...), indicating it is a single-stranded region.
4. R - Region der Primer - DNA bindet an hintere  
R - Region des RNA - Ausgangsprodukts
5. Reverse Transkriptase nutzt Primer - DNA  
→ synthetisiert in 5' - 3' - Richtung ( $\leftarrow$ ) DNA  
entlang Template - RNA
6. RNase H baut RNA in den fertigen Bereichen  
ab, außer PPT - Region  
Poly - Runn - Track
7. PPT RNA = Primer für Synthese nach rechts
8. RNase H baut tRNA - Primer ab
9. U3, R, US - Bereiche an beiden Seiten komplementär

=> Ringschluss

=> DNA - Verlängerung an beiden 3' - Enden

=> vollst. cDNA

## Non - LTR - Retroelemente

- in Eukaryoten

2 Familien:

- LINE = long Interspersed Nuclear Element
- SINE = short - --

## Transposition LINE

- LINE kann gesamte Sequenz direkt transkribieren

## Vorteil Evolution

- Transposons beeinflussen Genom - Evolution  
zB durch
  - Mutagenese durch Insertion / Genkonversion
  - Regulation der Transkription
    - Springen in Introns → alternatives Spleißen  
Sense / Antisense - Promotoren
- ...

# V. Transkription

= Abschreiben der DNA in RNA

## RNA - Arten

### rRNA

- = ribosomale RNA
- lange RNA Moleküle
- strukturelle + funktionelle Komponenten der Ribosomen
- wenige Arten
- sehr viele Kopien

### mRNA

- = messenger RNA
- von kurz bis sehr lang
- codieren für Proteine
- sehr verschieden
- wenige bis sehr viele Kopien

### tRNA

- = transfer RNA
- sehr kurz (80-120bp)
- Adaptermoleküle bei Translation

### Sonstige

- snRNA : RNA-Splicing
- gRNA : RNA-Editing
- antisense-RNA, siRNA : RNA-Interferenz
- Riboswitches : Regulation von Transkription / Translation

! nur mRNAs codieren für Proteine  
Rest ist struktural

## RNA - Polymerasen (RNAP)

### Prokaryoten

- alle 3 RNA-Arten von gleicher RNAP transkribiert

### Eukaryoten

RNAP	Wirkort	Produkte
RNAP I	Nucleolus	18s, 28s, 5.8s rRNA Splicing!
RNAP II	Nucleoplasma	mRNA; U1, U2, U4, U5 sRNA
RNAP III	Nucleoplasma	tRNA, 58sRNA, U6 sRNA
mt-RNAP	Mitochondrien	alle mitochondrialen RNAs

### Voraussetzungen

- DNA als Matrize (1 Strang wird abgelesen)
- Ribonukleotid-Triphosphate als Bausteine, Energiequelle  
ATP, CTP, GTP, UTP
- Kofaktor  $Mg^{2+}$

### Unterschiede RNAP - DNAP

- RNAPs brauchen KEINE Primer
- RNAP Fehlerrate  $\gg$  DNAP Fehlerrate  
 $1/10^4$                      $1/10^6$
- RNAP: NTPs
- DNAP: dNTPs
- RNAP: UTP statt dTTP
  - Grund: Spontane DNA Fehler machen dTTP zu dUTP
  - ⇒ wäre dUTP DNA-Baustein kann Reparatur nicht zw. Fehler / korrekt unterscheiden

⚠ RNA ist NICHT einzelsträngig

- nimmt komplexe Sekundärstrukturen ein,  
faltet sich zu Doppelstrangbereichen

## Nomenklatur



- Sinnstrang 5' - 3' = gewünschte Sequenz  
 = nicht-codogener Strang  
 = nicht-Matrizenstrang  
 = nicht-transkribierter Strang

=> um diese Seq. zu bekommen muss ich das Komplement komplementieren

- Matrizenstrang 3' - 5' = codogener Strang  
 transkribierter Strang

Transkriptions-Initiationsstelle



Upstream -5 -4 -3 -2 -1 +1 +2 +3 +4 Downstream

↑  
Matrizenstrang  
↓



Transkriptions-  
Richtung

! keine Position 0

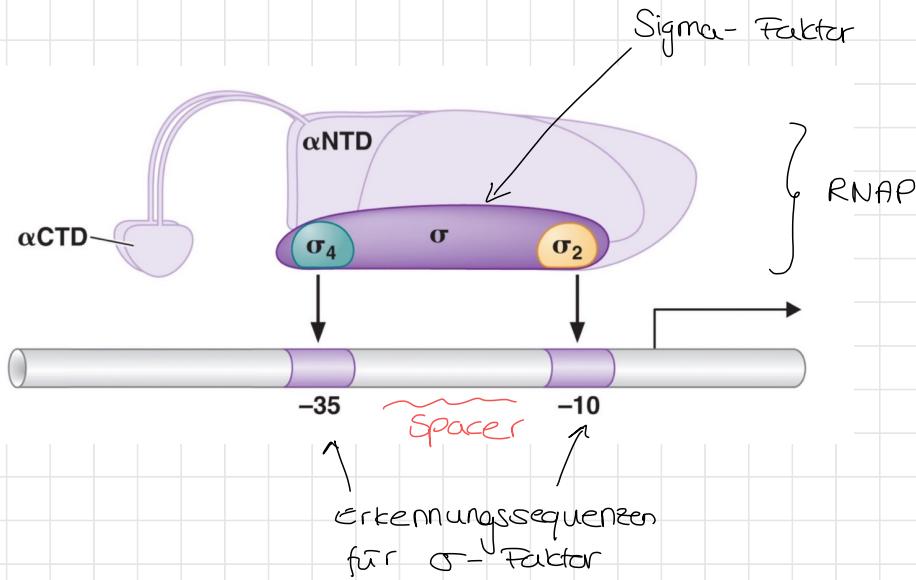
# Bakterien

RNAp = RNA-Polymerase

## Promotoren

- = Bindestellen für RNAp auf DNA
- legen Startposition + Richtung der Transkription fest
- idR & DSR Region upstream der Init-Stelle

## Aufbau



## Erkennungssequenzen

- = konsensussequenzen
  - -35-Region: TTGACA
  - -10-Region = Pribnow-Box / TATA-Box: TATAAT
- ⇒ je höher Übereinstimmung mit konsens, desto höhere Affinität zur RNAp = desto stärker Promoter

## Spacer

- = Sequenz zw. -35-Reg., TATA-Box
- Länge entscheidend für Funktion
- Sequenz beliebig
- Optimal: 16-19 bp
- länger / kürzer: schwächerer Promoter

## Arten

- Standard - Promotor: -35 - Region (6 bp) 

The diagram shows the DNA sequence with the -35 region (6 bp) and the -10 region (9 bp) indicated by brackets below the sequence line. The sequence is labeled with positions -35, -10, and +1.
- UP - Element: UP-  
↓  
Element  
zusätzlicher Kontakt  
zur RNAP = stärkerer Promoter
- fehlende -35 - Region:  
↳ extended -10 kompensiert 

The diagram shows the DNA sequence with the extended -10 region compensating for the missing -35 region. The sequence is labeled with positions extended -10 and +1.

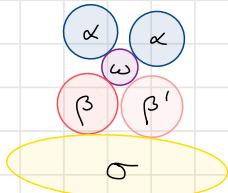
## RNA - Polymerase

### Funktionen

- Scanning: suchen + erkennen der Promotoren auf DNA
- binden an Promotoren
- Transkription starten + durchführen + beenden
- Interaktion mit Aktivatoren / Repressoren

### Aufbau

- RNAP = Hölzernzym in Krabbenenschere mit beweglichen Greifern



1. 2  $\alpha$  - Untereinheiten binden
2. 2  $\beta$  - Untereinheiten binden
3.  $\omega$  - Untereinheit bindet
4.  $\sigma$  - Faktor bindet

$\sigma$  - Faktor: erkennt Promoter

austauschbar je nach Situation

zB  $\sigma^{70}$  = Standard

$\sigma^{32}$  = bei Hitzechock

$\sigma^{S7e}$  = bei Stickstoffmangel

### $\alpha$ - Untereinheit

- Interaktion mit Regulatorproteinen

### $\beta$ - Untereinheiten

- binden an DNA, Ribonukleotide (= 2 Bindestellen)
- $\beta + \beta'$  = katalytisches Zentrum  $\approx$  Greifer der Schere

### $\omega$ - Untereinheit

- stabilisiert Struktur

## Transkription

### Initiation

1. RNAP bindet unspezifisch an DNA (geringe Affinität)
2. RNAP wandert entlang DNA  $\rightarrow$  sucht Promotor
3.  $\sigma$ -Faktor erkennt Promotor
4. RNAP + Promotor = geschlossener Promoter-Komplex  
- DNA-Doppelhelix nach geschlossen
5. RNAP entwindet  $\approx 12$  bp an +1-Stelle  
= offener Promoter-Komplex  
 $\rightarrow$  Übergang geschl.  $\rightarrow$  offen durch Konformationsänderung  
(ohne Energieaufwand)
6. +1-Initielle bekräftigt ATP/GTP-Bindung  
= Elongationsstelle
7. Elong.-stelle bindet zweites NTP entsprechend Matrize
8. Hydrophiler Angriff auf Phosphatgruppe  
 $\Rightarrow$  Abspaltung PP<sub>i</sub> + Phosphodiesterbindung

↓  
= Treibende Kraft ?

9. nach Synthese von 6-10 bp (=abortive RNA) :
- σ-Faktor entfernt
  - ⇒ Elongationsphase

### Scrunching

- während Synthese der abortiven RNA: RNAP bewegt sich nicht
- ⇒ "Stau" im katal. Zentrum  
= Federspannung = Energie
- ⇒ nach ein paar bp: Feder springt → RNAP läuft los

### Elongation

- durch Core-RNAP ohne σ-Faktor
- optimale Bed.: 50-100 Schritte / Sekunde
- Topo iso ist Supercils
- RNAP: 2 Korrekturmechanismen
- non-template Strang wird außerhalb der RNAP verloren geführt
- fertige RNA, template Strang verlassen RNAP an versch. Stellen

### Termination

#### Rho-Protein-abh. Termination

Rho-Protein = Terminationsfaktor

= ATP-abh. Helicase → bildet Hexamer

- Rho-Prot. bewegt sich entlang der RNA zur RNAP (ATP-Verbrauch!)  
→ falls bei RNAP angekommen:  
Rho "zieht" RNA aus RNAP raus ⇒ Termination
- Normalerweise ist Rho ca. gleich schnell wie RNAP
- C/G-reiche Stelle: RNAP langsamer  
⇒ Rho kann aufholen

## Rho unabh. Termination

- kein Terminationsfaktor
- Terminationsstelle am Ende der Transkripteinheit:
  - z C/G - Folge - Repeats getrennt durch A-Block
- => Repeats bilden Doppelstrang direkt nach Transkription  
    ↳ Startarm + Schleife
- => Doppelstrang geht in RNA-Kanal
- => Konformationsänderung
- => Termination

## Regulation

### Notwendigkeit

- Bedarf an Genprodukten variabel
- Genexpression teuer → nur bei Bedarf

### Arten

- konstitutive Genexpression = housekeeping genes  
    = nicht reguliert
- adaptive Genexpression = reguliert → induzierbar/reprimierbar

### Möglichkeiten der Regulation

#### alternativer Sigmafaktor

- selektive Transkription durch spezifische Promotormerkmalen

#### Aktivator-/Repressorproteine

besitzen spezifische DNA-Bindedomänen

## Aktivatorproteine

- bindet an spez. Stelle im Promoterbereich  
=> erhöht Transkriptions-Initiationsrate der RNAP
- entweder Interaktion mit  $\alpha$ -UE (Klasse I)  
oder  $\sigma$ -Faktor (Klasse II)

## Mögliche Regulation:

- Aktivierung durch Rekrutierung
- Aktivator stimuliert Übergang geschlossen  $\rightarrow$  offen
- Aktivator ändert Promotor-DNA-Struktur damit RNAP bindet

## Repressorproteine

- blockiert Initiation oder Elongation

## Mögliche Regulation:

- Repressor blockiert Promoter  $\rightarrow$  RNAP kann nicht binden
- Repressor bindet Bindestelle (downstream)  
 $\Rightarrow$  verhindert Elongation

## Co-Aktivatoren / Co-Repressoren

### Aktivierung

- Positiv
- Co-Aktivator bindet an inaktiven Aktivator  
 $\Rightarrow$  Aktivierung des Aktivators  
 $\Rightarrow$  Transkription

### Repression

- Co-Repressor bindet an aktiven Aktivator  
 $\Rightarrow$  Inaktiv. des Aktiv.  
 $\Rightarrow$  Repression

### Negativ

- Co-Aktivator bindet an aktiven Repressor  
 $\Rightarrow$  Inaktiv. des Repressors  
 $\Rightarrow$  Transkription

- Co-Repressor bindet an inaktiven Repressor  
 $\Rightarrow$  Akt. des Repressors  
 $\Rightarrow$  Repression

## Operone

Hinweis aus VL: genau anschauen, kommt sicher in Klausur dran.

- = mehrere Gene für gleichen Pathway gemeinsam exprimieren
- gemeinsam regulieren

→ Expression durch einen Operator (= Regulatorbindstelle) einen Promoter (= RNA-P - Bindstelle)

erzeugt polycistronische mRNA

= mehrere Leseraster für mehrere Enzyme  
→ Ribosomen erkennen als einzeln

! nur in Prokaryoten möglich

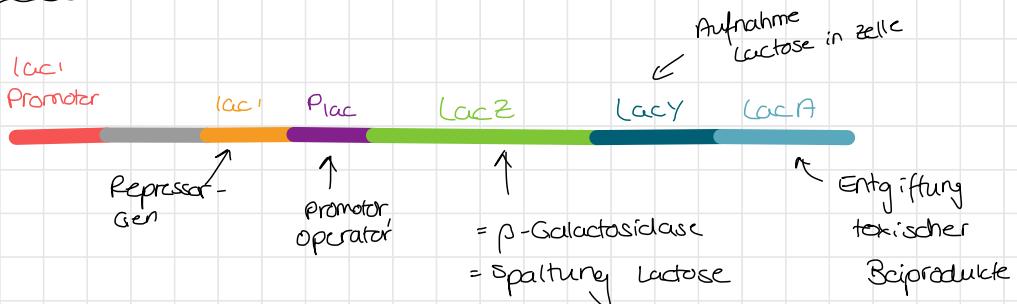
Beispiele:

- Lac-Operon: verstoffwechselt Lactose bei Abwesenheit von Glucose
- araBAD-Operon: Arabinase
- trp-Operon: synthetisiert Tryptophan

## Lac-Operon

• Expression nur wenn keine Glucose verfügbar UND Lactose verfügbar

Struktur:



## Regulation

- CAP-Protein = Aktivator
  - bindet an CAP-Bindestelle (Aktivatorstelle) falls KEIN Glucose vorhanden
  - CAP-Bindung induziert durch Co-Aktivator cAMP
    - cAMP Konzentration steigt in Abwesenheit von Glucose
  - CAP assoziiert mit  $\alpha$ -CTD von RNAP
    - erhöht RNAP Affinität
  
- Lac-Repressor
  - bindet an Repressorstelle falls KEIN LACTOSE vorhanden
    - blockiert RNAP
    - ⇒ verhindert Transkription
  - bindet an 2 Stellen auf DNA
    - bildet DNA-Schleife
    - ⇒ verhindert Bindung von RNAP
  - Co-Aktivator Allolaktose schwächt Bindung Lac-Repressor an DNA
    - löst sich
    - ⇒ Transkription möglich

Allolaktose = Nebenprodukt von  $\beta$ -Galactosidase  
 ⇒ Lac-Operon nie ganz abgeschaltet

## Zustände

	keine Laktose	Laktose
Glucose	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Repressor gebunden</li> <li>· CAP frei</li> <li>⇒ keine Transkription</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Repressor frei</li> <li>· CAP frei</li> <li>⇒ basale Transkription</li> <li>= geringe Aktivität</li> </ul>
keine Glucose	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Repressor gebunden</li> <li>· CAP gebunden</li> <li>· RNAP gebunden</li> <li>⇒ keine Transkription</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Repressor frei</li> <li>· CAP gebunden</li> <li>· RNAP gebunden</li> <li>⇒ Transkription</li> </ul>

## araBAD - Operon

- Kontrolle durch Anti-Aktivierung

### Struktur

- 3 Strukturgene: araB, araA, araD = Arabinose-Verwerter
- Regulatorprotein: AraC = Repressor und Aktivator
- Arabinase = Co-Aktivator
- CAP = zusätzlicher Regulator

### Regulation

- ohne Arabinose:

- AraC bindet araI<sub>1</sub>, araI<sub>2</sub>
- bildet DNA-Schleife
- ⇒ RNAp kann nicht binden
- ⇒ keine Transkription

- mit Arabinose:

- AraC bindet an araI<sub>1</sub>, araI<sub>2</sub>
- rekrutiert CAP, RNAp
- ⇒ Transkription

## trp - Operon

- Tryptophan - Biosynthese

### Struktur

- 5 Synthese - Proteine + Leader - Peptid
- Tryptophan = Co-Repressor = Selbstregulation

### Regulation

- Tryptophan vorhanden:

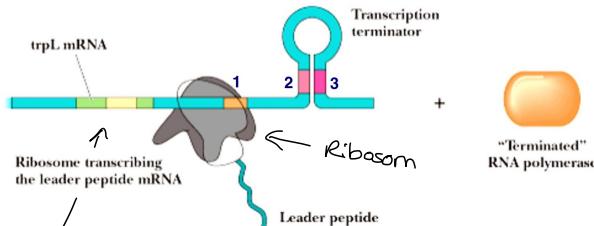
- Trp bindet Trp-Repressor → bindet an Operator
- ⇒ blockiert Promotor

## Attenuation

= physische Kopplung Transkription → Translation  
 = Translation beginnt auf RNA die noch transkribiert wird

- je nach Trp-Menge: bilden Haarnadel-Struktur an untersch. Stellen:

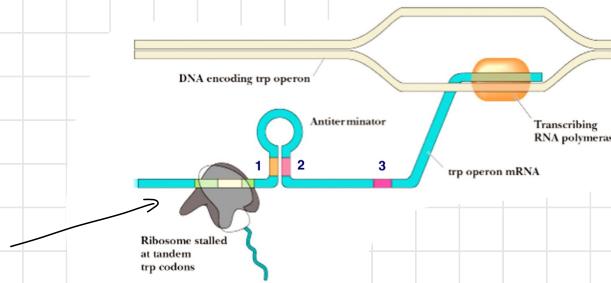
viel Trp:



diese Region ist Trp-reich

- viel Trp vorhanden: Ribosom kann schnell darüber gehen
- Z, 3 binden
- ⇒ Termination der RNAP

wenig Trp:



Ribosom wird hier aufgehalten

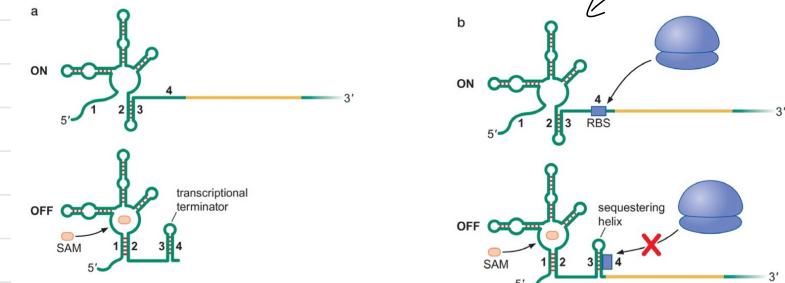
- ⇒ 1, 2 binden ⇒ RNAP arbeitet weiter

## Riboswitches

- = Aptamer zur Bindung von Molekülen
  - ↪ 3D - Struktur von RNA
- bindet spezifische Moleküle

- können Transkription + Translation regulieren

Bsp. SAM



mit SAM: Strukturänderung

- 3 + 4 binden = Terminationsschulter
- ⇒ keine Transkription

Ribosomen  
Bindestelle  
↓

ohne SAM: RBS ist  
frei

- + RBS blockiert
- ⇒ keine Translation

# Phagen

am Beispiel:  $\lambda$ -Phage

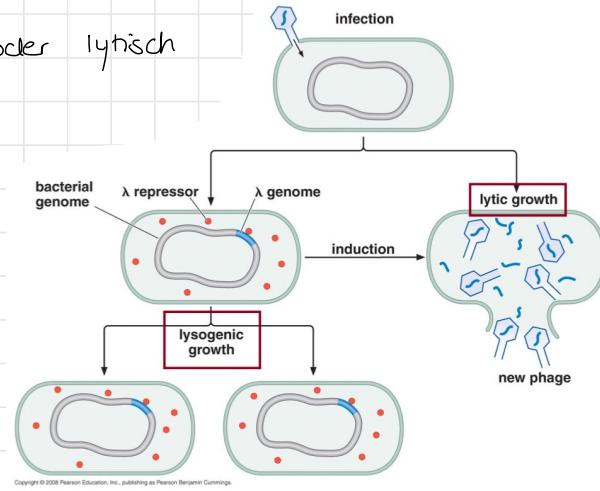
- temperaturter Bakteriophage
- 48kb lineares Genom
- ca. 70 Gene

## Infektion

- $\lambda$ -Phage injiziert Genom in Bakterium
- lineares Genom zirkuliert über cos-Stellen
- Einbau  $\lambda$ -Genom in Bakterien-Genom mittels seq. Spez. Rekombination ( $\alpha tP/\alpha tB$ )

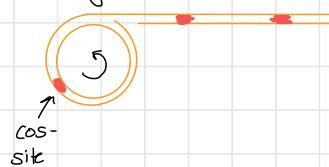
## Zyklen

- lysogen oder lytisch



> lytisch: kontinuierliche DNA-Synthese

- innerer strang der Doppelhelix = Substrat  
→ "rolling circle"



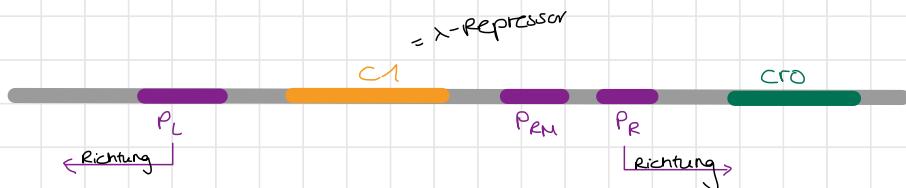
... = langes Molekül mit vielen Phagen-Genom-Kopien

→ Trennung an cos-sites + in einzelne Kopie verpacken

## Regulation

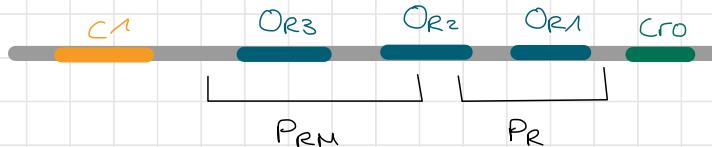
### Struktur λ-Genom

- Operon
- 2 Kontrollregionen: rechts, links
- komplexe Regulation von 2 Hauptpromotoren  $P_L$ ,  $P_R$



- regulatorische Proteine: C1, CRO  
Repressor + Aktivator

### Promotorregionen

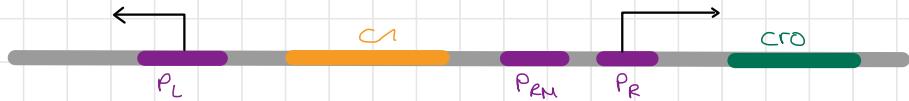


$OR_1, OR_2, OR_3 = \text{Repressor-Bindestellen}$

- $P_R, P_L$  = starke Promotoren  $\rightarrow$  brauchen keine extra Aktivierung
- $P_{RM}$  = schwacher Promoter  $\rightarrow$  Aktivierung durch C1  
 $\rightarrow$  Repression durch CRO
- Kooperative Bindung C1 an  $OR_1, OR_2$   
 $\rightarrow$   $OR_1$  bindet leichter als  $OR_2$   
 $\hookrightarrow$   $OR_1$  gebunden = leichtere  $OR_2$ -Bindung  
 $\Rightarrow$  erleichtern Bindung an  $OR_3, OR_3$   
bei hoher C1 Konzentration

⇒ Repression von C1

### lysischer Zyklus



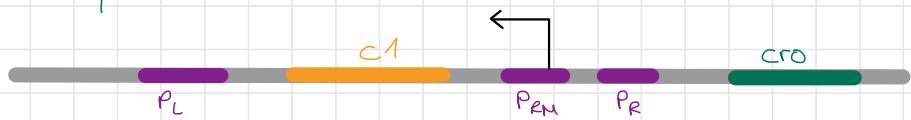
→  $P_L$ ,  $P_R$  aktiv

→ Cro wird exprimiert

→ Cro setzt sich auf OR3

⇒ verhindert C1 - Expression

### lysogener Zyklus



→  $P_{RN}$  aktiv

→ C1 wird exprimiert

⇒ niedrige C1 - Konzentration:

- Repression  $P_R$

- Aktivierung  $C1$

→ C1 bindet an OR1, OR2

hohe C1 - Konzentration:

- C1 bindet auch an OR3

→ C1 nicht mehr exprimiert

→ OR1, 2, 3 werden wieder frei

→ C1 exprimiert

→ ...

## Problem:

- Prm muss durch C1 aktiviert werden, aber Prm exprimiert erst C1

⇒ C2-Protein entscheidet: lytisch oder lysogen

1. Pr exprimiert Cro und C2
2. C2 bindet an PRE (Repressor-Establishment)
  - Pol geht nach links rückwärts durch C2, Cro; vorwärts durch C1
  - aktiviert C1-Gen
  - ⇒ Regulation von C1 durch 2 Promotoren (PRE, PRM)
3. C2 durch C3 stabilisiert
  - C3 durch Wirtsprotease HflB gespalten
4. Kontrolle über multiplicity of infection
  - = je mehr Phagen Zelle infizieren, desto eher lysogen
5. HflB kontrolliert über Wachstumsbed. des Wirts
  - ⇒ je gesünder desto mehr HflB
  - ⇒ desto eher lysischer Zyklus

## Umschalten lysogen → lytisch

- SOS-Antwort in E. coli wenn viele DNA-Schäden
  - zentraler Regulator: RecA
  - ⇒ viel RecA in der Zelle = Zeichen für viele Schäden = Zeichen, dass Zelle ungesund
  - ⇒ Phage schaltet auf lytisch um
- RecA = C0-Aktivator für Repressor
  - = spaltet λ-Repressor (C1)
  - lysischer Zyklus

# Eukaryonten

## RNAP II

- ähnliche Struktur wie Bakterien RNAP (Krabbenschere)
- = homologe Untereinheiten an vergleichbaren Pos. im Komplex
- Unterschied: C-terminale Domäne an grösster UE

## CTD

- Wichtig für
  - Interaktion RNAP II + Aktivatoren
  - Übergang Init.-> Elongationsphase
- Init.-phase: wenig phosphoryliert
  - wird vor Elong. stark phosph.
  - Konformationsänderung

## Aktivierung

- RNAP II braucht  $\approx 80$  Proteine (Faktoren) damit Anlagerung an Promotor möglich
- braucht weitere Faktoren während Elongation
- ohne Aktivierung quasi keine Basis-Aktivität

## mRNA

- alle euk. mRNAs haben
  - 5'-Kappe
  - poly(A)-Schwanz am 3'-Ende
- Stabilität der mRNA  
nötig für Translation

← curser Histon-mRNAs

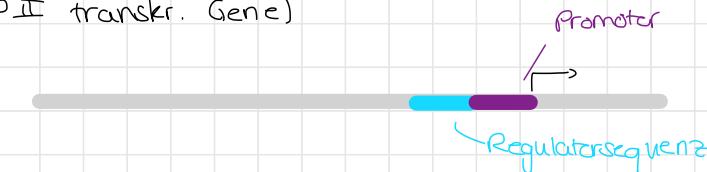
- nur monocistronisch

- alternatives Splicing

## Gene

Aufbau (RNAP II transkr. Gene)

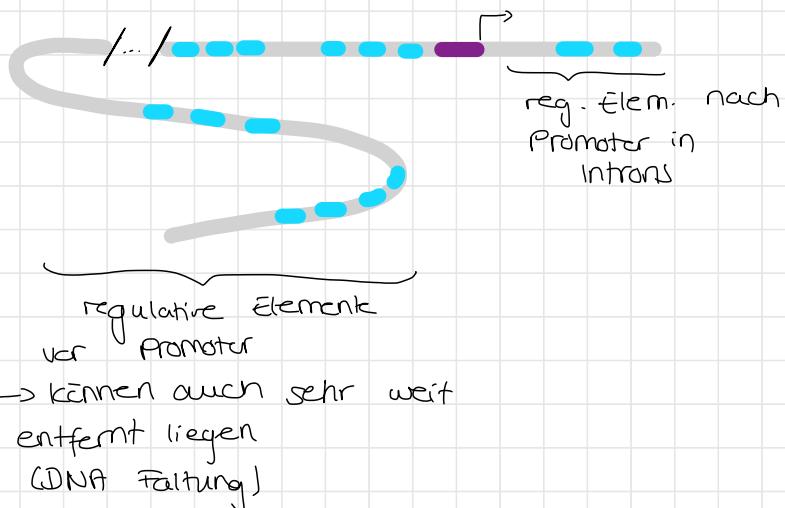
Bakterien:



Hefen:

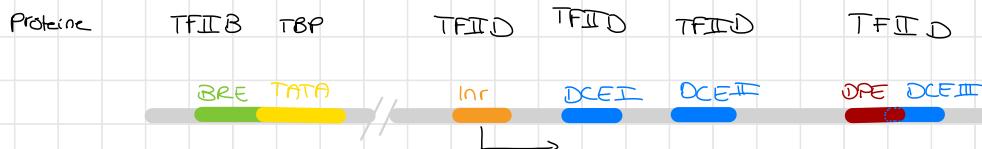


Säuger:



Core - Promoter = Promoterbereich in Euk.

- Assemblierungsbereich für Prä-Initiationskomplex (PIC)
- Bindestelle für allg. Transkr. faktoren
- bestimmt Startstelle + Richtung
- nicht alle Elemente in jedem Promoter!



- BRE = TFIIB Recognition Element
- TATA Box (Seq. ist TATA<sup>A</sup><sub>T</sub><sup>A</sup><sub>T</sub><sup>A</sup>)
- Inr = Initiator Element

- DCE = Downstr. Core Element
- OPE = Downstr. Promoter Elem.

## Transkriptionsfaktoren der RNAP II

- TF IID = TBP → Erkennen TATA - Box / Promotoren
  - + TAFs → regulatorische Funktionen
- TF IIA = stabilisiert TF IID Bindung
- TF IIB = Bindung RNAP II, bestimmt Startstelle
- TF IIF = bringt RNAP II an Promotor
- TF IIE = bringt TF IH + Regulation von TF IH
- TF IH = DNA - Helikase (Entwinding)
  - + - Kinase

## TAFs

- = TBP - assoziierte Faktoren
- TAF 1 + TAF 2 : erkennen Inr - Elemente
- TAF 1 : Phosph. + Acetylierung der Histone  
→ ändert Packungsdichte (Chrom. Struktur)
- TAF 6 + TAF 9 : erkennen DPE - Elemente
- u. a. TAF 4 : Interaktion mit upstream Transkript. fakt.

## TBP

- bindet TATA - Box in kleiner Rinne  
→ krümmt DNA

## Prä - Initiationskomplex Aufbau

1. TF IID bindet über TBP an TATA - Box
2. Bildung DAB - Komplex:  
Rekrutierung von TF IIA, TF IIB
3. TF IIF interagiert mit RNAP II  
→ wird zum Promotor gebracht

## 6. Rekrutierung von TFIIE, TFIIH

5. - TFIIH entwindet DNA  
- Serin 5 im CTD wird phosphoryliert  
=> Übergang zur Elongation

## Regulation der Initiation

- Genspezifische Transkriptionsfaktoren binden upstream
  - regulieren PIC-Bildung  
(direkte/indirekte Interaktion mit RNAP II)
- Mediator-Komplex ( $\approx 25$  Proteine): Vermittlung zw. RNAP II
  - + Regulatorproteine
- Modifikation der Chromatinstruktur durch
  - Chromatin-Remodeling-Komplexe
  - Histon-Acetyl-Transferasen

## Elongation

- CTD als Koordinator
  - je nachdem welches Serin phosph. andere Aktivität
- > Ser 5 phosph.:
  - CTD interagiert mit Capping-Enzymen
    - ⇒ Ablösung vom Promotor
- > Ser 2 phosph.:
  - CTD interagiert mit Komponenten für Splicing
    - ⇒ Elongation
- Problem: RNAP II kommt nicht über Nukleosome
  - ⇒ FACT deassembliert Histon vor RNAP
  - assembliert nach

## Capping

= Addition von 7-Methyl-Guanosin am 5'-Ende

= GMP

1. RNA-Triphosphatase spaltet  $\gamma$ -Phosph. vom mRNA 5'-Ende ab
2. Guanyltransferase überträgt GMP  
→ 5'-5' - Bindung zw. GMP  $\alpha$ -Ph + mRNA  $\beta$ -Ph.
3. Methyltransferase methyliert Guanin

## Polyadenylierung

= PolyA-schwanz am 3'-Ende der mRNA

- 1 CTD der RNAP II rekrutiert
  - CPSF (Cleavage and polyadenylation factor)
  - CstF (cleavage stimulation factor)
2. CPSF, CstF binden an Poly-A-Sequenz der mRNA  
⇒ schneiden mRNA
3. Poly-A Polymerase synthetisiert poly-A-Sequenz ( $\approx 200$  bp)
4. Poly-A-Bindeprotein bindet an poly-A-Sequenz  
⇒ stabilisiert Struktur

## Termination

- kein Rho-Homolog
- RNAP II beendet Transkription oft erst hunderte BP downstream

### Theorie 1: Torpedo-Modell

- fertig Transkr. RNA wird abgeschnitten  
⇒ RNAP II synth. weiter, neue RNA hat kein 5'-CAP  
⇒ wird von Ribonuclease abgebaut bis RNAP II eingeholt

## Theorie 2:

- Prozessierungsenzyme vom CTD transferieren zur mRNA
- => Konf. Änderung in RNAP II
- => Spontane Termination

## RNAP I

- Transkription von rRNA -Genen
- Transkription im Nukleolus
- rRNA  $\approx$  80% der RNA in Zelle
- rRNA - Gene als Batterien mehrerer hundert Kopien im Genom  
(getrennt durch NTS = Non-Transcribed-Spacer)
  - $\rightarrow$  18S, 5, 8S, 28S hintereinander = gemeinsame Regulation
  - ↳ Untereinheit verstreut im Genom

## Promotor

- 2 Bereiche:
  - Core - Promotor
  - Upstream Control Element (UCE)

## Transkription

- UBF = Upstream Binding Factor
  - bindet an UCE
  - = Aktivator
- S<sub>L</sub>1 = TBP + 3 TAFs
  - binden an Core

## RNAP III

- Transkr. kleiner RNAs
  - tRNA
  - 5s RNA
  - bestimmte snRNAs

} Gene verteilt über ges. Genom

## tRNA Gene

- haben intragene Kontrollelemente
  - Box A
  - Box B

## Transkription

1. TF<sub>IIIC</sub> bindet an Box A, B
2. TF<sub>IIIB</sub> = TBP + TAFs bindet an TF<sub>IIIC</sub>
3. Rekrutiert RNAP II

## Genregulation in Eukaryoten

gleich wie Bakterien

- Aktivatoren + Repressoren
- spez. Sequenzen in Promotorregionen
- Beeinflussung der Transkr. Initiation

Unterschiede:

- Aktivatoren sehr viel wichtiger als Repressoren  
→ sehr geringe Basissatz
- höhere Komplexität der Regulation

## Funktionsweisen

- upstream / downstream binden seq. spez. Transkr.-faktoren  
→ regulieren PIC-Bildung durch (in)direkte Interaktion mit RNAP II
- Mediator-Komplex (20-30 Proteine): vermittelt zw. Regulator-Proteinen + RNAP II
- Histon-Acetyl-Transferasen, Chromatin-Remodeller ermöglichen/verhindern Zugang zur DNA

## Promotor Struktur

- euk. Promotoren = modular
- Module up- oder downstream
- Kombination aller Module bestimmt Expressionsmuster des Gens
- Stärke der Transkr. init. abh. von Modulbesetzung durch ihre Bindungsproteine

## Module

- Core-Promoter - Module
  - Erkennung durch allg. TF
- Basale Promoter - Module
  - Erkennung basaler Aktivatorproteine
  - nicht gewebe- / entwicklungspezifisch  
(→ Regulation durch globale Faktoren, zB Hitze)
- Response - Module
  - Erkennung durch Response - Regulatorproteine
- Zellspez. Module
  - Erkennung durch zell-, gewebebesp. Regulatorproteine
- Entwicklungspez. Module
  - Erkennung durch entwicklungspez. Regulatorproteine

## Alternative Promotoren

⇒ versch. Transkript-, Proteinvarianten  
(gewebe-, entwicklungspez.)

- alternative Promotoren können gleichzeitig aktiv sein

Bsp. Dystrophingen Mensch:

- 7 & Introns
- mind. 7 alt. Prom.
- je Promotor eigene modulare Regulation
- alle Promotoren von gleicher Silencer/Enhancerseq. beeinflusst

## UAS - Module

gibt's auch als Silencer

- unmittelbar upstream vom regulierten Gen
- bindet Aktivator → wirkt nur auf folgendes Gen

## Enhancer

- kann weit entfernt liegen (up- oder downstream)
- bindet Aktivator der mehrere Gene up-/downstream beeinflusst

## Isolatoren

- liegen zw. Enhancer + Promotor
  - binden spez. Isolatorproteine
- ⇒ inhibieren Kommunikation zw. Enhancer + Promotor  
ohne Enhancer komplett zu blocken

## Relokation

- Induktion eines Gens sorgt für Shift der DNA in Richtung Kernpore  
→ Abtransport der RNA ermöglichen / unterstützen

## Locus - Kontrollregionen

≈ Operone, ABER jedes Gen hat eigenen Promoter

- reguliert Expression mehrerer Gene, genaue Fkt. unklar

z.B. humanes Globingen - Cluster

- 5 Globingene, je eigene Regulatormodule
- zur Expression über LCR Sequenzen benötigt

## Gen-spezifische TF

### Aktivatoren

- binden an UAS-Module od. Enhancer (seq. spez.)
- stimulieren Transkr.
- mind. 2 Domänen: DNA-Bindedom., Aktivierungsdom.
- Oft weitere Domänen (Dimersierung, Kerntransport, ...)

## DNA-Bindedomäne:

- binden an DNA-Binde-Stelle

## Aktivierungsdomäne:

- Rekrutieren PIC → Interaktion mit PIC über aug. TFS oder indirekt über Mediator

## Co-Aktivatoren

- anders definiert als bei Bakterien
- = Proteine
- stimulieren ohne spez. DNA-Erkennungsseq. Transkription
- unspez. DNA-Bindung oder Protein-Protein-Wechselw. mit seq. spez. Aktivatoren

## Mediatorkomplex

- verbindet Aktivatoren mit RNAP II
- ≈ 20 Untereinheiten

## Chromatinstruktur

dicht gepacktes Chromatin = kein Zugang der RNAP II zur DNA

→ Aktivator bindet an DNA

→ Co-Aktivatoren können binden

Histon-Acetyl-Transferase

Histon-Acylierung verhindert  
binden benachbarter  
Histone

→ öffnen der Struktur

Chromatin-Remodeller

→ lockert DNA-Wicklung  
um Histone

auch andere Modifik. möglich: Phosphor., Methyl.

→ je nach Kombination andere Regulation

## Repressoren

- binden seq. spez. an URS - / Silencer -Module
- $\geq 2$  Domänen : DNA - Bindedomäne, Repressordom.

## Mechanismen

- kompetition: besetzt Aktivatorbindestelle
- Inhibition: hemmt Aktivator
- Dirkte Repression: Interaktion mit Mediator
- Indirekte Repr.: Rekrutiert Co-Repressor, zB. Histon-Deacetylase

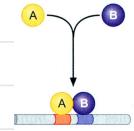
## Co-Repressor

= Protein

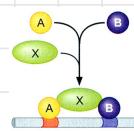
- hemmt Transkr.
- seq. unspez. Bindung oder wechselt mit seq. spez. Regulatoren

## Synergetische Interaktion, Kooperation

- verschaltet Signalwege:  
- Faktoren binden nur gemeinsam



- X aktiviert Signalweg durch Interaktion mit A, B



$\Rightarrow$  beliebig komplexe Verschaltungen / Interaktionen möglich

## Kombinatorische Kontrolle

- je Kombi von Aktivatoren: anderes Gen aktiviert  
zB Zelltypbestimmung tief

# VII. Mutation und Reparatur

2 wichtige Faktoren:

1. Konstanz der Erbinfo
  - Zellteilung
  - Weitergabe von Merkmalen
2. Variabilität + Mutationen
  - Evolution? Anpassen an Umweltbed.

## Mutationsklassen

### Punktmutationen

- Transitionen
  - = Purin  $\rightarrow$  Purin / Pyrimidin  $\rightarrow$  Pyrimidin
  - A  $\leftrightarrow$  G                    C  $\leftrightarrow$  T
- Transversionen
  - = Purin  $\leftrightarrow$  Pyrimidin

### Frame Shifts = Indels

- Insertion
  - = Insert einer neuen Base
- Deletion
  - = Löschen einer Base

=> Leseraster verändert

=> anderes Protein als Resultat

## Chromosomenmutation

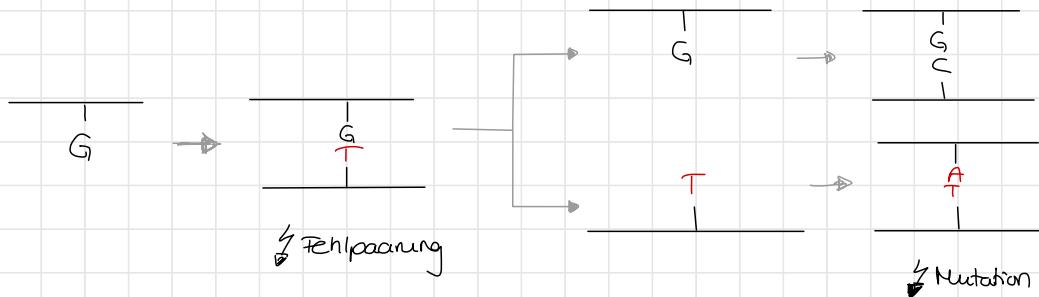
- Translokationen / Rearrangements  
= Chrom. Teile wandern zu anderem Chrom. / tauschen Plätze
- Verluste  
zB Abbruch eines Teilchrom

## Genommutationen

- Aneuploidie  
= # Chrom. inkorrekt  
zB. Trisomie 21
- Polyploidie  
= Chromosomensatz vervielfacht

## Ursachen

- Falscheinbau von Basen während Replikation



- DNA-Schäden  
= Veränderung der kodierenden Eigenschaften der Basen  
zB Deamidierung
- fehlerhafte Reparatur von DNA-Schäden

## Arten

- "forward" Mutation = Funktionsverlust / Resistenzentwicklung, ...
- Reversionen = Rückgewinnung einer Funktion / Fähigkeit die durch frühere Mutation verloren war

## Mismatch - Reparatur

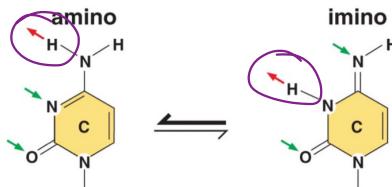
- Ursache von Mismatches: Falscheinbau während Replikation
- Ursache von Falscheinbau:
  - Keto - Enol - Tautomerie
  - "wobbly" - Basenpaare

## "wobbly" - Paare

- Bindung von zB C,A durch Ausbilden von 2 H-Brücken  
→ weniger stabil, aber prinzipiell möglich

## Keto - Enol - Tautomerie

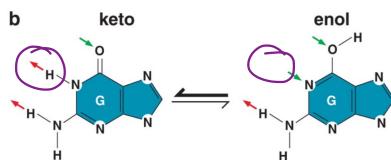
- Cytosin: hauptsächlich in Amino - Form in Zelle (C)  
seltener in Imino - Form (C')



H ist an anderer Stelle

- Guanin: haupts. in Keto - Form (G)  
seltener in Enol - Form (G')

H ist entfernt



=> H-Bindung Donoren / Akzeptoren verschieden

=> Kannen auch eingebaut werden

=> Fehlpaarung A mit C'      => Konformationsänderung  
                                T mit G'      im DNA Backbone

## Reparatur

### E. coli

1. MutS-Dimer bindet an postreplikative dsDNA
2. MutS wandert entlang DNA, sucht Fehlpaarungen
3. An Fehlpaarungsstelle: MutS-Konformation ändert sich
4. MutS Monomere binden ATP
5. MutL bindet an DNA
6. MutH bindet an DNA  
= Endonuklease  
→ erzeugt Nick in der Nähe der Fehlpaarung  
im neu synthetisierten Strang \*
7. Exonuklease baut Strang bis zur Fehlpaarung ab
8. Pol III, SSB, Ligase re-synthetisieren Strang

\* Strangunterscheidung:

- durch Hemimethylierung nach Replikation  
→ Dam-Methylierung des neuen Strangs erst nach gewisser Zeit

=> ! Reparatur nur möglich solange hemimethyliert

## Eukaryoten

- ähnlich zu E. coli
- MutS ersetzt durch Homologe : MSH (=MutS-Homologe)
  - Scanning -Funktion
  - versch. Homologe mit versch. Spezifität  
(Insertion / Fehlpaarung,...)
- MutL - Homologe
  - MLH, PMS
- KEINE MutH - Homologe
  - Stranguntersch. über Okazaki - Fragmente

## DNA - Schäden

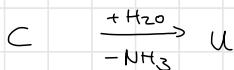
### Arten

- Spontan
- UV - Strahlung, ionisierende Strahlung
- durch Chemikalien

### Spontan

#### Desaminierung

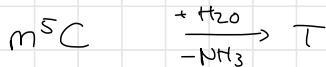
> aus Cytosin kann mit Wasser durch Abspaltung von  $\text{NH}_3$  Uracil werden



=> falls nicht sofort erkannt + repariert:  
bei nächster Repl. Paarung mit A statt G  
=> Mutation

da U unnatürliche Base in DNA: Erkennung leicht

> aus methyliertem Cytosin\* kann mit Wasser durch Abspaltung von  $\text{NH}_3$  Thymin werden



\* liegt häufig so in DNA vor

=> T ist natürliche Base

=> wird nicht als Fehler erkannt

=> Mutation

## Depurinierung

= hydrolytische Spaltung der Base und OH-Rest im Backbone

=> Base fliegt aus DNA

=> Verlust der gen. Information ( $\ominus$  ≠ Deletion)

## UV-Schäden

UV:  $\lambda \approx 260\text{nm}$

= Absorptionsmax. der Basen

## Thymin-Dimer

- benachbarte Thyminen bilden Cyclobutan-Ring aus 4 C-Atomen aus

=> Konformationsänderung der DNA

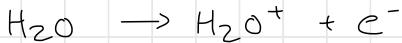
## T(6-4)C-Photoproduct

- benachbarte Thymin + Cytosine binden an C-6 des Thymins, C-4 des Cytosins

=> Konformationsänderung der DNA

## ionisierende Strahlung

- $\gamma$  und Röntgenstrahlen ionisieren Wasser:



=> Folgen:

- $\text{H}_2\text{O}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{H}_3\text{O}^+$
  - $\cdot\text{OH} + \cdot\text{OH} \leftrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$  Peroxid
  - $e^-_{\text{aq}} + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^-$  Superoxid
  - $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$  Peroxid
- =>  $\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  sehr reaktiv
- => greifen Doppelbindungen an (Oxidation)

## Basenschäden

- verändertes G ( $\text{oxo G}$ ) verursacht Mutationen durch Paarung mit A
- Thymin-Glykol verhindert Basenpaarung  
=> blockiert Replikation

## Strangbrüche

- Einzel- und Doppelstrang

## Chemikalien

### Alkylierung / Adduktbildung

= Modifikation der N-, O- Gruppen

- Verändert Paarungseig.
- Verändert Konformation

## Ursachen

- Endogene Agenzien  
zB SAM = wichtiger Cofaktor, reagiert aber manchmal mit DNA
- Exogene Agenzien

## Bulky Adducts

- = unformige Anheftungen
- chem. Stoffe heften sich an Basen, ändern Konformation

## Basenanaloga

- anstelle der Basen in DNA eingebaut  
(passen chemisch auch)
- Fehlpaarung

## Intercalatoren

- lagern sich zw. Basenpaare
- Frame Shift
- zB Ethidiumbromid

## Konsequenzen

Desaminierung von C  
Oxidation von G  
Basen-Analoga

} direkte Induktion  
von Fehlpaarungen

Intercalatoren

} Induktion von Frame Shifts

Photoproducte  
Depurinierung  
Oxidation  
Alkylierung } nicht immer  
Addukte  
Strangvernetzung  
Strangbrüche

} Störung Transkription  
→ Replikation

## Reparaturmechanismen

### Passiver Schutz

- Haut, Pigmente
- Struktur der DNA
  - nur best. Basenpaarungen möglich
  - Helixform
- Radikalfänger, Antioxidanzien
  - zB Vitamin C, E
- Redox Puffer
  - zB Glutathion ← machen  $H_2O_2$  unschädlich
- Enzyme
  - zB Superoxid Dismutase, Katalase
- Räuml. Trennung Zellatmung (reaktiver Sauerstoff) in Organellen,  
DNA im Zellkern

## Aktive Reparatur

- direkte Eliminierung (Photoreakt., Alkyltransferasen)
- Excision des Schadens (BER, NER, TCR)
- Rekombination = Verpflegung eines intakten Bereichs

## Photoreaktivierung

- Enzym Photolyase ? nicht in Säugetieren
- spezifisch für T-T-Dimere
- 2 Chromophore
  - Lichtsammel
  - Katalysator (Elektronen- Donor)

1. Bindet (im Dunkeln) an fehlerhafte DNA
2. Katalysiert durch Licht (300-500 nm)
3. Auflösen der Dimer-Struktur

## Alkyltransferasen

- = Enzyme die CH<sub>3</sub> - Methylierung von Basen entfernen
  - für jede Base ist einziges Enzym nötig

## Basen-Excisionsreparatur (BER)

1. Glycosylasen scannen (= überwachen) Genom  
→ erkennen Basenschäden
2. Flip-Out der beschädigten Base
3. Hydrolyse der Base-Zucker-Bindung  
→ Base entfernt  
⇒ apurinische Stelle
4. Zucker entfernen, Auffüllen der Lücke, Ligation  
(Exonuklease) (DNA-Pol) (Ligase)
- Je nach Schaden andere Glycosylase, Schnitte sonst gleich

## Nukleotid - Excisionsreparatur (NER)

Beispiel E.coli:

1. Erkennung von Unregelm.keiten im DNA - Backbone
  2. Uvr A B bindet unter ATP - Verbrauch, scannt entlang DNA bildet Bubble um Fehlerstelle
  3. Uvr A verlässt Komplex  
Uvr B schneidet H - Brücken => Strangtrennung
  4. Uvr C - Dimer bindet  
→ Uvr B/C = Endonuklease  
→ Nicks links, rechts von Schadensstelle
  5. Uvr D (Helikase) löst geschnittte ssDNA vom anderen Strang
  6. DNA - Pol I, Ligase füllen Lücke
- NER unselektiv bei vielen Schäden aktiv

## Transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR)

- normale RNAP bleibt an mutierten DNA - Stellen "hängen"
- bleibt stehen
- rekrutiert NER - Proteine zur Reparatur

## Doppelstrangbruch - Reparatur

z Möglichkeiten:

- durch homologe Rekombination
- End - zu - End - Verknüpfung (NHEJ)

## homologe Rekombi

(Bakterien, oft Hete und Euk.)

- fehlerfrei
- intakte Kopie nötig

→ sucht homologe Kopie → Strandinvasion  
→ Synthese

NHEJ = Non Homologous End Joining (bei Säugetieren)

- nicht fehlerfrei  
(falsche Enden verknüpft)
- keine intakte Kopie nötig

1. Ku70/Ku80 binden an dsDNA-Enden

2. Rekrutieren DNA-PKcs (Protein-Kinase)

→ bilden Komplex mit Endo-/Exonuklease Artemis

3. Artemis prozessiert Enden

4. Ligation

- Mensch: fast nur NHEJ-Reparatur (45% repeats im Genom)

## Zellreaktionen

### E. coli SOS-Antwort

- bei massiver DNA-Schädigung
- aktiviert Reparatursysteme
- Sicherstellen der Replikationsfähigkeit

Regulator: RecA (auch für homologe Rekombi)

## Schadenstoleranz

- Punktmutationen nicht immer schlimm  
→ degenerierter gen. Code

- Ähnlichkeiten zw. As

⇒ Möglichkeit zum Bypass von Repl. blockaden

zB Translisionssynthese bei E.coli:

→ DNA-Pol III fällt ab, andere DNA-Pol übernimmt  
für Schadensstelle

▷ erzeugt Mutationen

## physiologische Reaktionen

- Zellzyklus anhalten  
→ Zeit für Reparatur gewinnen
- Apoptose bei zu geringer Reparaturkappa

## Epigenetik

= Änderung der Genfunktion, die NICHT auf Mutation / Rekombi basieren

→ Veränderung an Chrom

→ Veränderung der Aktivität von Chrom.- (abschnitten)

→ Vererbung an Tochterzellen ohne Änderung der DNA Sequenz

→ Veränderter Phänotyp  
gleicher Genotyp

## Modifikationen ≠ Mutationen ?

- Methylierung von Cytidin-Basen in Cytosin-Guanosin-Nukleotid-Dimeren
- Seitenketten-Methylierung / -Acetylierung
- Phosphorylierung von Histonen
  - Verdichtung / Ausdehnung des Chromatins beeinflusst
  - Einfluss auf Genexpression
- beschleunigter Telomer-Abbau durch psychische Belastung

# VIII. Spleißen mRNA Euk.

## Unterschiede mRNA

im Vergl. zu Prok.

- nur 1 Gen je Transkript

- 5'-Capping

- PolyA-Tail am 3'-Ende

- Splicing

- 4-5h Halbwertszeit

- Startcodonfindung:

- > Prok.: Bindemechanismus

- = RBS in mRNA + kompl. Sequenz in 16S rRNA

- > Euk.: Scanning-Mechanismus

## pre-mRNA

= mRNA mit Introns noch drin

! pre-mRNA mit ges. Gen transkr. aber allen Introns noch drin existiert so nicht

→ Splicing-Maschine wird schon während transkr. von CTD der RNAP II rekrutiert

⇒ Splicing läuft schon während Transkr.

## Stats

- fast alle euk. Gene: ≥ 1 Intron

- größtes Gen: Muskel dystrophie (2,4 MB)  
→ fast nur Introns

- meiste Introns: Titin (368)

- 60% der menschl. Gene alternativ gespleift

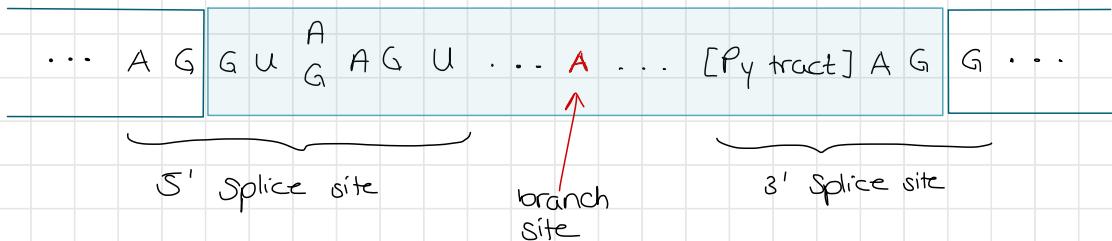
- größte Variabilität durch alt. Sp.!

**DSCAM** → 38016 mögl. Kombis

(Schlüssel-Schloss-Prinzip zur Verschaltung von Nerven im Gehirn)

## Introns

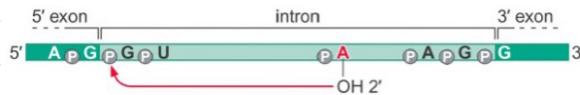
• Grenzen definiert durch hochkonservierte Sequenzen



Py = Polypyrimidin

## Mechanismus

1. Nukleophiler Angriff durch A 2'-OH :



2. Spaltung + nukleophiler Angriff durch 3'-OH



=> Trennung von Intron, Exons



= Intron-Lasso



Abbau

## Spliceosom

= Spleiß-Apparat

### Bestandteile

- 5 snRNPs : U1, U2, U4, U5, U6
- 41 Proteine in den snRNPs
- 70 Spleiß-Faktoren
- 30 weitere Proteine

### snRNPs

- kennen RNA- RNA - Hybride ausbilden  
→ erkennen Intron- Exon - Grenzen (konservierte Seq.)

### Assembly

#### 1. Early Complex (E)

- U1 erkennt 5' Spleiß-Stelle durch Basenpaarung
- U2AF bindet an Poly Py + 3' Spl. Stelle  
→ rekrutiert B3P an branch site (A)

= RNA - RNA - Hybridisierung

#### 2. A complex

- U2 verdrängt B3P  
→ in U2 fehlt die komplementäre U-Base zu A  
⇒ A wird verdrängt = exponiert

#### 3. B complex

- tri-snRNP Komplex aus U4, U6, U5 interagiert mit U1, U2  
⇒ Rearrangement bringt beide Spl.-Stellen in räuml. Nähe
- U2AF verlässt Komplex

#### 4. U1 verlässt Komplex, U6 besetzt Stelle

#### 5. C Complex

- U4 verlässt Komplex

=> U6 interagiert mit U2 (RNA:RNA Paarung)  
=> U2 + U6 = Kat. Zentrum für Splice-Reaktion

## 6. Splice-Reaktion (siehe oben)

### Arten

Klasse	Vorkommen	Mechanismus	Katal. Maschine
nukl. pre-mRNA	sehr häufig, meiste euk. Gene	siehe oben	Spliceosom
Gruppe II Introns	<ul style="list-style-type: none"><li>selten, in einigen euk. Genen</li><li>häufig in Mitochondrien / Plastiden</li></ul>	siehe oben	Selbstsplicing -> RNA Ribozym
Gruppe I Introns	<ul style="list-style-type: none"><li>selten, manche nukl. rRNA in Euk.</li><li>Organellgene, einige prok. Gene</li></ul>	andrer	-" -

# Biologische Funktionen

## Domain Shuffling

- Exons häufig Protindomänen  
=> neue Proteinvarianten durch Shuffling

## mRNA Qualitätskontrolle

= nonsense-mediated decay of mRNA (NMD)

- untransl. mRNA markiert durch exon-junction Proteine

pioneer - Runde = 1. Runde Transl.

→ entfernt exon-junction - Proteine

→ falls vorzeitiges Stop-Codon (Punktmut. / Frame Shift) :

nicht alle entfernt

=> zum Abbau freigegeben

## alternatives Spleißen

- SR-Proteine (Ser/Arg-reich) rekrutieren Spleißproteine  
=> erhöhen Spleißen - Genauigkeit

=> Spliceasom kann durch Repressorbindung am Spleißen gehindert werden

ODER

durch Aktivatorbindung rekrutiert werden

## RNA Editing

= nachträgliches Verändern der RNA Basensequenz

- sehr selten, aber wichtiger Mechanismus  
zB wichtige Genregulation in höheren Tieren

## Cytosin Desaminierung

ZB RNA verändern je nach Ort der Zelle

→ CAA in Leber nicht ändert

CAA in Gedärn desaminieren (macht C zu U)

⇒ UAA = Stop-Codon

= kürzere RNA als in Leber zelle

## guide-RNA

- in Mitochondrien von Trypanosomen
- guide RNAs editieren mitochondrialen mRNAs

# IX. Translation

- = übersetzen von mRNA → Proteine
- stark konserviert zw. Prok. + Euk.
- schnell wachsende Bakterienzellen:
  - bis zu 20 000 Ribosome
  - 80% der Energie für Translation
  - 50% des Trockengewichts -!!-
- > 100 Proteine + RNA-Moleküle beteiligt

## mRNA

- Startcodon → bestimmt ORF
  - Prok.: AUG (GUG, UUG)
  - Euk.: AUG
- Codons: 3 Basen für 20 AS =  $4^3 = 64$  Möglichkeiten  
↳ 61 für AS
- Stopcodon: UGA, UAA, UAG  
→ oft mehrere hintereinander

## Prokaryoten

- polycistronisch = mehrere Startcodons + Stopcodons
- vor dem Start ist jeweils eine RBS

## RBS

- = Ribosomen Bindestelle
- = Shine-Dalgarno-Sequenz
- hier bindet die 16S rRNA  
→ findet dadurch Startcodon

= Birncle - Mechanismus

## Translationskopplung

- Start- + Stopcodon können überlappen (AUGA)
- Translation ohne RBS möglich

## Eukaryoten

- monocistronisch
  - 5' - CAP
  - 3' - Poly(A)-Schwanz
  - Scanning - Mechanismus findet Start
- Ribosom assembliert an 5'- CAP
- Komplex hat erste tRNA für Start schon dabei
  - Met-tRNA scannt von 5' nach 3' bis Start erkannt

## Kozak - Sequenz

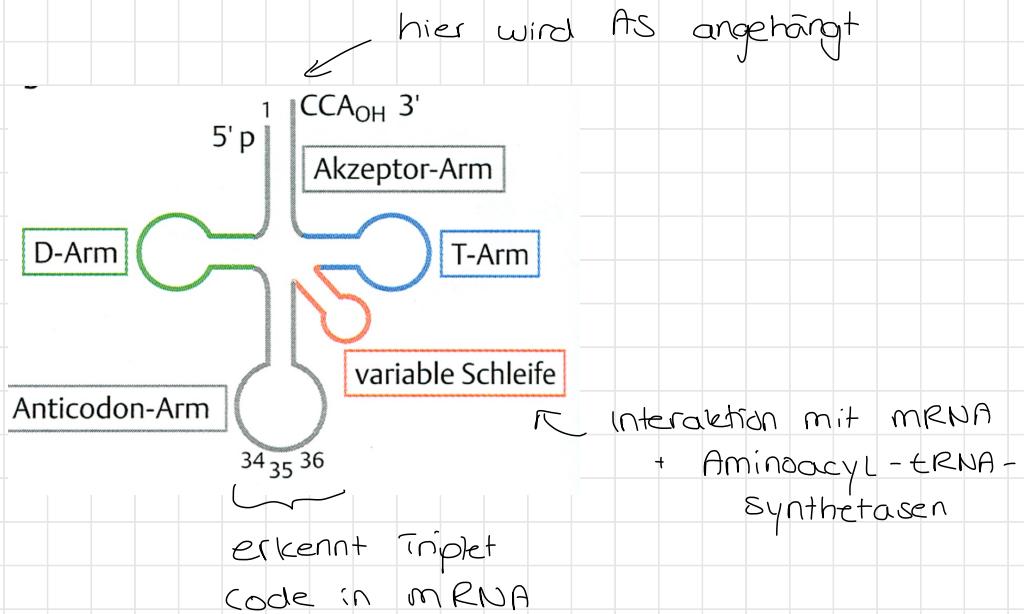
- erhöht Effizienz
- nicht essentiell

## tRNA

- = Adaptern zw. Codonen + Aminosäuren
- je Codon 1 tRNA
- manche tRNAs können >1 Codon erkennen  
(? nur gleiche AS)
- 1 tRNA immer nur für 1 bestimmte AS
- synonome Arten übertragen gleiche AS
- 10 - 15% der RNA von Bakterien
- ≈ 400 000 tRNA pro Bakterienzelle
- 75 - 95 Nukleotide lang

## Struktur

Sekundärstruktur: Kleeblatt



3D - Struktur: umgekehrtes L  
- intramolekulare Basenpaarung



## Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

- beladen tRNA mit AS
- kann nur mit 1 bestimmten AS assoziieren  
→ je AS andere Am.-tRNA-Syn.
- Fehlerrate 0,1%
- ? nach Beladung KEINE Korrektur mehr

## Beladung

- Anlagerung ATP → AS + tRNA an Am. t.s. Enzym
- Bildung von Aminoacyl-AMP unter ATP-Spaltung

- 2) - Aminoacyl-AMP reagiert mit 2'-OH / 3'-OH der tRNA \*
- > Abspaltung AMP + Bildung Aminoacyl-tRNA
- ↑  
= beladene tRNA
- \* energieriche Bindung  
als Energie für Peptidbindung  
an AS Kette später

### Spezifische Erkennung

- Am.-tRNA-Sy erkennt passende tRNA über
  - Akzeptor-Arm
  - Anticodon-Arm
  - ggf. weitere Strukturmerkmale
- erkennt passende AS über
  - spezifische Interaktionen im katalyt. Zentrum
  - bei ähn. AS entweder geringe Bindung  
oder z.B. Prüftasche die falsche Strukturen erkennt

### Ribosomen

- ermöglichen spez. wechs. Wirk. von Codon + Anticodon der tRNA
- katalysiert Peptidbindung zw. AS benachbarter tRNA
- 2 Untereinheiten

### Untereinheiten

- je 1-3 RNA-Moleküle (60%)
- viele versch. Proteine (40%)
- > kleine UE : Dekodierungs-Zentrum = Treffpunkt mRNA + tRNA
- > große UE : Peptidyl-Transferase-Zentrum = Verknüpfung AS

## Euk.

### große UE

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

### Ribosom

### kleine UE

- 18 S rRNA
- $\approx$  33 Proteine

## Prok.

### große UE

- 5 S rRNA
- 23 S rRNA
- $\approx$  34 Proteine

### Ribosom

### kleine UE

- 16 S rRNA
- 21 Proteine

## Ribozym

Ribosom = Ribozym (= katalytisch aktives RNA-Molekül)

→ katal. Zentren sind RNA

Proteine nur in Peripherie

## Translation

### Initiation

3 Schritte:

1. Rekrutierung Ribosom an mRNA
2. P-Stelle mit beladener tRNA besetzen
3. Ribosom präzise über Start-Codon platzieren

→ benötigt spez. Init-tRNA  
Transl.-Init. faktoren

## fMet - tRNA

= Init - tRNA

- Beladung durch normale Met - tRNA - Synth.
- ungefähr gleiche Konzentration wie normale Met - tRNA  
(in E. coli)

## Prokaryoten

1. Verhindere Bindung der UE ohne mRNA:
  - IF3 bindet E-Stelle der kleinen UE  
→ verhindert Bindung der großen Anlagerung beladener tRNAs
2. IF1 bindet A-Stelle der kleinen UE  
→ verhindert Anlagerung beladener tRNAs
3. IF2 = GTPase interagiert mit IF1, fMet-tRNA,  
kleine UE  
→ führt alle 3 zusammen
4. fMet-tRNA bindet an Startcodon  
⇒ Konformationsänderung der kleinen UE  
⇒ IF3 wird frei
5. große UE bindet an Komplex  
⇒ GTPase von IF2 spaltet GTP → GDP  
→ IF2-GDP geht weg
6. IF1 geht weg  
⇒ Ribosom bereit für Elongation

mRNA durch Interaktion mit 16s rRNA eingebaut  
(RBS)

## Eukaryoten

Unterschiede:

- komplexere Faktoren
- Init.-tRNA Teil des Init.-Komplexes, Init.-Met. unmodifiziert  
→ Scanning?

2 parallele Prozesse:

- Aufbau Prä-Init.-Komplex
- Vorbereiten der mRNA

### Prä-Init.-Komplex

1. eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5 binden an kL. UE  
→ verhindern Assoz. mit großer UE / beladener tRNA  
(≈ IF1-3)
2. eIF2-GTP bringt Init.-tRNA zur kL. UE  
↪ mit unmodifiziertem Met beladen

### mRNA Vorbereitung

1. eIF4E bindet an CAP
2. eIF4G bindet an eIF4E + mRNA  
eIF4A eIF4G + mRNA
3. eIF4B aktiviert Helikase-Aktivität von eIF4A  
↪ entfernt Sekundärstrukturen am 5'-Ende

### Zusammenfügung

1. an mRNA angelagerte Faktoren wechselwirken mit kL. UE  
→ Prä-Initkomplex fertig (hat Met-tRNA dabei?)
2. kL. UE scannt ATP-abh. mRNA bis Init.-tRNA erstes Start-Codon findet

- ⇒ Konf. Änderung der Kl. UE
- ⇒ GTP → GDP an eIF2
- ⇒ eIF2, eIF1, eIF3, eIF5 gehen weg

3. eIF5B-GTP bindet an Init-tRNA

- ⇒ rekrutiert gr. UE
- ⇒ GTPase von eIF5B
- ⇒ eIF5B-GDP geht weg
- ⇒ Met-tRNA geht auf P-Stelle

⇒ bereit für Elongation

### Zirkularisierung mRNA

- eIF4G + Poly(A)-binding-Protein wechselwirken
  - ⇒ Zirkularisierung
  - ⇒ höhere Effizienz (Ribosom am Ende direkt auch wieder am Start)

### Elongation

3 Schritte:

1. A-Stelle gemäß Codon mit Aminoacyl-tRNA beladen

2. Peptidbindung zw. Aminoacyl-tRNA in A-Stelle  
Peptidyl-tRNA in P-Stelle

3. Translokation: Peptidyl-tRNA aus A-Stelle  
in P-Stelle schieben

## A-Stelle Beladen

A-Stelle = Akzeptorstelle

1. EF-Tu-GTP bindet Aminoacyl-tRNA an 3'-Ende  
→ verhindert Peptidbindung der AS  
(erst Codon prüfen!)

### 2a. korrekte Paarung:

- EF-Tu-GTP bindet effizient an 50S-UE
- ⇒ Spaltung GTP → GDP
- ⇒ EF-Tu-GDP kann nicht mehr an tRNA binden
- ⇒ geht weg

### 2b. inkorrekte Paarung:

- tRNA Affinität zu A-Stelle gering
- EF-Tu-GTP bindet nicht
- ⇒ beide verlassen Ribosom

## Erkennung Codon

- 2 Adeninreste der 16S rRNA interagieren mit 1. + 2. Basenpaaren von Codon-Anticodon-Struktur  
→ erkennt korrekte G:C / A:U Paare

## Peptidbindung

im P-Zentrum = Peptidyltransferase-Zentrum

- Peptidsynthese beginnt vom Aminoterminal des AS aus
- wachsende Polypeptidkette wird auf Aminoacyl-tRNA übertragen  
(also die die gerade die neue AS gebracht hat)
- Aminoacyl-tRNA wird zu Peptidyl-tRNA

- Katalyse durch die rRNA? (Ribozym)

## Translokation

- Mechanismus unvoll. verstanden!
- Ausgangslage:
  - Polypeptidkette hängt an tRNA in A-Stelle
  - leere tRNA in P-Stelle
  - leere E-Stelle
- A geht nach P  
P                    E
- nach Transfer der Polypeptidkette:
  - tRNA in P-Stelle frei
  - Konf. Änderung
    - Ribosom bindet EF-G-GTP
    - spaltet zu EF-G-GDP
    - Verdrängt Pep.-tRNA aus A nach P
    - ⇒ zieht mRNA mit
    - ⇒ tRNA aus P jetzt in E
    - ⇒ EF-G-GDP + freie tRNA in E geben

## Termination

- keine tRNAs für Stop-Codons UAG, UAA, UGA  
⇒ Transl. stoppt
- Stop-Codone von Terminationsfaktoren (Protine) erkannt
  - besetzen A-Stelle
  - lösen Polypeptidkette von tRNA
- Recyclingfaktoren + EF-G lösen leere tRNA + mRNA vom Ribosom
- IF3 bindet kli. u.E → neuer Prozess startet

## Mechanismus

RF = Release-Faktor

1. RF1 bindet an Stop-Codon (ahmt tRNA nach)  
→ vermittelt Freisetzung der Pol. p. Kette über  
GGQ-Motiv
2. RF3 bindet an RF1  
→ katalysiert Ablösen von RF1
3. GTP → GDP ⇒ Dissociation RF3

## Ribosomen-Recycling

RRF = Rib.-Recycl.-Faktoren

1. RRF ahmt tRNA nach  
→ bindet an A-Stelle
2. RRF rekrutiert EF-G-GTP  
→ Ablösung leerer tRNA aus A-, P-Stelle  
(ähnlich wie bei Elongation)
3. IF3 stimuliert Ablösung von EF-G-GDP

## Regulation

### Transl. init bei Bakterien

- durch Inhibition der RBS Bindung
- z.B. - RNA-bindendes-Protein inhibiert Zugang zu RBS
  - Inhib. durch intramolek. Basenpaarung der mRNA  
→ falls mehrere ORF sukzessive transl. werden sollen

## genetischer Code

- 61 Codons für 20 AS  
→ degeneriert

## Gesetzmäßigkeiten

- XYC + XYL immer synonym  
(häufigste Mut.: Desaminierung C → U)
  - XYA + XYG fast immer syn. (außer Met, Trp)
  - Mutation an Stelle 3 häufig synonym  
(Hypoth.: wobble-Base)
  - Mut. Pos. 1: meist ähnl. AS (polar bleibt polar,...)
  - Py an Pos 2 meist hydrophob  
Pu hydrophil  
→ Transitionen häufiger als Transversionen
- ⇒ Auswirkung von Mut. möglichst gering halten

## wobble-Hypothese

- 1. + 2. Base des Anticodons: Standard-Basenpaarung
- 3. kann schwanken  
= weniger wichtig für Erkennung

## Codon-usage

- Genome mit hohem AT-Gehalt bevorzugen Codons mit 2-3 U/A-Basen
- GC-Gehalt  
2-3 G/C-Basen
- Verwendung von Code-Wörtern (=codon-usage)

entspricht Vorkommen synonymer tRNAs

- Gene mit hoher Nachfrage nutzen häufige Codons  
geringer