

Teil Molekularbiologie**1. Über Mutationen**

- a) In welchem Teil eines Operons befinden sich Mutationen, welche die Menge eines Enzyms in einem Organismus beeinflussen?

Solche Mutationen befinden sich im Operator.

- b) In welchem Teil befinden sich Mutationen, welche K_M oder K_{cat} eines Enzyms beeinflussen?

Um die Eigenschaften eines Enzyms zu verändern müssen Mutationen im codierenden Bereich liegen, da sie so Aminosäuren der herzustellenden Proteine verändern.

- c) Weshalb beeinflussen gewisse Mutationen den Phenotyp nicht?

Der Genetische Code umfasst 64 mögliche Basentriplets, jedoch nur 20 Aminosäuren plus 3 ‚stop-codons‘. Es gibt also genetische Mutationen welche die Aminosäuresequenz nicht verändern. Zusätzlich gibt es DNA Sequenzen,

welche weder für Proteine und RNAs kodieren noch für die Regulation eine bemerkbare Rolle spielen.

d) Welche Mutationen haben den grössten Effekt auf den Phenotyp?

Insertionen und Deletionen, welche zu einem Frameshift führen, sowie der Einbau eines ‚stop-codons‘ zerstören meist das ganze Gen.

2. Mikroarrays

Was sind DNA Mikroarrays? Was kann damit nachgewiesen werden?

DNA Mikroarrays sind kleine Chips, auf denen örtlich getrennt verschiedene bekannte DNA Sequenzen angebracht werden. Wird die gesamte gefärbte DNA (diese wird indirekt aus der mRNA hergestellt) eines Organismus auf den Chip transferiert, können die Chip-DNAs mit den DNAs des Organismus hybridisieren. Dabei entsteht ein Farbmuster auf dem Chip, welches spektroskopisch analysiert und mit den Sequenzinformationen in Verbindung gebracht werden kann. So kann beobachtet werden, welche Gene in einem Organismus vorhanden sind, oder bei RNAs, welche Gene exprimiert werden. Beliebte sind vor allem Experimente zum Vergleich von Organismen in verschiedenen Umgebungen. Chips können mit allen interessanten Biomakromolekülen hergestellt werden, also mit Proteinen und neu auch mit Oligosacchariden.

3. Evolutionary Engineering

Das Enzym Chorismat Mutase erzeugt Prephenat, was mit Hilfe von weiteren Enzymen und Stoffen in die Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin umgewandelt wird.

Wie könnte man dieses Enzym verbessern? Beschreiben Sie kurz die nötigen Schritte.

Da Tyrosin und Phenylalanin, sowie alle anderen Aminosäuren für den Organismus überlebenswichtig sind, kann man Selektion anwenden.

Chorismate -- Chorismat Mutase -- > Prephenate

Mutagenese

Das Enzym Chorismat Mutase muss zu Beginn mutiert werden. Dabei entsteht eine Vielzahl verschiedener Varianten der Chorismat Mutase. Jede Zelle exprimiert dabei nur eine dieser Varianten.

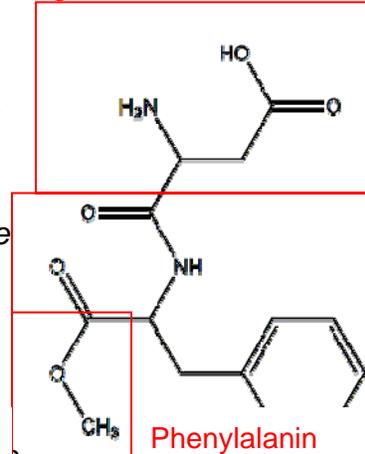
Selektion

Die Zellen werden auf einem Nährmedium ohne Tyrosin und Phenylalanin, dafür mit Chorismat inkubiert. Ist eine Zelle dank der Chorismat Mutase Variante fähig, aus dem beigegebenen Chorismat Prephenat und anschliessend die fehlenden, lebenswichtigen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin herzustellen, wird sie überleben. Die überlebenden Zellen müssen anschliessend isoliert und analysiert werden.

4. Produktion von Aspartam

Aspartam ist ein künstlicher Süsstoff der etwa 200mal süsser ist als Zucker (Saccharose) und im Gegensatz zu anderen künstlichen Süsstoffen einen sehr zuckerähnlichen Geschmack hat. Um die gleiche Süsse eines Nahrungsmittels zu erreichen, muss viel weniger Aspartam beigefügt werden als herkömmlicher Zucker. Dies reduziert die Kalorienmenge und ist deshalb sehr beliebt in Diät-Nahrungsmitteln. Der übermässige Konsum von Aspartam-gesüssten Lebensm. allerdings zu Methanolvergiftungen (und mö anderen Schäden) führen.

Asparaginsäure



Methanol

Phenylalanin

Aus welchen beiden Bausteinen (plus Methanol, CH₃OH) besteht Aspartam?

Aus Methanol und den beiden Aminosäuren Phenylalanin und Asparaginsäure

Erklären sie, weshalb es sinnvoll ist, die Bausteine für Aspartam in Bakterien herzustellen?

Aminosäuren sind extrem wichtige Bausteine für Bakterien, daher müssen Enzyme, welche an der Herstellung von Aminosäuren beteiligt sind, sehr effizient sein. Es werden also viele Aminosäuren in Bakterien gebildet, welche man nur noch von den anderen Zellbestandteilen trennen muss. Zudem sind Aminosäuren mit chemischen Methoden nicht sehr effizient herzustellen.

Die Produktion von Substanzen in Zellen kann verbessert werden, indem der Anabolismus verstärkt und der Abbau der Substanz gehemmt wird.

Erklären sie kurz wie man den Katabolismus der Aspartam-Bausteine verstärken kann?

Da die beteiligten Enzyme schon äusserst effizient sind, können Bakterien nur durch Regulation der beteiligten Enzyme verbessert werden. Erhöhung der Transkription/Translation von Enzymen (sogenannte Überexpression), welche diese bestimmten Aminosäuren herstellen, sowie Verminderung der Expression von Enzymen, welche die Aminosäuren in weitere Stoffe umwandeln. Dabei sollte aber nicht die Proteinbiosynthese-Mechanik beeinträchtigt werden. Ebenfalls ist das Ausschalten negativer Regulationen auf Proteinbasis vorstellbar (siehe Übung 5).

Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme sind Proteine, welche bestimmte DNA Sequenzen erkennen und jeweils eine Phosphatbindung beider DNA Stränge hydrolysieren. Dadurch entstehen zwei Fragmente mit komplementären Enden.

*Das Restriktionsenzym Sau3239I schneidet bei der Sequenz C-TCGAG,
EcoR1 bei G-AATTC.*

Demnach:

ATCTCGAGTTTAGGCGCCAGCGCGAATTCAAAGGAGCA

TAGAGCTCAAATCCGCGGACGCGCTTAAGTTTTCTCGT

+ Sau3239I =

ATC TCGAGTTTAGGCGCCAGCGCGAATTCAAAGGAGCA

TAGAGCT CAAATCCGCGGACGCGCTTAAGTTTTCTCGT

ATCTCGAGTTTAGGCGCCAGCGCGAATTCAAAGGAGCA

TAGAGCTCAAATCCGCGGACGCGCTTAAGTTTTCTCGT

+ EcoR1 =

ATCTCGAGTTTAGGCGCCAGCGCG AATTCAAAGGAGCA



Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

Kapitel 5

Musterlösung- Übung 9

Vorlesung Bio-Engineering

Sommersemester 2008

TAGAGCTCAAATCCGCGGACGCGCTTAA GTTTTCTCGT

Praktisch alle Restriktionsenzyme weisen eine palindromische Erkennungssequenz auf. Erklären sie was eine palindromische Erkennungssequenz sein könnte.

Griechisch: *palíndromos* = rückwärts laufend. Im Bezug auf DNA bedeutet palindromisch, dass auf dem Komplementärstrang in derselben Richtung (e.g. 5' -> 3') dieselbe Sequenz vorhanden ist und der schnitt an beiden Strängen symmetrisch ist.

-> 5' CTCGAG 3'

3' GAGCTC 5' <-

Diese Symmetrie ist auch in der Struktur der Restriktionsenzyme ersichtlich.

Zu welcher Enzymklasse gehören Restriktionsenzyme?

Hydrolasen

Welches DNA-Stück ergibt sich aus folgender Reaktion:

ATCTCGAGTTTAGGCGCCAGCGCGAATTCAAAGGAGCA

TAGAGCTCAAATCCGCGGACGCGCTTAAGTTTTCTCGT

+ Sau3239I + EcoR1 =

ATC TCGAGTTTAGGCCGCCAGCGCG AATTCAAAGGAGCA
TAGAGCT CAAATCCGCGGACGCGCTTAA GTTTCCTCGT

An wievielen Stellen würde EcoR1 das menschliche Genom ($3 \cdot 10^9$ bp) durchschneiden?

EcoR1 schneidet ungefähr alle 4^6 Basenpaare, da dies der Wahrscheinlichkeit, die Erkennungssequenz in einer zufälligen DNA Sequenz zu finden, entspricht. Das ergibt 1 Schnitt alle 4096 Basenpaare und somit etwa 732'000 Schnitte im menschlichen Genom.

Organismen exprimieren normalerweise ein weiteres Enzym, welches die Erkennungsstellen der für den Organismus spezifischen Restriktionsenzyme für Restriktionsenzyme unlesbar macht. Die DNA dabei aber für alle anderen Zwecke unbeschädigt! Können sie sich vorstellen, weshalb Organismen Restriktionsenzyme exprimieren?

Durch die Schutzenzyme, sogenannte DNA-Methylasen, wird die eigene DNA gegen Restriktionsenzyme, welche den ungeschützten Organismus zerstören würden, geschützt. Fremde DNA welche zum Beispiel bei einer viralen Infektion in die Zelle gerät, ist nicht geschützt und kann so zerstört und das Virus unschädlich gemacht werden.