

Einführung in die Molekularbiologie

Prof. Dr. Martin Hagemann

Vorlesung 3

RNA-Modifikationen

Spleißen

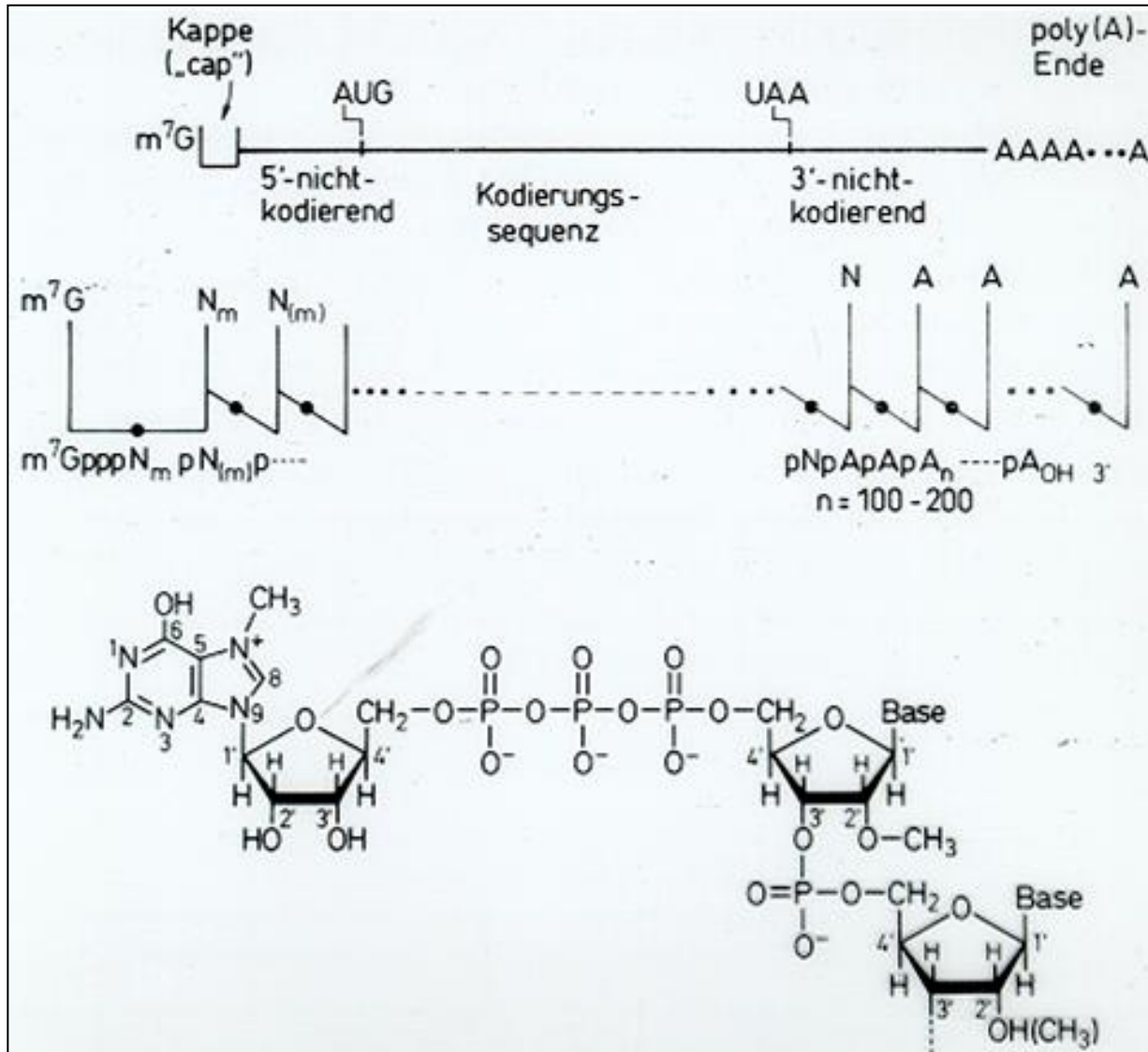
RNA-Editing

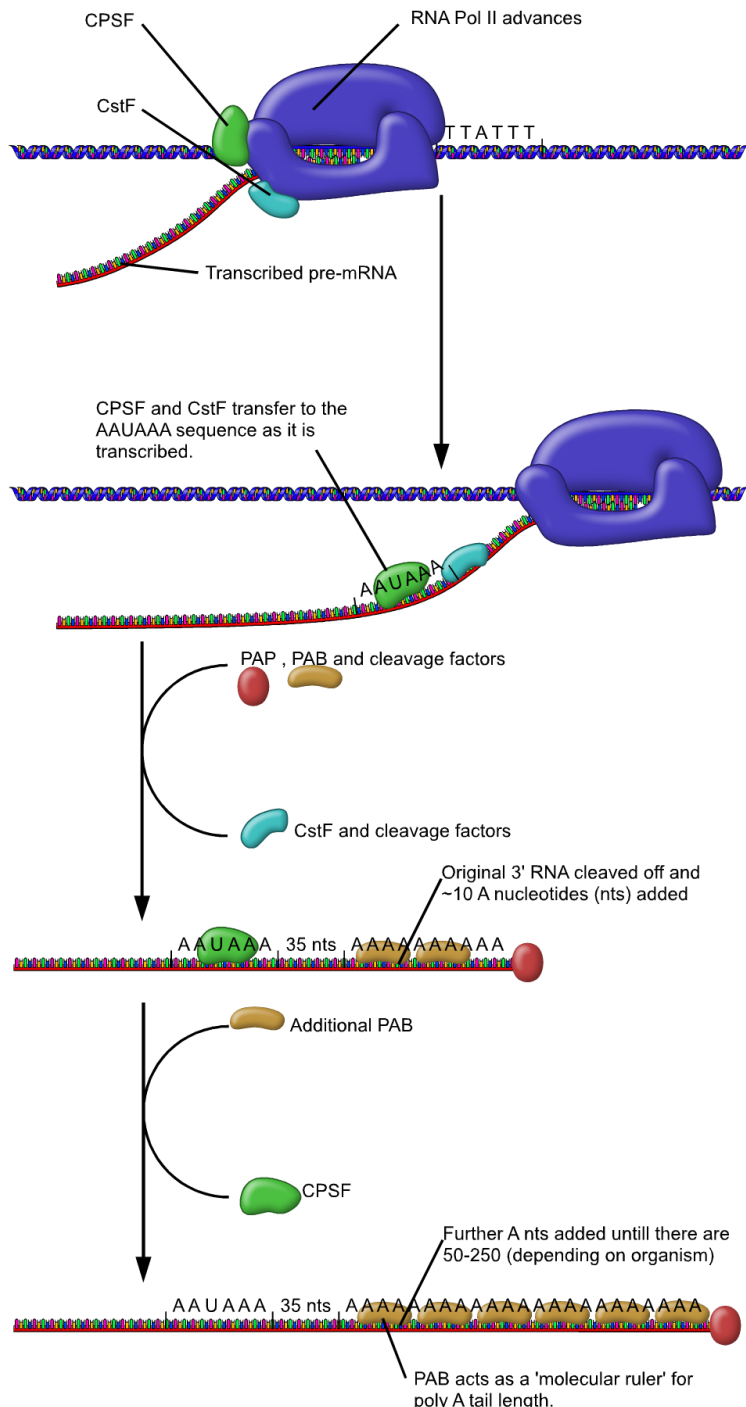
Regulation der Transkription bei Prokaryoten



Modifikation der mRNAs bei Eukaryoten

Am 5'-Ende wird eine Kappe angefügt





3'-Modifikation der mRNAs bei Eukaryoten – Poly-A-Synthese

Für die Poly-Adenylierung gibt es Erkennungssequenzen, -AAUAAA-

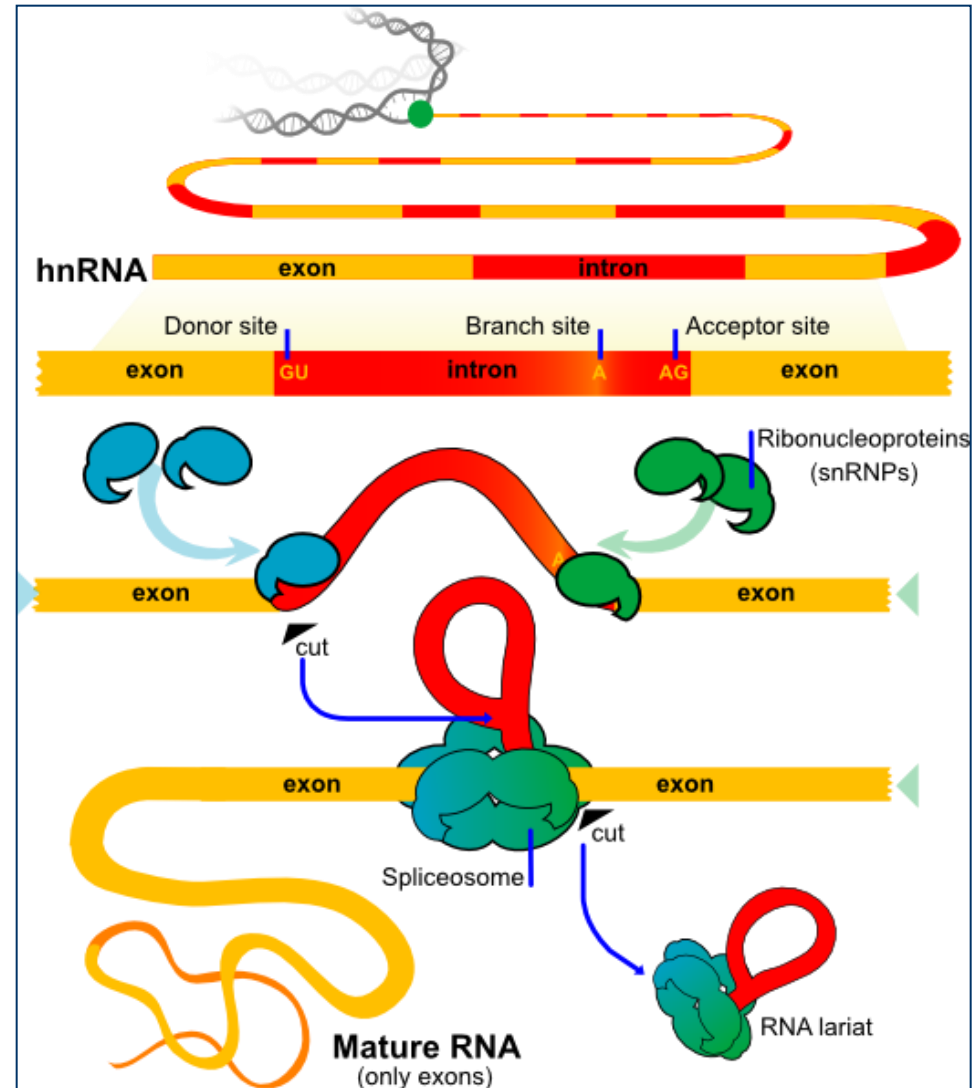
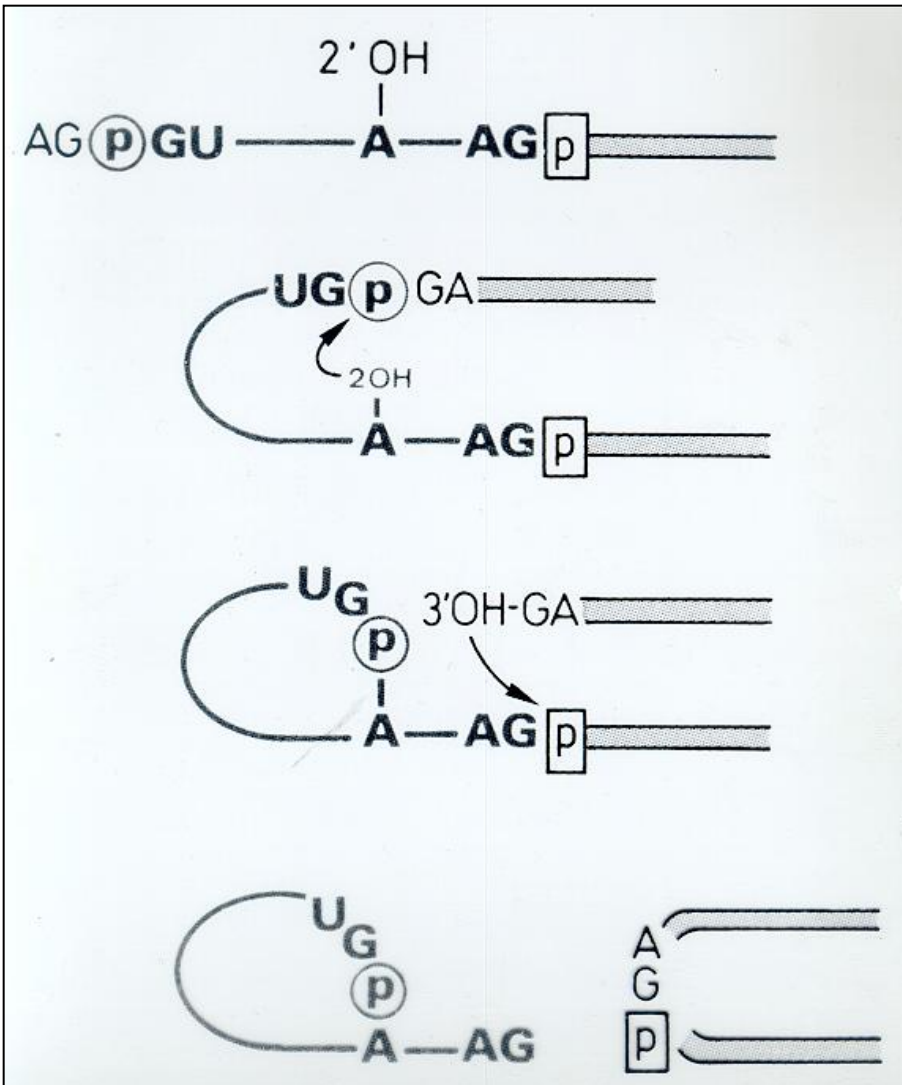
Die Poly-Adenylierung ist ein Mehrschrittprozess:
Erkennen, Schneiden, Matrifreie-RNA-Synthese

Poly-Adenylierung ist nicht universell!
Existiert auch in Prokaryoten (Organellen)!



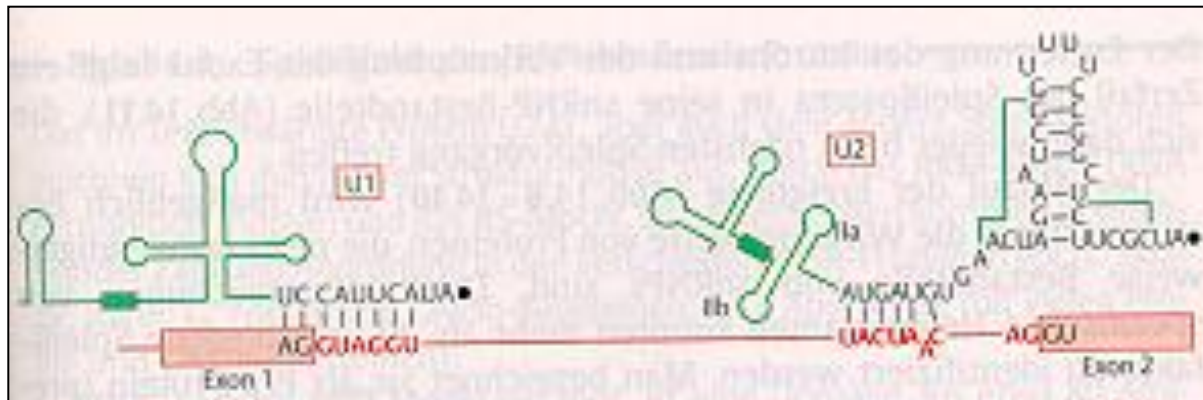
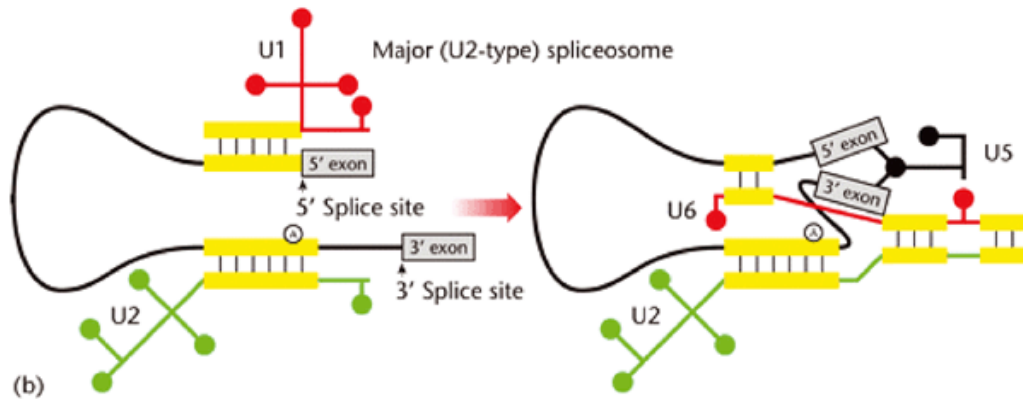
Spleißen – Entfernen von Introns aus mRNAs bei Eukaryoten

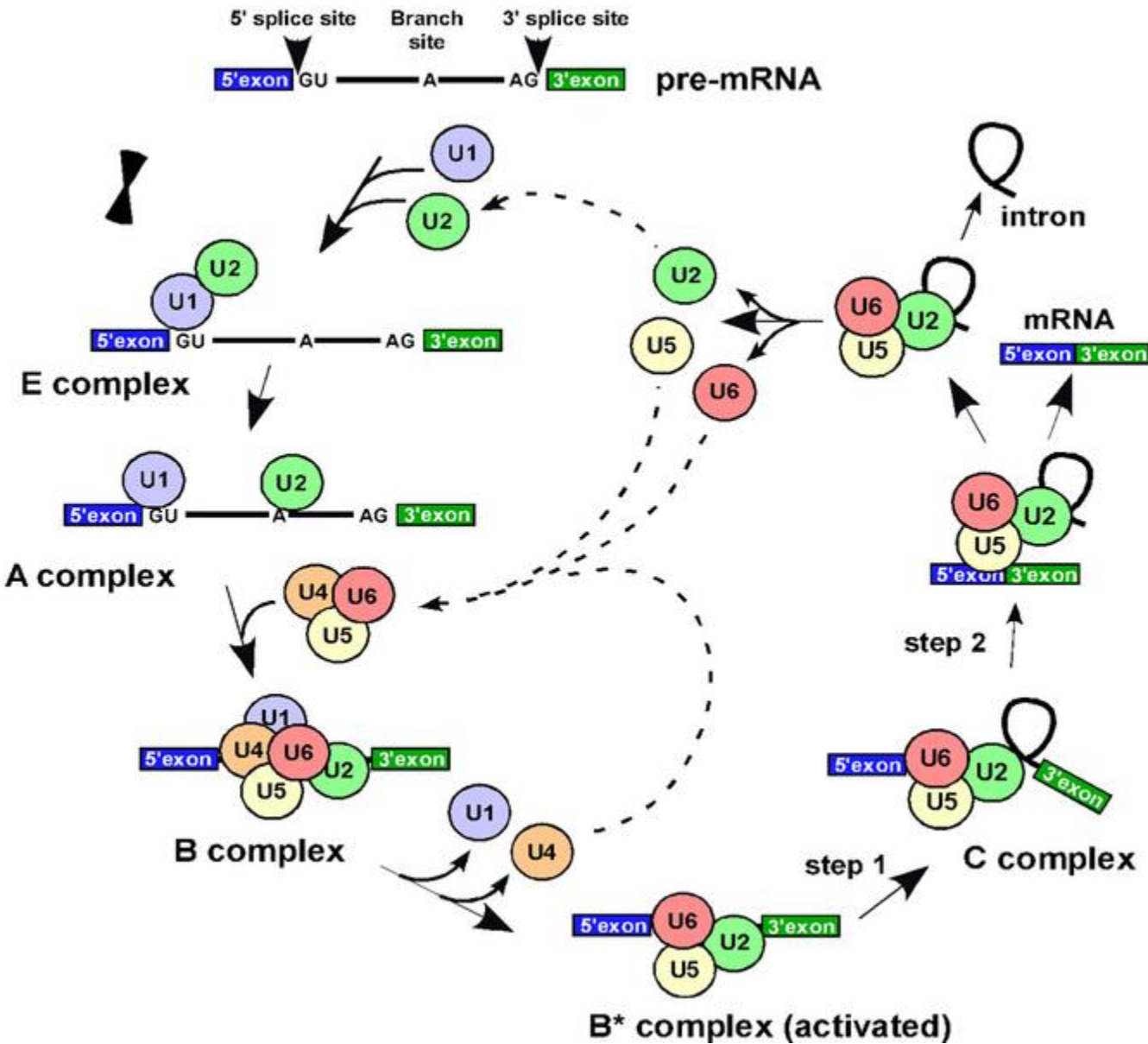
Das Spleißen ist ein 2-Schrittprozess



Spleißen – Entfernen von Introns aus mRNAs bei Eukaryoten

Am Spleißen sind sn-U-RNAs beteiligt, snRNAs mit Bindeproteinen falten sich in eine konservierte Sekundärstruktur, z.B. sn-U1-RNA bindet 5' Intronende, sn-U2-RNA bindet Verzweigungsstelle, sn-U6-RNA bindet U1 und U2 usw.





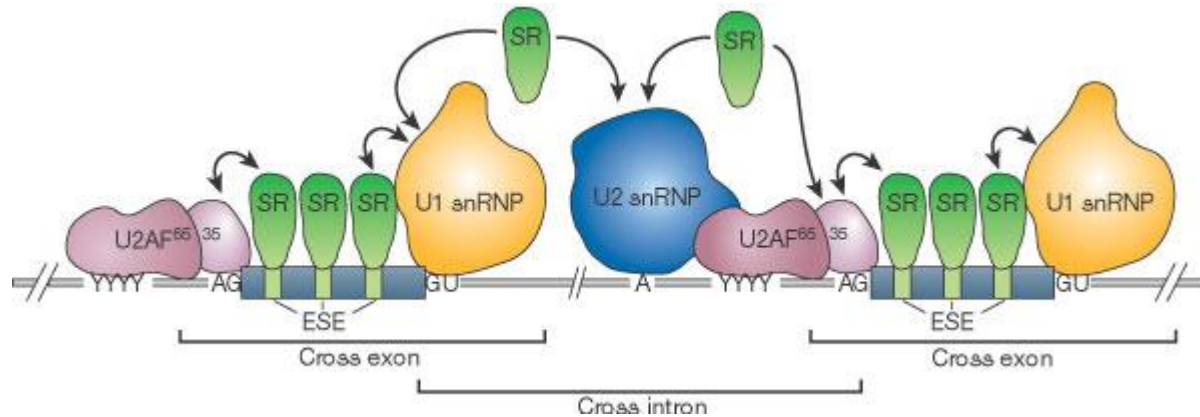
Spleißen –
Entfernen von
Introns aus mRNAs
bei Eukaryoten

Für das Spleißen wird
das „Spliceosom“
schrittweise
zusammengebaut, um
die mRNAs in eine
sterisch-definierte
Position zu biegen.

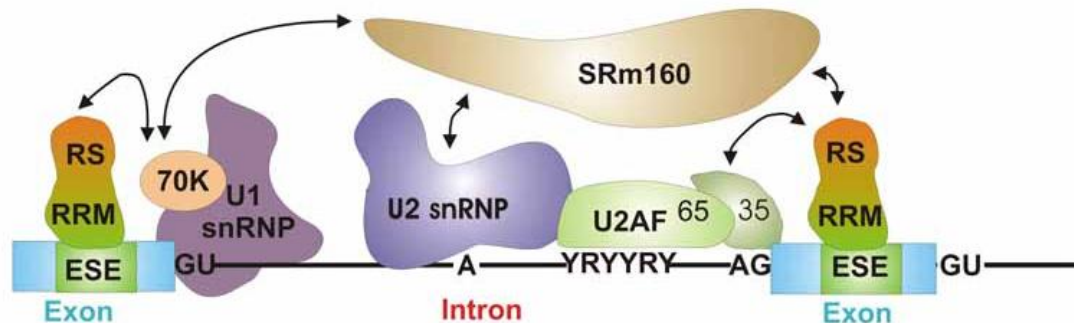


Spleißen – Entfernen von Introns aus mRNAs bei Eukaryoten

Am Spleißen sind weitere Spleißfaktoren (z.B. SR-Proteine) beteiligt, die an so genannte Exon-Spleiß-Enhancer (ESE) binden können.

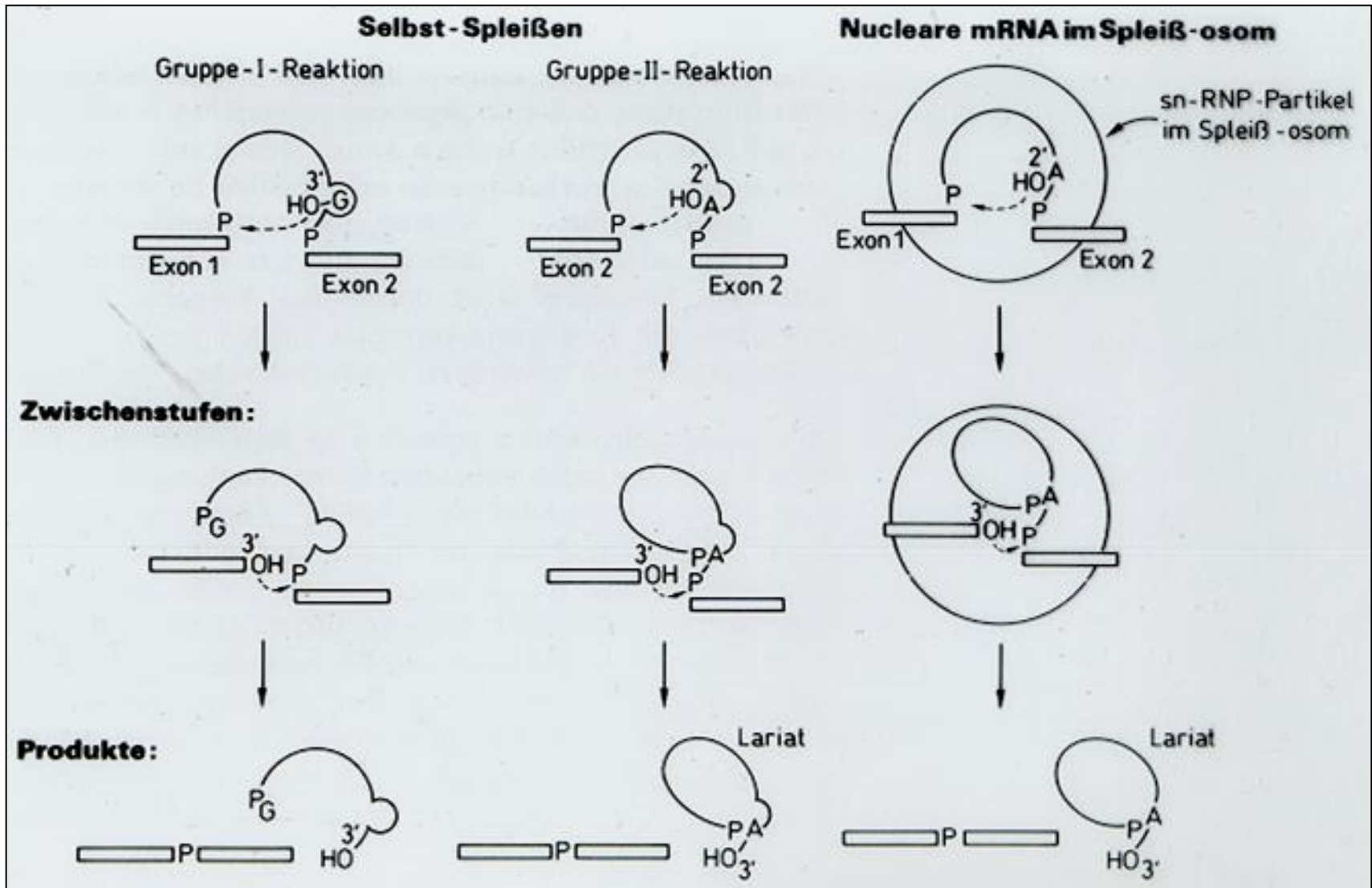


ESE Function Model



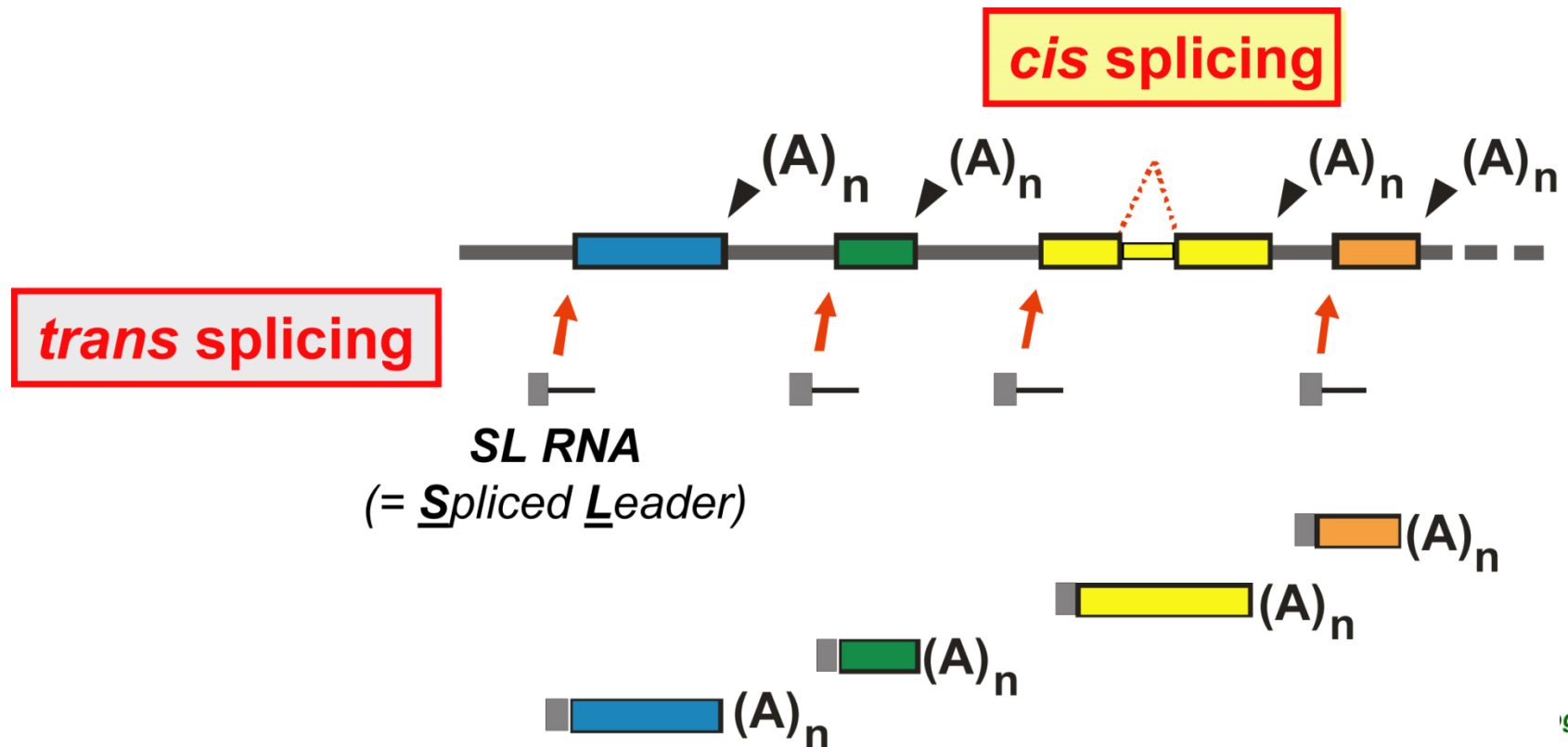
Spleißen

Vergleich von Selbstspleißen und der Reaktion im „Spliceosom“



Trans-Spleißen

Verbinden von RNA Molekülen separater Gene (trans)!
Bei Trypanosomen tragen alle mRNAs gleiche 5'-Enden,
die posttranskriptional angefügt werden.
Bei *Caenorhabditis elegans* werden durch trans-Spleißen
polygene mRNAs prozessiert.



Inteine – Proteine die sich nach Spleißen aktivieren!

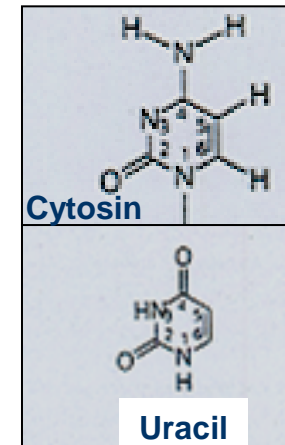
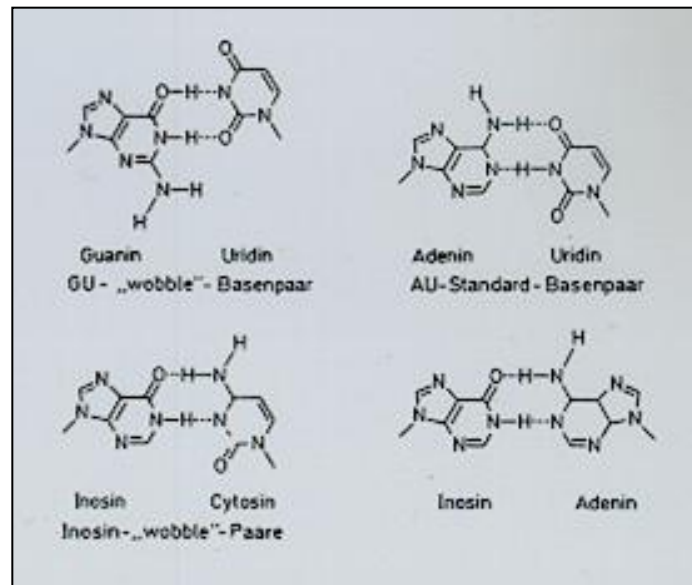
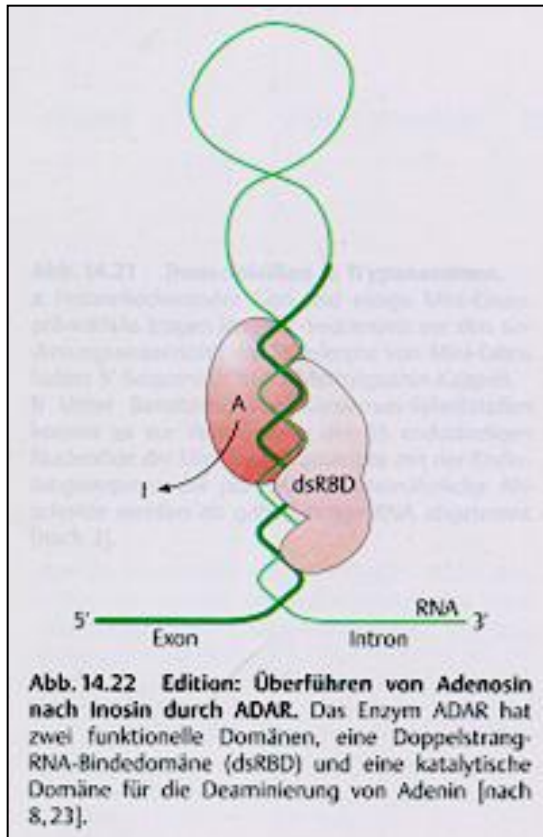
RNA-Editieren

Definition: Beim RNA-Editieren wird die **kodierende** Sequenz der RNA so verändert, dass ein anderes oder ein funktionales Protein entsteht. Dabei sind reife RNA und DNA Sequenz verschieden!!!!!!



RNA-Editieren

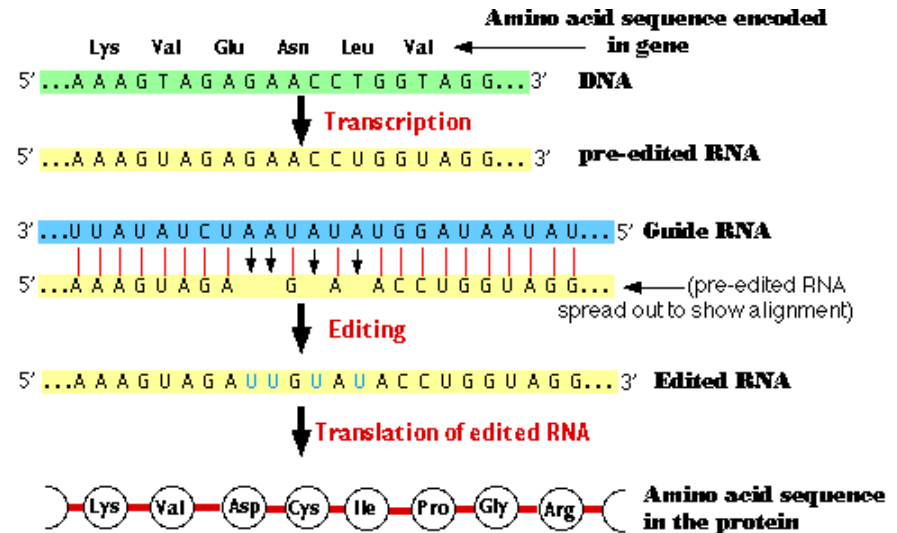
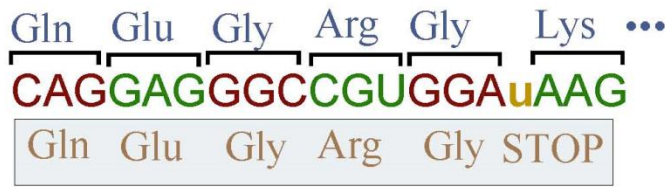
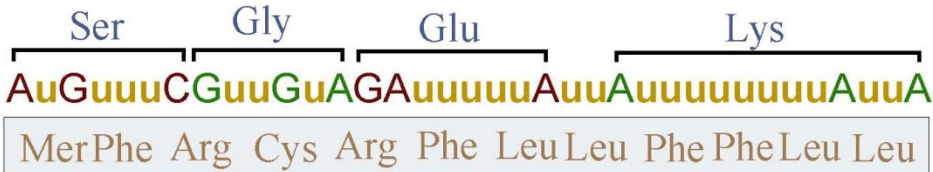
Meist wird U in C umgewandelt bzw. zusätzliche Basen eingefügt, es kann aber auch zur Umwandlung von A in I kommen (z.B. Gen für UE-B des Glutamat-Rezeptors)



RNA-Editieren

In Mitochondrien von Trypanosomen wird vielfach U in mRNAs (z.B. in das Cyt_c-Gen) eingefügt.

Dabei helfen so genannte „guide“ (g) RNAs



Pflanzenmitochondrien – alternativer genetischer Code? – nicht auf mRNA-Ebene!

Arg-Codon CGG = Trp?

Trp-Codon UGG

Serin-Codon UCG = Leu?

Leu-Codon UUG



Regulation der Transkription – bei Prokaryoten

Wichtigste Regulationsebene ist Initiation der Transkription

Stimmt weitgehend bei Bakterien – Transkription direkt mit Translation gekoppelt

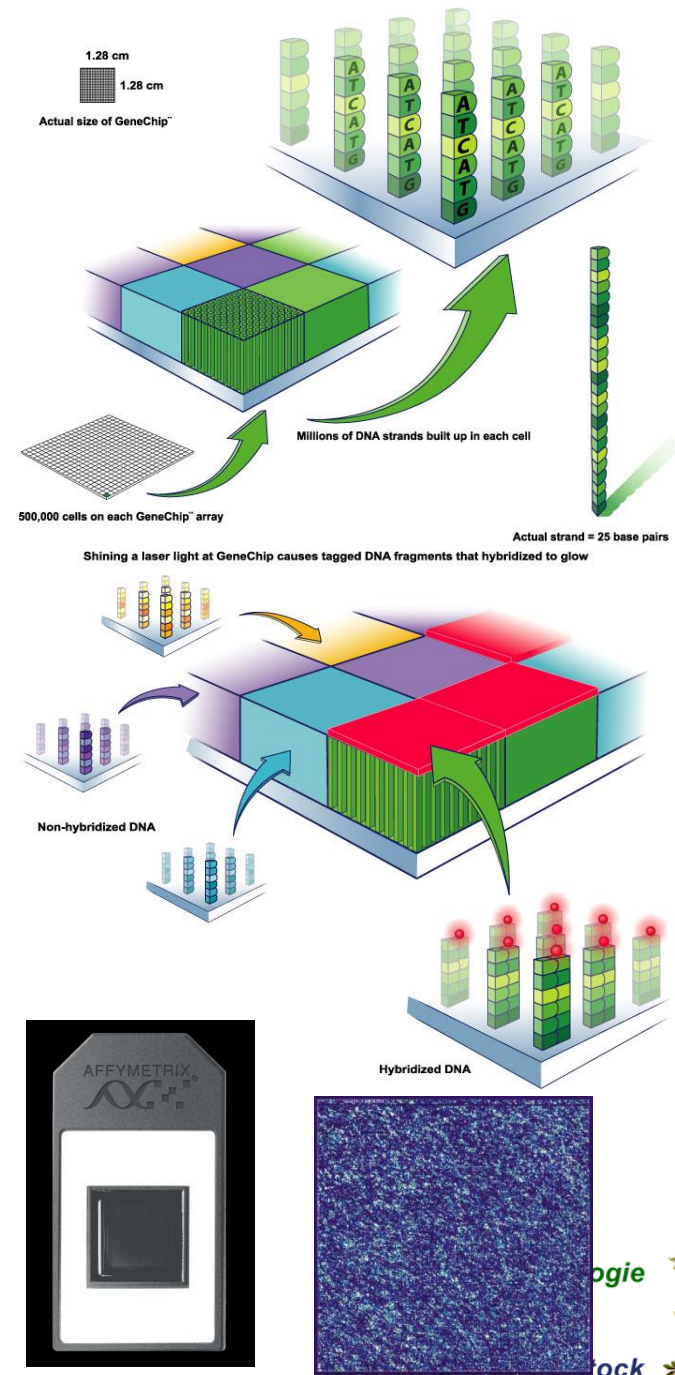
Bei Eukaryoten auch so bisher dargestellt – evtl. fraglich!

Gemessen wird häufig die „Steady State“-Menge der mRNA!!

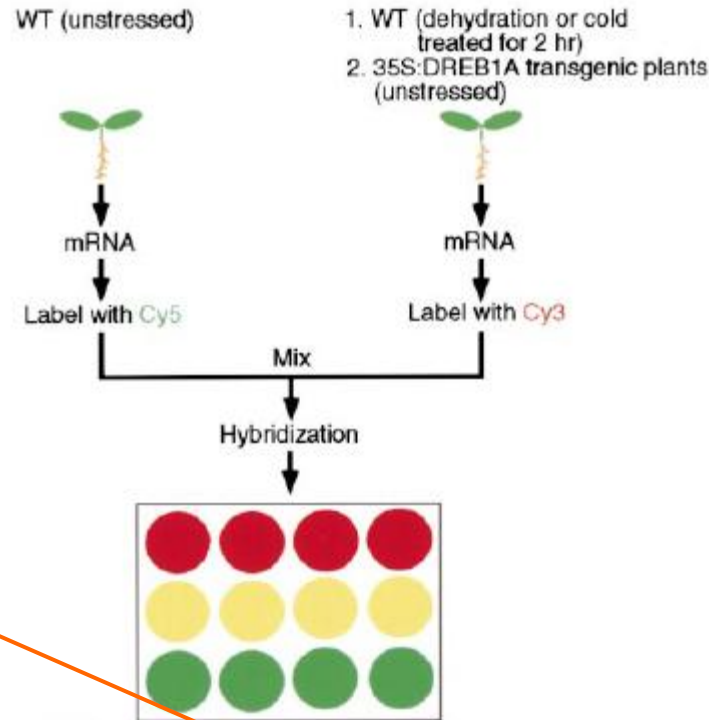


DNA-Microarrays

- Pro Gen existieren mehrere Sonden
- Sonden bestehen aus maximal 25 bp
- Arrays sind extrem spezifisch, selbst Unterschiede von nur einem bp werden erkannt
- Erlauben genomweite quantitative Transkriptuntersuchungen
- Transkripte werden in cDNA umgeschrieben, fragmentiert, markiert, und danach hybridisiert
- Nach Hybridisierung erfolgt Scanning und Auswertung



Differentielle RNA-Markierung und Auswertung von DNA-Microarrays



Doppelspotting zur Absicherung

keine Expression

Tubulin als interne Kontrolle

Auslöschung des Signals durch gleich starke Expression in beiden Zuständen

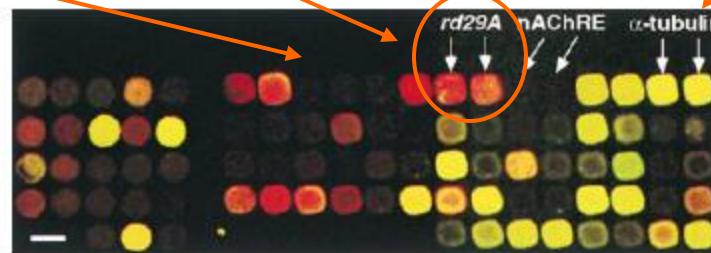


Figure 1. cDNA Microarray Analysis of Gene Expression under Cold Stress.

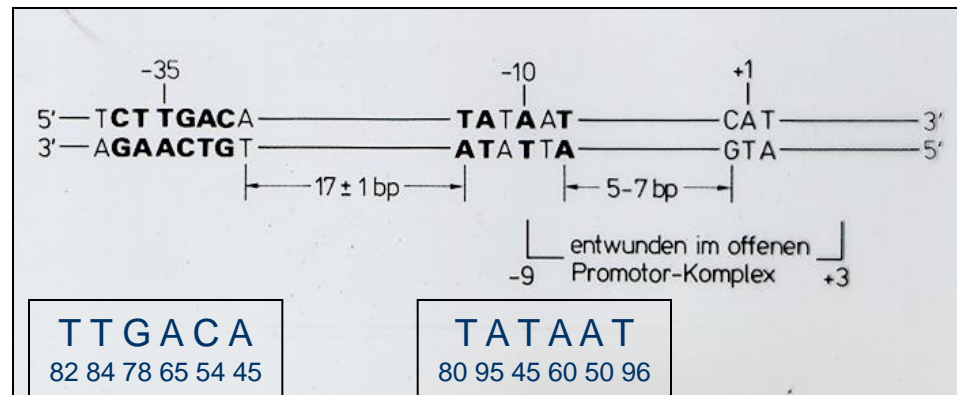


Regulation der Transkription bei Prokaryoten

Wichtigste Regulationsstelle der Genexpression!?

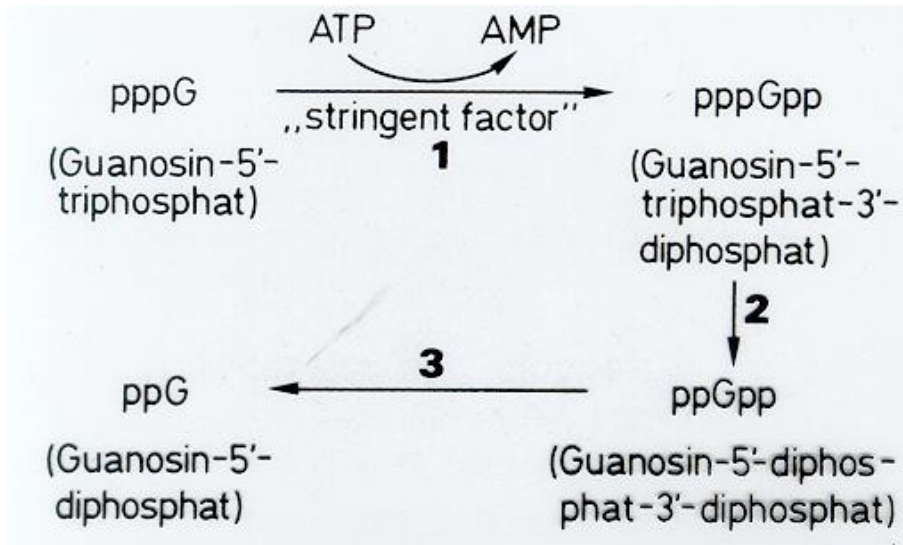
1. Promotorsequenz – starke Promotoren ähneln der consensus-Sequenz

Ergebnis einer langen Adaptation (Kurzzeit – Akklimation)
Biotechnologie



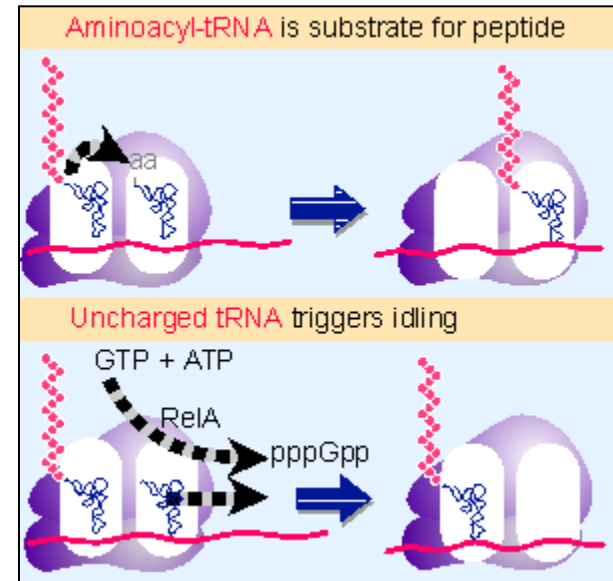
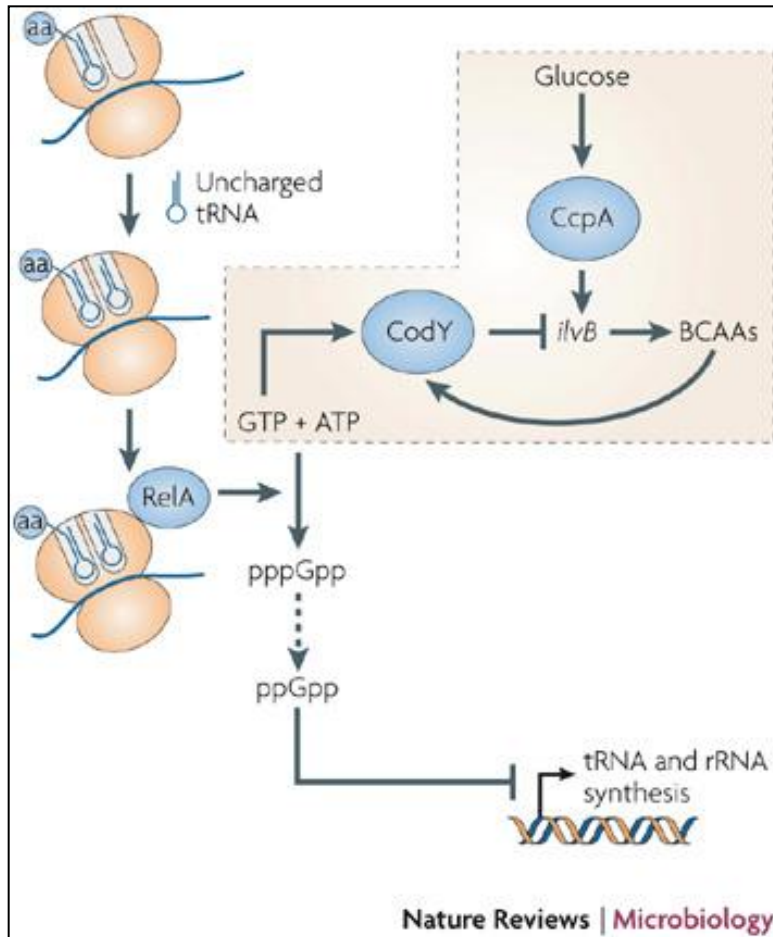
Regulation der Transkription bei Prokaryoten

2. „stringent – response“, generelle Beeinflussung der Transkriptionsrate niedermolekularer Faktor beeinflusst RNAP Generelle Reaktion auf Nahrungs-(AS)-Mangel



Regulation der Transkription bei Prokaryoten

2. „stringent – response“, generelle Beeinflussung der Transkriptionsrate niedermolekularer Faktor beeinflusst RNAP Unbeladene tRNAs am Ribosom dienen als Sensor



Neben dem Translationsstopp wird die RNA-Polymerase gehemmt und damit global die Transkription abgebrochen.



Regulation der Transkription bei Prokaryoten

3. Alternative Sigmafaktoren

Sigmafaktor-spezifische Promotorsequenzen charakterisieren Regulons

Tabelle 11.1: *E. coli*-Sigma-Faktoren erkennen Promotoren mit verschiedenen Consensussequenzen

Gen	Masse	Verwendung	-35-Sequenz	Entfernung	-10-Sequenz
<i>rpoD</i>	70 kD	alle Gene	TTGACA	16–18 bp	TATAAT
<i>rpoH</i>	32 kD	Hitzeschockgene	CCCTTGAA	13–15 bp	CCCGATNT
<i>rpoE</i>	24 kD	Hitzeschockgene	unbekannt	unbekannt	unbekannt
<i>rpoN</i>	54 kD	Stickstoffmangelgene	CTGGNA	6 bp	TTGCA
<i>fliA</i>	28 kD	Geißelgene	CTAAA	15 bp	GCCGATAA



Regulation der Transkription bei Prokaryoten

3. Alternative Sigmafaktoren

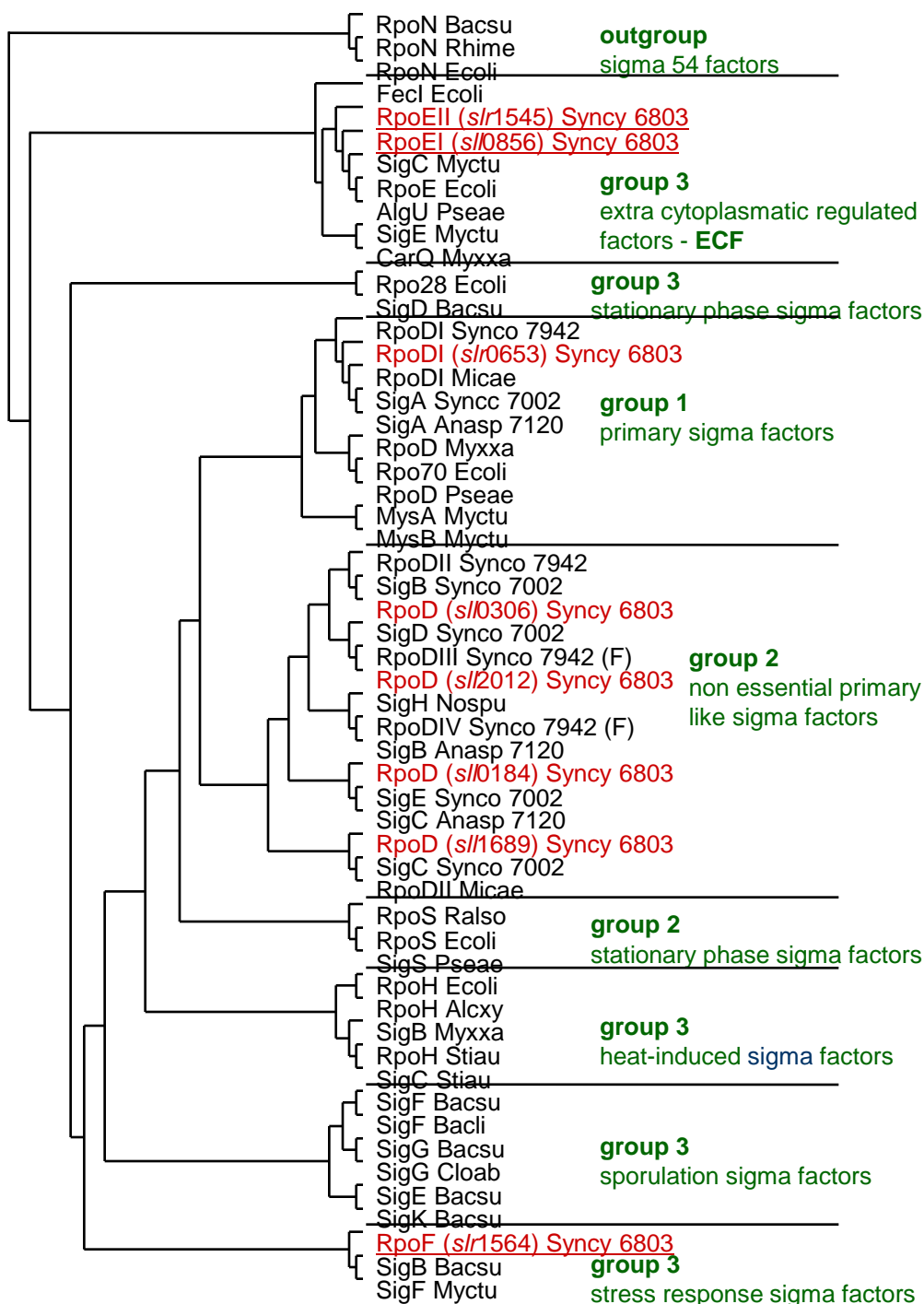
lassen sich in Gruppen einteilen:

Sig70 versus Sig54

Sig70 Group 1

Sig70 Group 2

Sig70 Group 3 (ECF)

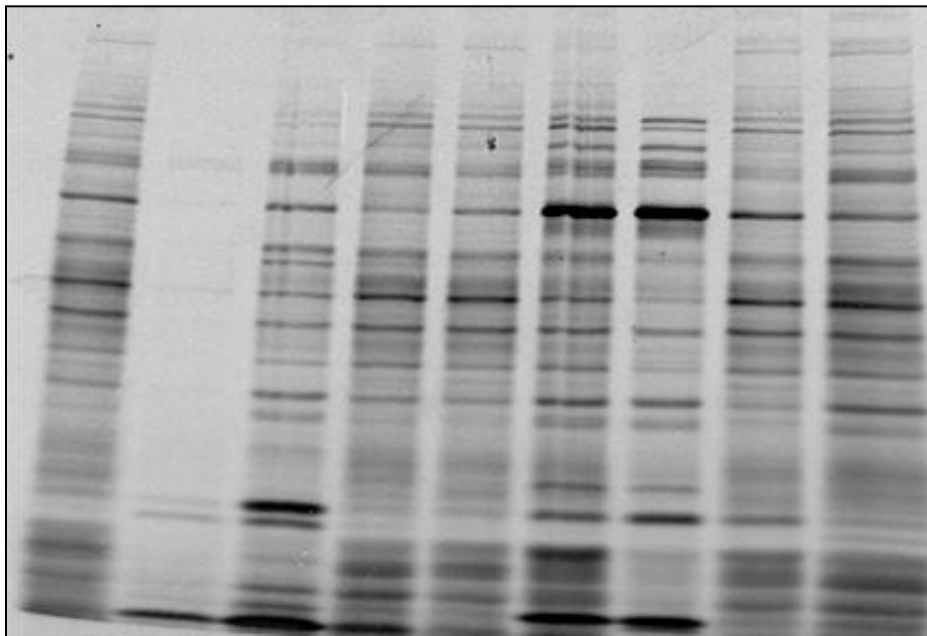


Regulation der Transkription bei Prokaryoten

3. Alternative Sigmafaktoren

z.B. Regulation der Hitzeschockantwort bei *E. coli*

Stressproteinsynthese in *Synechocystis*



30°C
Kontrolle

43°C 45°C
Hitzeschock

Tab. 5.4 Einige Hitzeschock-Gene und Hitzeschock-Proteine von *E. coli*

Gen	Protein	Funktion
<i>dnaK</i>	DnaK (Hsp 70)	diese 3 Proteine bilden zusammen eine funktionelle Einheit, die als Chaperon die native Faltung von Polypeptiden fördert
<i>dnaJ</i>	DnaJ	
<i>grpE</i>	GrpE	
<i>groEL</i>	GroEL	auch diese Proteine bilden ein Chaperon, das die native Proteinfaltung fördert
<i>groES</i>	GroES (Hsp 10)	
<i>hspG</i>	ähnlich dem eukaryotischen Protein Hsp90	
<i>lon</i>	ATP-abhängige Protease	
<i>lysU</i>	Lysyl-tRNA-Synthetase, Form II	
<i>rpoD</i>	Sigma-70-Faktor	

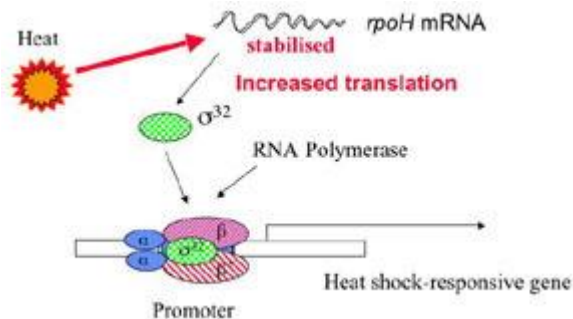


Regulation der Transkription bei Prokaryoten

3. Alternative Sigmafaktoren

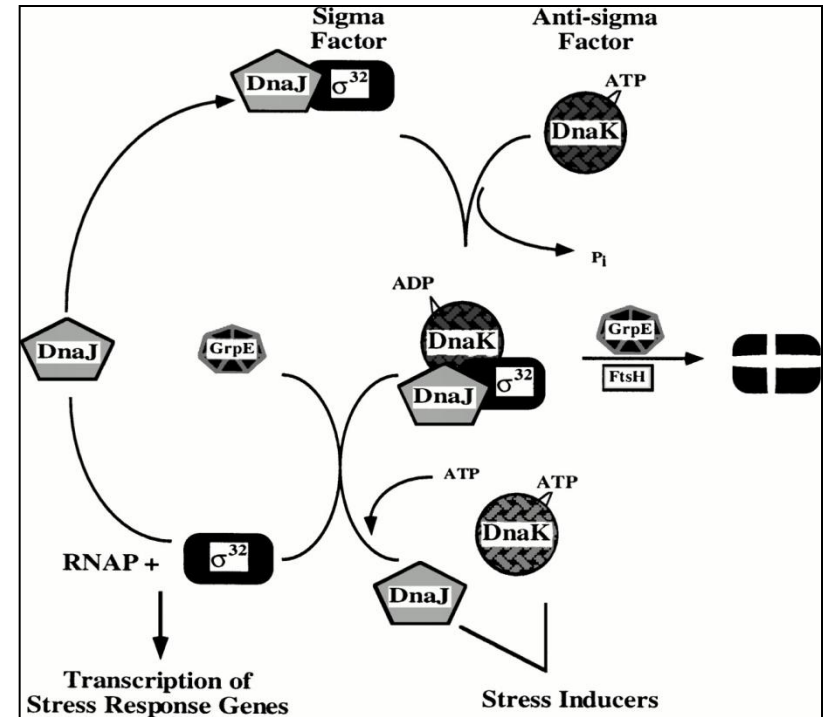
z.B. Modell zur Regulation der Hitzeschockantwort bei *E. coli*
Hitzeschockgene haben mehrere Promotoren

Hitzeschock stabilisiert mRNA
Mehr Sig32 (*rpoH*) konkurriert mit Sig70



Titrationmodell

Hitzeschock setzt Sig32 vom Chaperon DnaJ
DnaJ Expression hemmt Sig32 erneut

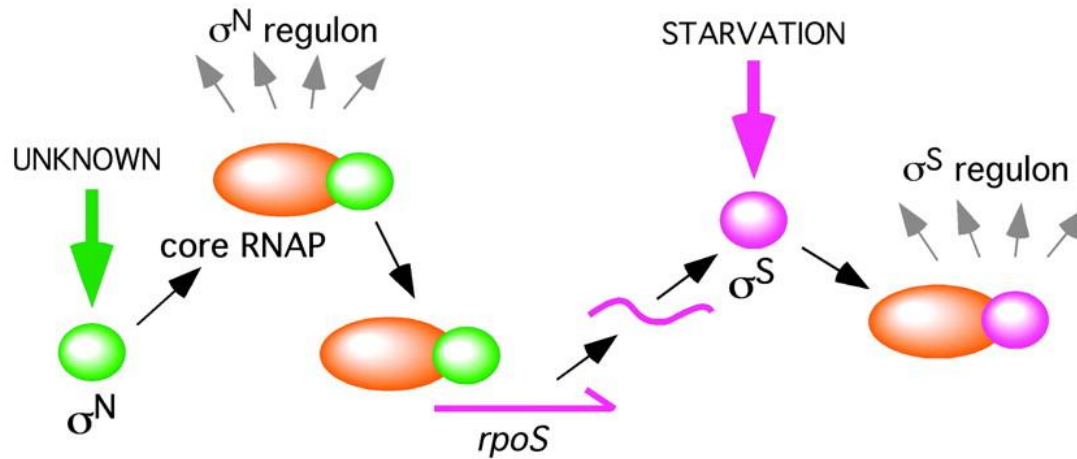


Regulation der Transkription bei Prokaryoten

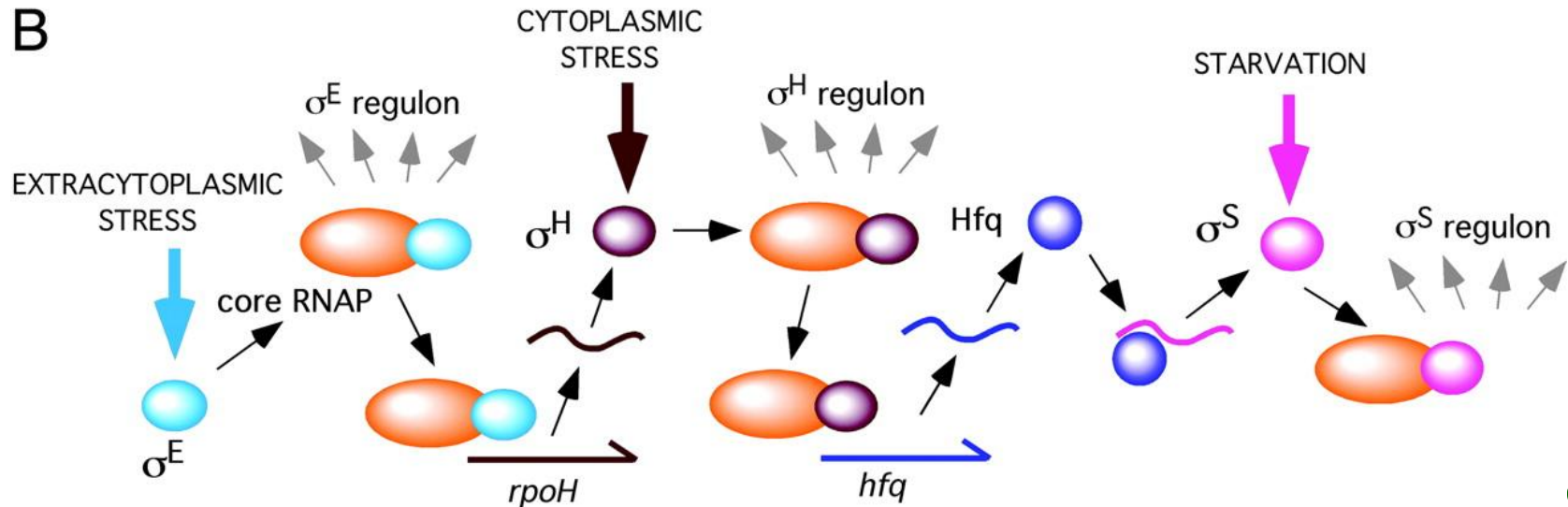
A – Sigmafaktorkaskade nach N-Mangel

B – Sigmafaktorkaskade nach Lösungsmittelstress

A



B



Regulation der Transkription bei Prokaryoten

! In vielen Bakterien wird die Hitzeschockantwort anders als bei *E. coli* durch ein Repressorprotein reguliert !

