

Einführung in die Molekularbiologie

Prof. Dr. Martin Hagemann

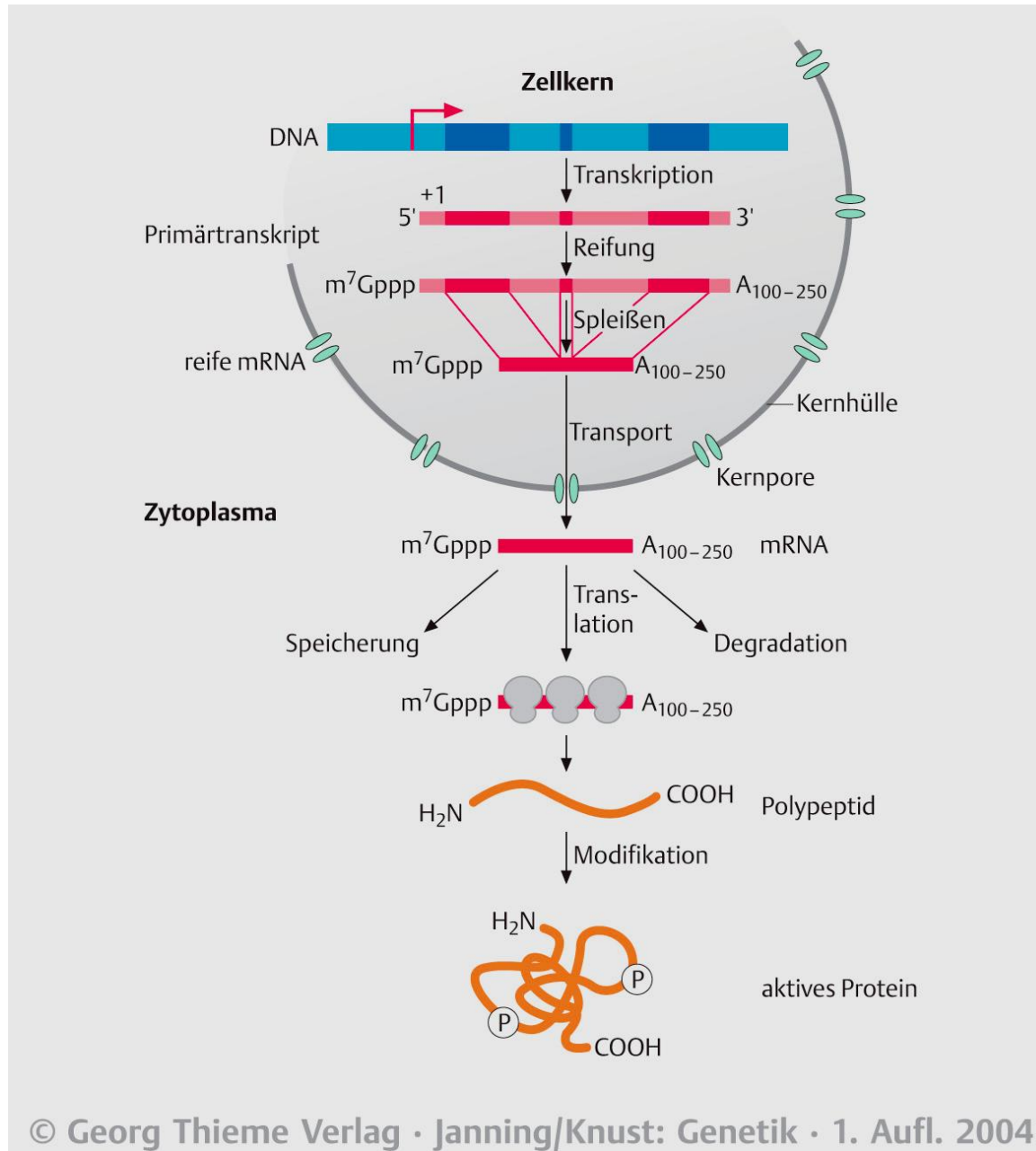
Vorlesung 7

Regulation der Transkription bei Eukaryoten

Regulatorproteine für Einzelgene
Rolle der DNA-Struktur
DNA-Remodelling
Epigenetik

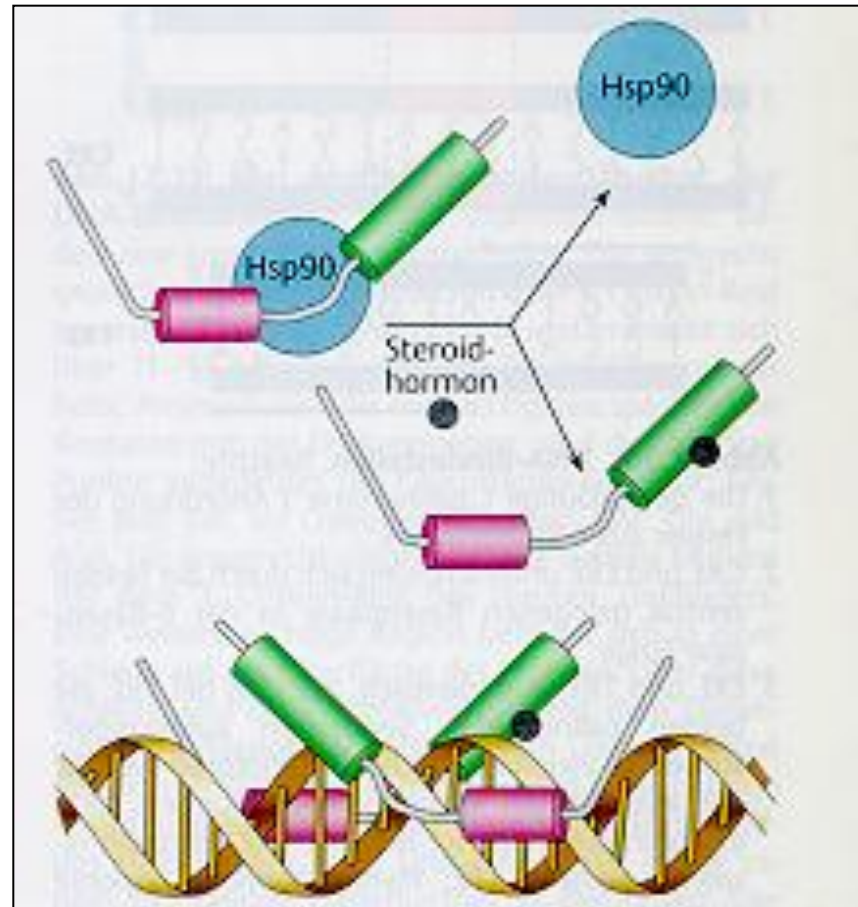


Ebenen der Genregulation bei Eukaryoten



Regulation der Transkription bei Eukaryoten Protein-codierende Gene mit RNAPII

Regulatorproteine - z.B. Steroid-Hormon-Rezeptoren

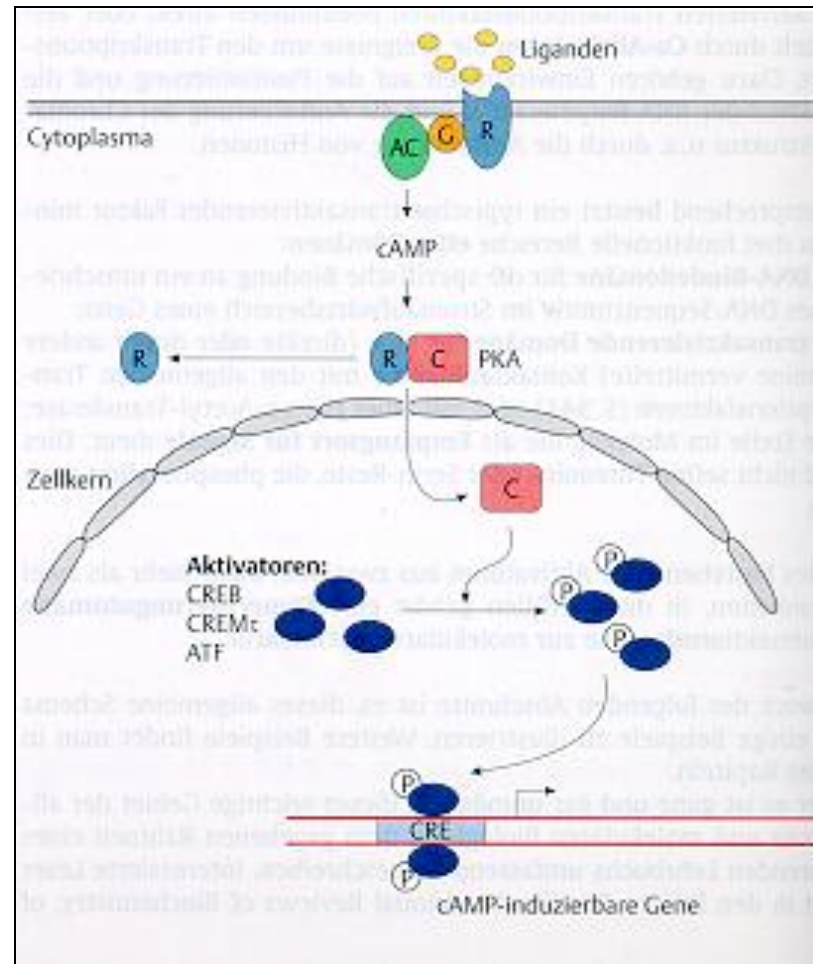


Regulation der Transkription bei Eukaryoten

Protein-kodierende Gene mit RNAPII

cAMP-abhängige Promotoren:
Bindestelle: 5'-TGACGTCA-3'

CRE: cAMP-response element
CREB: CRE-Bindeprotein



Regulation der Transkription bei Eukaryoten

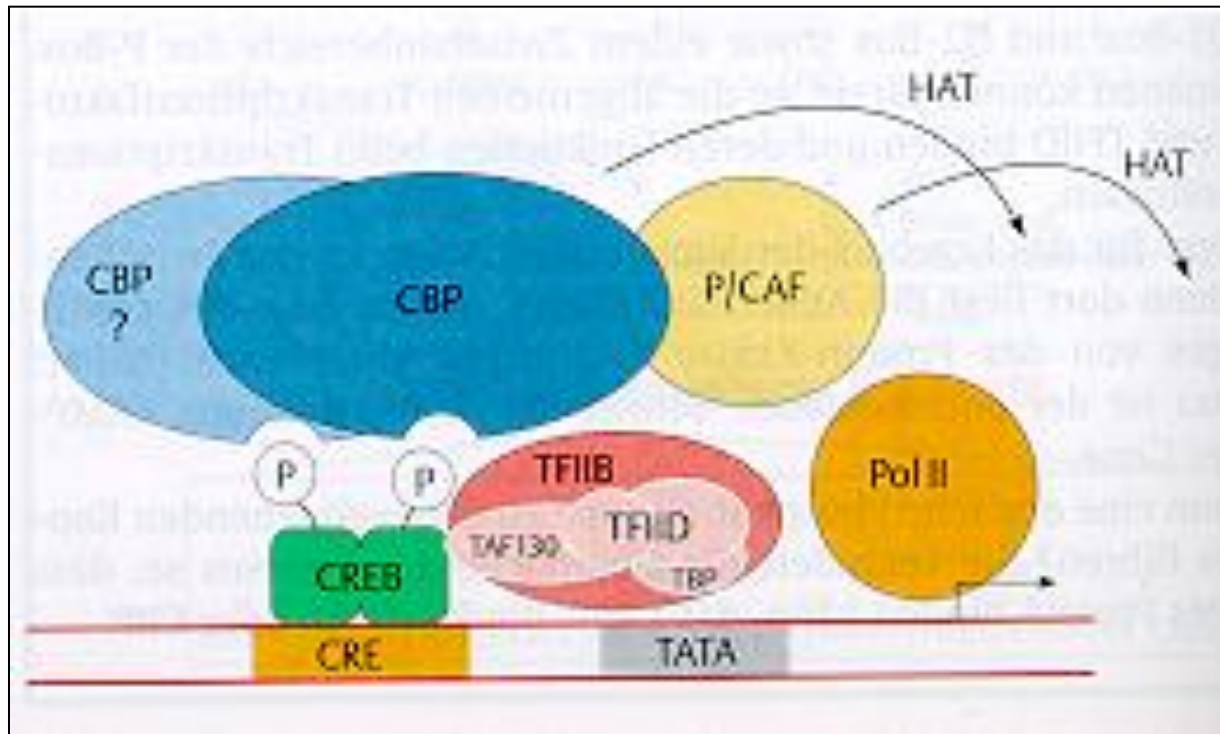
Protein-kodierende Gene mit RNAPII

Modell für die Genaktivierung durch den CREB/CBP Komplex

HAT – Histon-Acetyltransferase-Aktivität, Chromatinlockerung

P/CAF – P300/CREB-assoziiierter Faktor

Spezifität wird durch versch. Dimere und Phosphorylierungssites erreicht

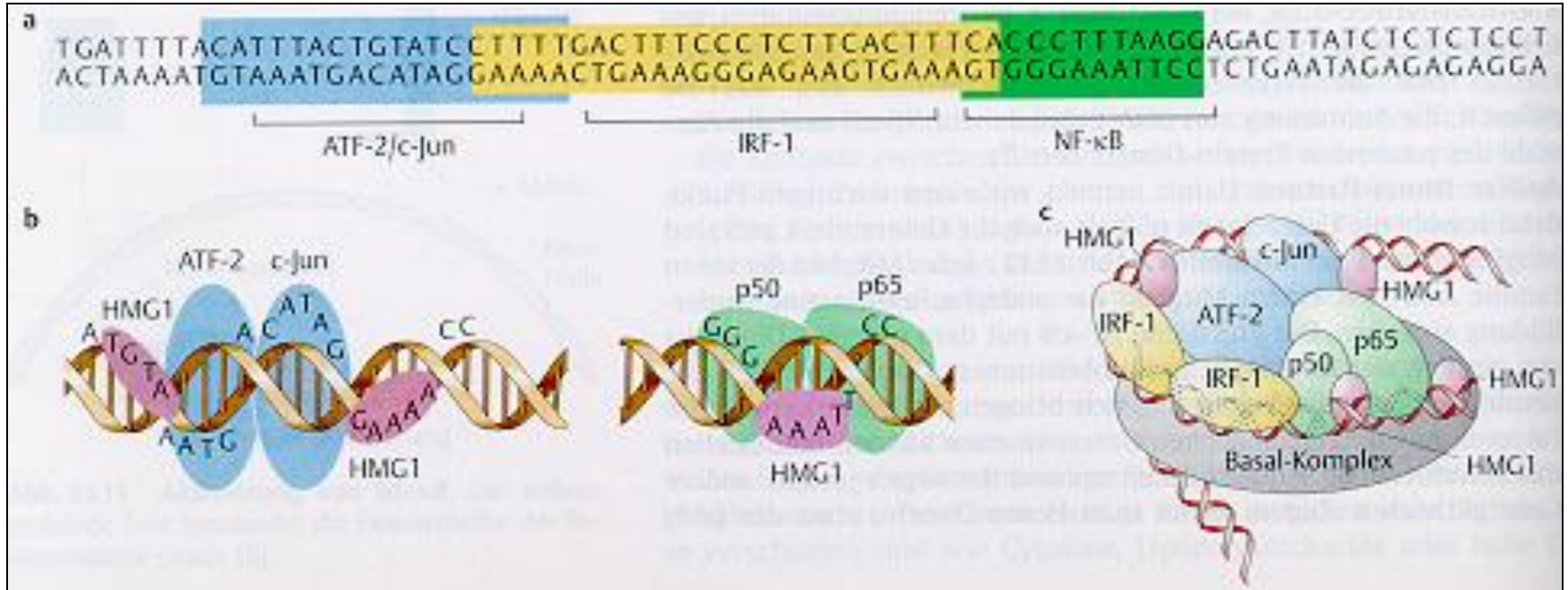


Regulation der Transkription bei Eukaryoten

Protein-kodierende Gene mit RNAPII

NF- κ B wirkt mit anderen Transkriptionsfaktoren zusammen
z.B. am Interferon- β -Gen

Zusätzlich werden Co-Aktivatorproteine rekrutiert

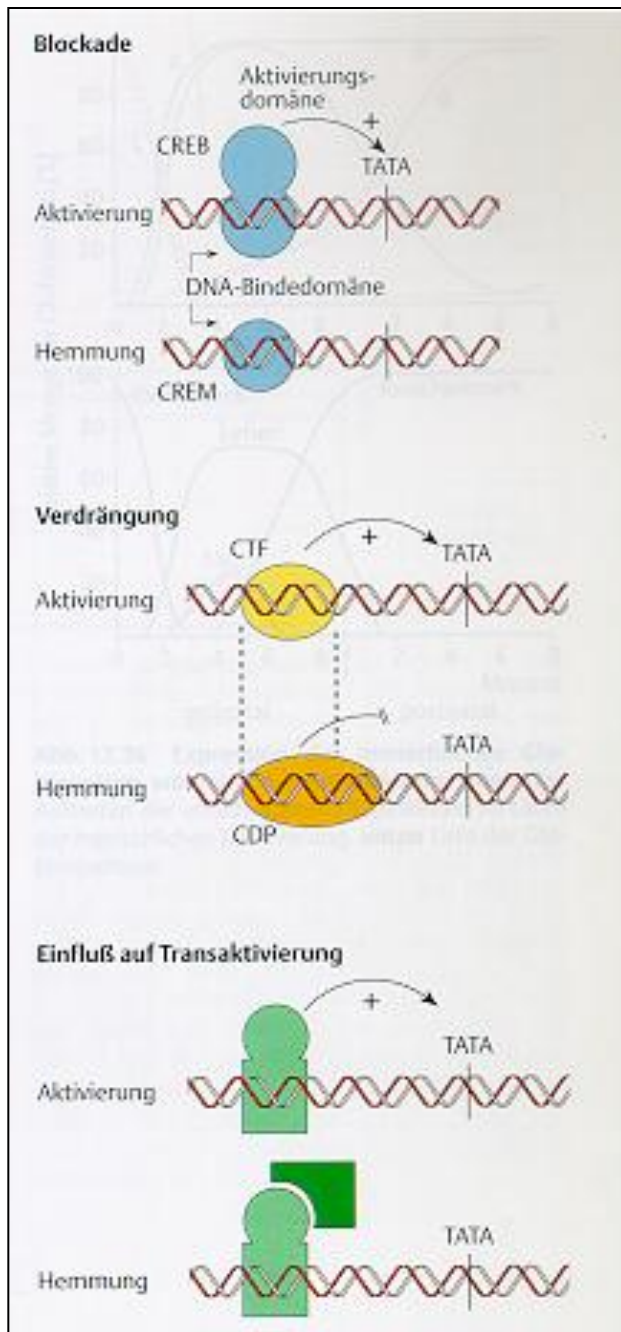


Regulation der Transkription bei Eukaryoten

Möglichkeiten für Hemmung der Transkription

Dephosphorylierung
Abbau

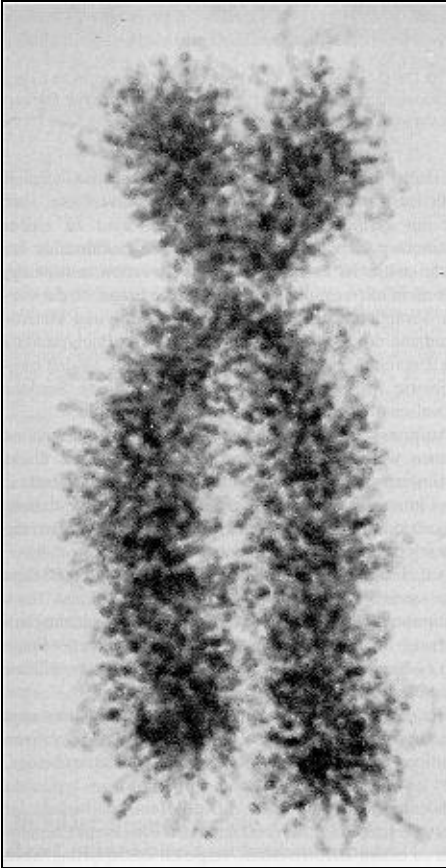
v.a. Chromatinbeeinflussung



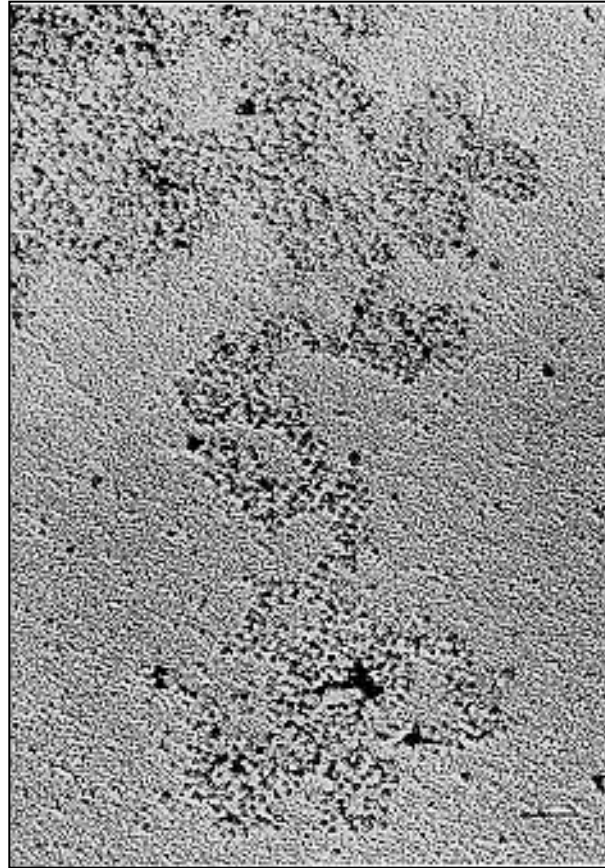
Regulation der Transkription bei Eukaryoten

Rolle der DNA-Struktur

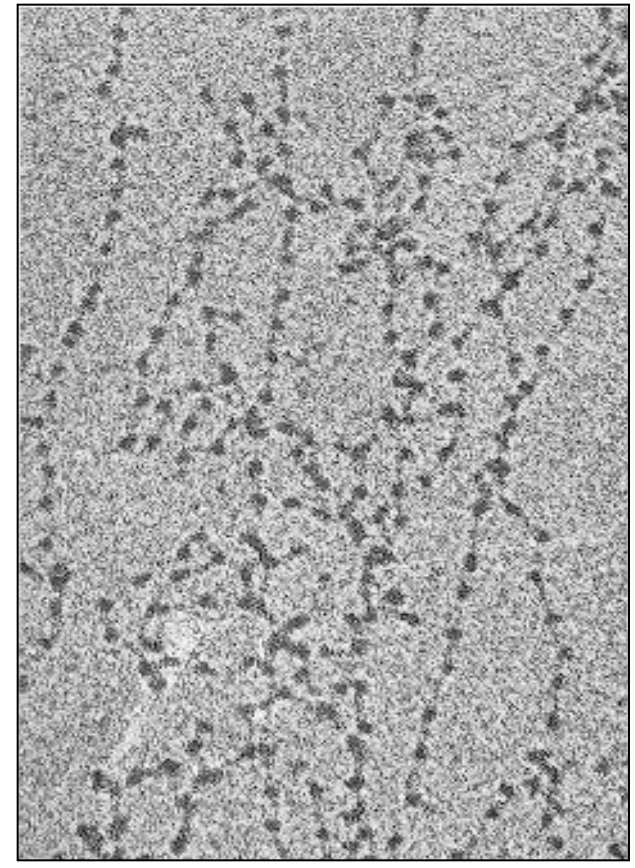
Chromosom



Freigesetzte 30 nm Faser



Nucleosomenstruktur





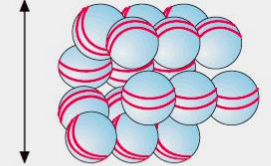
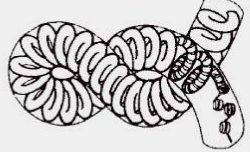
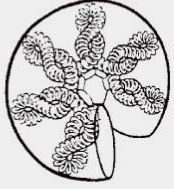
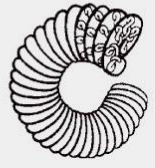
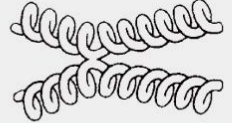
30 nm Faser in S-Phase

Ca. 150 kb Chromatinschleifen binden an Kernskelett



Regulation der Transkription bei Eukaryoten

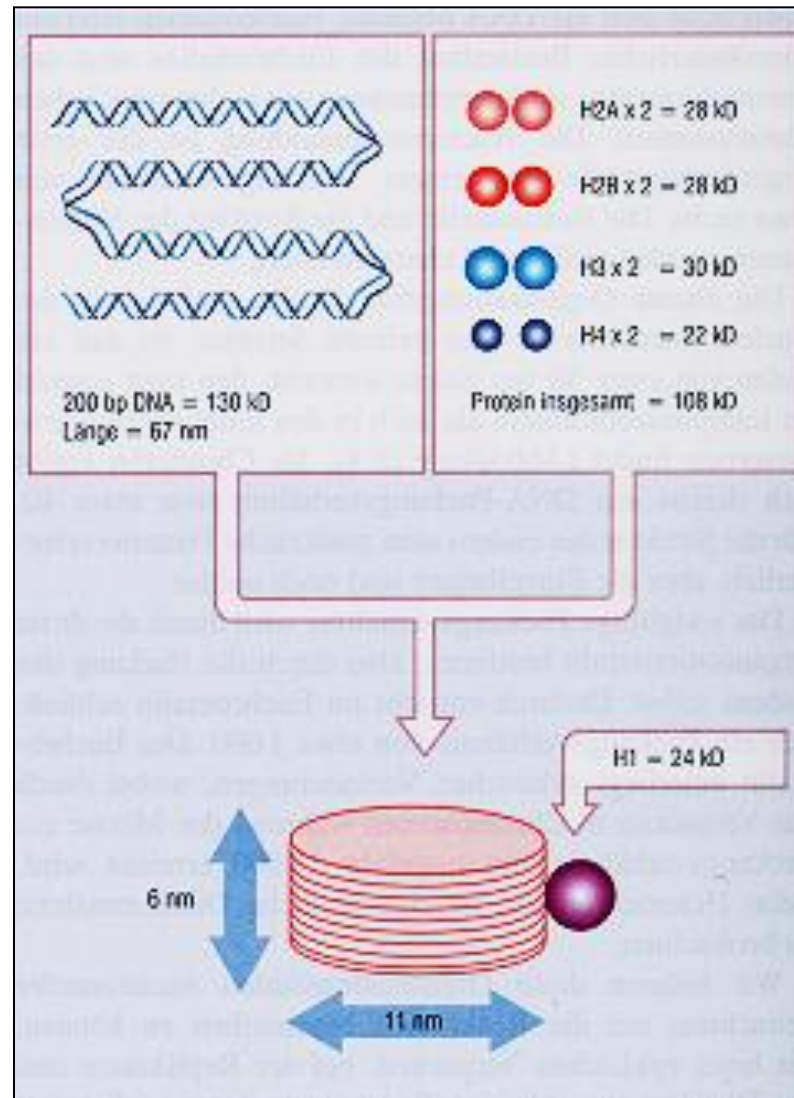
Rolle der DNA-Struktur

Bezeichnung Packungsgrad	Struktur
DNA 1	2 nm 
Nukleosomenfilament 6-7	10 nm 
30 nm Fibrille (Solenoid) ± 40	30 nm 
Chromatinschleife	
300 nm Fibrille	300 nm 
Chromatide ± 10000	700 nm 
Chromosom ± 10000	



Regulation der Transkription bei Eukaryoten

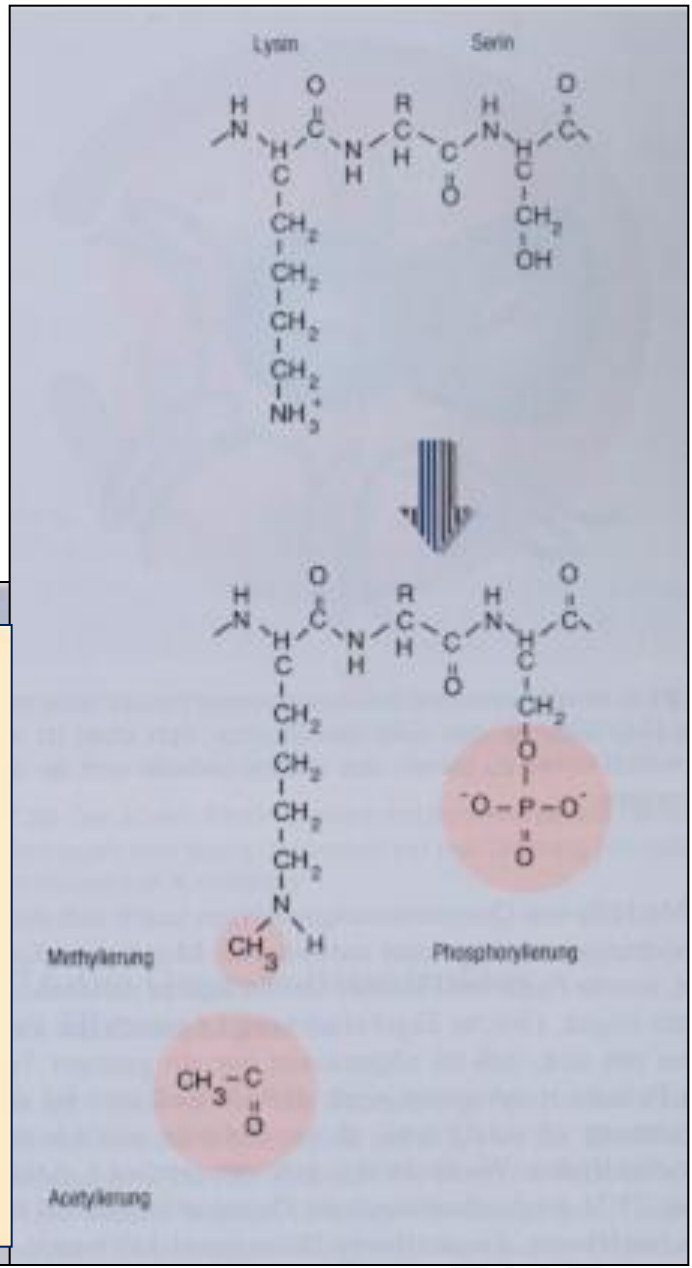
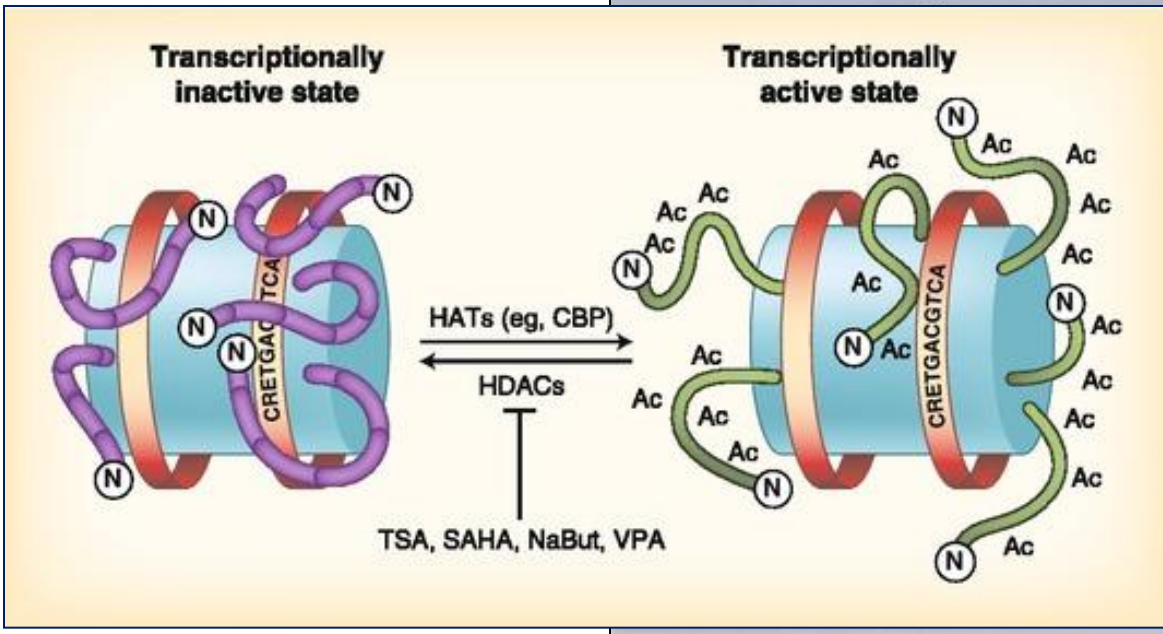
Rolle der DNA-Struktur Rolle der Histone



Regulation der Transkription bei Eukaryoten

Rolle der DNA-Struktur

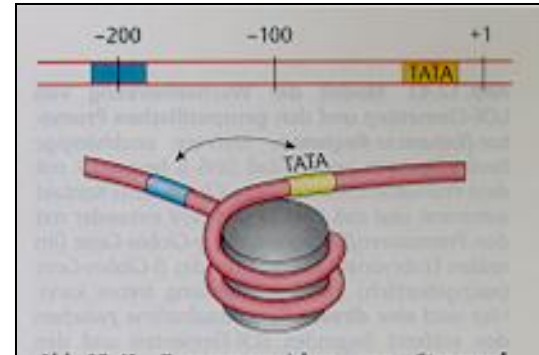
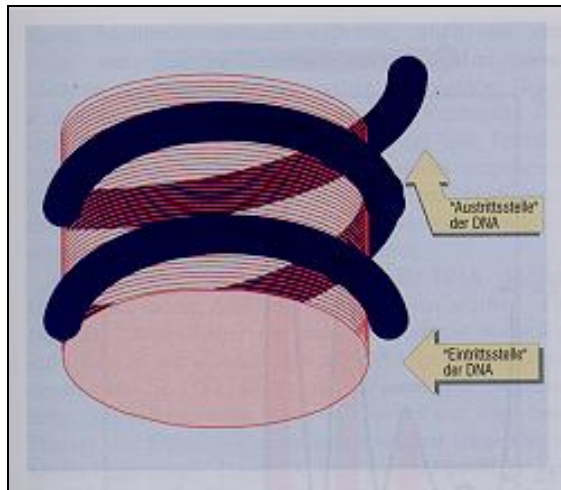
Histone haben flexible N-terminale Domänen, die modifiziert sein können



Regulation der Transkription bei Eukaryoten

Histone wickeln ca. 200 bp der DNA auf.

Histon-assoziierte DNA ist vermutlich für TF nicht zugänglich (Repression)
kann aber auch DNA-Boxen entsprechend positionieren (Aktivierung).

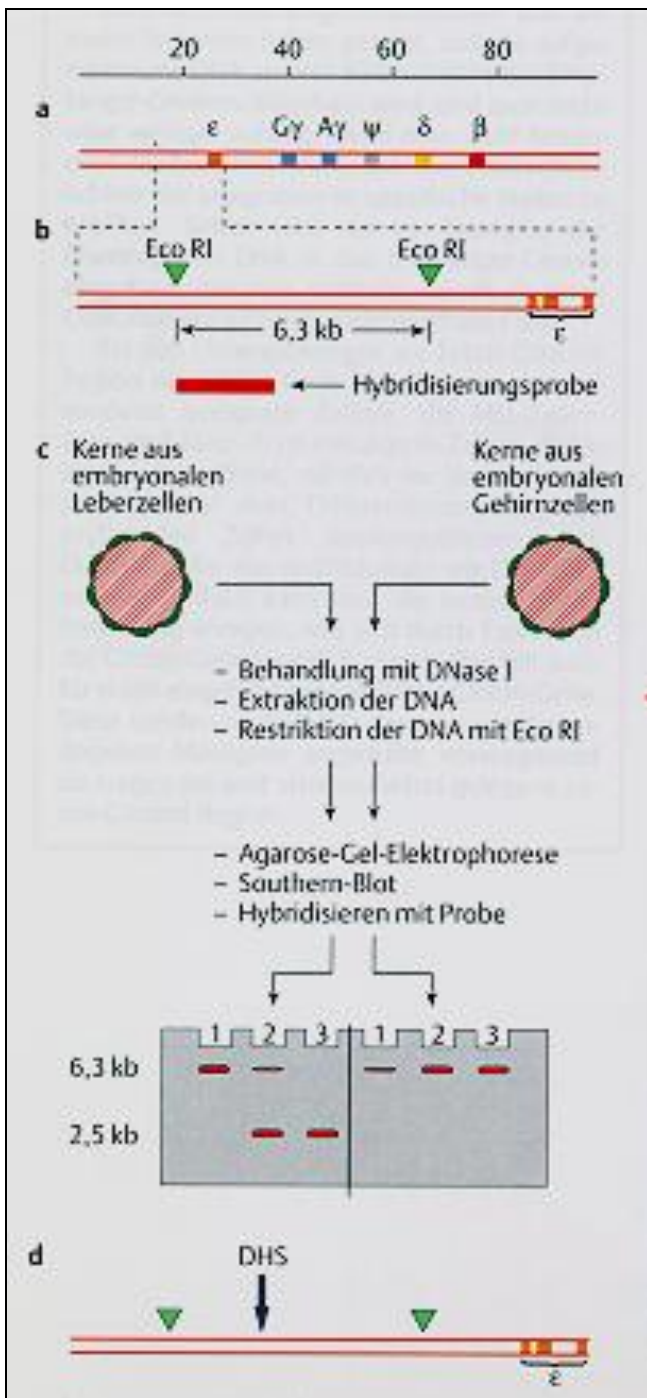


Regulation der Transkription bei Eukaryoten

Modifikation der DNA-Struktur führt zu DNase1-hypersensitiven Bereichen

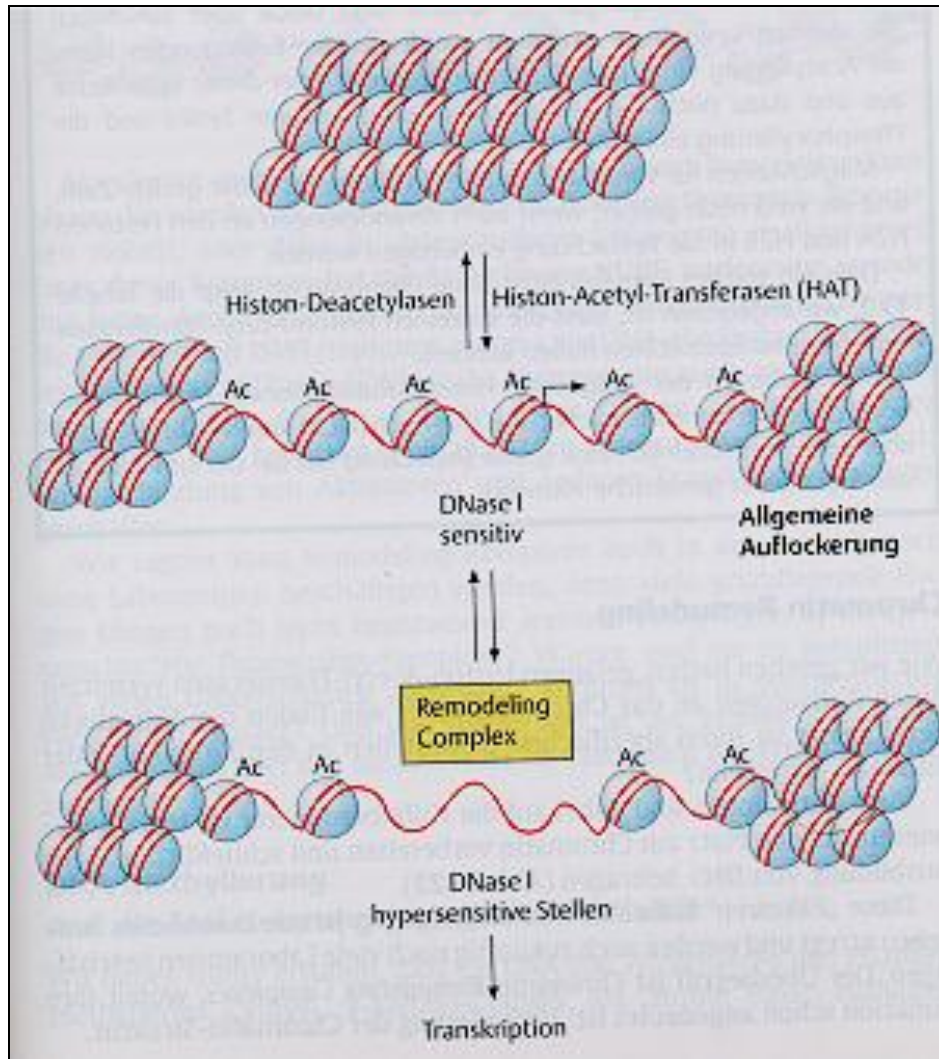
Hilfsmittel zur Charakterisierung der DNA-Verpackung

Heute können DNA-Modifizierungen durch Sequenz-Analyse Genomweit analysiert werden (s.u.)



Regulation der Transkription bei Eukaryoten

DNase1-hypersensitive Bereiche sind Ergebnis von Chromatin-Remodeling
Dabei sind v.a. Histon-Acetylierungen beteiligt



Tab. 13.3 Einige Histon-Acetyl-Transferasen in den Kernen menschlicher Zellen [aus 3]

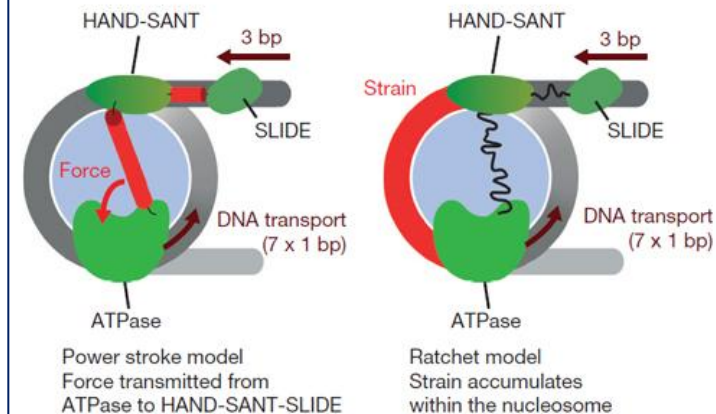
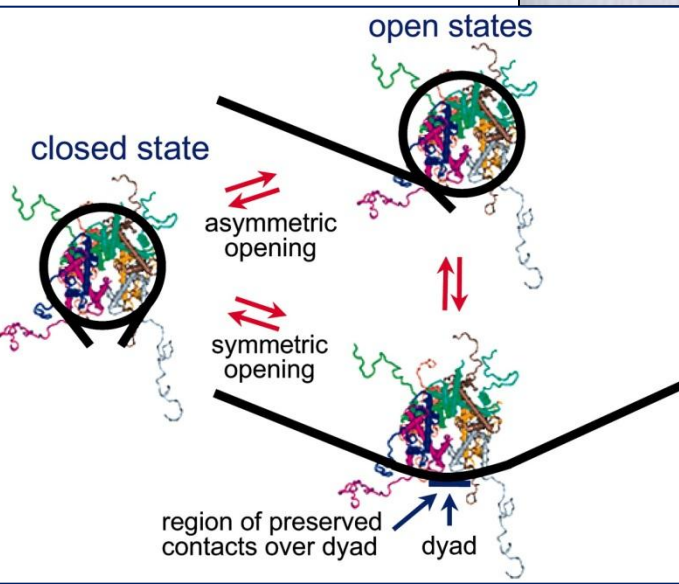
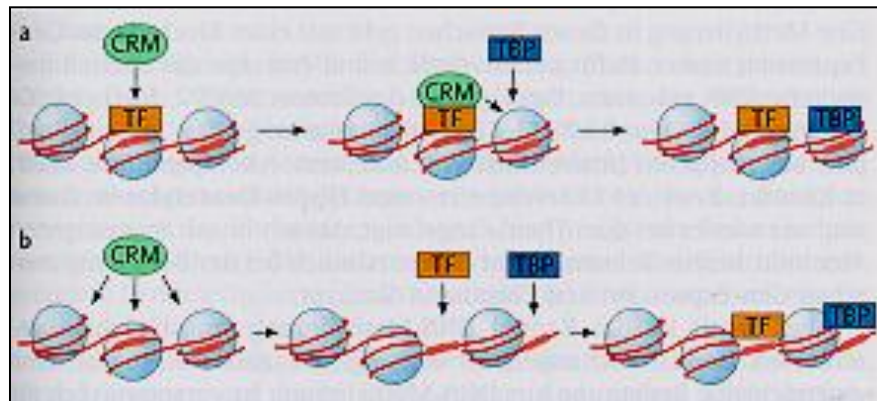
Enzym	Komplex	Spezifität/Funktion
p300/CBP (S. 370)	-	Acetylierung der vier Core-Histone Acetylierung von Transkriptionsfaktoren, z. B. p53
SCR1/ACTR (S. 385)	-	Acetylierung der Histone H3 und H4
PCAF (S. 370)	-	Acetylierung von Histon H3 und Transkriptionsfaktoren
hGCN5L	STAGA	Acetylierung von Histon H3
TFIIIC (S. 359)	-	Acetylierung der Histone H2A, H3 und H4
hTAF ₁₂₅₀ (S. 343)	TFIID	Acetylierung der (freien) Histone H3 und H4 sowie Transkriptionsfaktoren
Elp3	Elongator	Acetylierung der vier Core-Histone Funktion bei der Elongation der Transkription



Regulation der Transkription bei Eukaryoten

Chromatin-Remodeling lockert Nucleosomen (a) oder verdrängt sie (b):

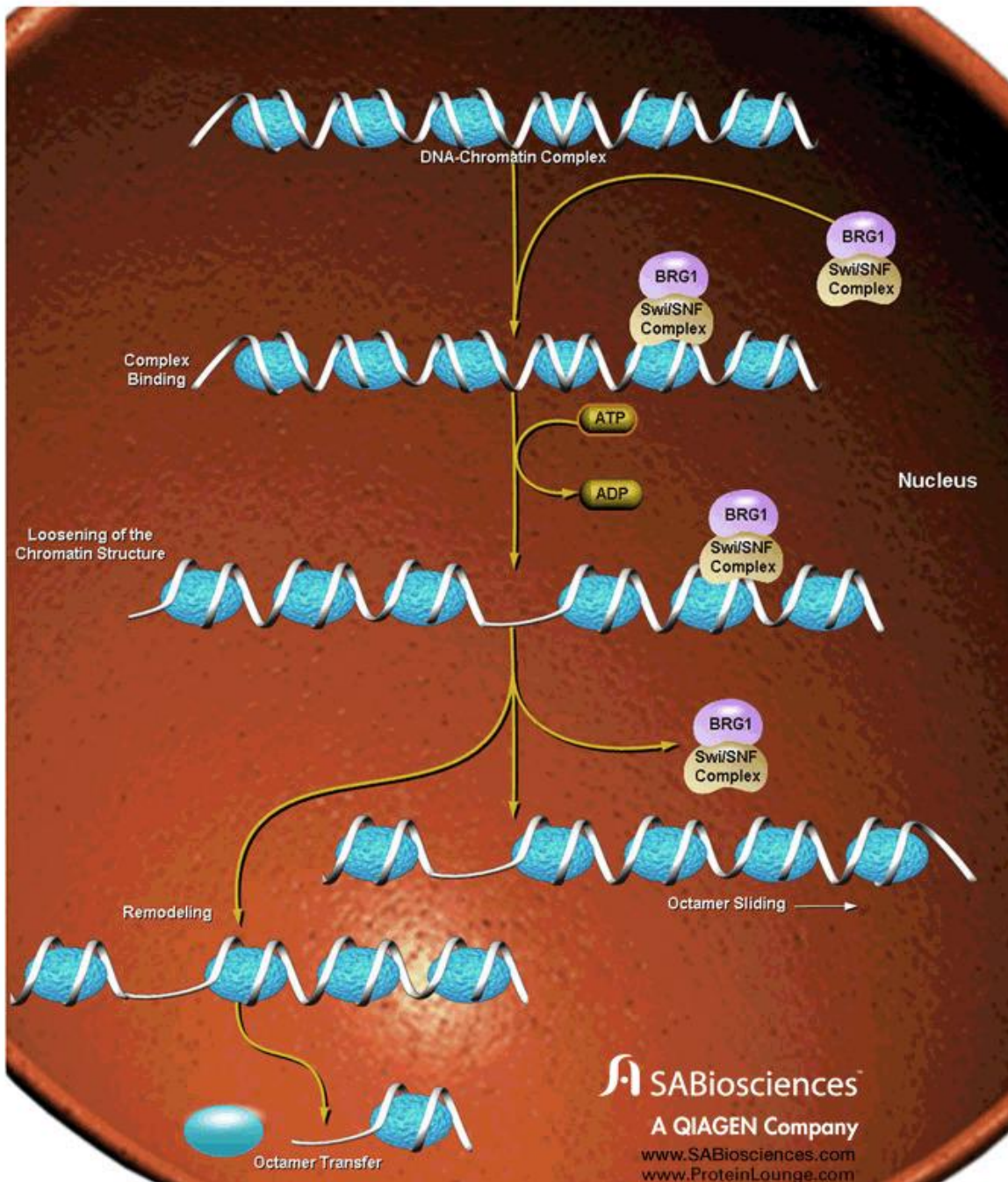
- a) TF können an der aufgelockerten Nucleosomenstruktur DNA erkennen
- b) DNA-Elemente sind nur in Nucleosomen-freien Stellen erkennbar



Chromatin-Remodeling

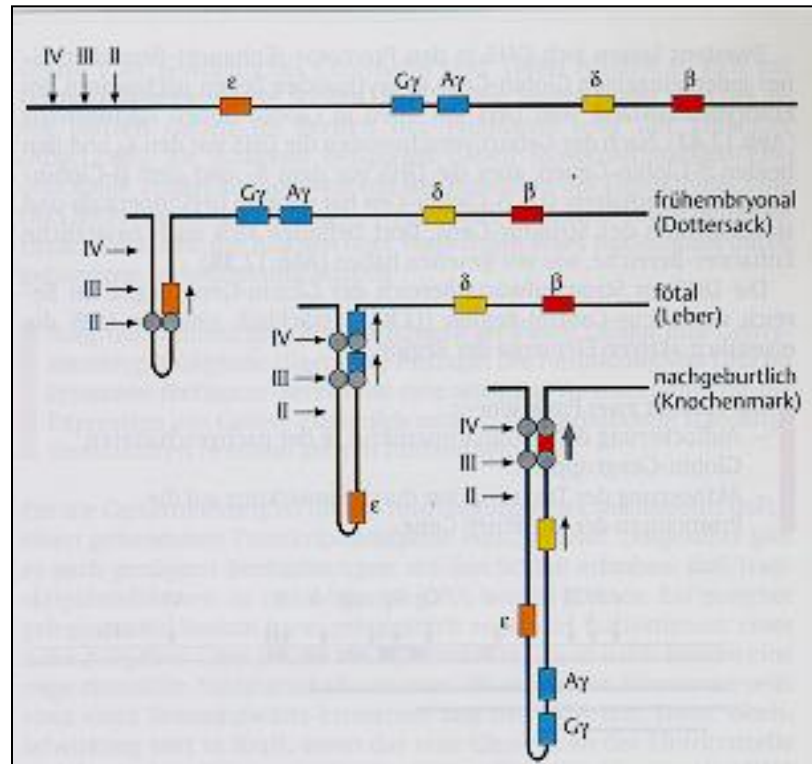
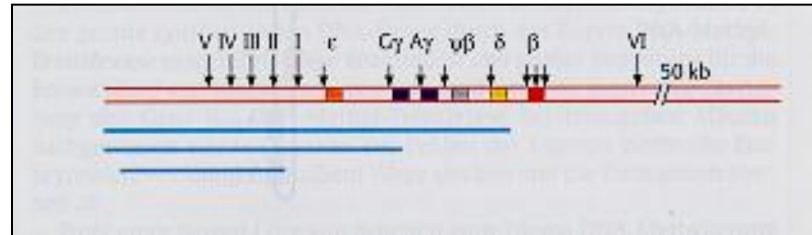
Verschiebung (Auflösung) von Nucleosomen im aufgelockerten Chromatin

Transcription activator BRG1 also known as **ATP-dependent helicase SMARCA4** is part of the **SWI/SNF** chromatin remodeling complex



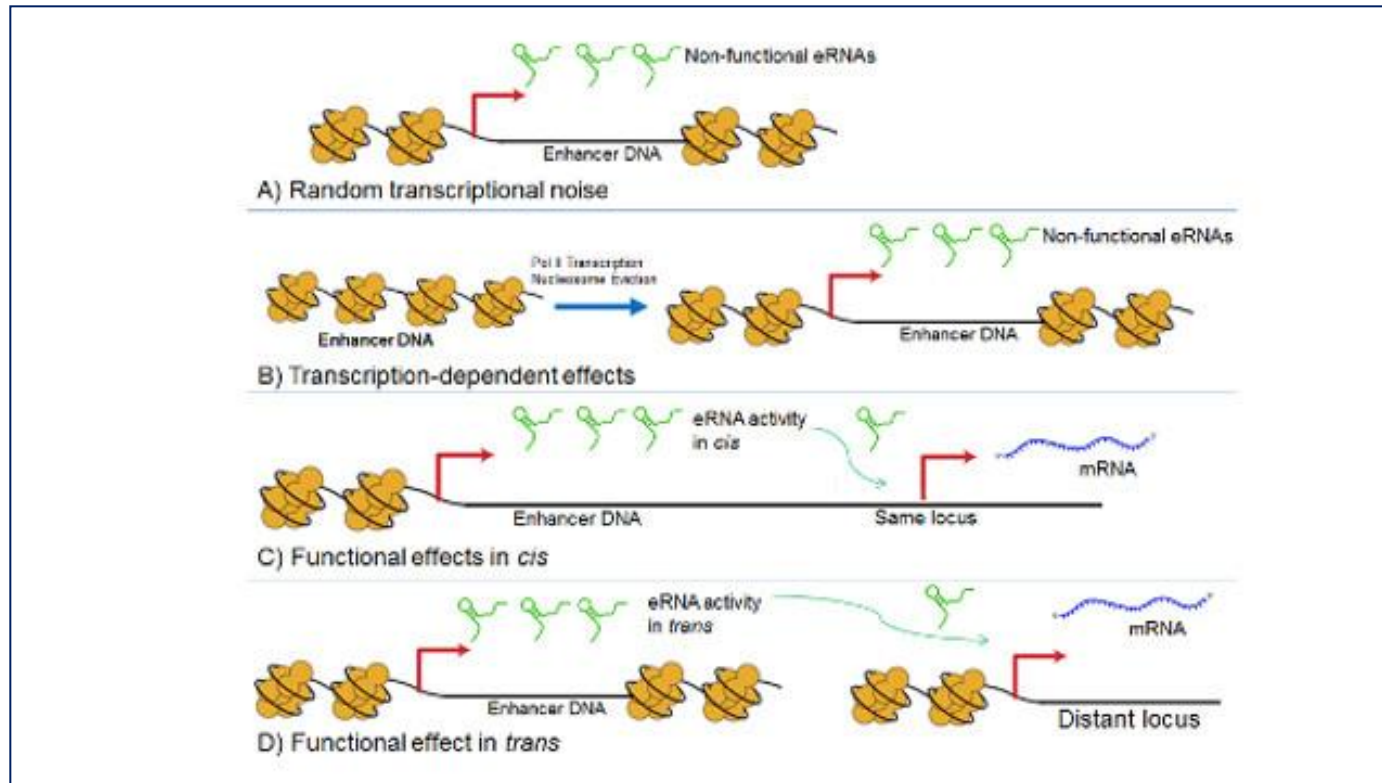
Regulation der Transkription bei Eukaryoten

DNase1-hypersensitiver Bereiche im Genlocus des β -Globingens
Locus-control-region (Enhancer) – gesamter DNA-Bereich wird zugänglich



Regulation der Transkription bei Eukaryoten

DNase1-hypersensitiver Bereiche/Enhancer werden intensiv transkribiert!
Funktional oder nicht?



<http://www.the-scientist.com//?articles.view/articleNo/39906/title/Exploring-the-Roles-of-Enhancer-RNAs/>



Regulation der Transkription bei Eukaryoten

Epigenetik – Vererbung von Merkmalen durch Mechanismen unabhängig von der DNA-Sequenz

Gibt es so etwas?

Zusammenhang Ernährung und Gesundheit

Wenn ja, wie kann das geschehen?

Lamarck kontra Darwin?

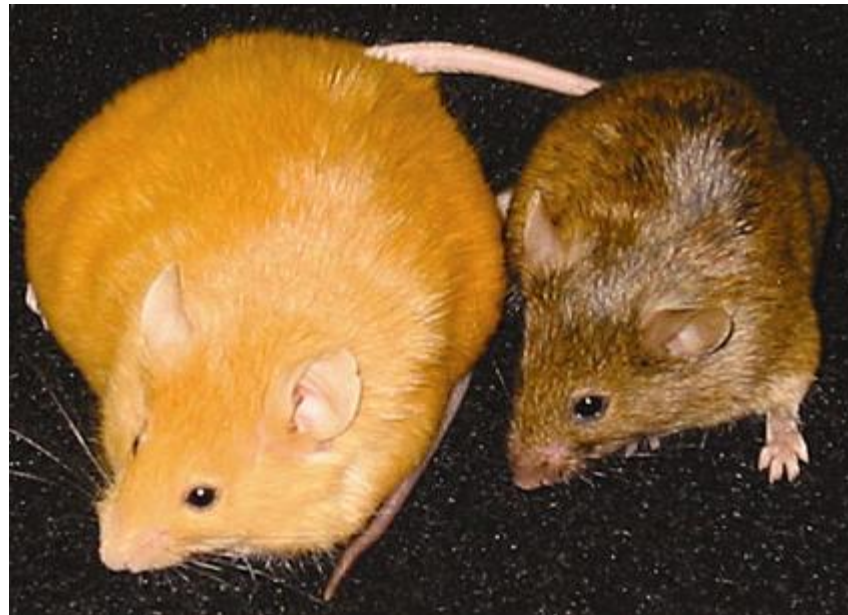
Deutliche Hinweise aus der Zwillingsforschung!

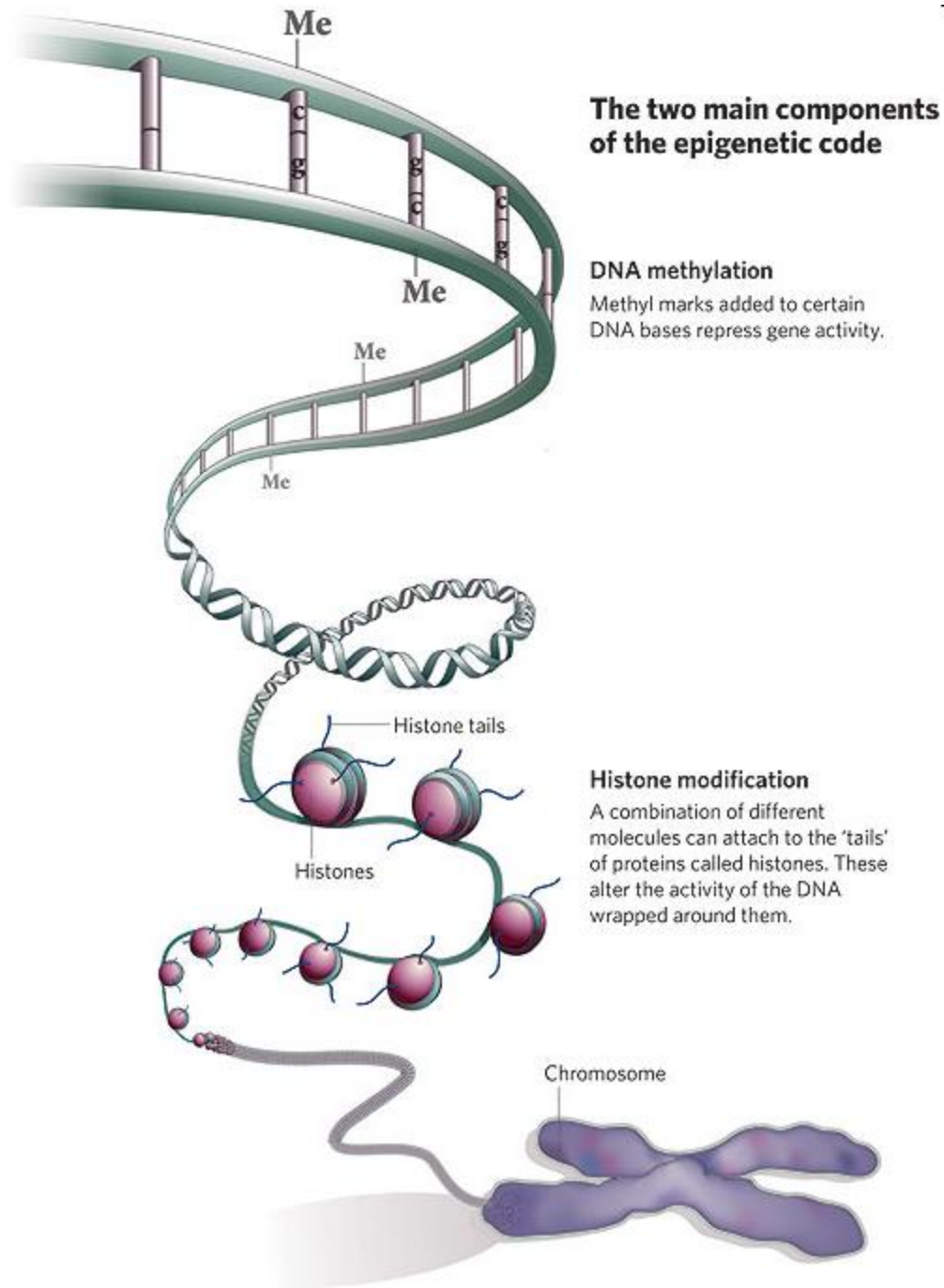


Regulation der Transkription bei Eukaryoten

DNA-Methylierung beeinflusst die Genaktivität

Unterschiedliche Färbung von Mäusen (Agouti-Mausmodell) abhängig von der Ernährung schwangerer Mäuse mit z.B. Folaten! (Methylierungen verändert)





Regulation der Transkription bei Eukaryoten

Vielfältige Histonmodifizierungen sind möglich

Rot – Acetylierungen, Blau – Phosphorylierungen, Gelb – Methylierungen,
Auch andere Modifizierungen sind möglich!

Entsteht so ein epigenetischer Code??



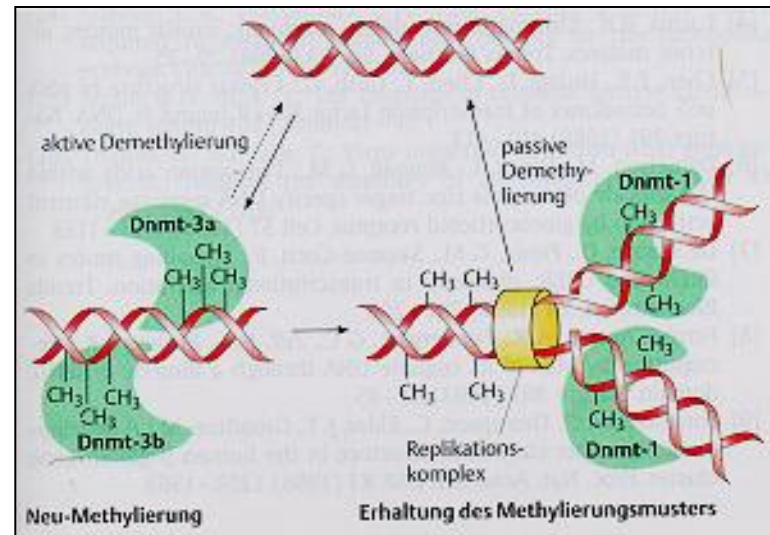
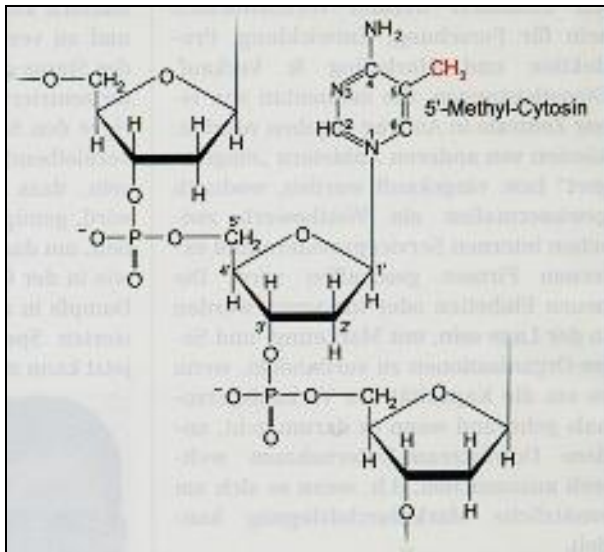
Regulation der Transkription bei Eukaryoten

DNA-Methylierung beeinflusst die Genaktivität

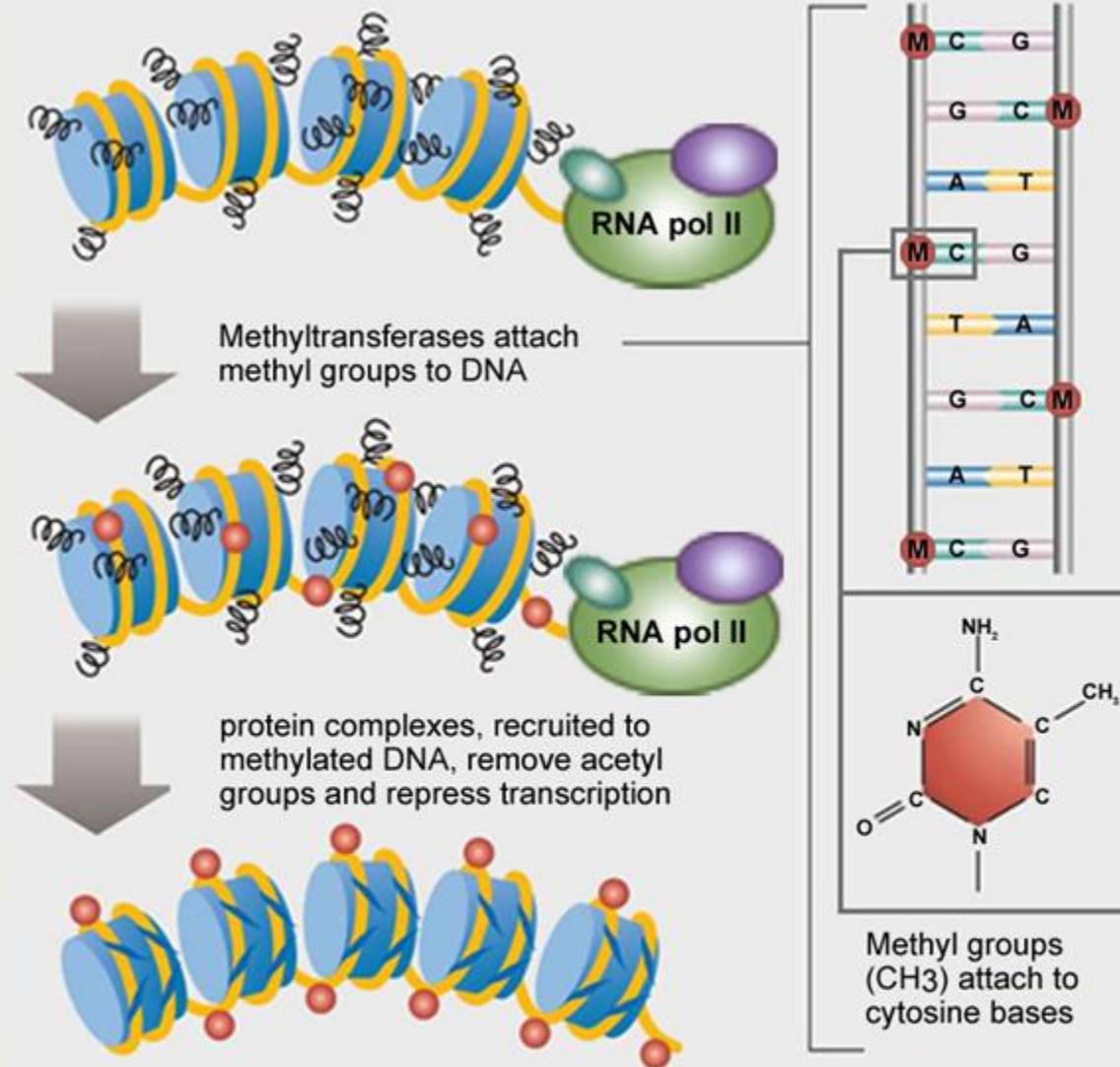
Regel – Methylierung vermindert Transkription




5-Methylcytosin wird in so genannten CpG-Inseln gebildet

Stabilität in der Meiose?



One Epigenetic Mechanism for Repressing Transcription



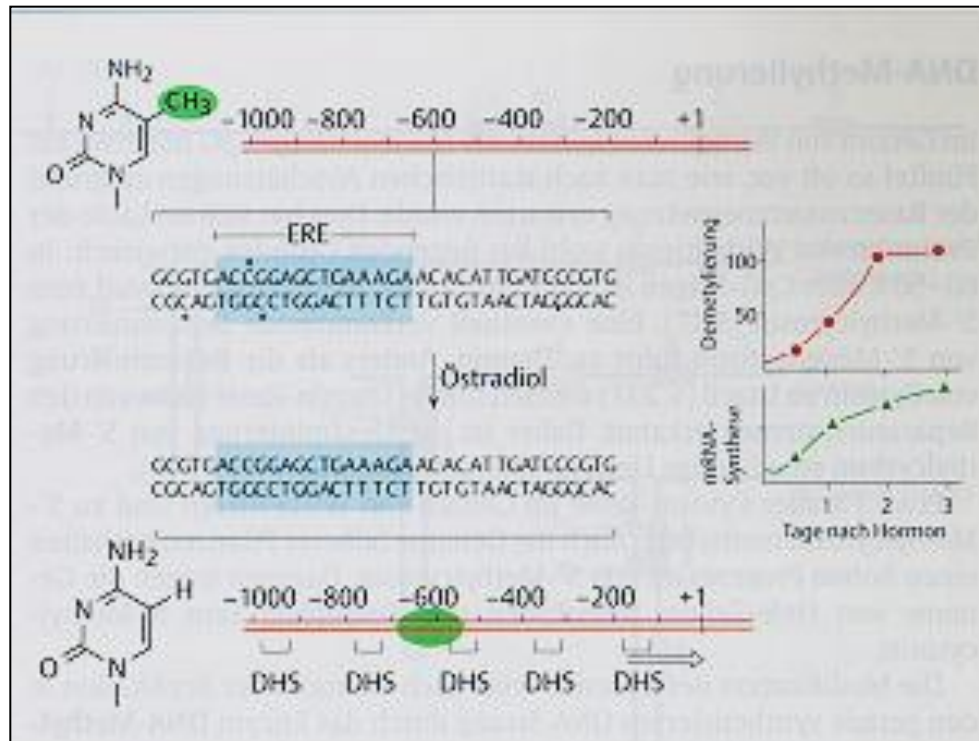
-  Deacetylated histone tail
-  Methylated CpG pair
-  Acetylated histone tail

Repression of transcription—the transfer of genetic information from DNA to RNA—is one route by which epigenetic mechanisms can adversely impact health.



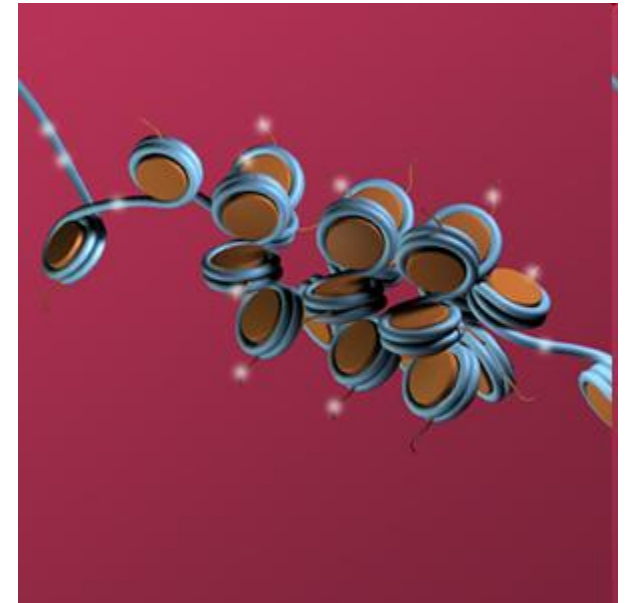
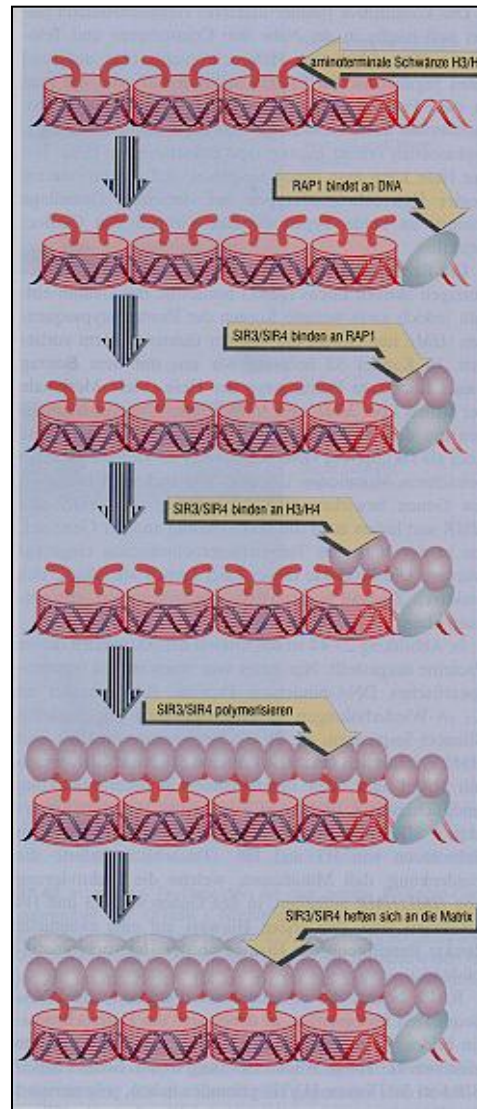
Regulation der Transkription bei Eukaryoten

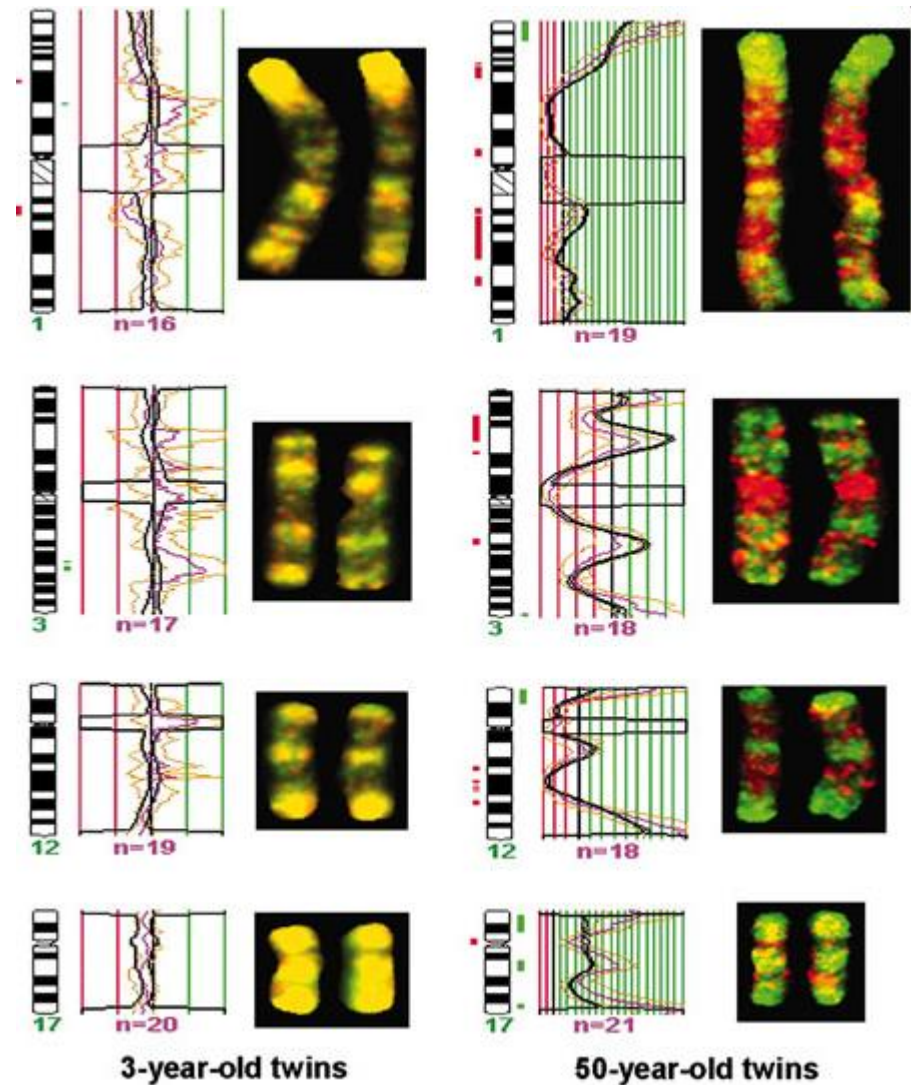
DNA-Demethylierung korreliert mit der Entstehung von DNase1-hypersensitiven Bereichen – beeinflusst Chromatinpackung



Regulation der Transkription bei Eukaryoten

DNA-Bereiche werden durch Überführung in Heterochromatin abgeschaltet
Das Protein RAP1 rekrutiert SIR3/SIR4 zur stabilen Histonbindung





3-year-old twins

50-year-old twins

Chromosome regions with differential DNA methylation in young and old monozygous twins. (Image Copyright (2005) National Academy of Sciences, U.S.A)

Significant DNA methylation changes are indicated as thick red and green blocks in the ideograms. The 50-year-old twin pair shows abundant changes in the pattern of DNA methylation (green=hypermethylation and red=hypomethylation), 3-year-old twins have a very similar DNA methylation (yellow).

Epigenetische Regulation – „Imprinting“



Depicted are a pair of normal chromosomes (a) and several illustrative lesions (b–f); maternal chromosomes are pink and paternal blue, and DMRs are indicated (Me). Imprinted genes are depicted, not to scale or in their entirety, with green representing active and red representing silent alleles, respectively. Patients with uniparental disomy (UPD, b) have complete genetic replacement of the maternal allele region with a second paternal copy (dashed enclosure). Loss of imprinting (LOI) of *IGF2* (c) causes a switch in epigenotype of the *IGF2/H19* subdomain (dashed enclosure). LOI of *LIT1* (d) causes a switch in epigenotype of the *p57/KVLQT1/LIT1* subdomain. Some patients show LOI of the entire imprinted gene domain in the absence of UPD (e). Other patients show localized chromatin disruption (small yellow circle, f) silencing *p57KIP2*.

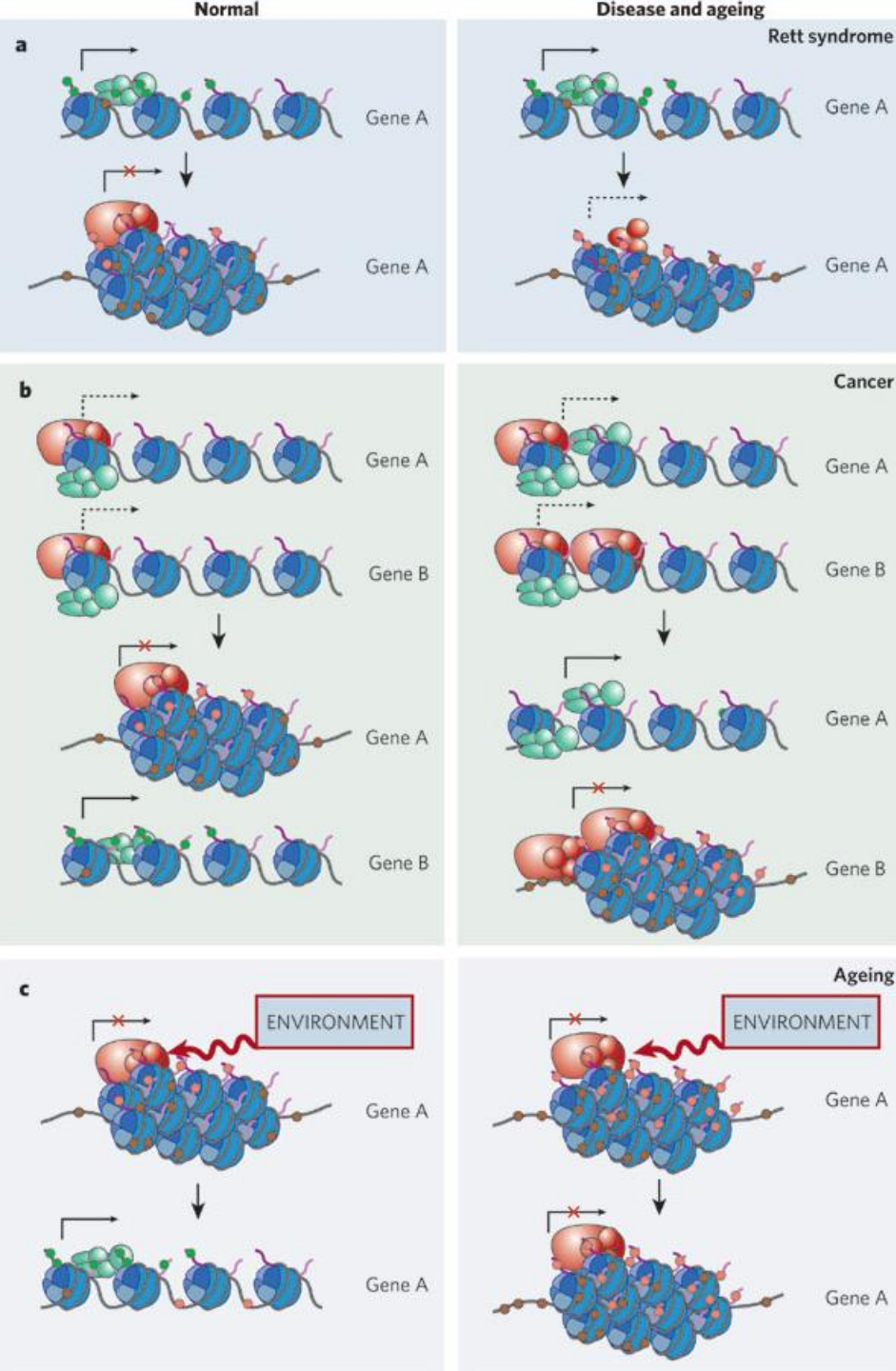
Epigenetische Effekte

A common feature of epigenetic lesions in human disease is that they affect a cell's ability to change its phenotype.

a, In monogenic disorders such as Rett syndrome, a defect in the normal epigenetic apparatus itself impedes normal development. DNA methylation proceeds normally but is not recognized owing to the absence of the MeCP2-methylation-interacting protein.

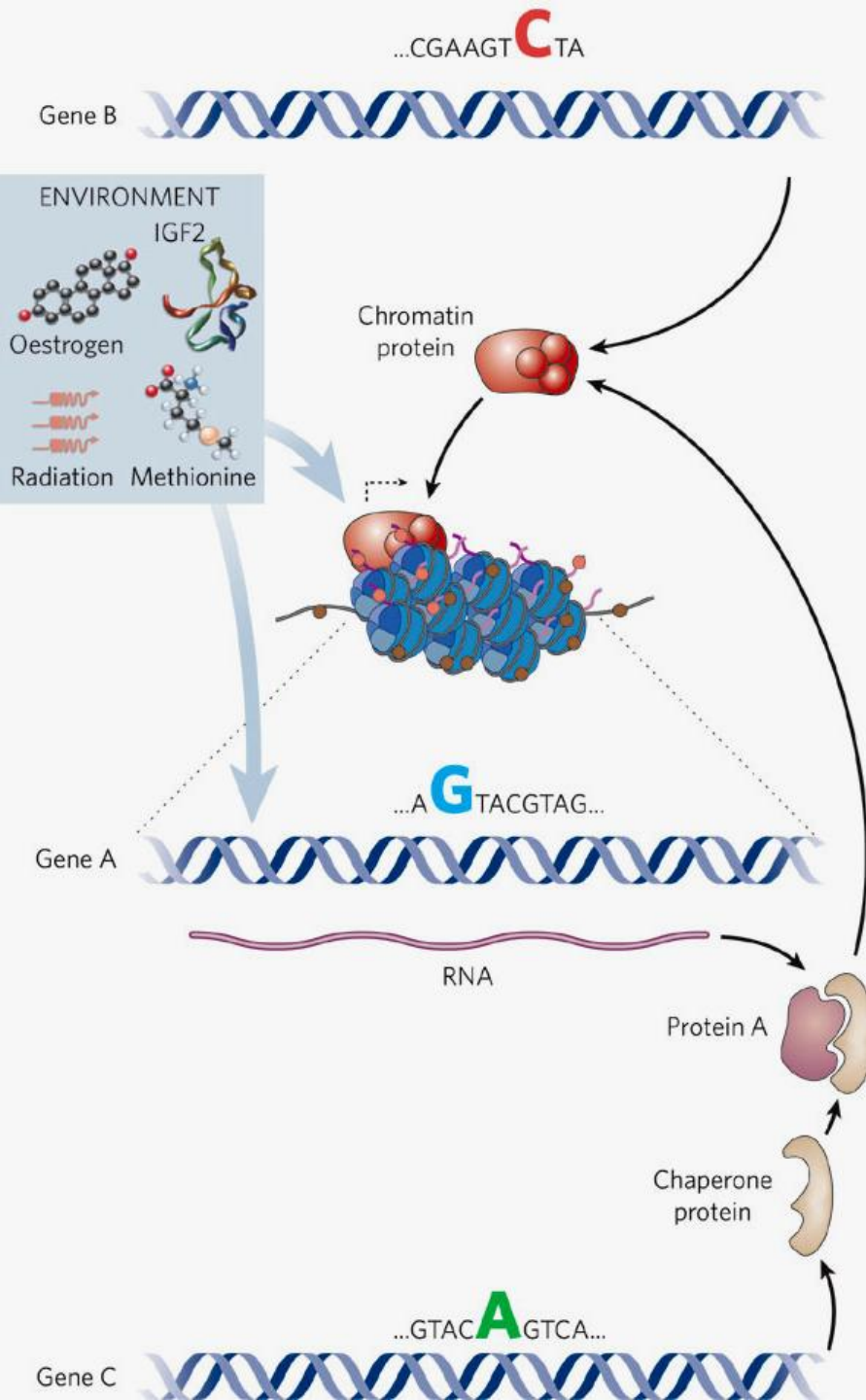
b, Cancer involves many epigenetic lesions that could affect a pluripotent programme in tissue-specific stem cells, etc. Examples of epigenetic lesions found in cancer include changes in chromatin proteins in stem cells caused by increased expression of *MLL1* in leukaemia (upper right panel, green complex above gene A representing *HOX* genes),

c, Ageing involves a loss of the normal plasticity of response to internal and external environmental signals. The epigenome could have an important role in ageing if the aged epigenome is less responsive to such signals. For example, a gene (at this point hypothetically) showing increased H3K9-methylation (upper right panel, red circles on nucleosomes) or DNA methylation (brown circles on DNA).



S.E. Baranzini et al., "Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis," *Nature* 464(29):1351-6, 2010.

Genetische und Epigenetische Mechanismen wirken zusammen



According to the common disease genetic and epigenetic (CDGE) hypothesis, the epigenome may modulate the effect of genetic variation (example shown is the large nucleotide in gene A, which could be C or G), either by affecting the gene's expression through the action of chromatin proteins or DNA methylation, or by modulating protein folding of the gene product of the variant locus or chromatin protein. The epigenome may, in turn, be affected by sequence variation in the genes encoding chromatin or chaperone proteins (genes B and C, respectively). Environmental factors (such as toxins, growth factors, dietary methyl donors and hormones) can affect the genome and the epigenome.

S.E. Baranzini et al., "Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis," *Nature* 464(29):1351-6, 2010.

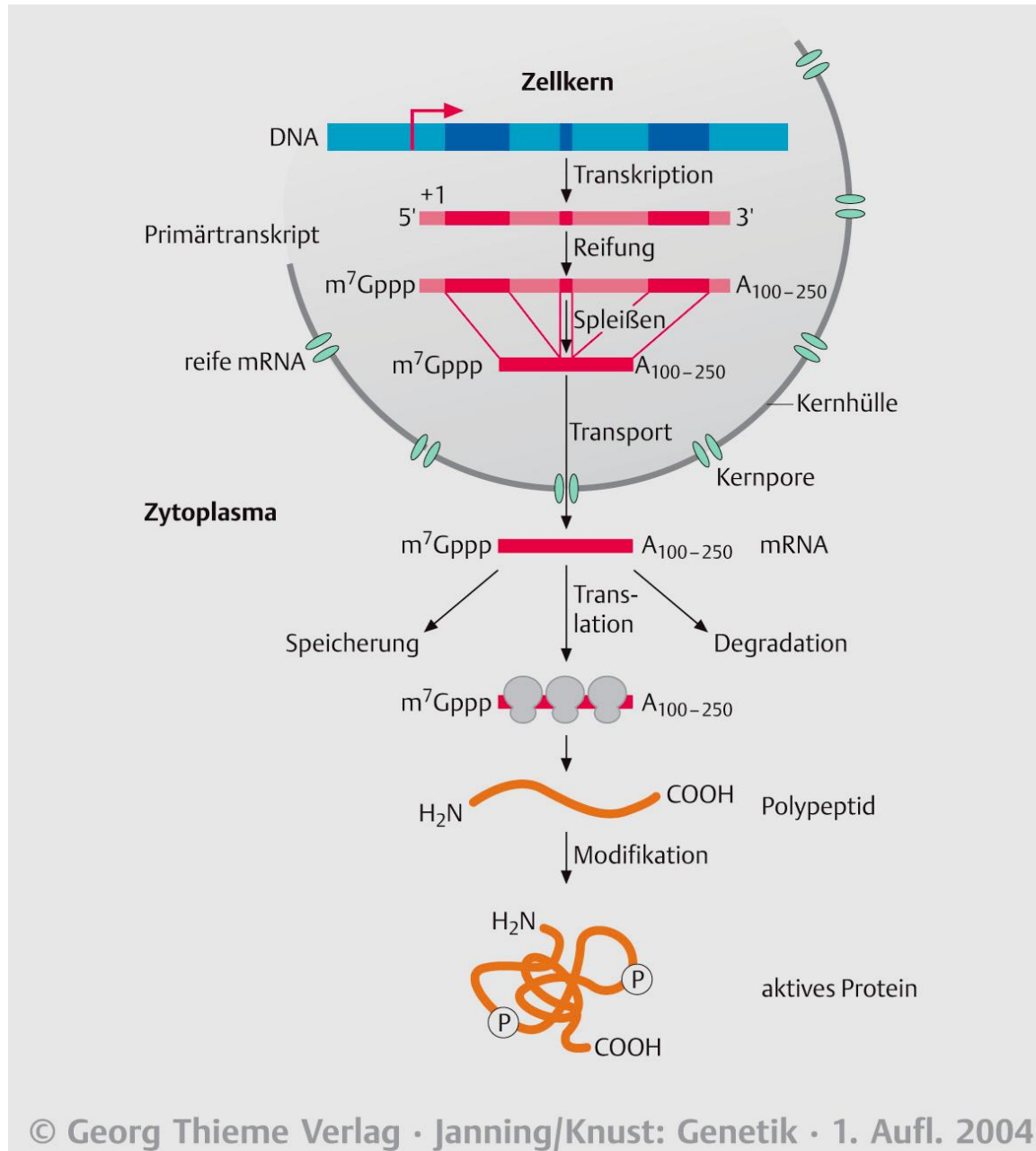
Regulation der Transkription bei Eukaryoten

Zusammenfassung

- Proteinkodierende Gene in Eukaryoten haben genspezifische Promotoren
- Grundpromotor: TATA-Box und andere Module (GC, CCAAT)
 - Bindestellen für universelle Transkriptionsfaktoren und RNAPII
 - upstream-Promotorelemente: DNA-Sequenzen mit fixierter Position vor Grundpromotor – Bindestellen für weitere Transkriptionsfaktoren, i.d.R. diverse
 - zelltypspezifische Transkriptionsfaktoren: Steroidhormonrezeptoren,
 - regulierte Transkriptionsfaktoren: CREB, NF κ B
- Aktivität der Transkriptionsfaktoren wird durch Phosphorylierung, Inhibitorproteine, Bildung von Homo- sowie Heterodimeren bzw. Bindung niedermolekularer Effektoren beeinflusst
- Aktivierung heißt häufig Rekrutierung weiterer TF, Coaktivatoren (z.B. CBP), universelle TF, DNA-modifizierende Proteine (z.B. HAT)
- DNA-Struktur hat generellen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität
- um übergeordnete DNA-Elemente (z.B. Enhancer) ist DNA aufgelockert
 - Bindung von TF führt zur WW mit anderen Elementen, induziert DNaseI-sensitive Bereiche, beeinflusst DNA-Methylierung, Bindung von TF usw. usf.

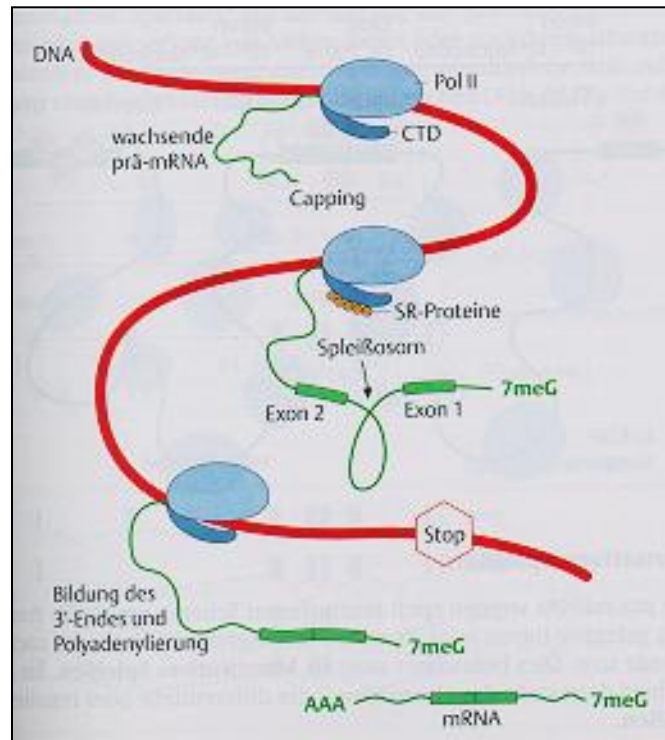


Ebenen der Genregulation bei Eukaryoten



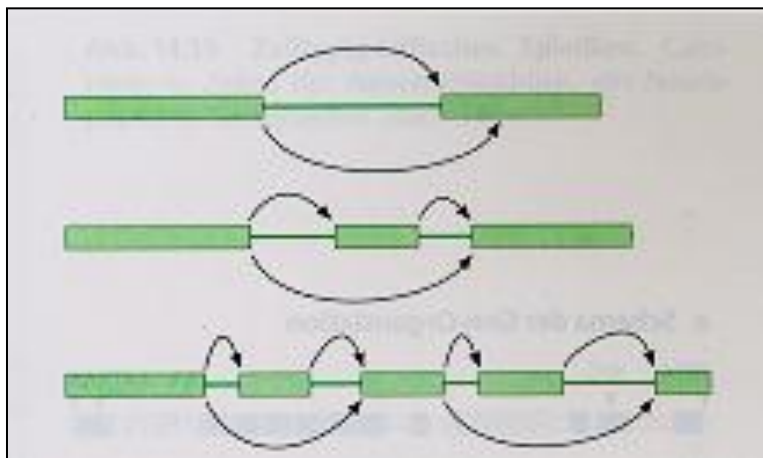
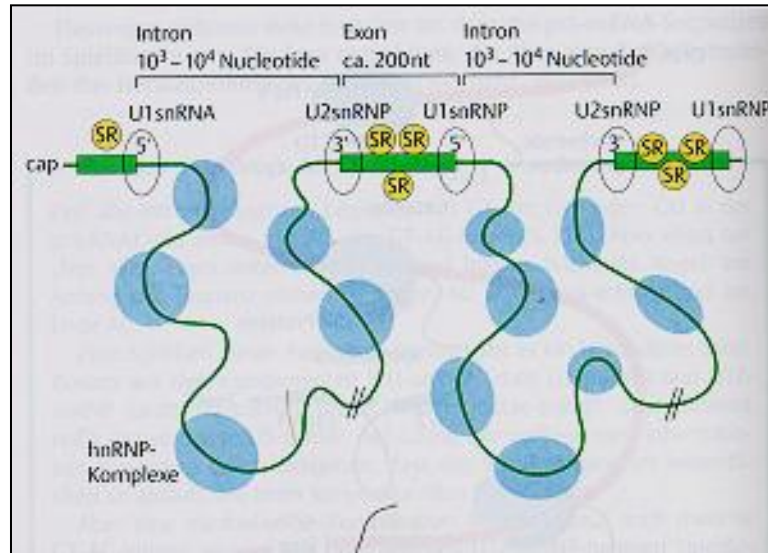
Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

prä-mRNA wird während der Transkription im Zellkern modifiziert



Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

prä-mRNA kann alternativ gespleißt werden



alternative 3' Spleißstellen

Entfernen von einem Exon

Einfügen bzw. Entfernen von Exonen

Pflanzenphysiologie

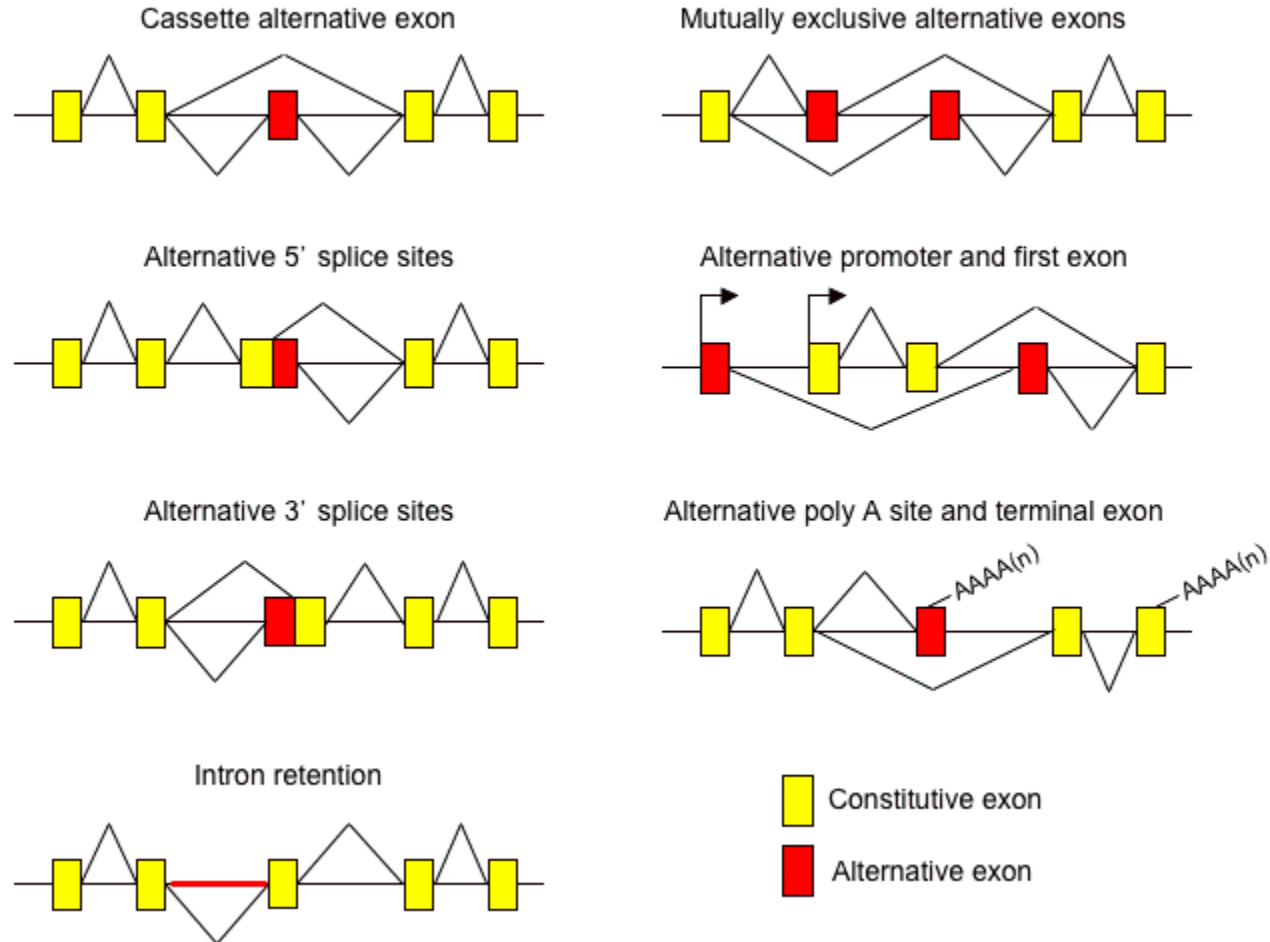
PUR

Universität Rostock



Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

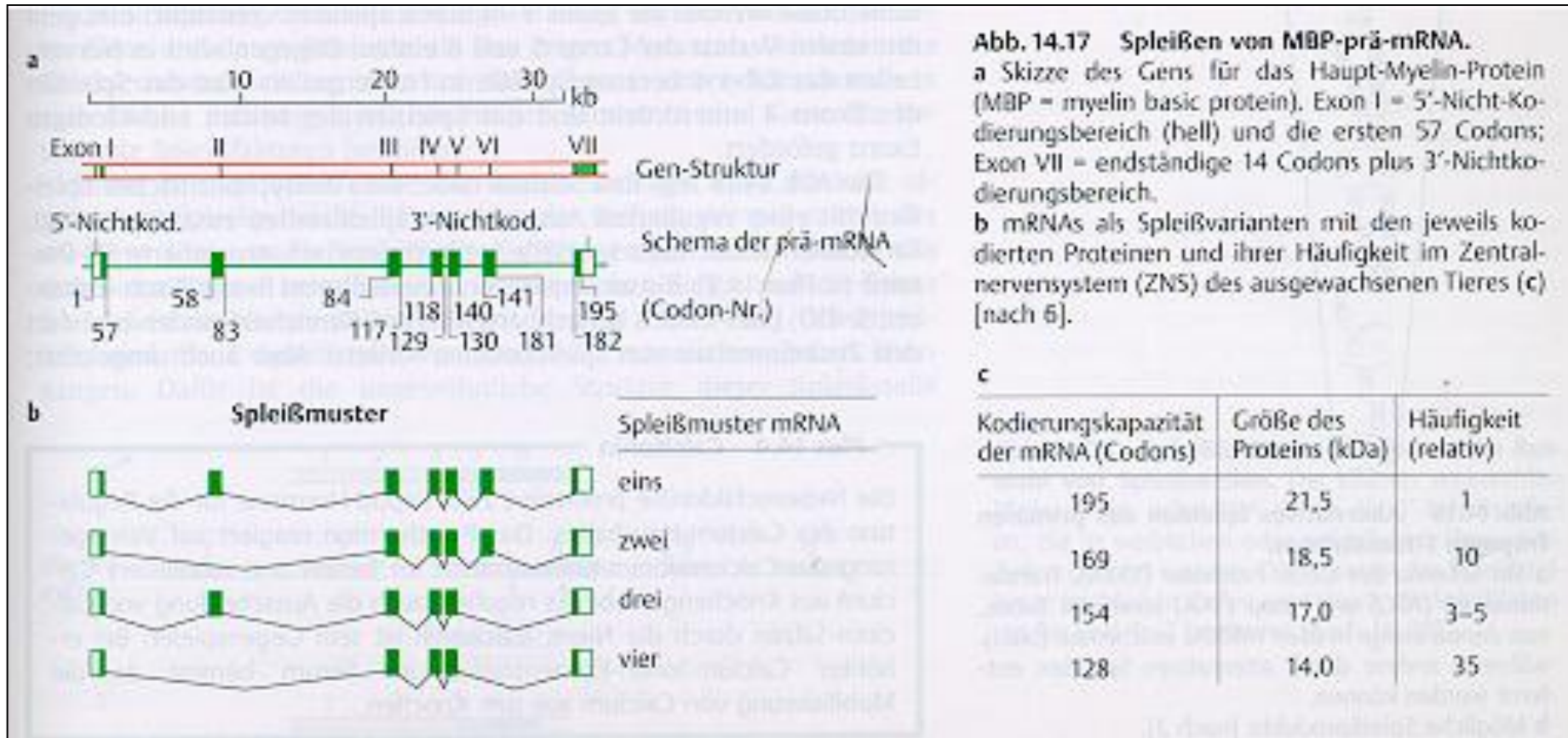
Typen von alternativem Spleißen



Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

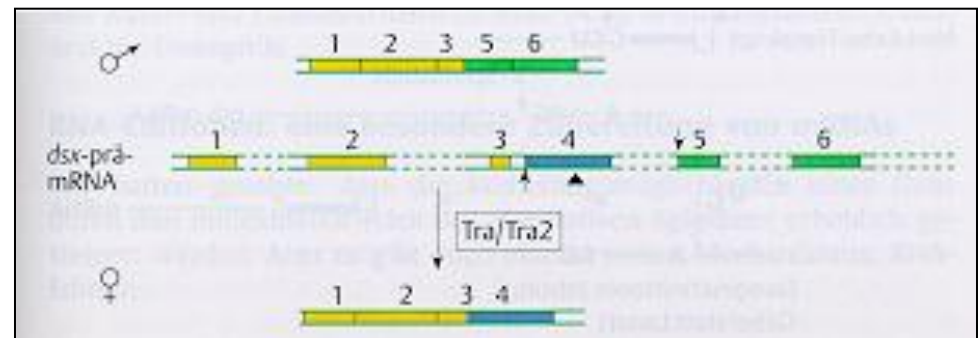
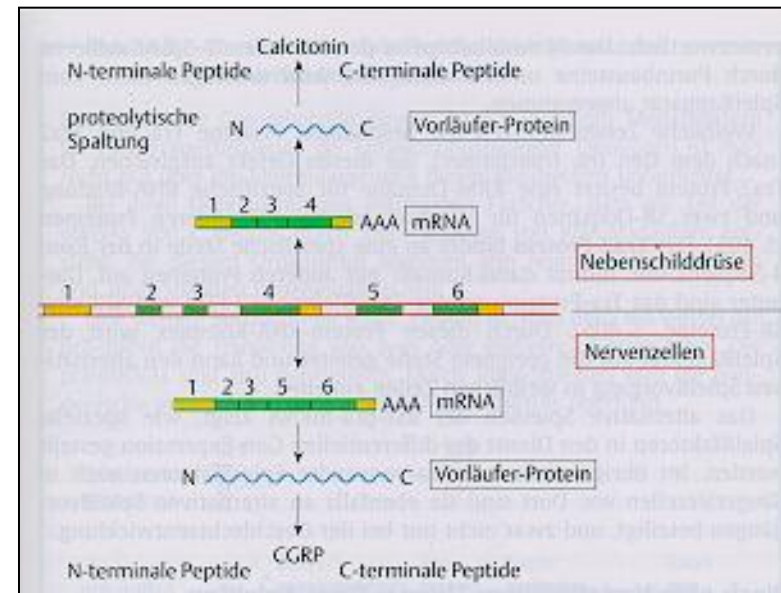
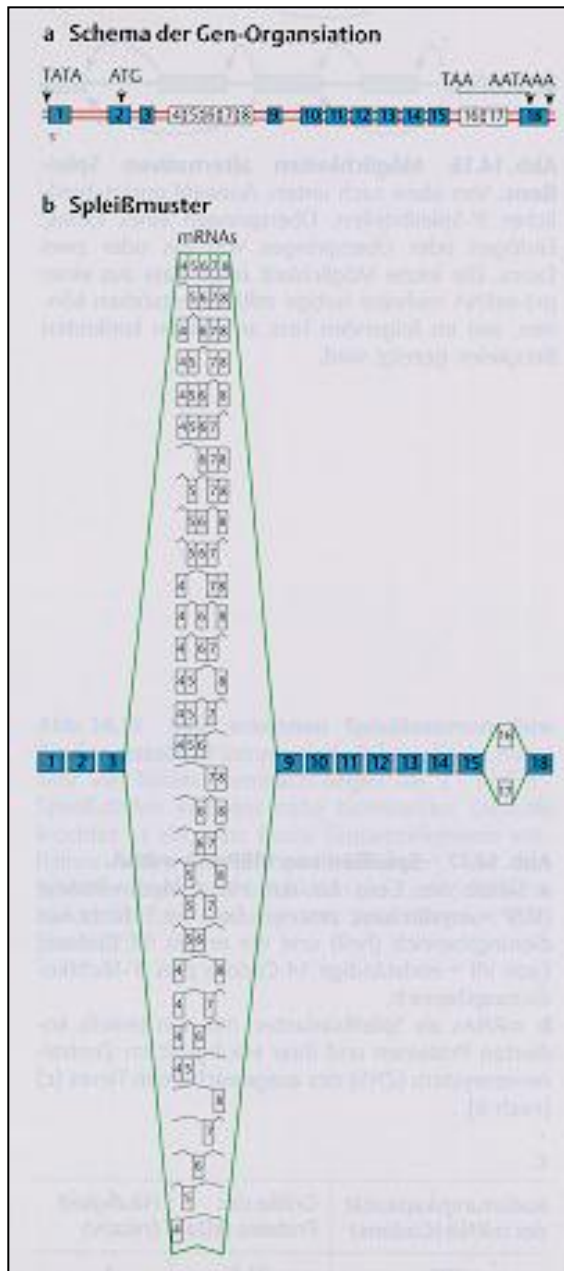
prä-mRNA kann alternativ gespleißt werden
z.B. Haupt-Myelin-Protein im Gehirn

(Mensch hat bis zu 25.000 Proteine/Peptide im Gehirn, Maus weniger)



Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

- z.B. Troponin-T im Muskel
- z.B. zelltypspezifisches Spleißen bei Calcitonin
- z.B. Geschlechtsbestimmung bei Drosophila

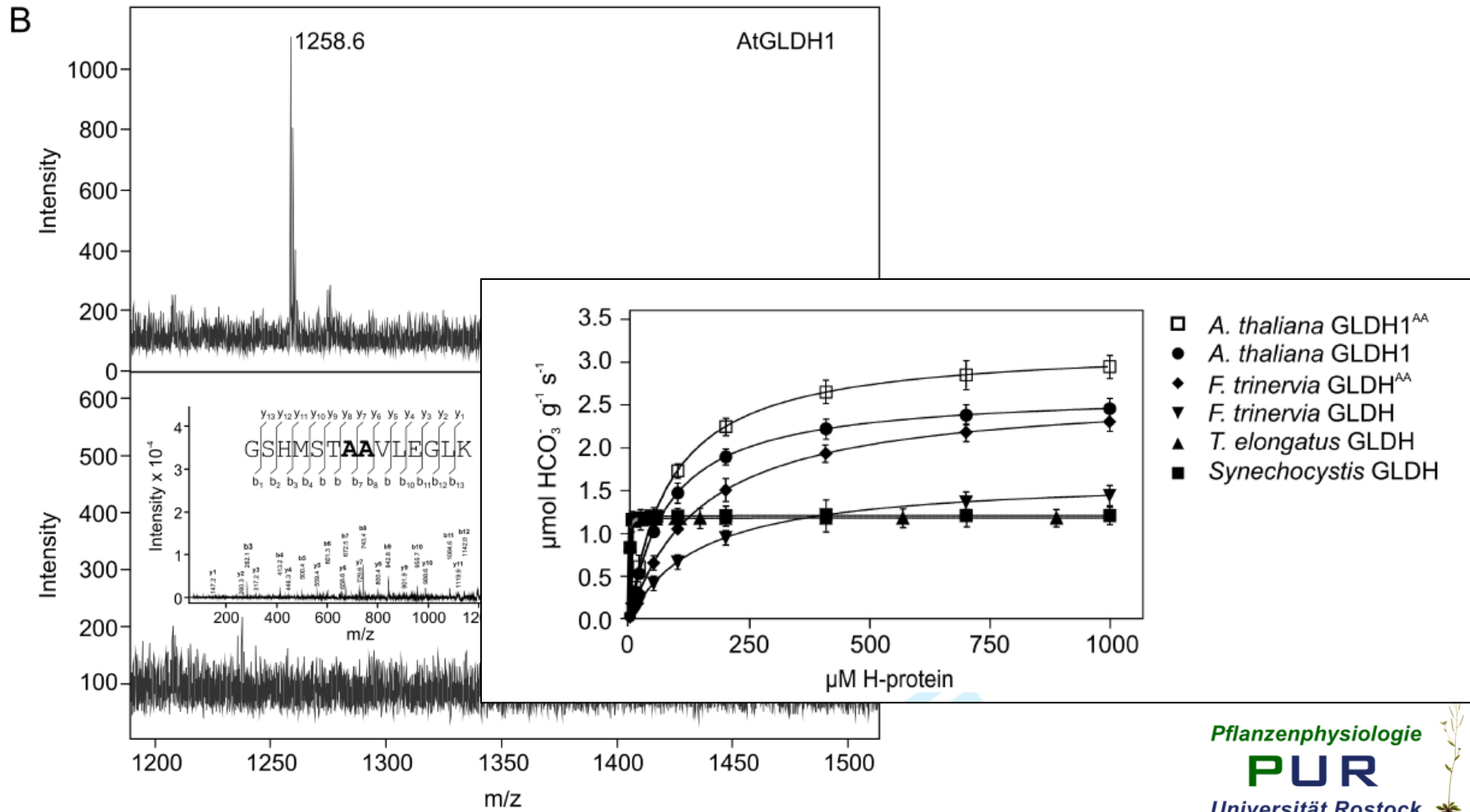


A

<i>F. trinervia</i> GLDH	GSHMSS--VLDGLKYANSHEWVKHEG...
<i>F. trinervia</i> GLDH ^{AA}	GSHMSSAAVLDGLKYANSHEWVKHEG...
<i>A. thaliana</i> GLDH1	GSHMST--VLEGLKYANSHEWVKHEG...
<i>A. thaliana</i> GLDH1 ^{AA}	GSHMSTAAVLEGLKYANSHEWVKHEG...
<i>Synechocystis</i> GLDH	GSHMMELEHPDDLTYLDSHEYVRFDG...
<i>T. elongatus</i> GLDH	GSHMRTLTYPEDLQYLDSHEYLRLEG...

Alternatives Splicen der H-Protein-UE des GDC erhöht dessen Aktivität

Hasse et al. 2008



Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

reife mRNA wird in das Cytoplasma exportiert
Komplex mit speziellen Ribonucleoproteinen

