

Einführung in die Molekularbiologie

Prof. Dr. Martin Hagemann

Vorlesung 8

Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

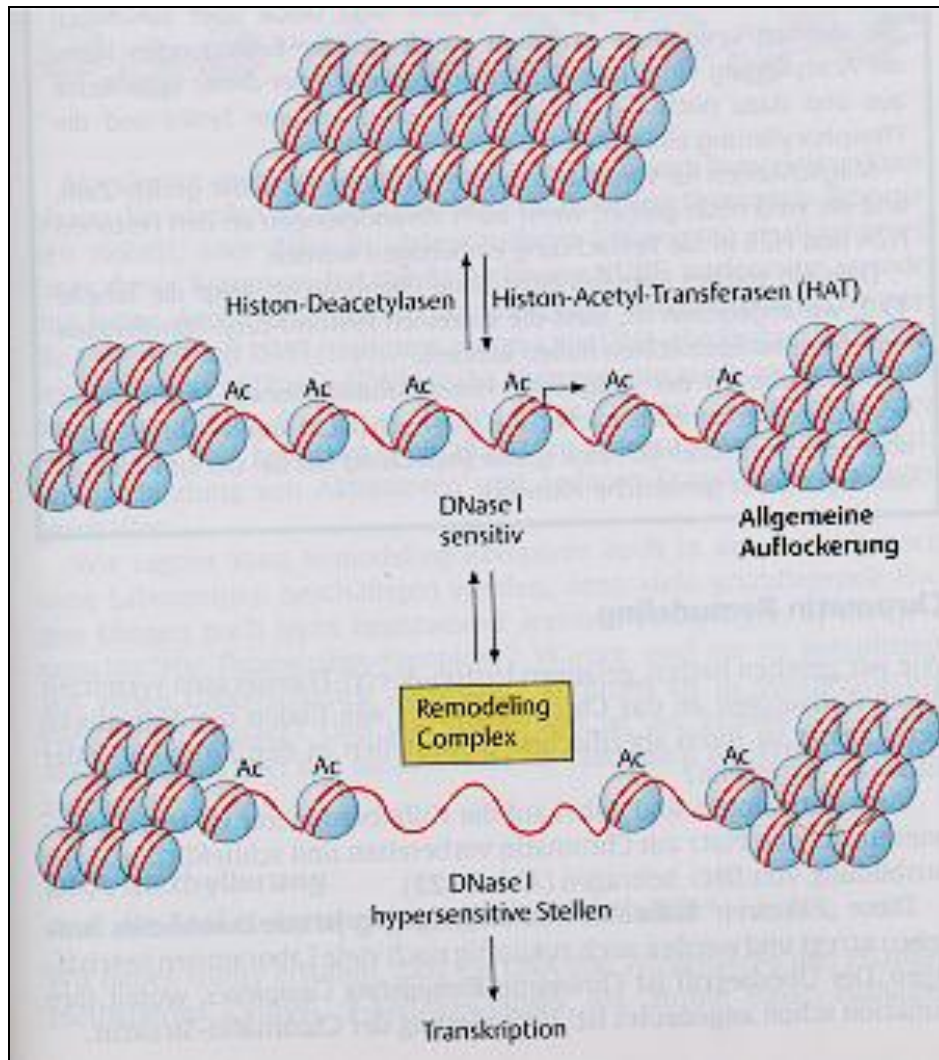
Posttranskriptionale Kontrolle
Alternatives Splicen
Regulatorische RNAs

Proteinsynthese, 2. genetischer Code



Regulation der Transkription bei Eukaryoten

DNase1-hypersensitive Bereiche sind Ergebnis von Chromatin-Remodeling
Dabei sind v.a. Histon-(De)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



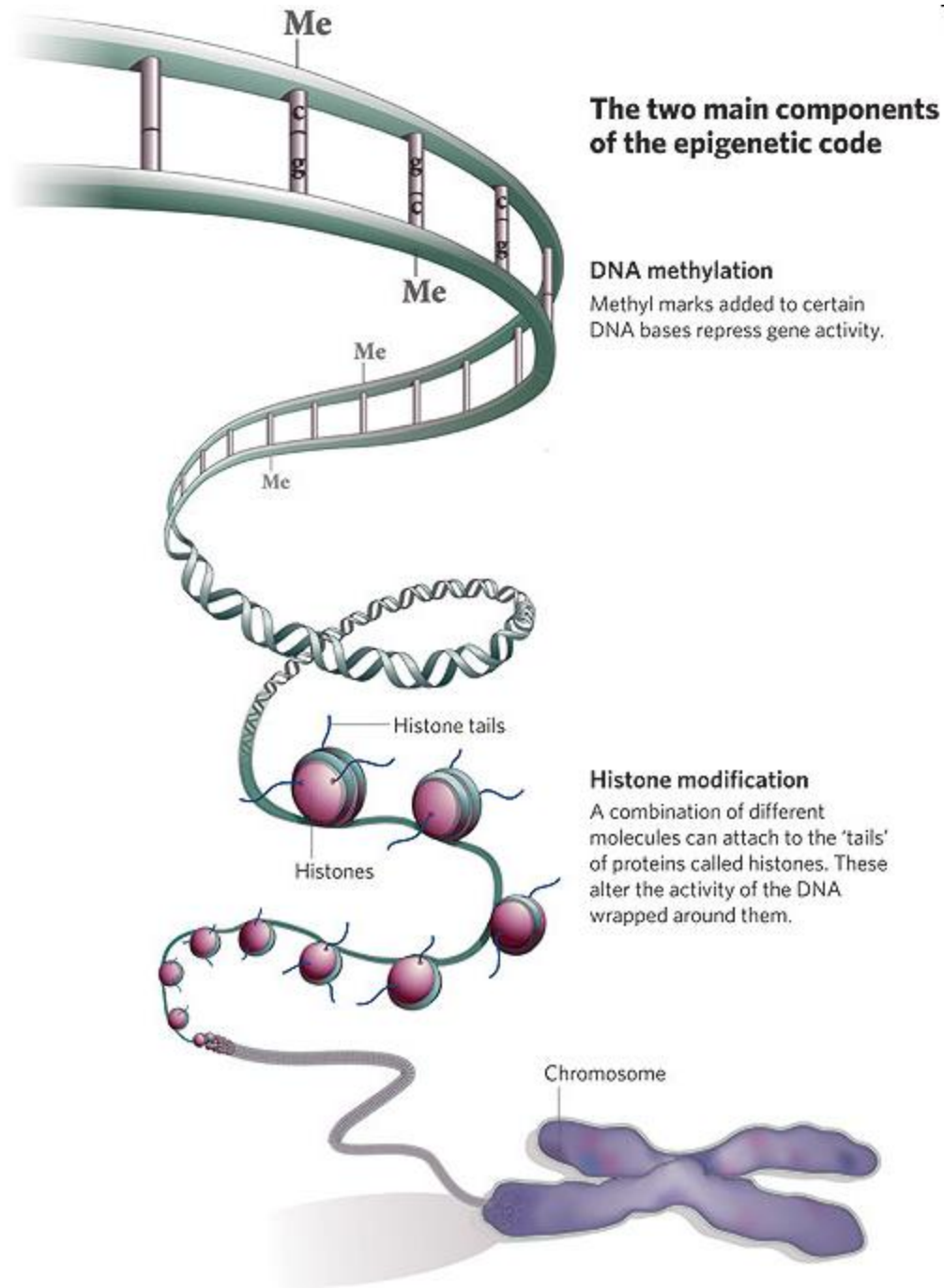
Regulation der Transkription bei Eukaryoten

Vielfältige Histonmodifizierungen sind möglich

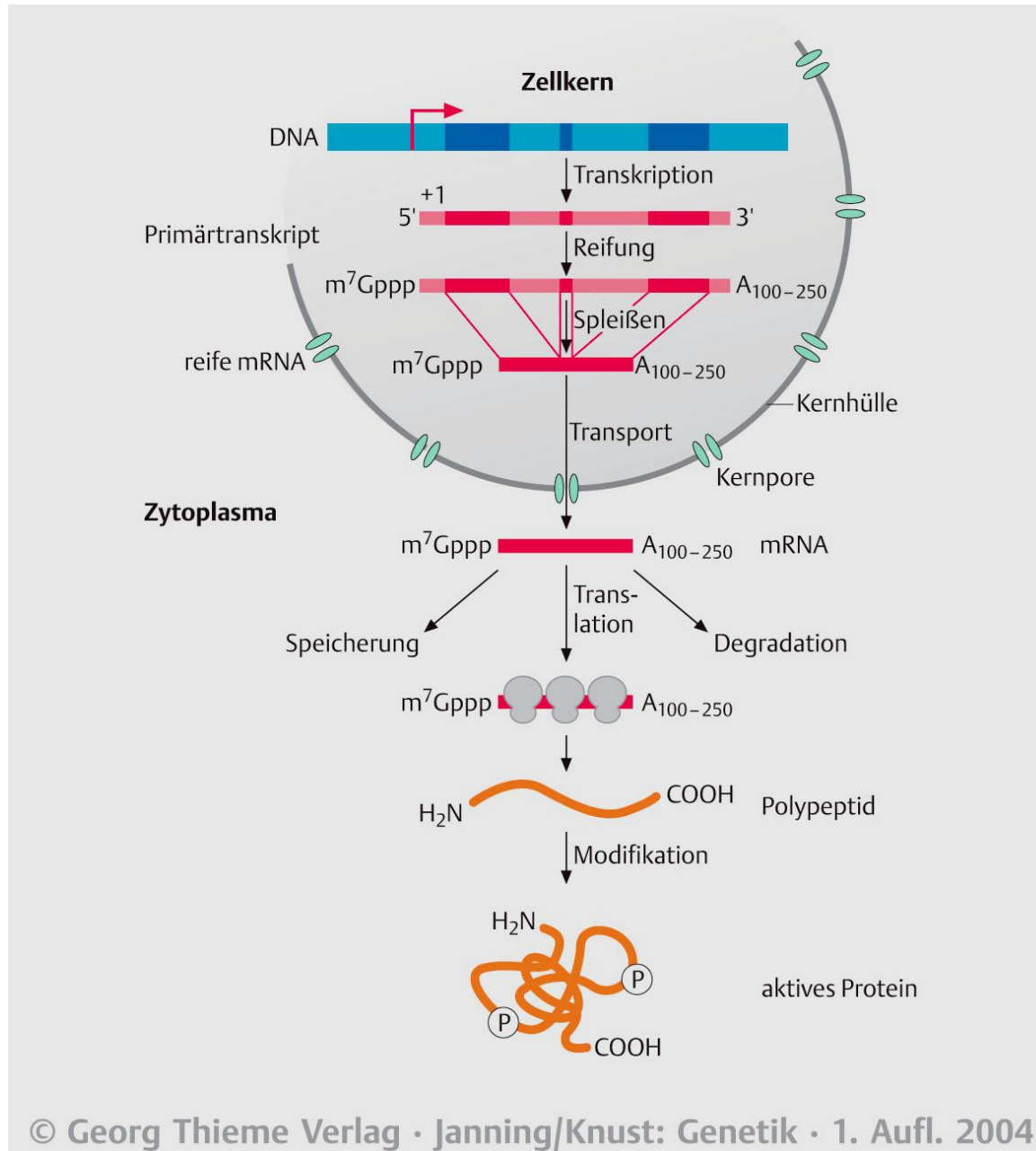
Rot – Acetylierungen, Blau – Phosphorylierungen, Gelb – Methylierungen,
Auch andere Modifizierungen sind möglich!

Entsteht so ein epigenetischer Code??



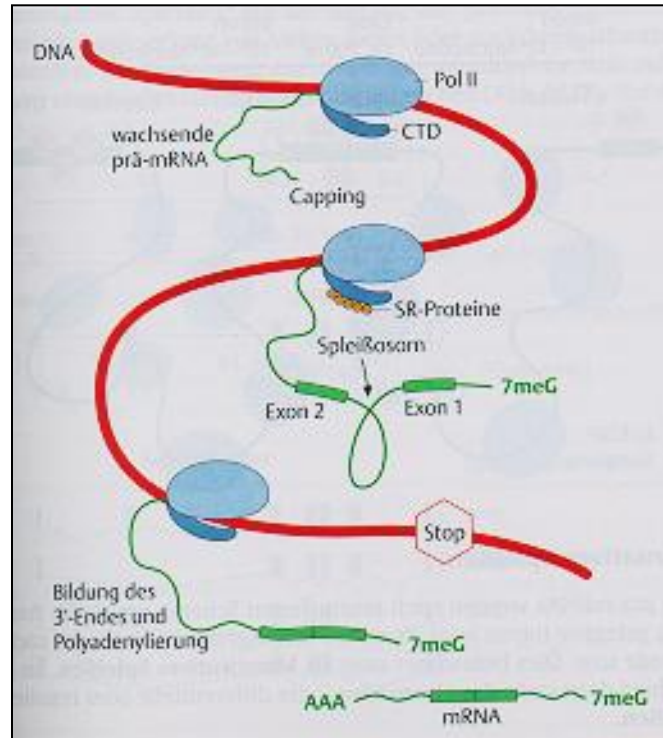


Ebenen der Genregulation bei Eukaryoten



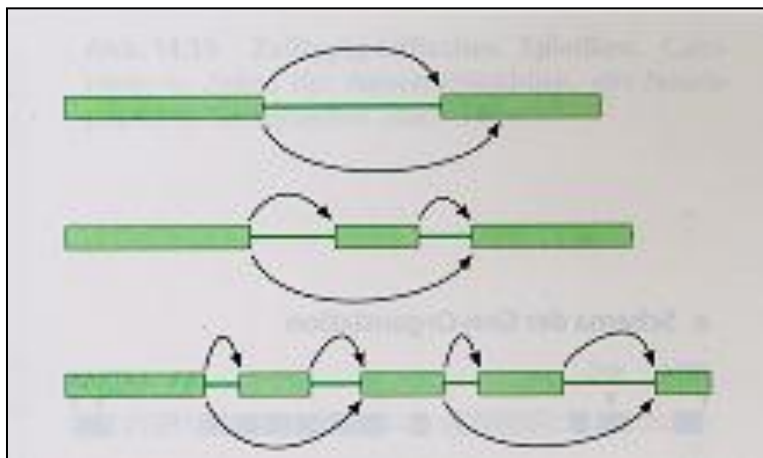
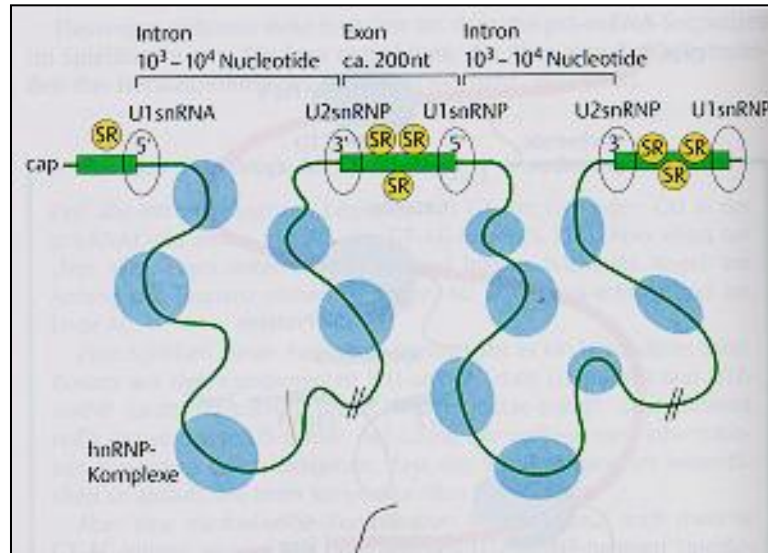
Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

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

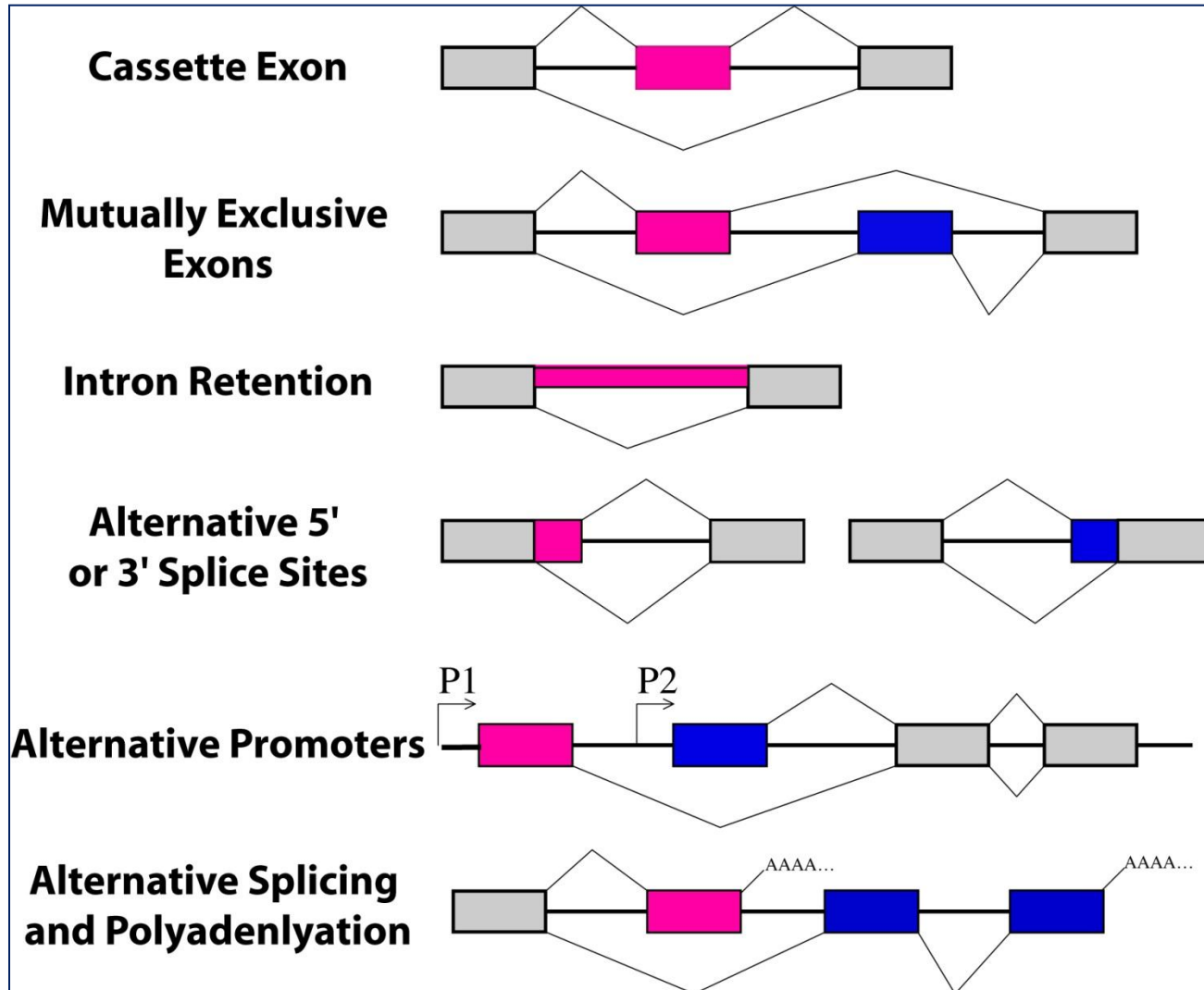
PUR

Universität Rostock



Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

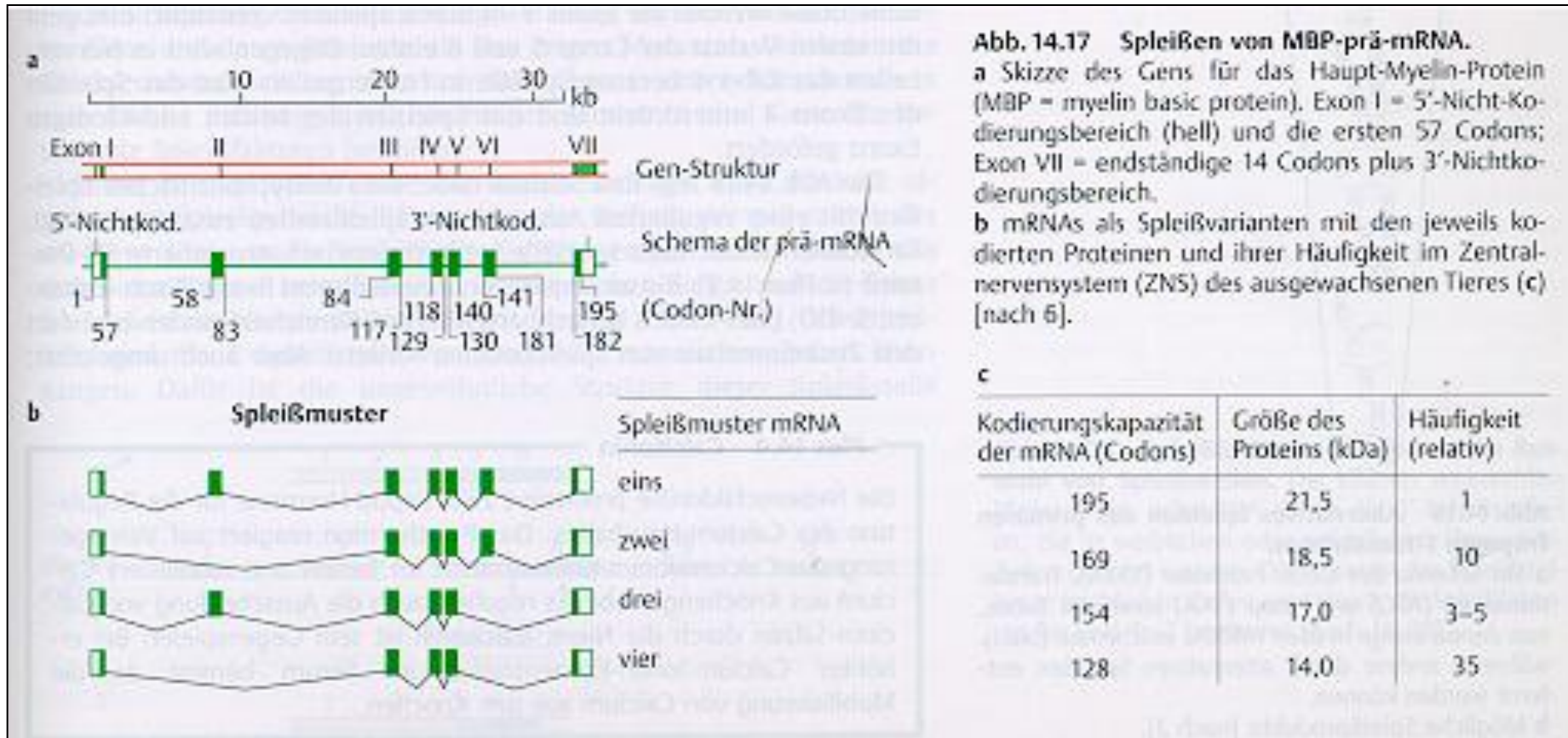
Typen von alternativem Spleißen



Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

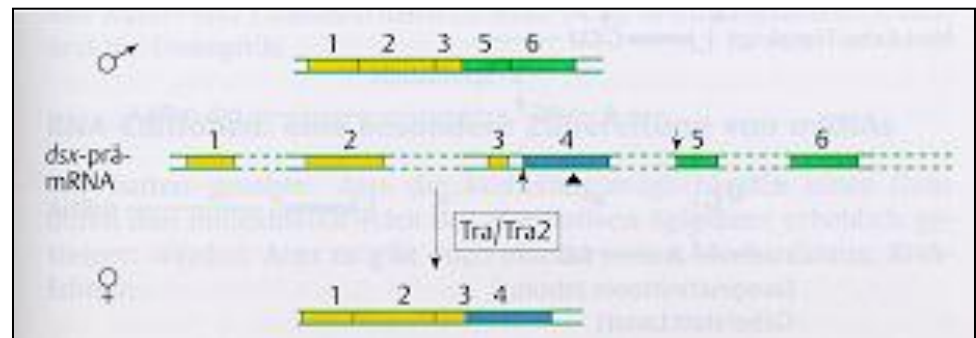
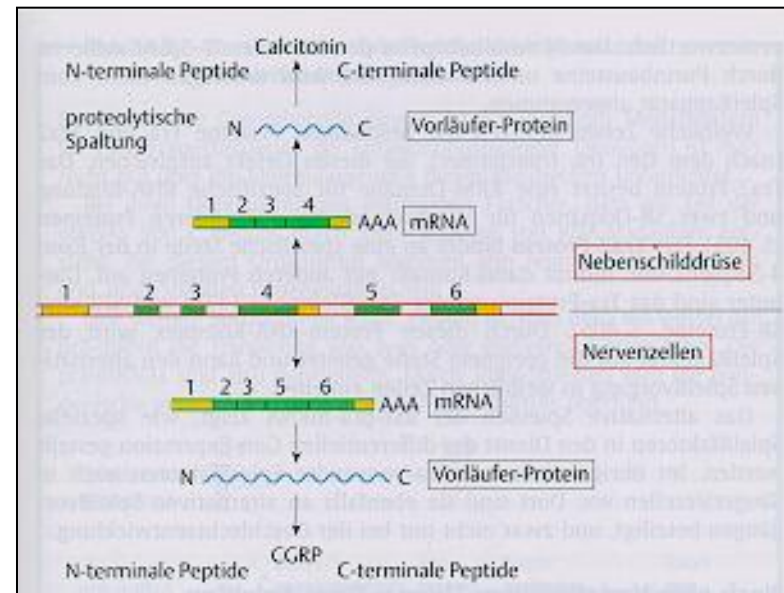
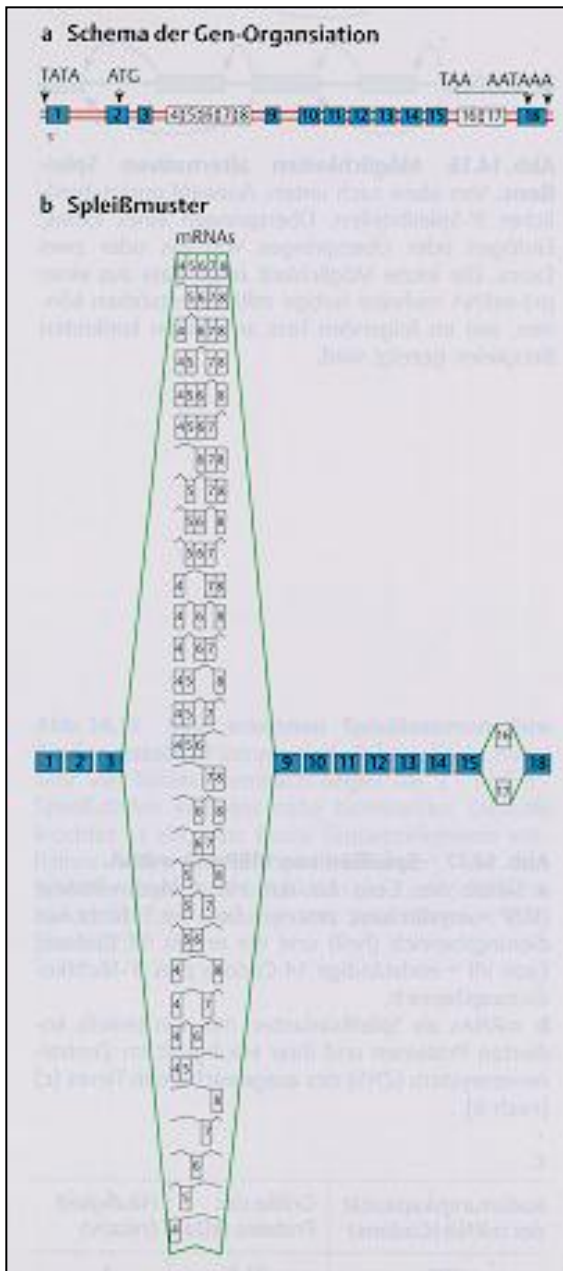
prä-mRNA kann alternativ gespleißt werden
z.B. Haupt-Myelin-Protein im Gehirn

(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

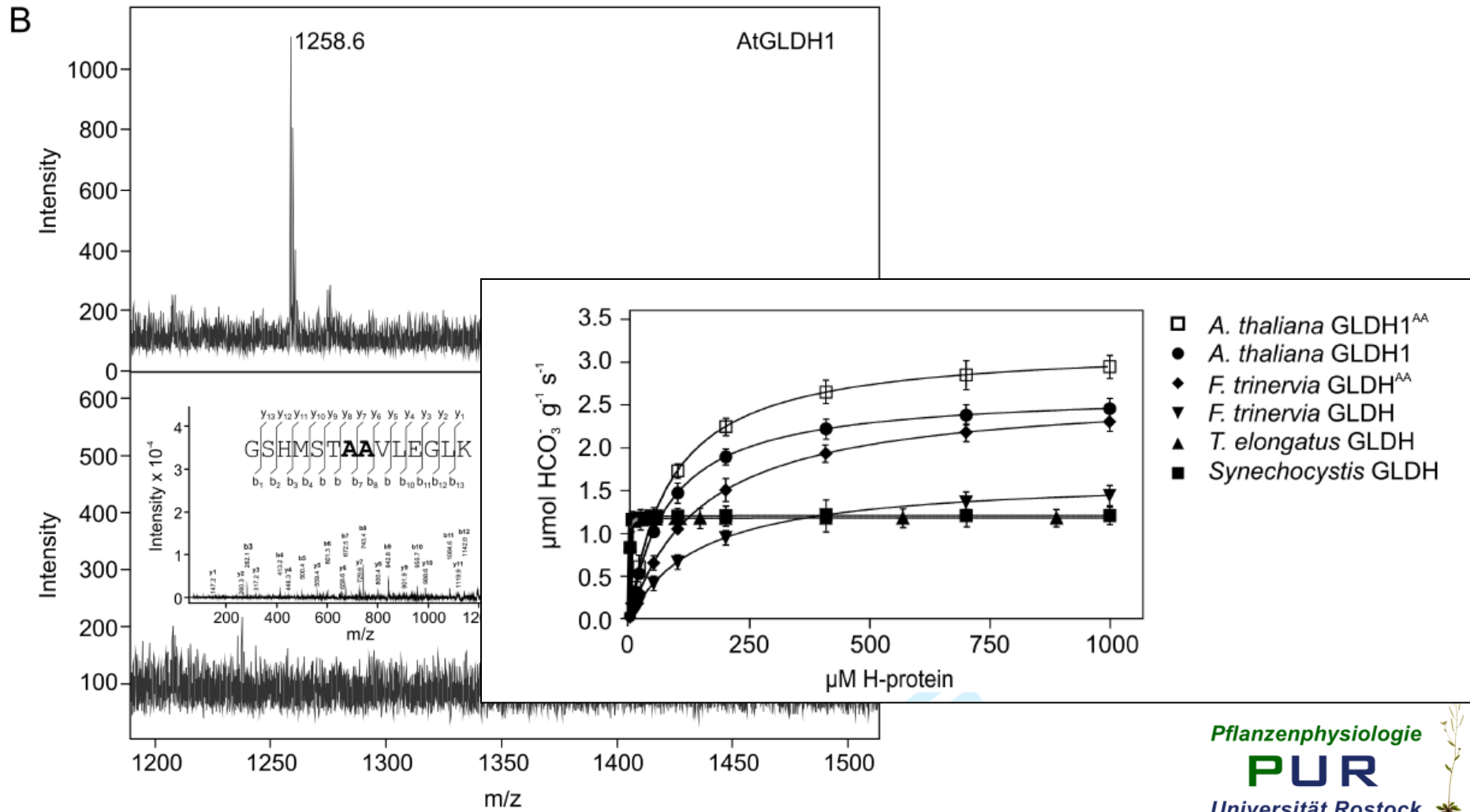


A

<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	GSHMMTLTYPEDLQYLDSHEYLRLEG...

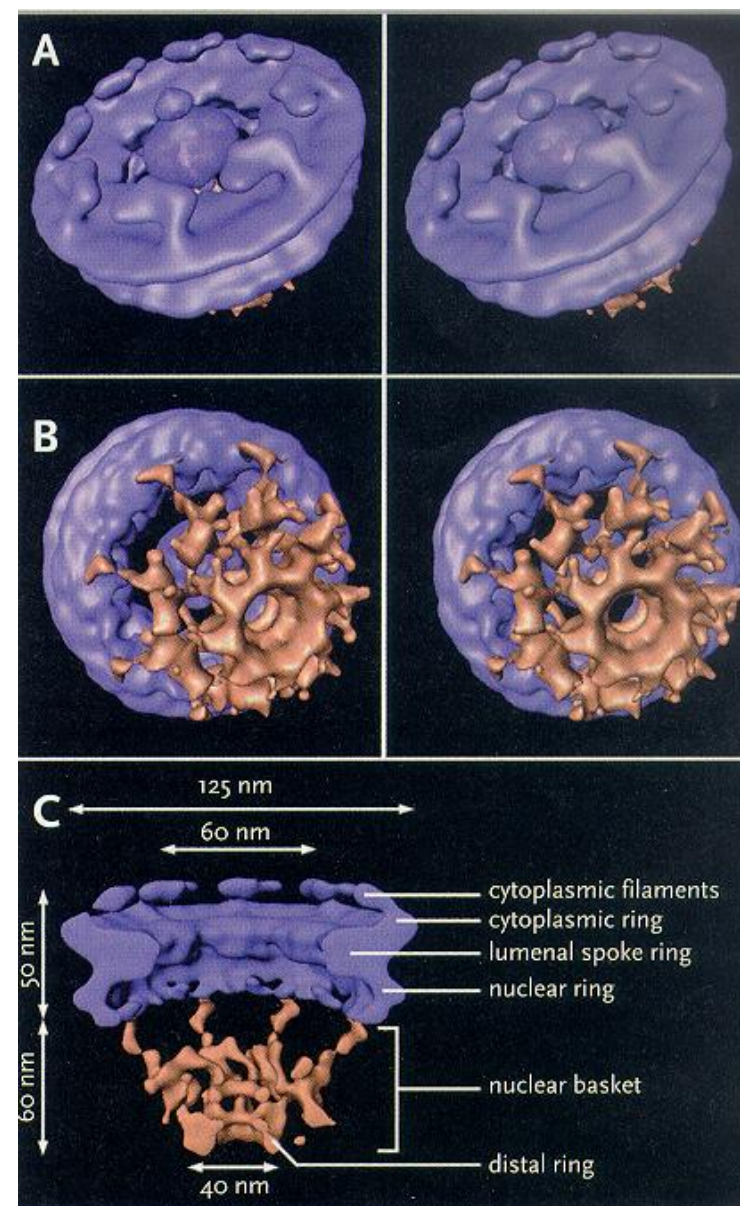
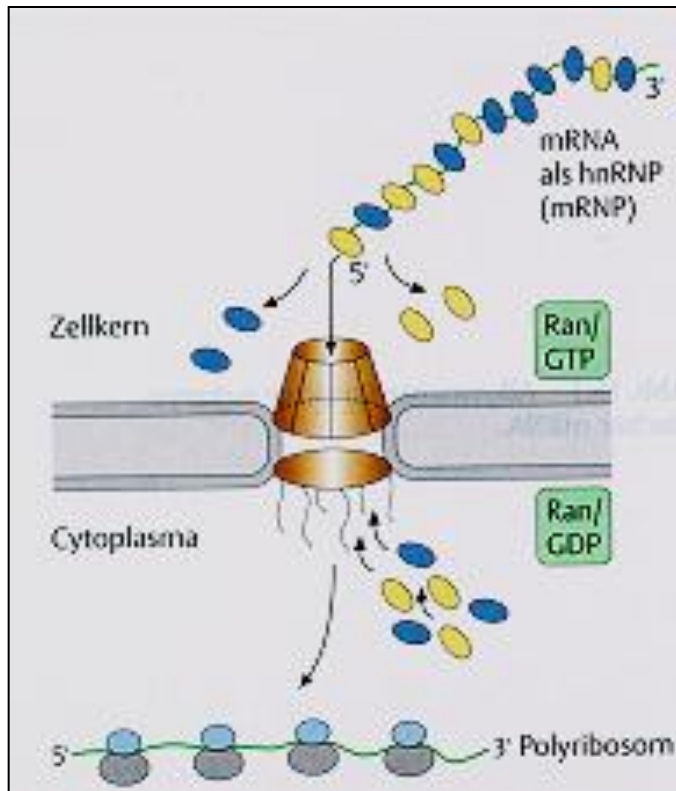
Alternatives Splicen der H-Protein-UE des GDC erhöht dessen Aktivität

Hasse et al. 2008



Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

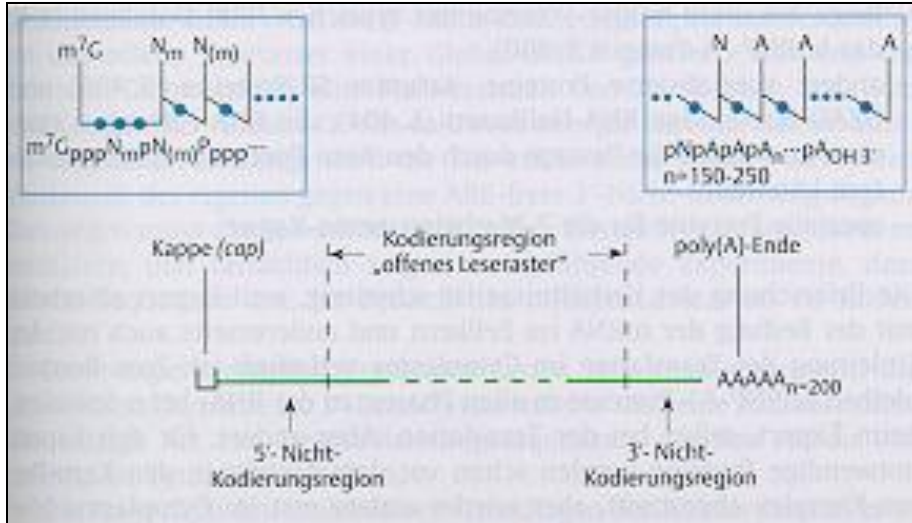
reife mRNA wird in das Cytoplasma exportiert
Komplex mit speziellen Ribonucleoproteinen



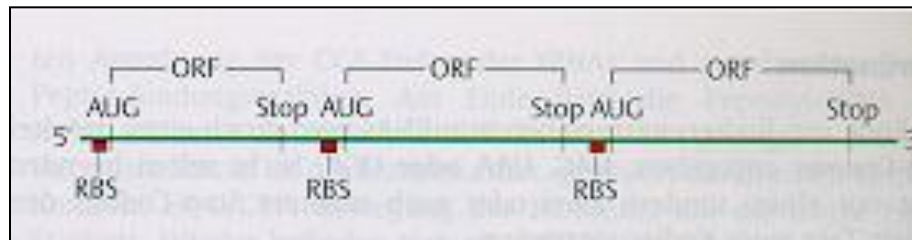
THE BIG PORE: A and B are stereoviews of the *Dictyostelium* nuclear pore structure from the cytoplasmic side and the nuclear side, respectively. C shows a cutaway view of the pore with dimensions indicated and the central plug/transporter removed. (From M. Beck et al., *Science*, 306:1387–90, 2004.)

Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

Struktur der reifen mRNA im Cytoplasma Vergleich mit bakterieller mRNA



- monocistronisch, 1 ORF
- cap am 5' Ende
- 5' nichttranslatierte Region (5' UTR)
- ORF eingerahmt von Start- und Stopcodon
- 3' nichttranslatierte Region (3' UTR)
- Poly-A-Schwanz

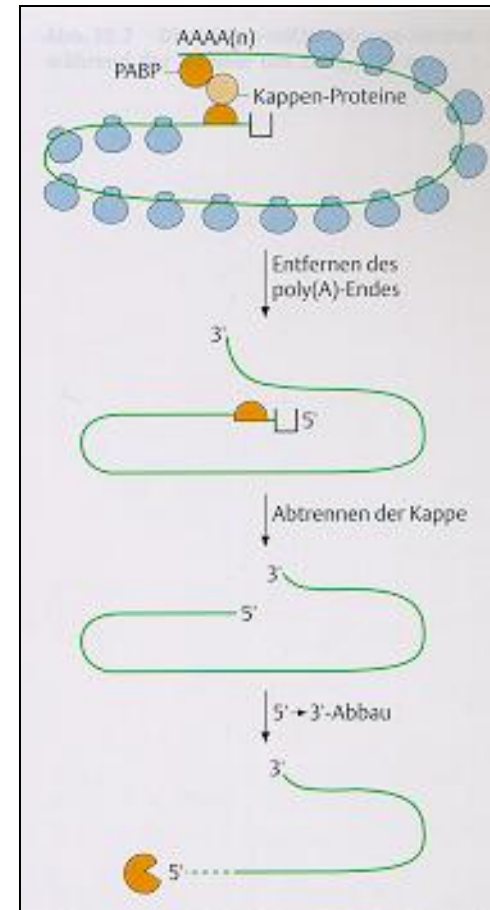
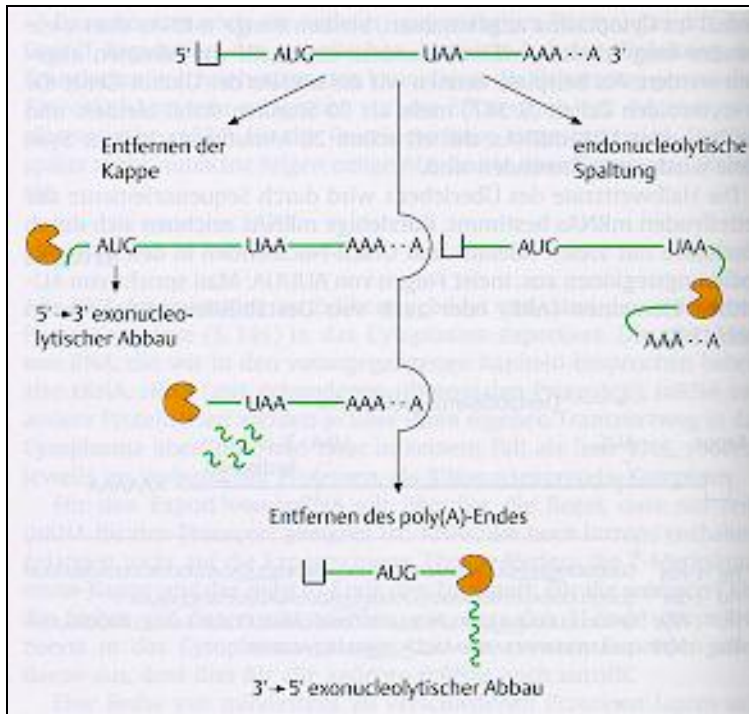


- meist polycistronisch, mehrere ORFs
- 5' nichttranslatierte Region (5' UTR)
- RBS- Ribosomenbindestelle vor AUG
- ORFs eingerahmt von Start- und Stopcodon
- 3' nichttranslatierte Region (3' UTR)
- Terminationshaarnadel



Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

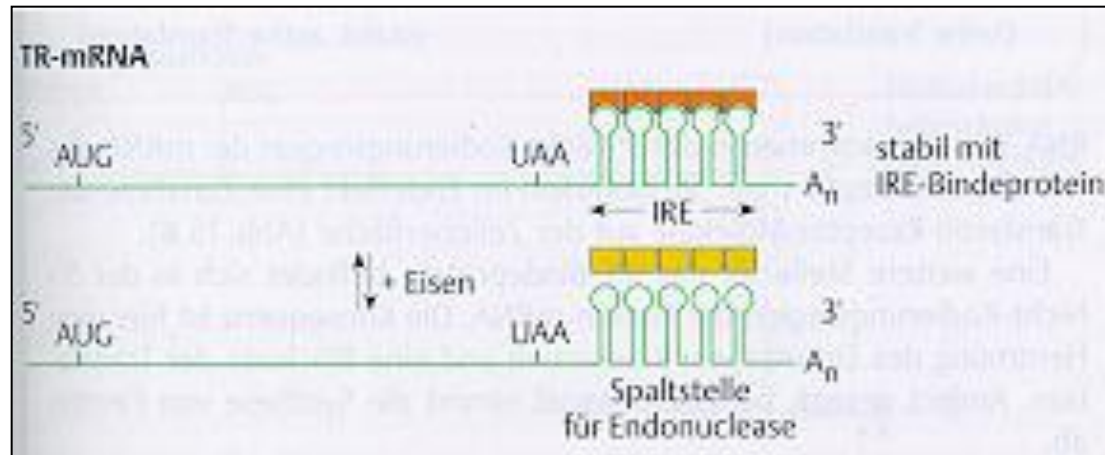
Abbauwege für mRNAs, Halbwertszeit
PolyA-Schwanz und Kappe schützen vor Abbau



Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

Stabilität der mRNA in der Zelle

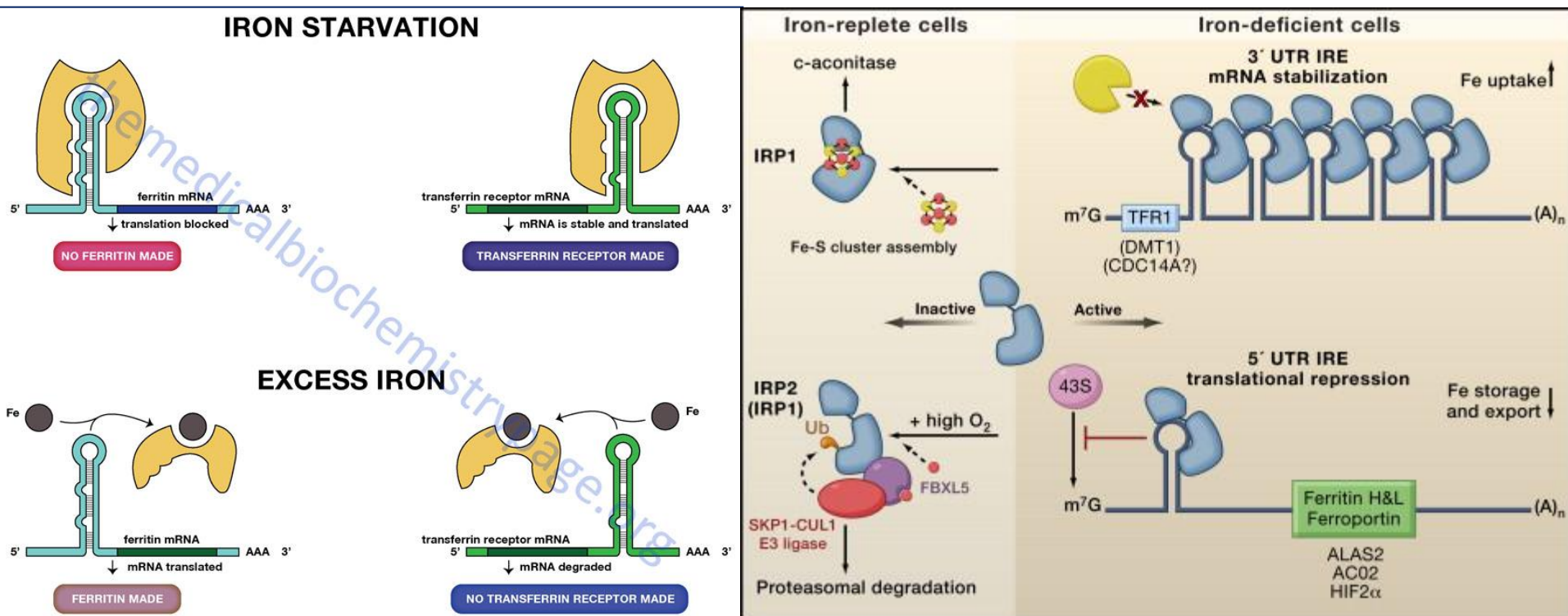
Stabilitätssequenzen können durch Proteine gebunden werden



Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

Stabilität der mRNA in der Zelle

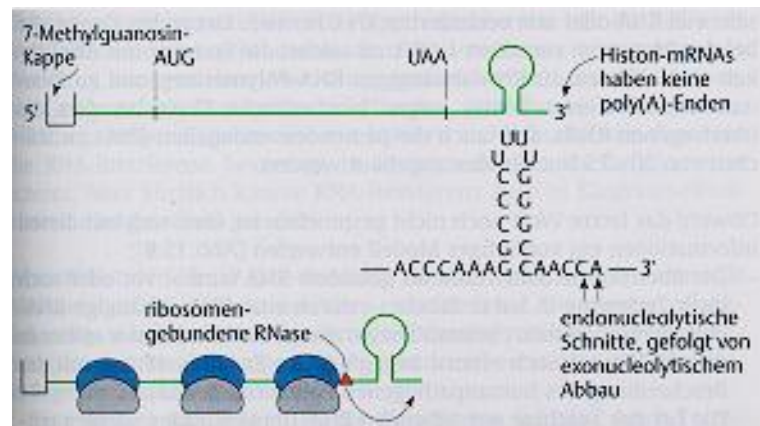
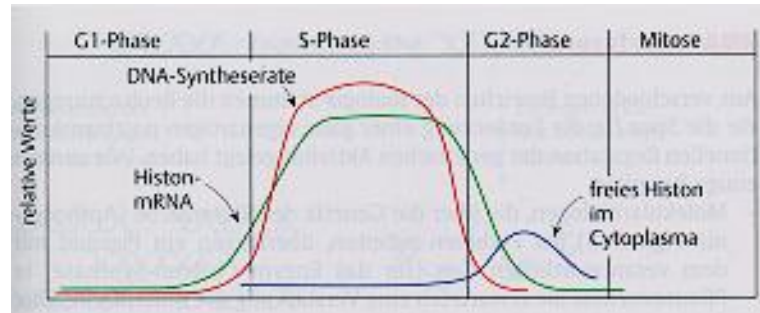
Eisenregulierte Proteine in Säugetieren werden auf mRNA-Ebene reguliert
Aconitase dient als Fe-Sensor



Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

Stabilität der mRNA in der Zelle

Koordinierung von DNA-Synthese und Histonmenge durch Destabilisierung von Histon-mRNA durch freies Histon (ähnlich ribosomale Proteine)

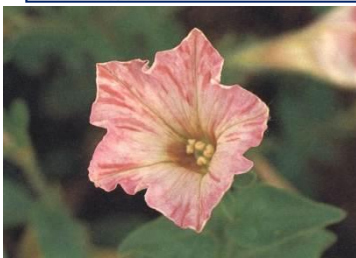
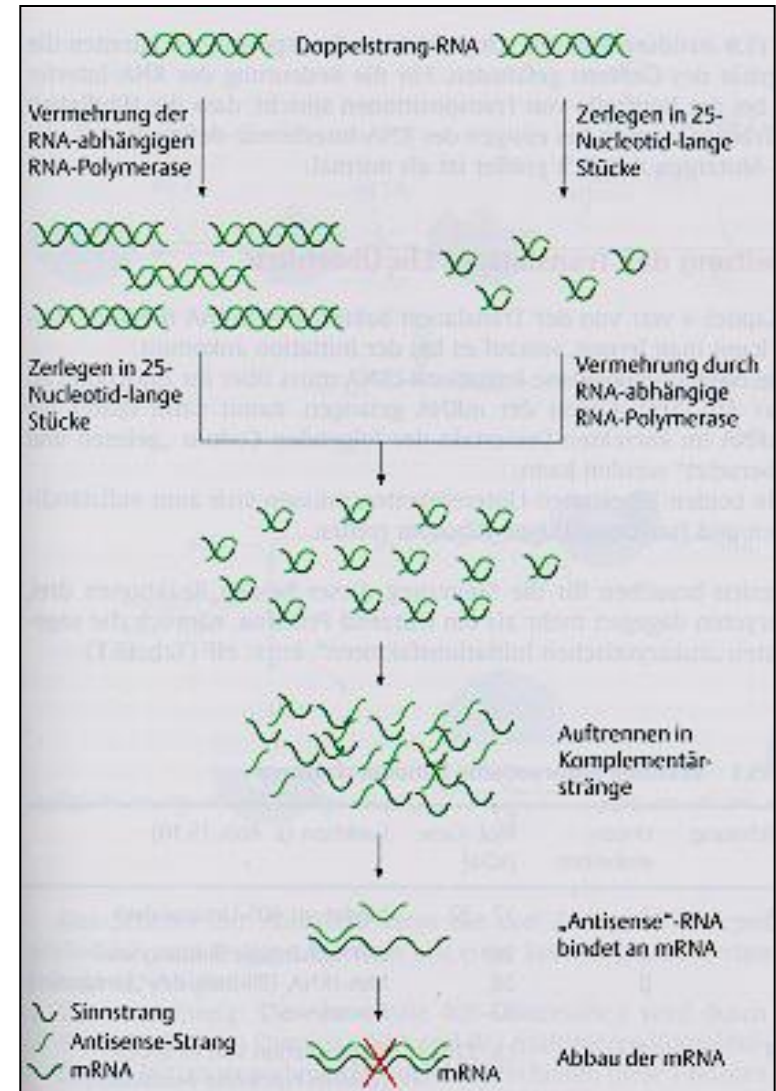
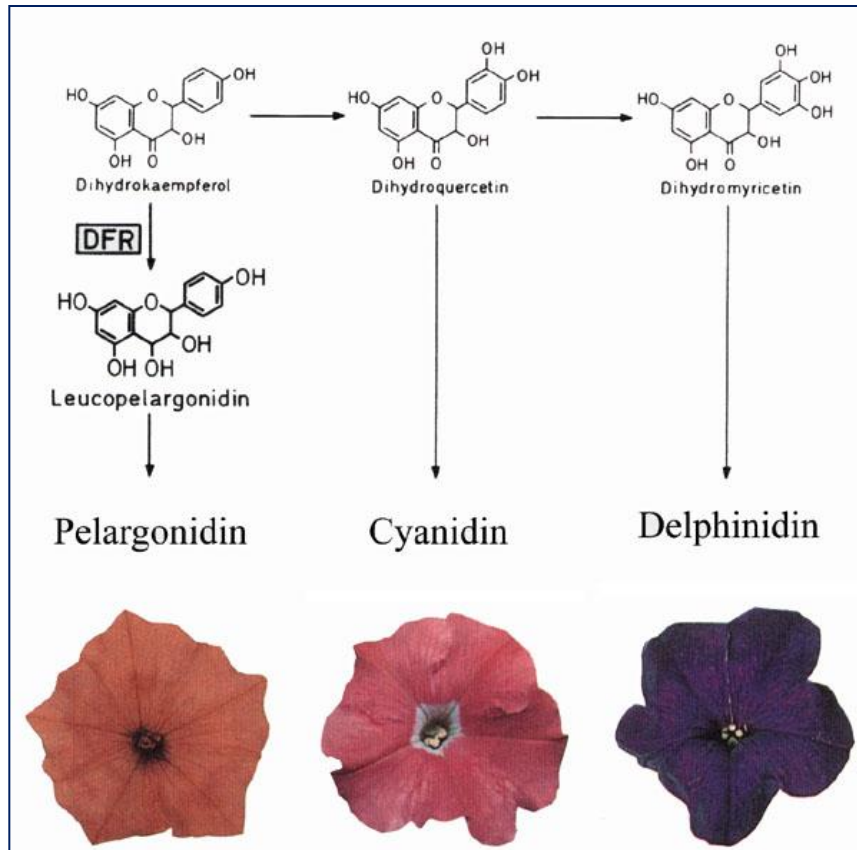


Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

Stabilität der mRNA in der Zelle – RNA-Interferenz (RNAi)

Petunienexperiment am MPI Köln

posttranscriptional gene silencing – PTGS, heute siRNA, miRNA



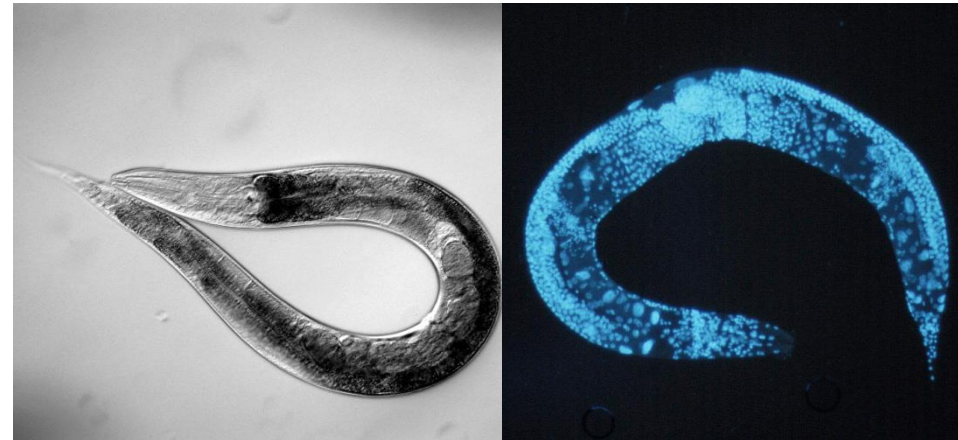
Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

Durch externe Zugabe kleiner RNAs lassen sich Gene ausschalten!

In 2006, [Andrew Fire](#) and [Craig C. Mello](#) shared the [Nobel Prize in Physiology or Medicine](#) for their work on RNA interference in the [nematode](#) worm *C. elegans*, which they published in 1998.



RNAi has become a valuable research tool, both in [cell culture](#) and in living organisms, because synthetic dsRNA introduced into cells can selectively and robustly induce suppression of specific genes of interest. RNAi may be used for large-scale screens that systematically shut down each gene in the cell, which can help identify the components necessary for a particular cellular process or an event such as [cell division](#). The pathway is also used as a practical tool in [biotechnology](#) and [medicine](#).



http://en.wikipedia.org/wiki/RNA_interference

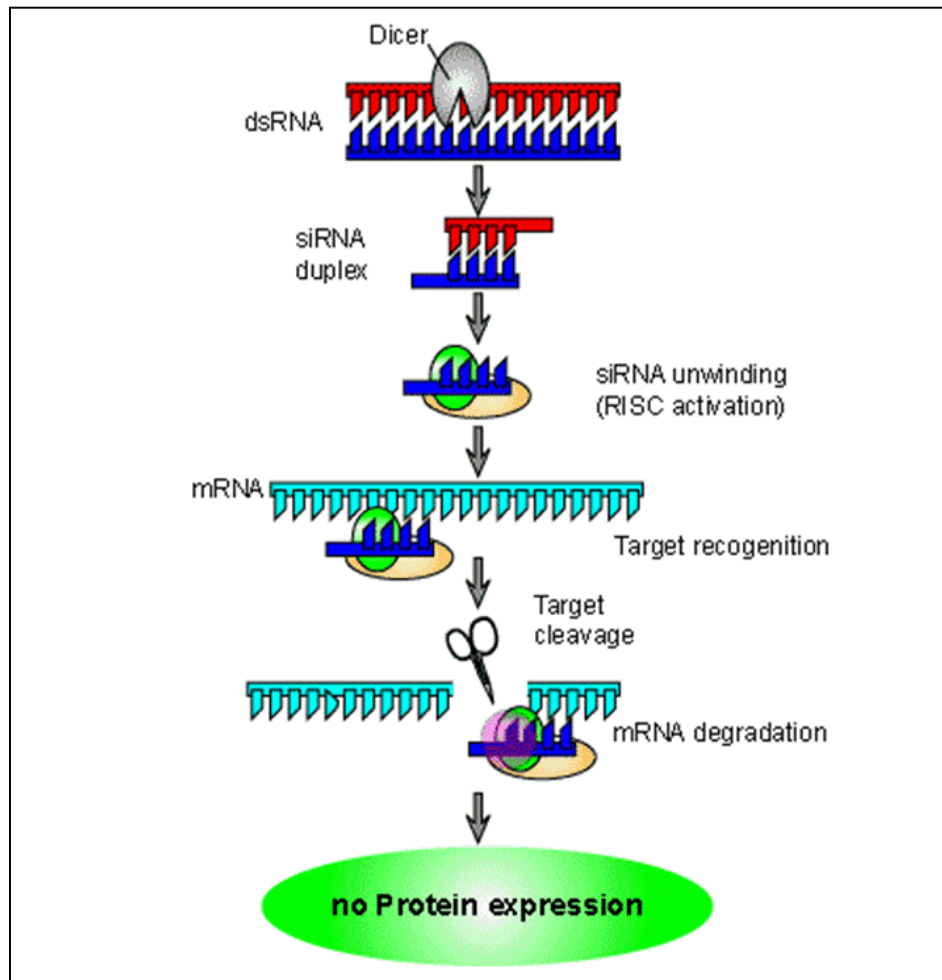
Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

Kleine RNAs spielen eine regulatorische Rolle!

Ca. 40% des nichtcodierenden Bereiches im humanen Genom ist exprimiert!

Es wurden ca. 8000 microRNAs vorausgesagt!

Darunter sind Primaten- und Gehirn-spezifische microRNAs!



Biospektrum Oktober 2006

miRNA – micro RNA

siRNA – short-interfering
RNA

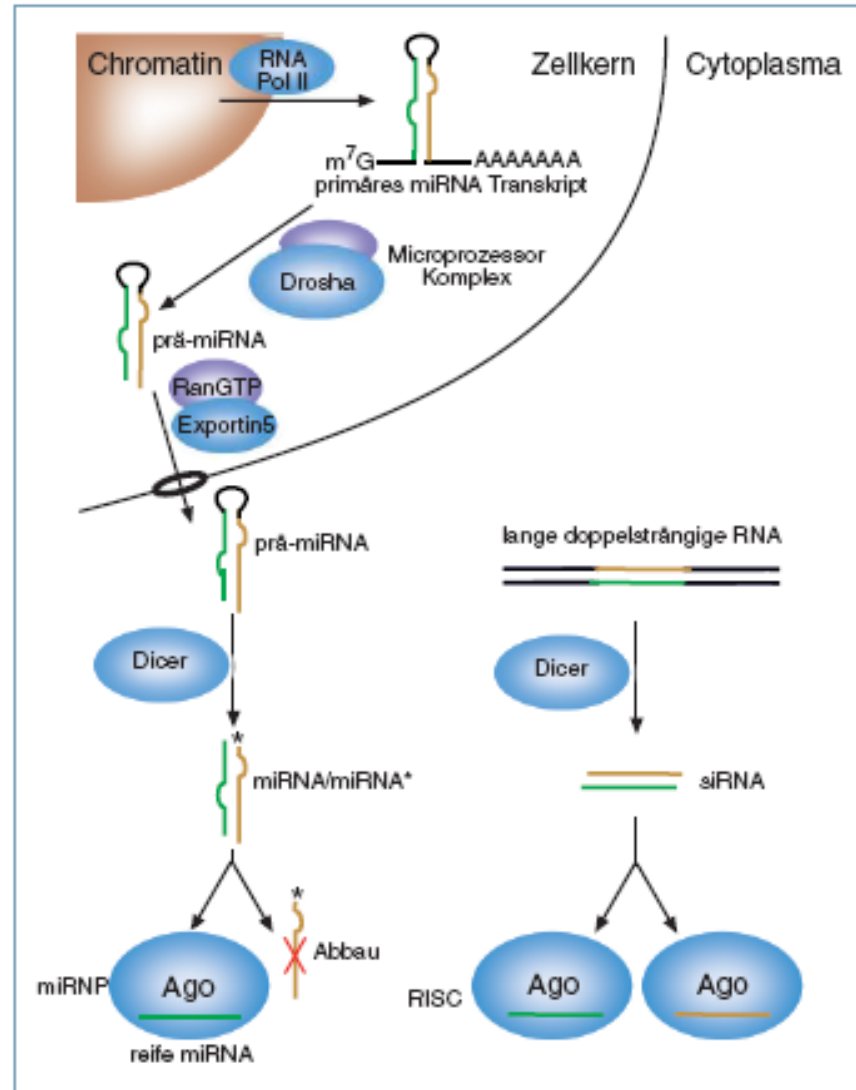
Drosha – RNaseIII

DICER – RNaseIII

RNaseIII macht 2 bp Überhänge

RISC – RNA induced silencing
complex

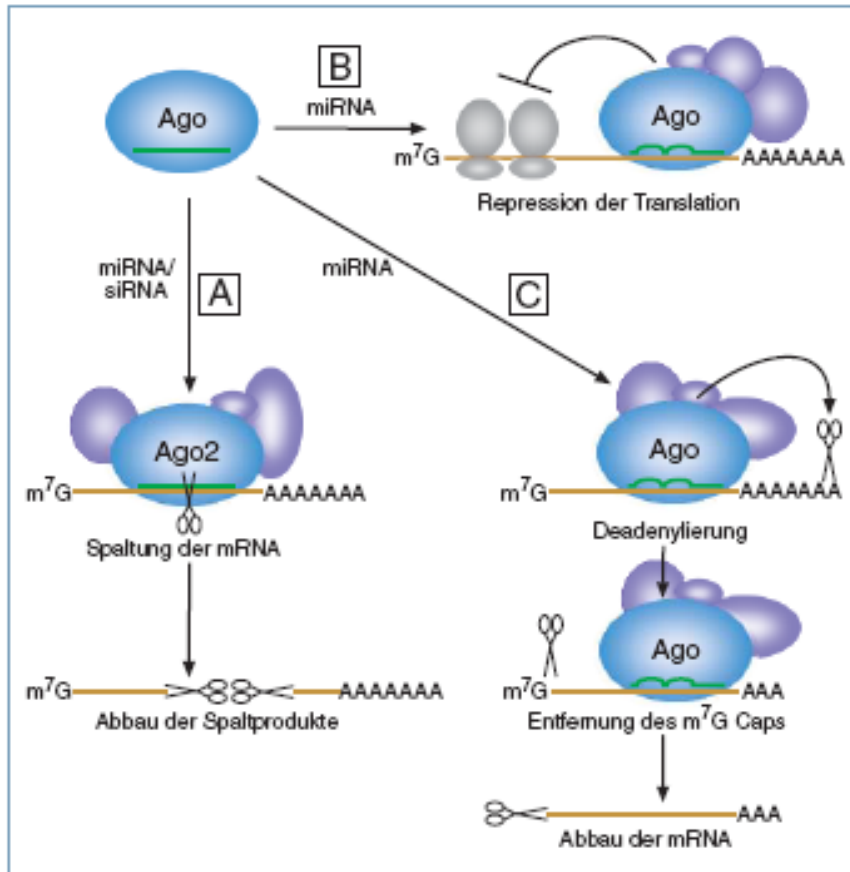
Ago – Argonauten Proteine (RNA
Bindung und Endonucleasen)



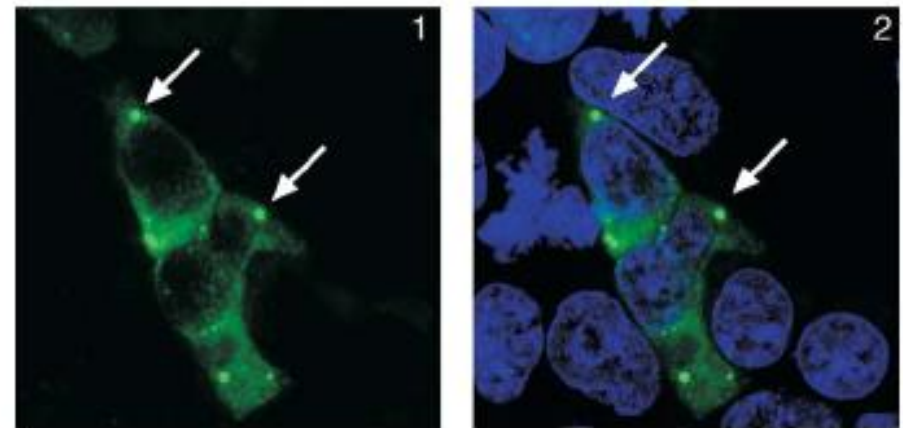
▲ Abb. 1: Schematische Darstellung der Biogenese von miRNAs und siRNAs. Details siehe Text.
m⁷G, 7-Methyl-Guanin; AAAA, Poly-A-Schwanz.



Wirkungsweise von kleinen RNAs mit Hilfsproteinen



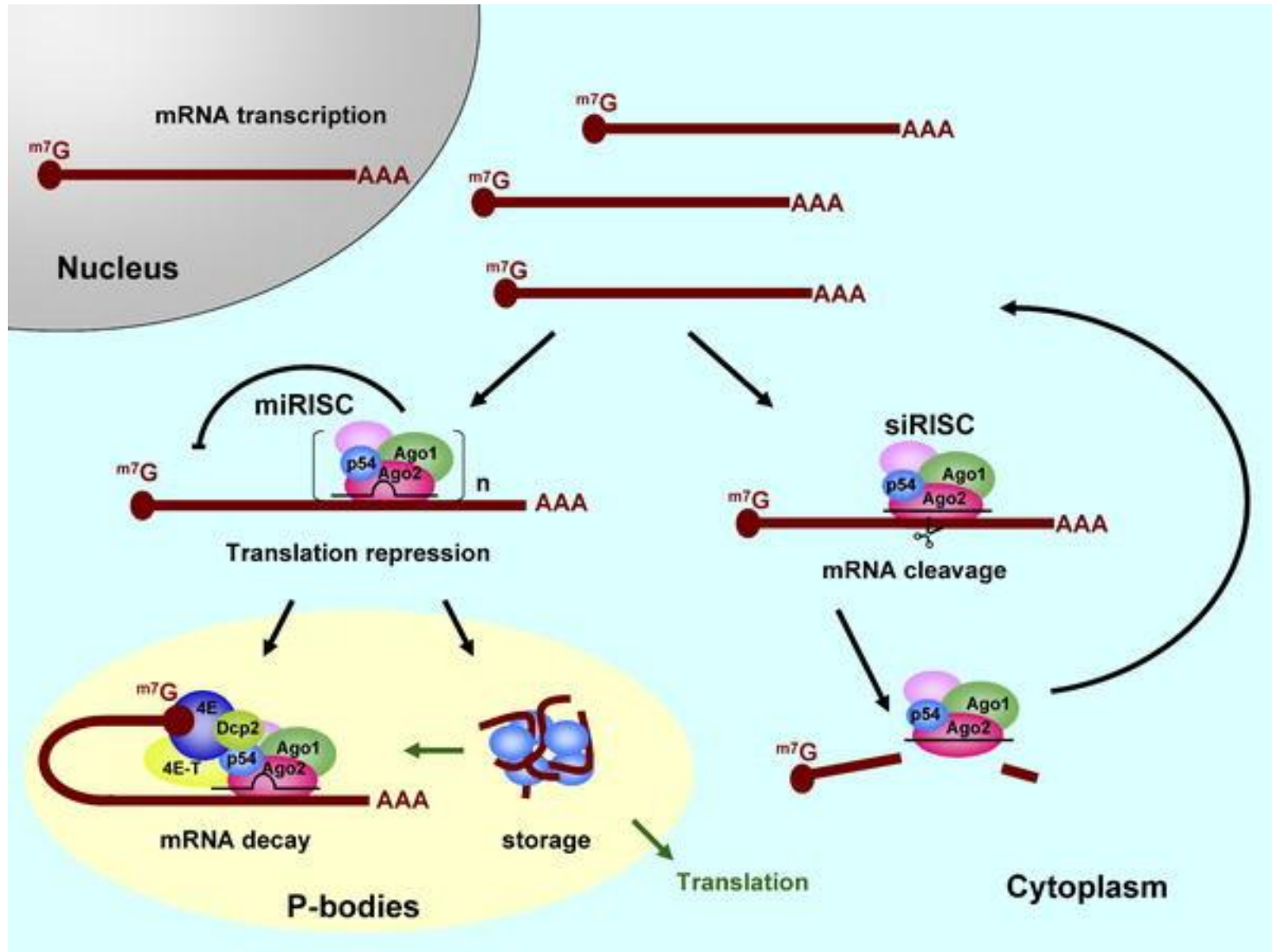
▲ Abb. 2: Schematische Darstellung der Funktion von miRNAs. miRNAs können sowohl die Stabilität ihrer Ziel-mRNAs (A, C) als auch deren Translation (B) beeinflussen. m⁷G, 7-Methyl-Guanin; AAAAA, Poly-A-Schwanz.



▲ Abb. 3: Lokalisation von Argonaut-Proteinen in HEK 293 Zellen. Teilabbildung 1 zeigt die Färbung mit anti-Argonaut-Antikörpern. P-bodies sind durch Pfeile gekennzeichnet. In Teilabbildung 2 sind die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

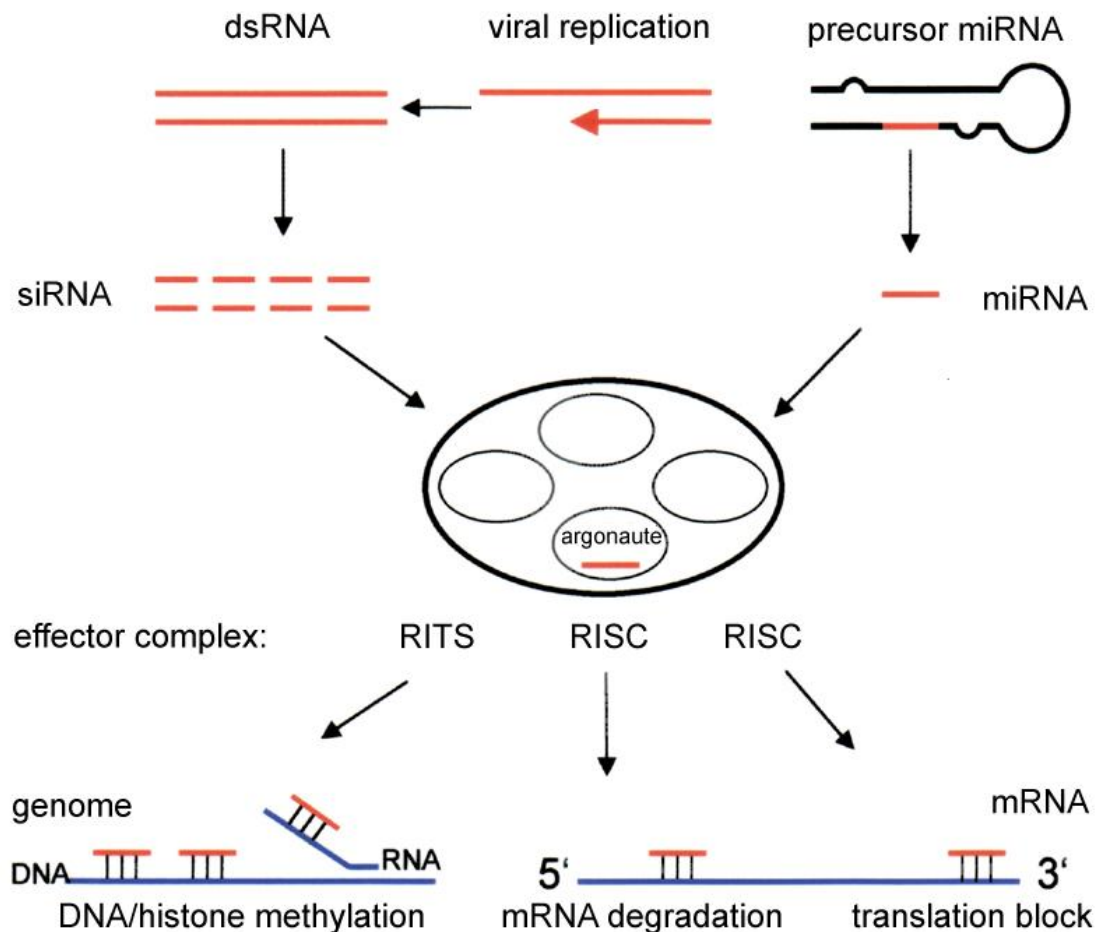


Wirkungsweise von kleinen RNAs mit Hilfsproteinen auf RNA-Stabilität bzw. Translation



Wirkungsweise von kleinen RNAs mit Hilfsproteinen auf Histon-Modifikation, RNA-Editing etc.

RNA-induced Transcription Silencing



Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

Kleine regulatorische RNAs wurden in allen Genomen gefunden

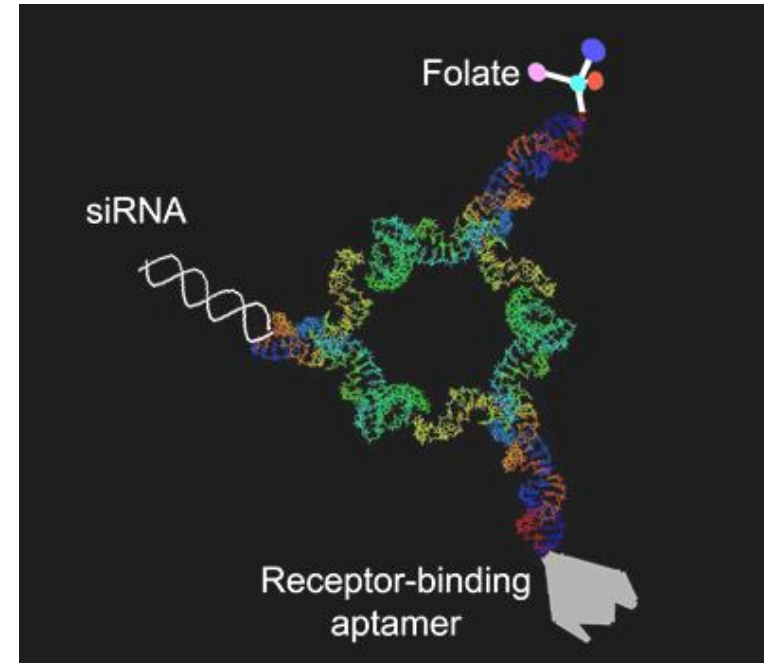
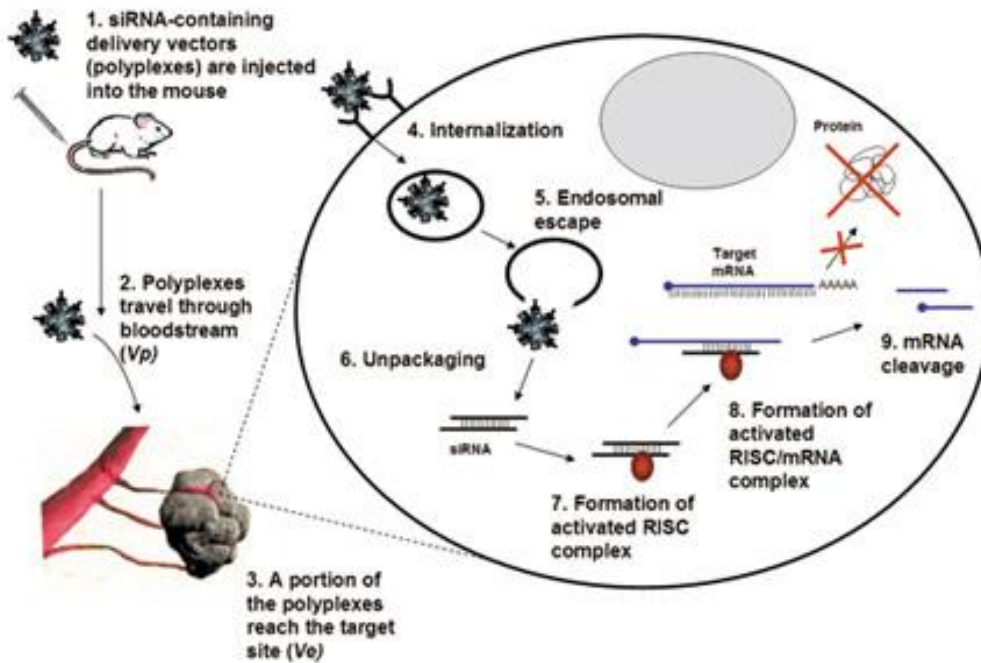
Table 1. Schemes for detecting small RNAs in genomes

Organism	Search criteria	Comments/Predictions	Confirmed RNAs	Reference
<i>E. coli</i>	1) Conserved sequence in IG 2) Stem-loops and/or microarray signal		16 sRNAs, 6 ORFs/ 60 tested	(Wassarman et al. 2001)
<i>E. coli</i>	Conserved structure in IG	275 candidates	11/49 tested	(Rivas et al. 2001)
<i>E. coli</i>	1) Orphan promoters, terminators in IG regions 2) Conserved sequences		14/23 tested	(Argaman et al. 2001)
<i>E. coli</i>	Orphan Promoters terminators at distances >45, <350 apart	227 initial candidates: 144 possible sRNA	7/8 tested novel; 6 others found previously	(Chen et al. 2002)
<i>M. jannaschi</i>	(G+C)% and CG dinucleotides	tRNAs, rRNAs found	19 candidates; none tested	(Schattner 2002)
<i>M. jannaschi</i>	High GC regions	tRNAs, rRNAs found	4/9 tested	(Klein et al. 2002)
<i>P. furiosus</i>	High GC, conserved sequence		4/8 tested	(Klein et al. 2002)
	Conserved structure in IG		4/17 tested	(Klein et al. 2002)
<i>A. fulgidus</i>	Transcript size (50–500 nt)	36/86 in known classes (snoRNAs)	86 (50 of unknown function)	(Tang et al. 2002)
Mouse	Transcript size (50–500 nt)	113/206: snoRNAs 26/201: in genes	201 (57 of unknown function)	(Huttenhofer et al. 2001)
<i>C. elegans</i>	Conservation, stem-loop structure, in IG	40 candidates	3/40 tested	(Lee and Ambros 2001)
	Transcript Size (22 nt), conserved stem-loop	38 candidates	13/13 tested	(Lee and Ambros 2001)
<i>C. elegans</i>	Transcript size (18–26 nt), 5'P, 3' OH	Stem-loop precursors	55 new microRNAs	(Lau et al. 2001)
<i>D. melanogaster</i>	Homology/proximity	3 found near others		
HeLa cells	Transcript size (19–25 nt)	Stem-loop precursors for microRNAs	16 novel microRNAs 21 novel microRNAs	(Lagos-Quintana et al. 2001) (Lagos-Quintana et al. 2001)
Mouse	Transcript size (19–25 nt)	Tissue-specific expression; Stem-loop precursors	34 novel microRNAs	(Lagos-Quintana et al. 2002)
<i>Arabidopsis</i>	Transcript size (22 nt), 5'-P, 3'OH ends	MicroRNAs; Stem-loop precursors; 2 without stem-loop	16/16 microRNAs; 1/2 others	(Reinhart et al. 2002)

All small RNAs listed here as confirmed were either predicted by the means indicated and then confirmed by Northern blot or were originally detected as a transcript. Purely computational approaches make significantly larger predictions of possible small RNAs; some of these predictions have been tested, and those that are confirmed are presented here. Others predicted but not confirmed may include conserved secondary structure elements in intergenic regions associated with mRNAs (for instance, terminator/antiterminator sequences).

Kleine RNAs gegen Krebs

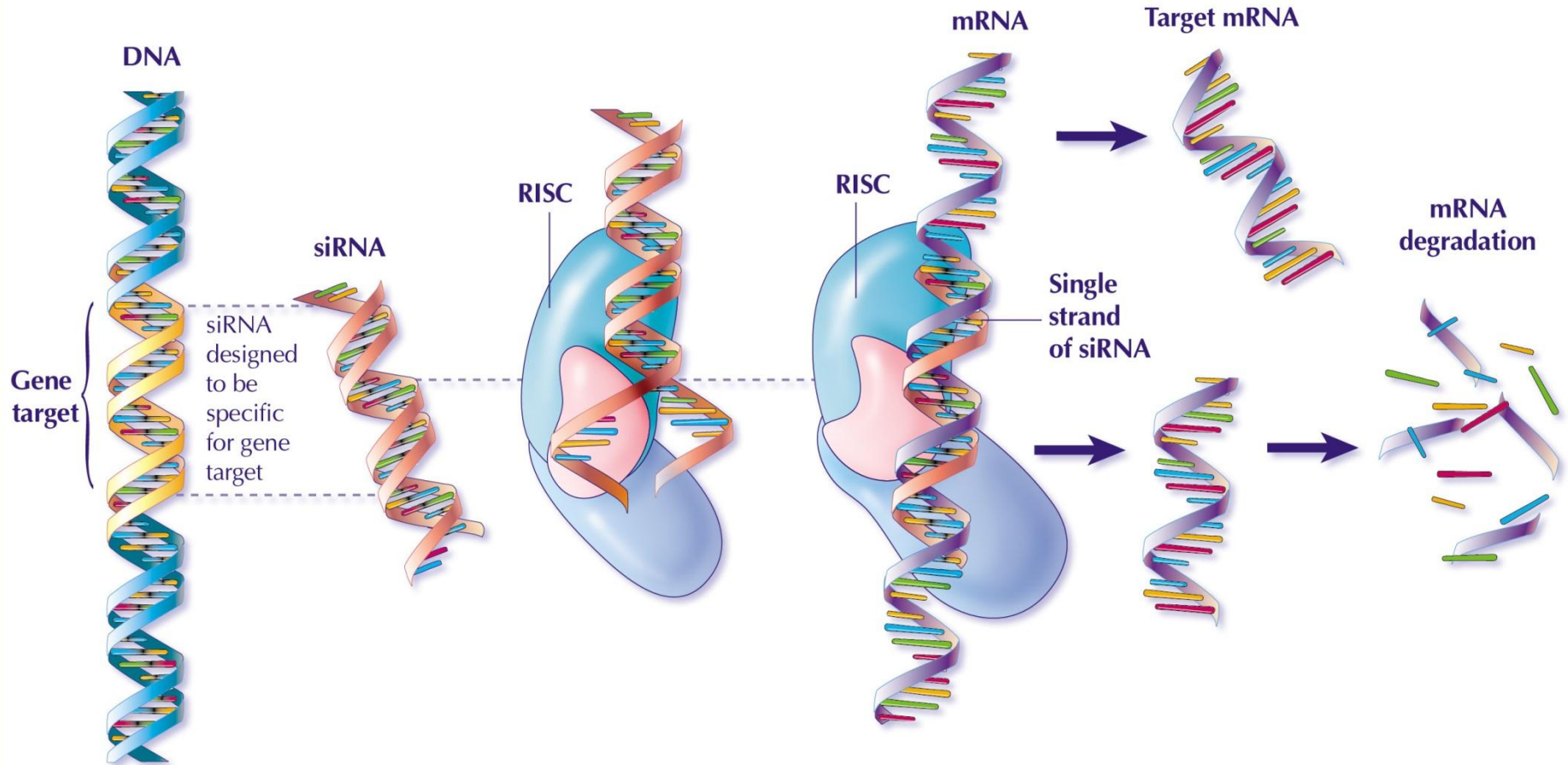
Gentech meets Nanotechnology



Kleine RNAs für/gegen Alles

siRNA Synthesis

RNA Interference



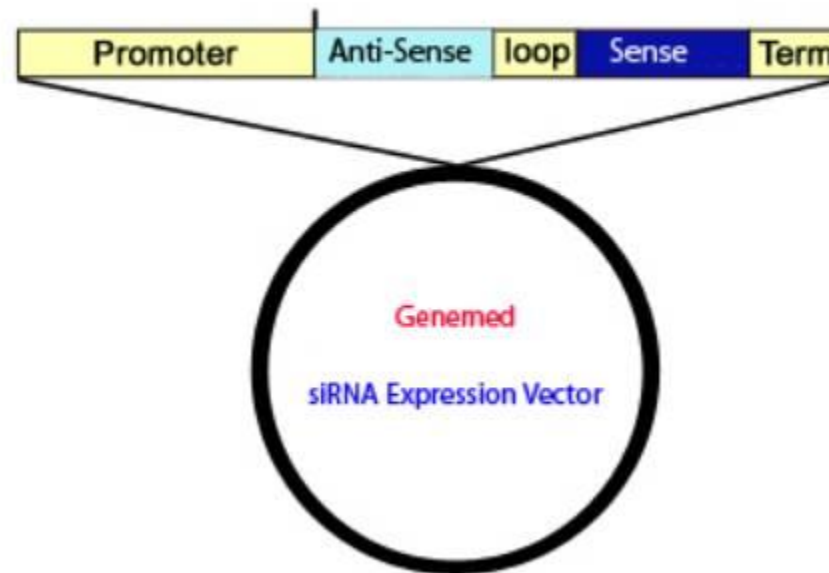
siRNA is targeted to a specific gene. This can occur through a natural process or be designed through chemical synthesis.

Within cells, siRNA unwinds and is incorporated into RISC, a stable protein-RNA complex.

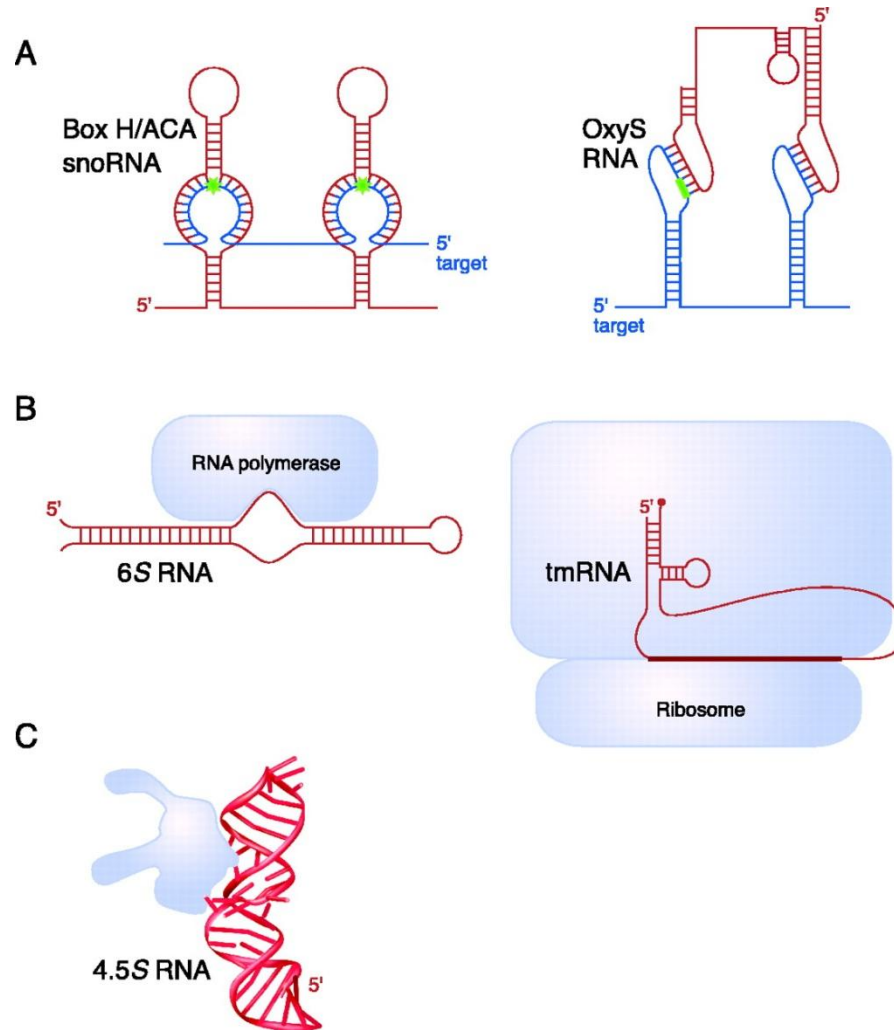
siRNA is directed to a targeted mRNA that is known to be involved in a disease pathway.

This mRNA is cleaved and undergoes degradation, thereby interrupting the protein synthesis of the targeted gene.

Kleine RNAs selber gemacht



Kleine RNAs – Bakterien können das natürlich auch



G. Storz Science 296, 1260 -1263 (2002)

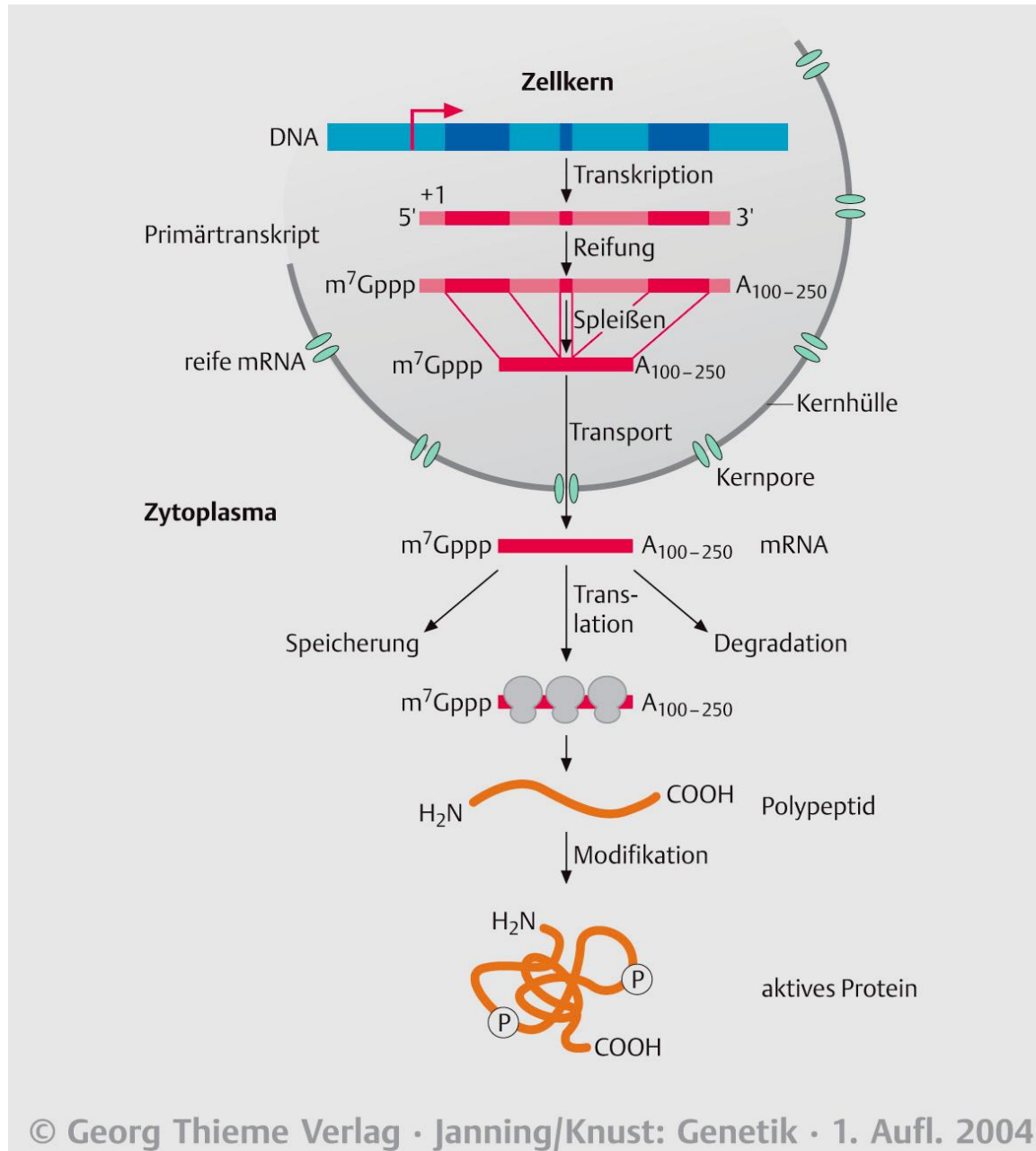
Zusammenfassung posttranskriptionelle Kontrolle

- Spielt insbesondere bei Eukaryoten eine sehr wichtige Rolle
- Zwei prinzipielle Mechanismen – mRNA Halbwertszeit bzw. Translatierbarkeit
- mRNA Halbwertszeit durch Sequenz vorgegeben (auch „cap“ und Poly-A)
- Bindung von Proteinen kann stabilisieren

- Kleine regulatorische RNAs (RNAi) stellen eine universelle Ebene der Regulation dar
- miRNAs – extra Gen für RNA, keine 100% ige Komplementarität
- siRNA – komplementäre antisense RNA oder künstliche dsRNA
- Wirksame kurze ssRNA-Moleküle entstehen durch DICER und RISC-Komplexe
- Vermutlich mehr Gene für miRNAs (siRNAs) als proteinkodierende Gene
- Beeinflussen die mRNA Stabilität oder Translatierbarkeit der mRNA
- RNAi kann systemisch sein oder auch über Speicherformen wirken

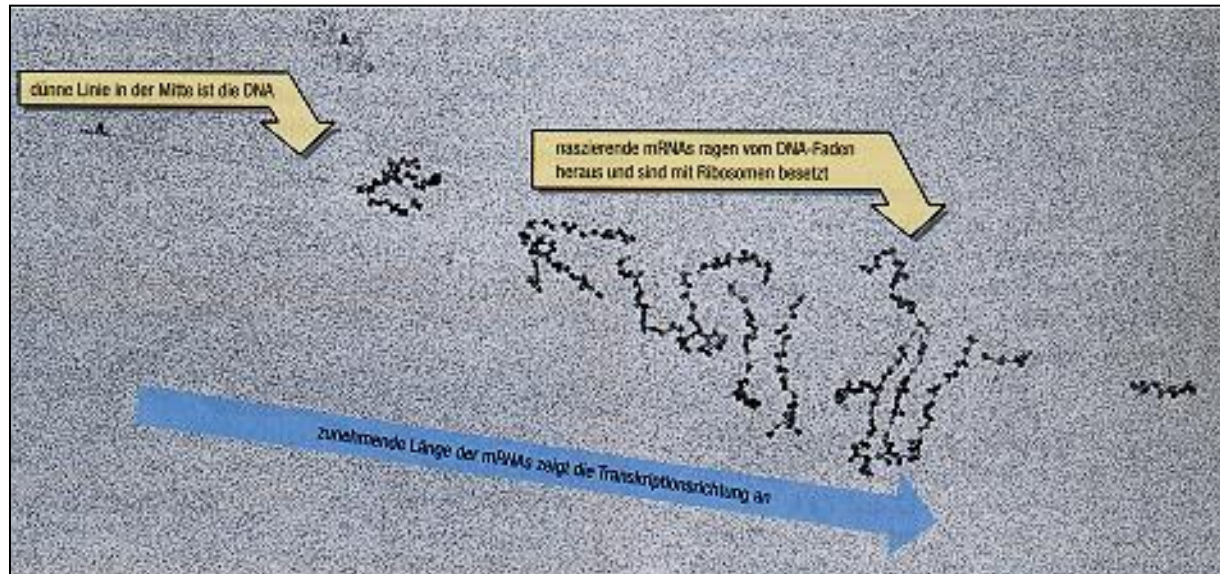


Ebenen der Genregulation bei Eukaryoten



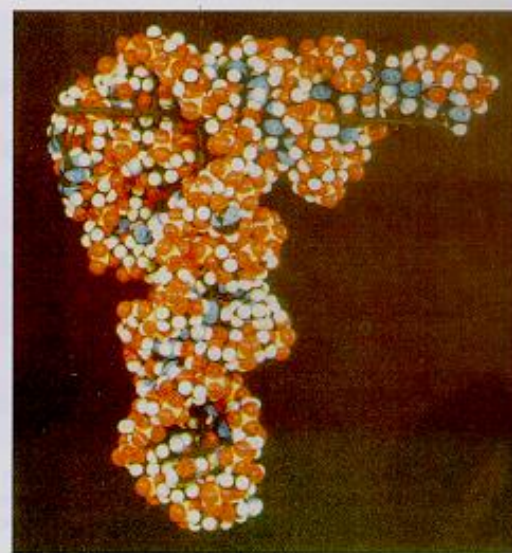
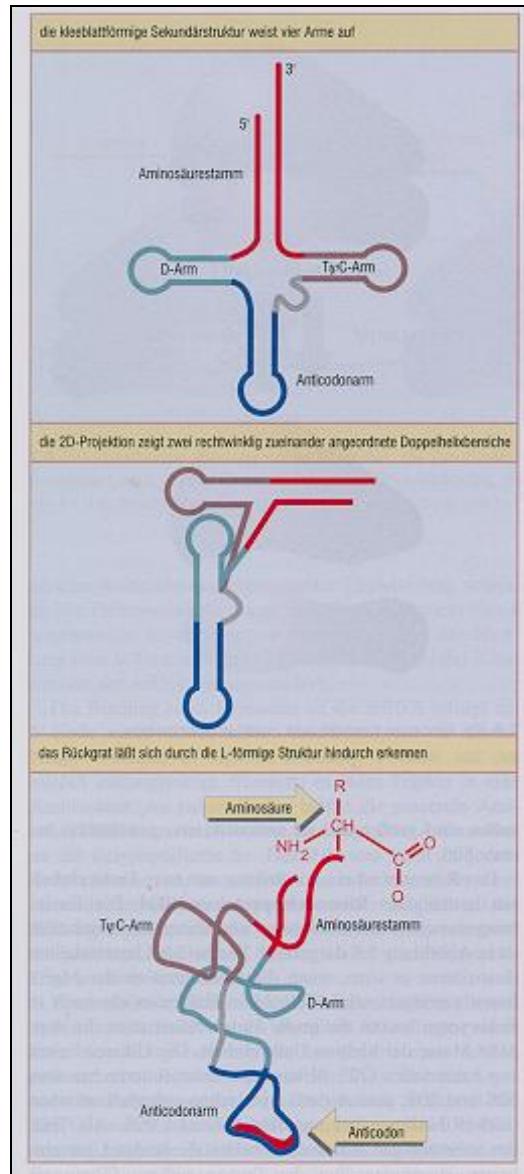
Proteinbiosynthese

Proteinbiosynthese findet an Polysomen statt
Kopplung von Transkription und Translation bei Prokaryoten



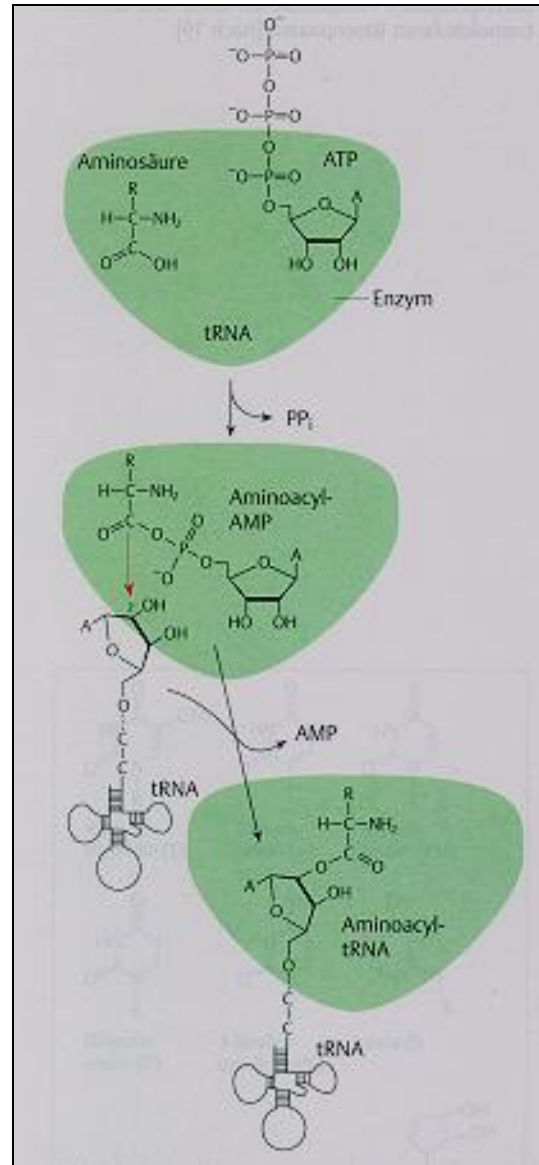
Proteinbiosynthese

Struktur der tRNA, am 3'-Ende wird die AS gebunden



Proteinbiosynthese

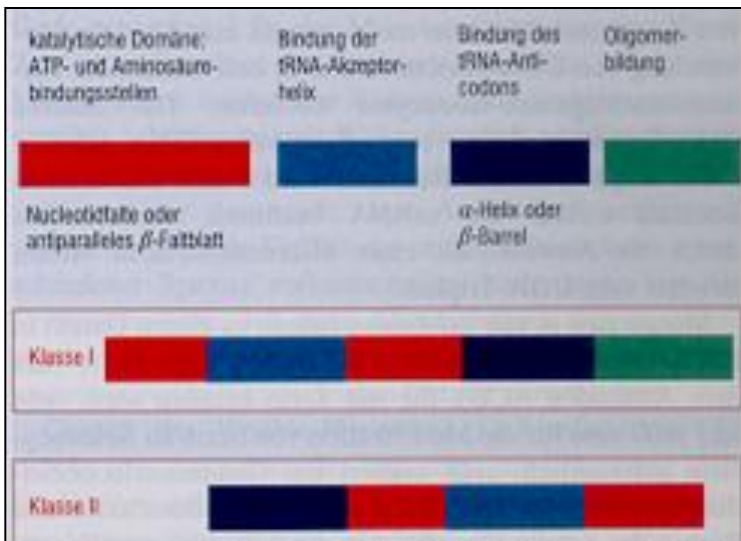
Aminoacyl-tRNA-Synthetasen beladen die tRNA in einer 2Schrittreaktion



Proteinbiosynthese

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen fallen in 2 Klassen, evolutionär unabhängig
 2. genetischer Code, 20 Enzyme spezifisch für je eine AS

Klasse I Spezifität	Untereinheiten*	Klasse II Spezifität	Untereinheiten
Arginin	577 (M)	Alanin	875 (T)
Cystein	461 (M)	Asparagin	467 (D)
Glutaminsäure	471 (M)	Asparaginsäure	590 (D)
Glutamin	551 (M)	Glycin	303/689 (T, $\alpha_2\beta_2$)
Isoleucin	939 (M)	Histidin	424 (D)
Leucin	860 (M)	Lysin	504 (D)
Methionin	676 (D)	Phenylalanin	327/795 (T, $\alpha_2\beta_2$)
Tyrosin	424 (D)	Prolin	572 (D)
Tryptophan	334 (D)	Serin	430 (D)
Valin	951 (M)	Threonin	624 (D)



**Klasse 1: N-terminale katalytische Domäne,
 Mit Rossman-Schleife
 heften AS an 2'OH-Gruppe im Adenin**

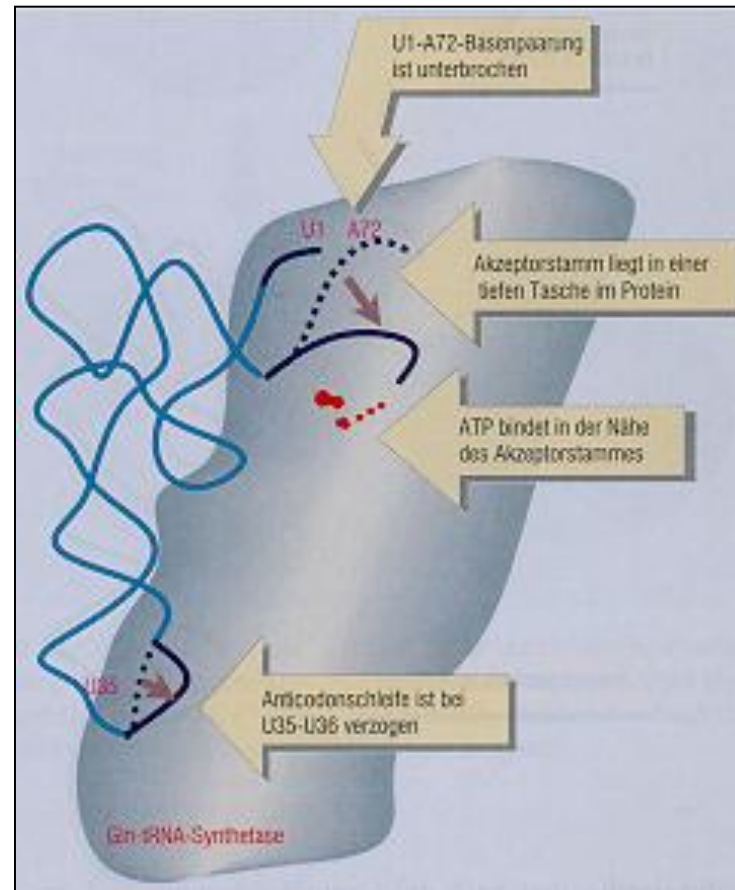
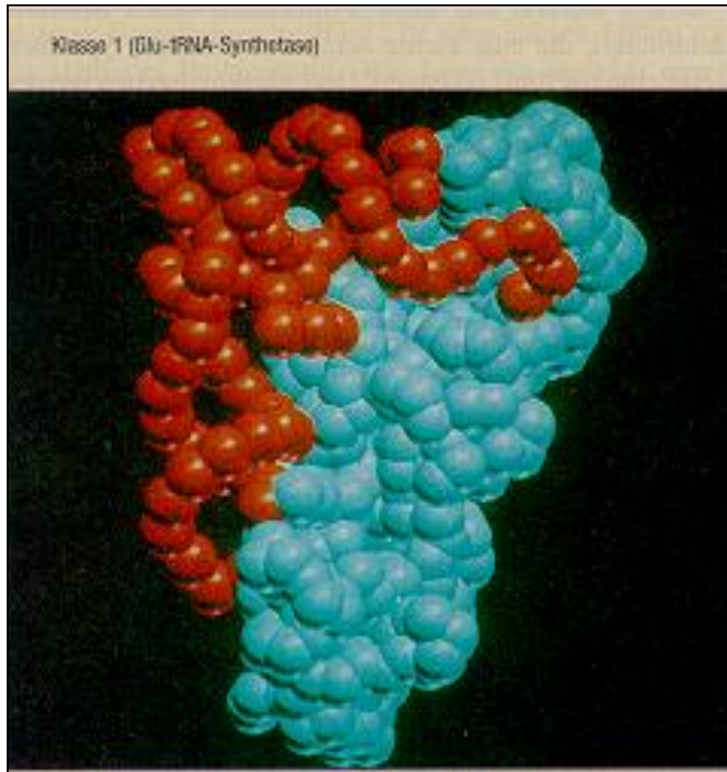
**Klasse 2: drei allg. Sequenzähnl. in kat. Domäne,
 heften AS an 3'OH-Gruppe im Adenin**



Proteinbiosynthese

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen der Klasse 1

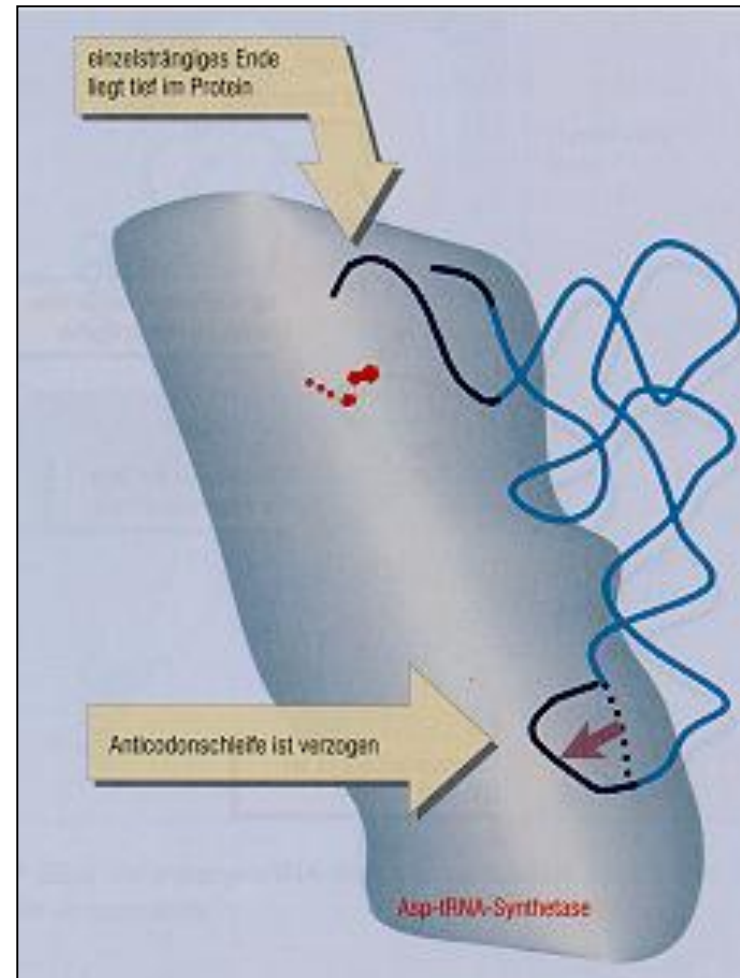
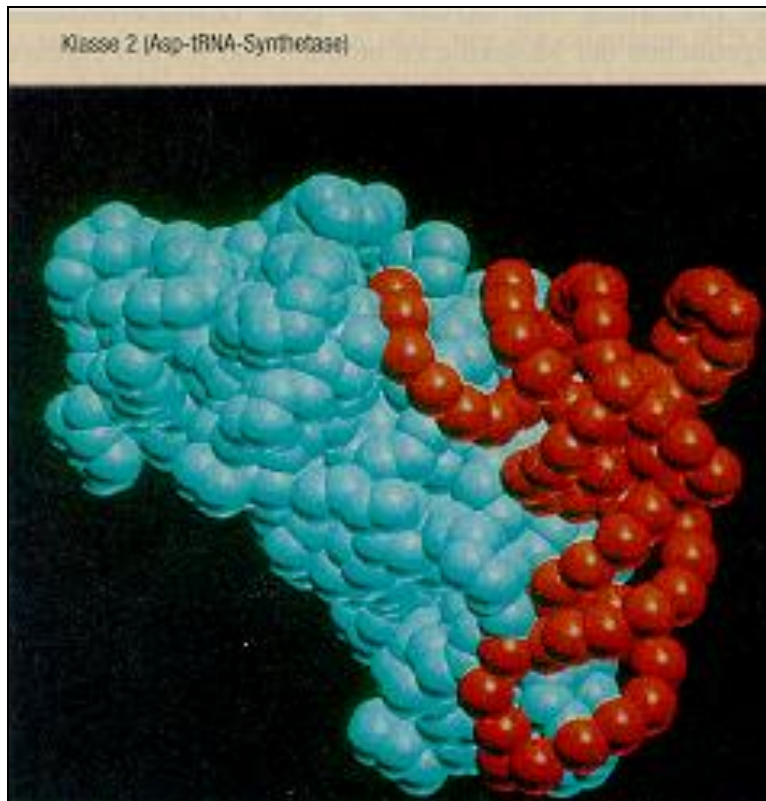
Kontakt mit tRNA an der kleinen Furche des Akzeptorstamms und im Anticodonbereich – räumliche Erkennung!

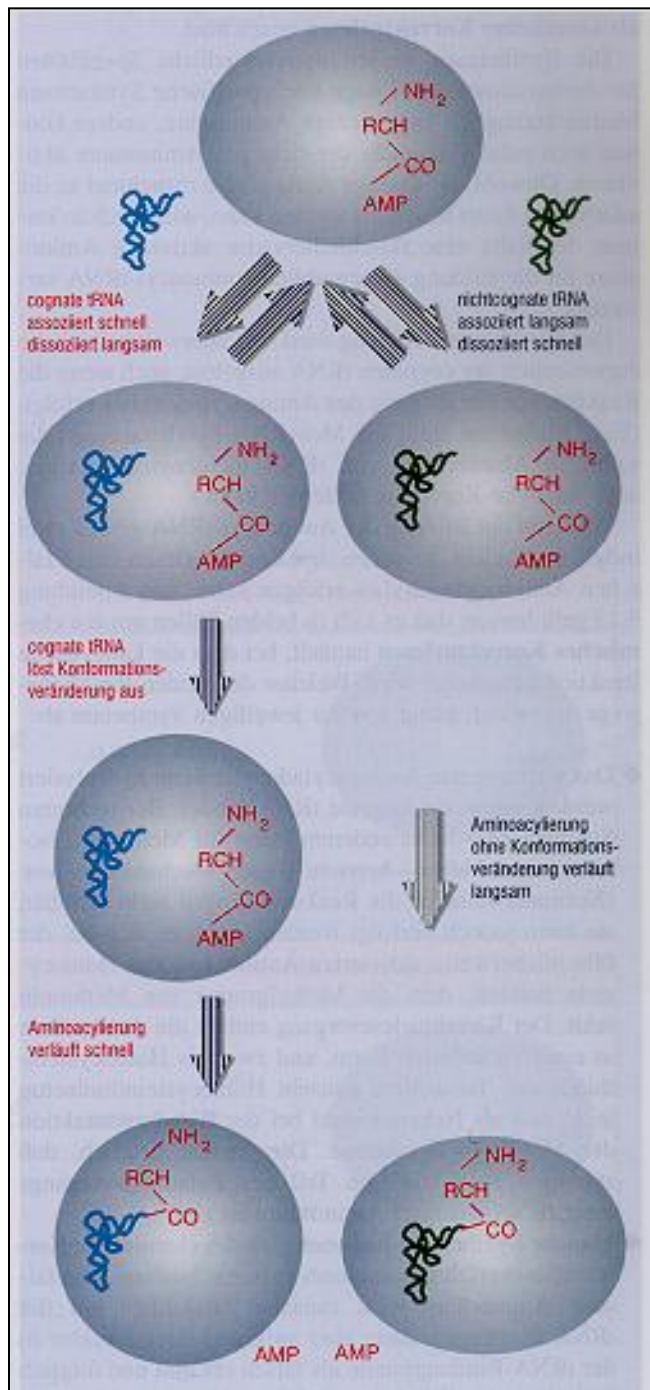


Proteinbiosynthese

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen der Klasse 2

Kontakt mit tRNA über variable Schleife und der großen Furche des Akzeptorstamms sowie im Anticodonbereich – räumliche Erkennung!





Proteinbiosynthese

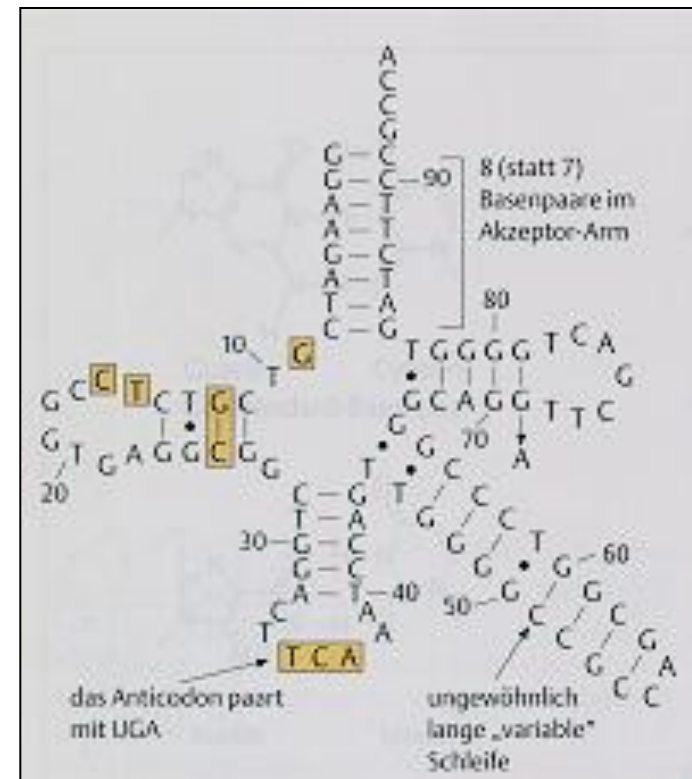
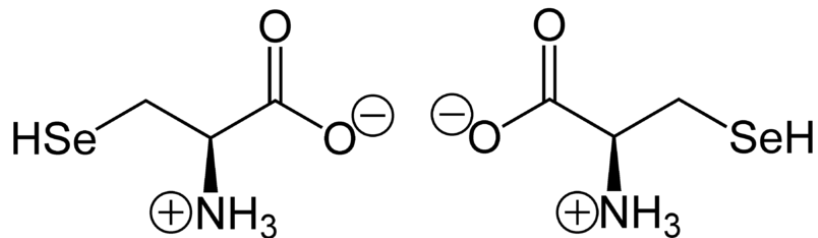
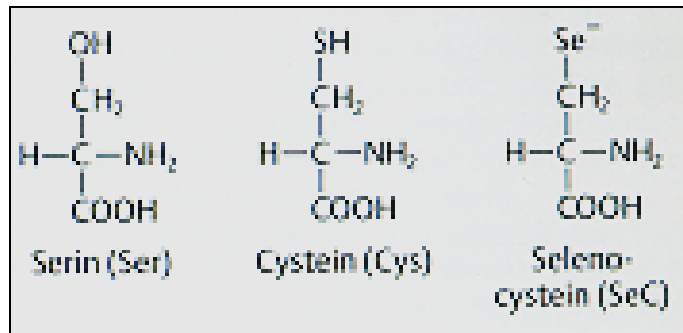
Aminoacyl-tRNA-Synthetasen machen ein zweistufiges „proof-reading“
 Fehlerrate entspricht der der Proteinbiosynthese! 1/60.000



Proteinbiosynthese

Selenocystein – 21. proteinogene Aminosäure

SeH-Gruppe sehr reaktiv, z.B. Formiat-DH, Glutathion Peroxidase
 Serin-spezif. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen belädt die tRNA
 spezifischer Translationsfaktor ist beteiligt

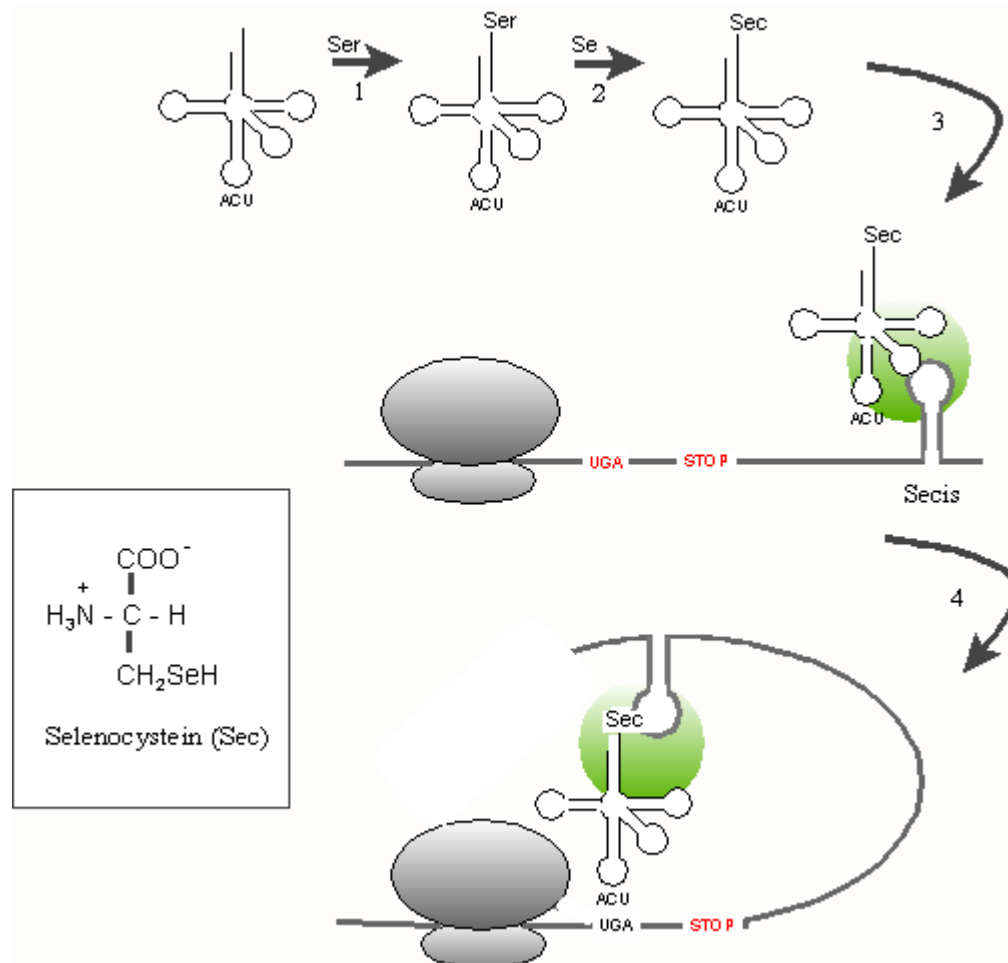


Proteinbiosynthese

Selenocystein – 21. proteinogene Aminosäure

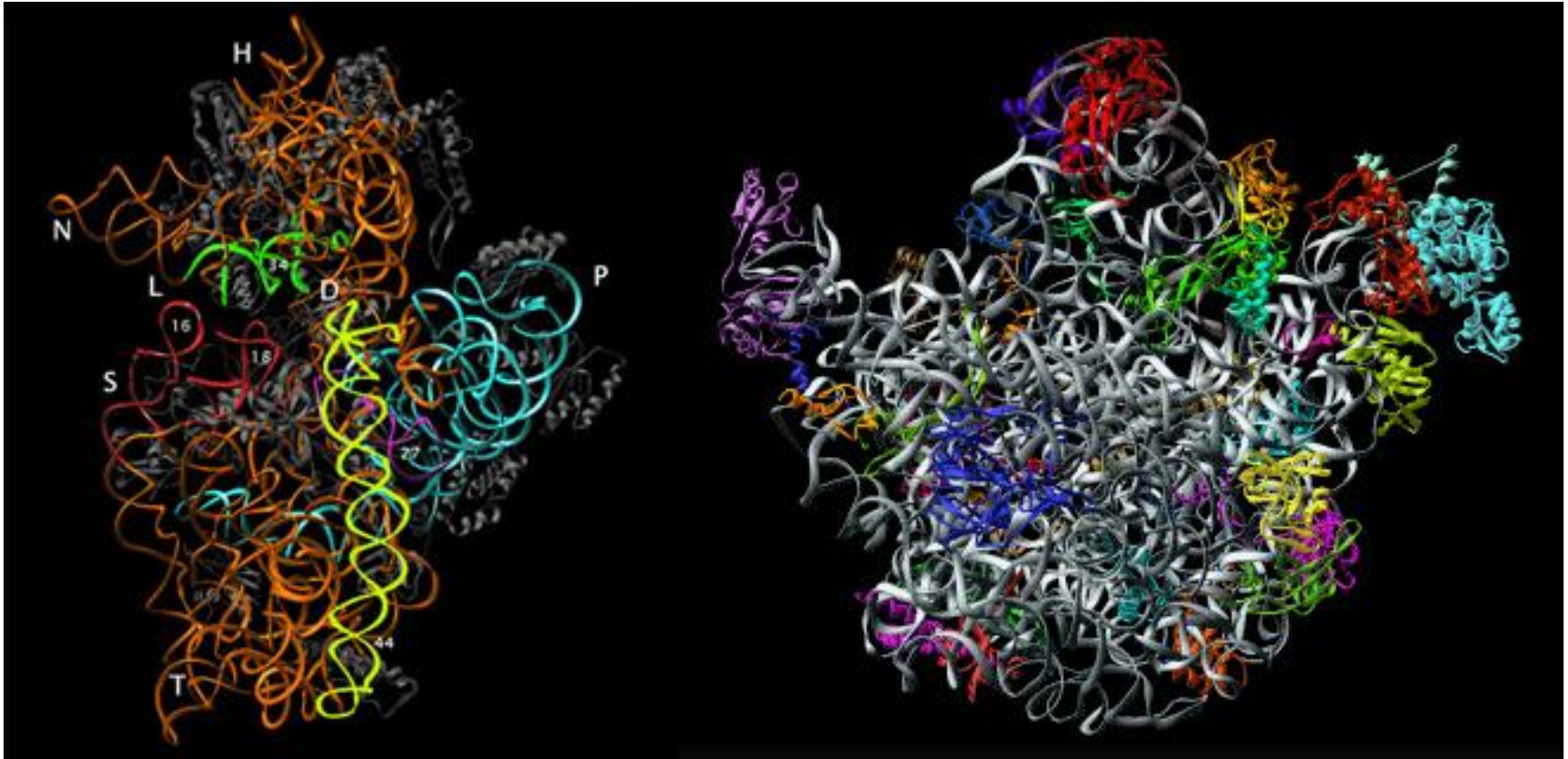
Serin-spezif. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen belädt die tRNA
spezifischer Translationsfaktor ist beteiligt

Secis – selenocystein insertion sequence, von SelB erkannt



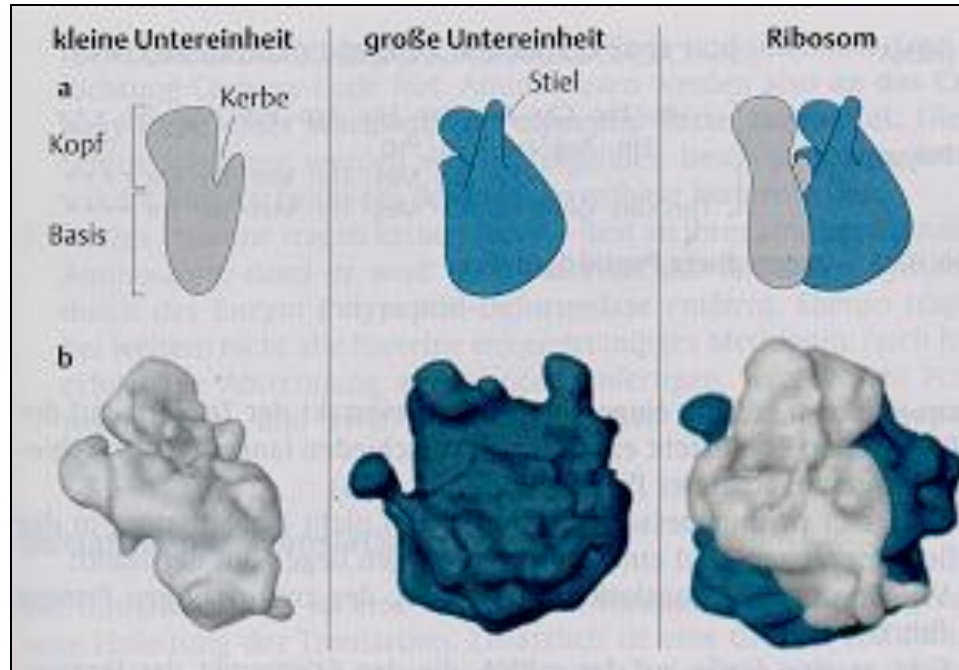
Proteinbiosynthese

Tertiärstruktur von Ribosomen aus *E. coli*



Proteinbiosynthese

Räumliche Darstellung von Ribosomen
E. coli hat bis zu 20.000 Ribosomen, 25 % der TM



Proteinbiosynthese

Ribosomen enthalten mehrere aktive Zentren, an deren Bildung rRNAs sowie verschiedene ribosomale Proteine beteiligt sind.

mRNA zwischen den UE, 3 Bindestellen für tRNAs, Peptidsynthesezentrum, 1 Peptidkanal,

