Einführung in die Molekularbiologie
Prof. Dr. Martin Hagemann

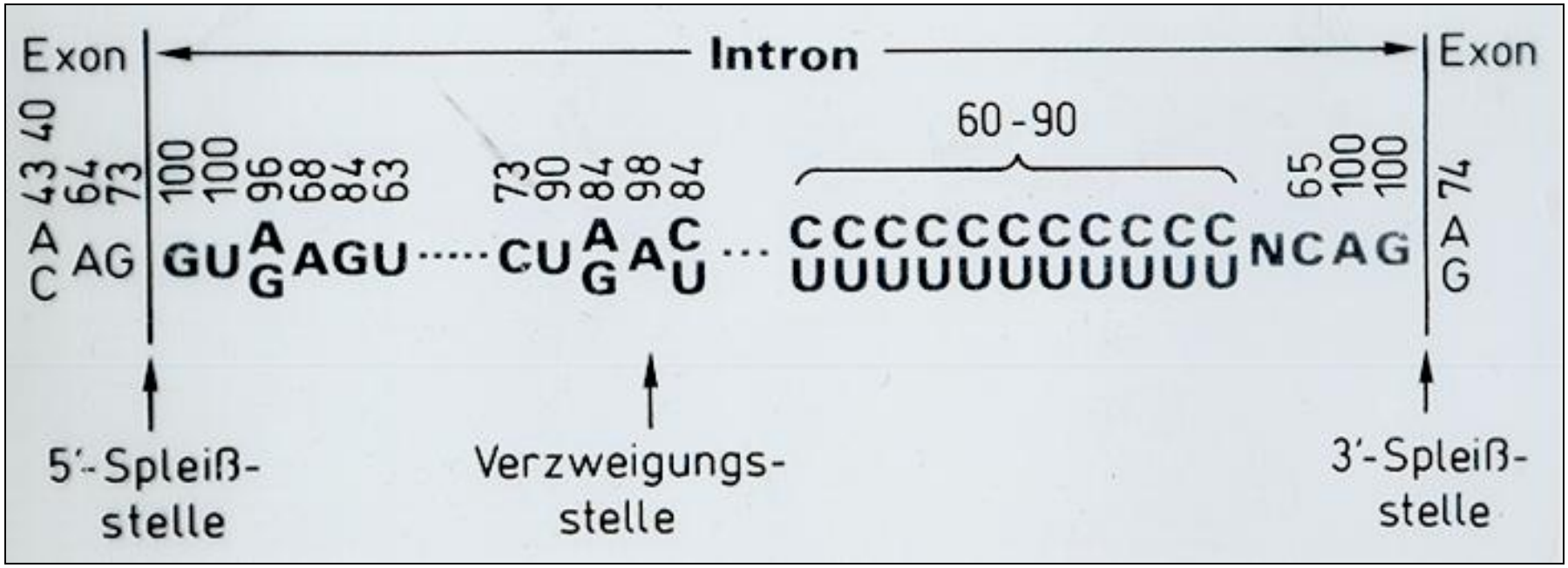
Vorlesung 3

Spleißen von RNA
RNA Editieren
DNA-bindende Proteine (u.a. Transkriptionsfaktoren)
Regulation der Transkription bei Prokaryoten

Pflanzenphysiologie
PUR
Universität Rostock

Spleißen – Entfernen von Introns aus mRNAs bei Eukaryoten

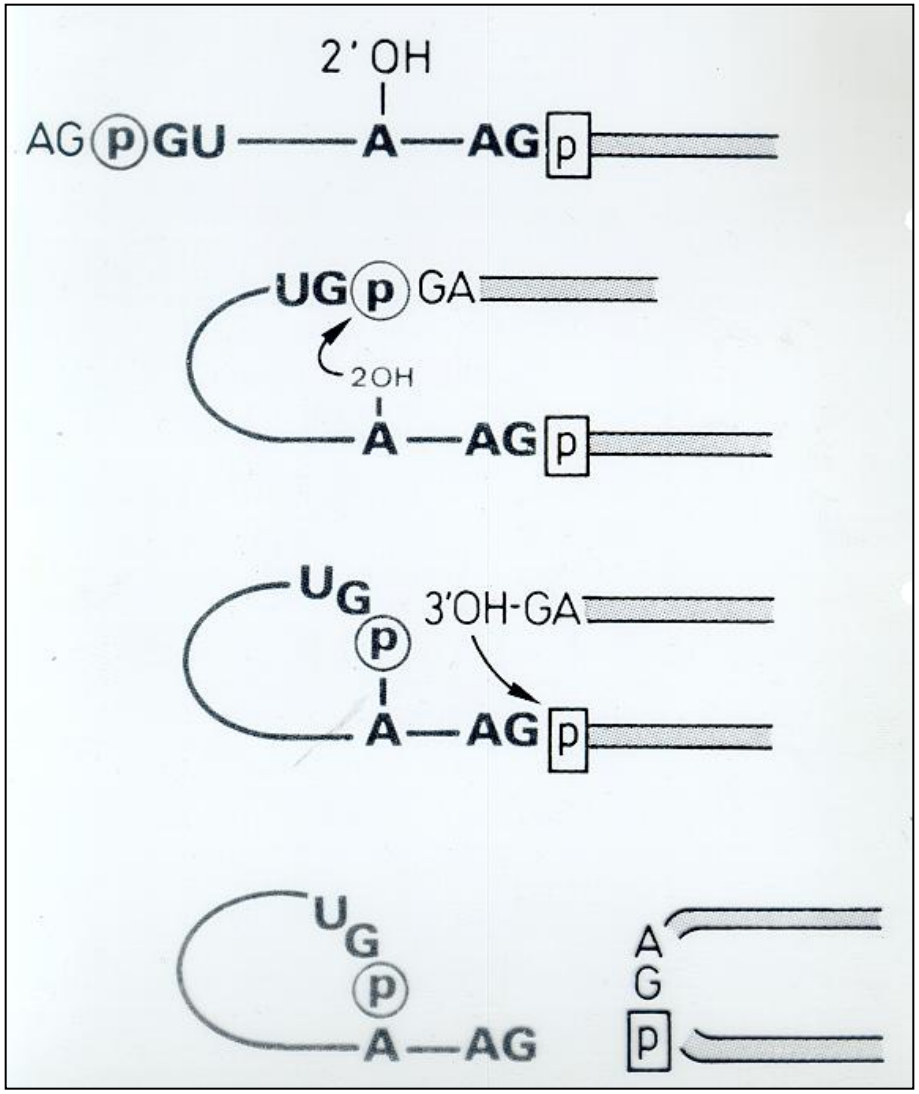
Intron/Exon-Übergänge weisen konservierte Sequenzen auf
Neben den hier gezeigten GU-AG-Introns existieren AU-AC-Introns
Warum gibt es Introns? („Intron early“ versus „Intron late“ Hypothesen)

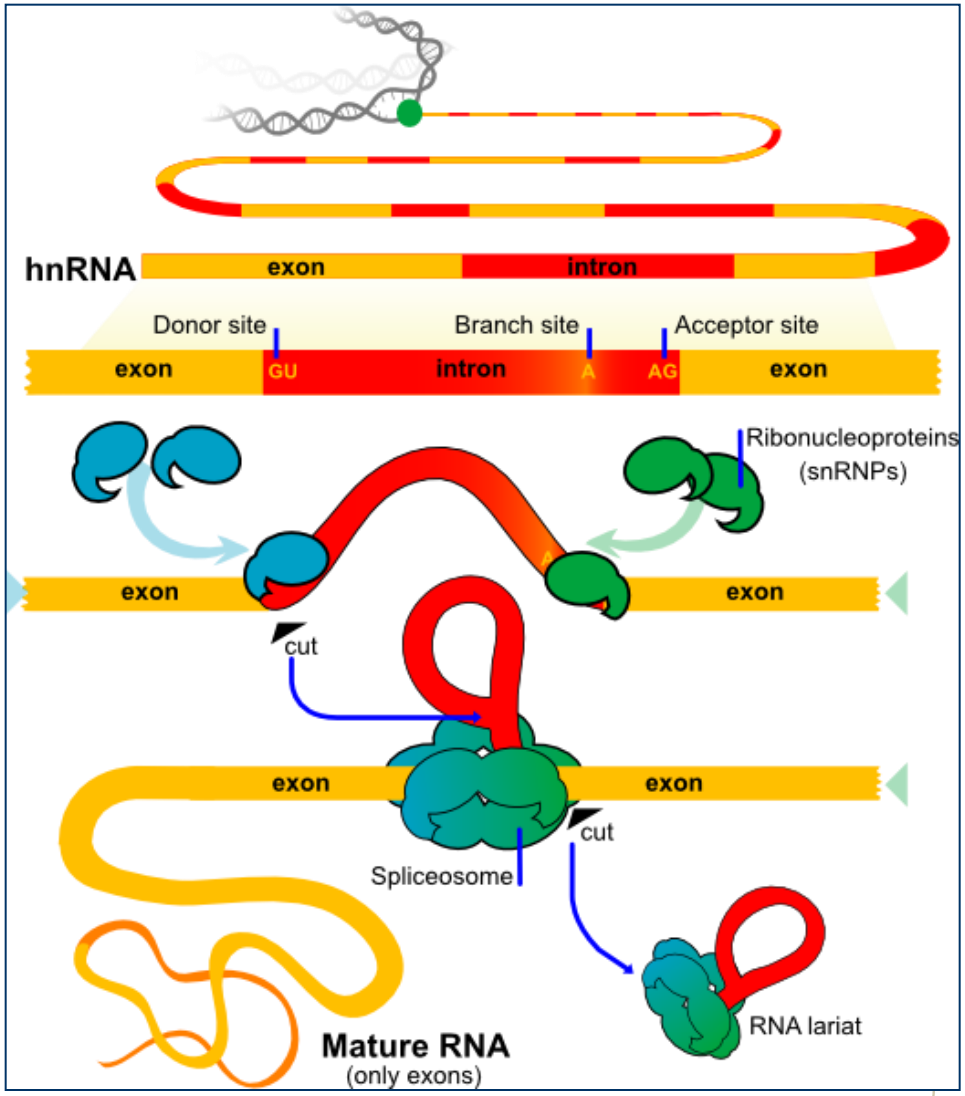


Pflanzenphysiologie
PUR
Universität Rostock

Spleißen – Entfernen von Introns aus mRNAs bei Eukaryoten

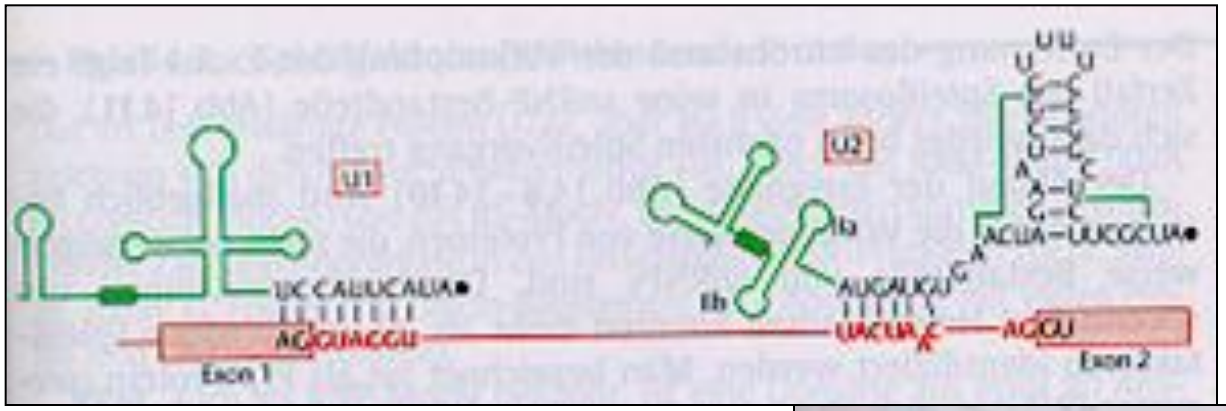
Das Spleißen ist ein 2-Schrittprozeß

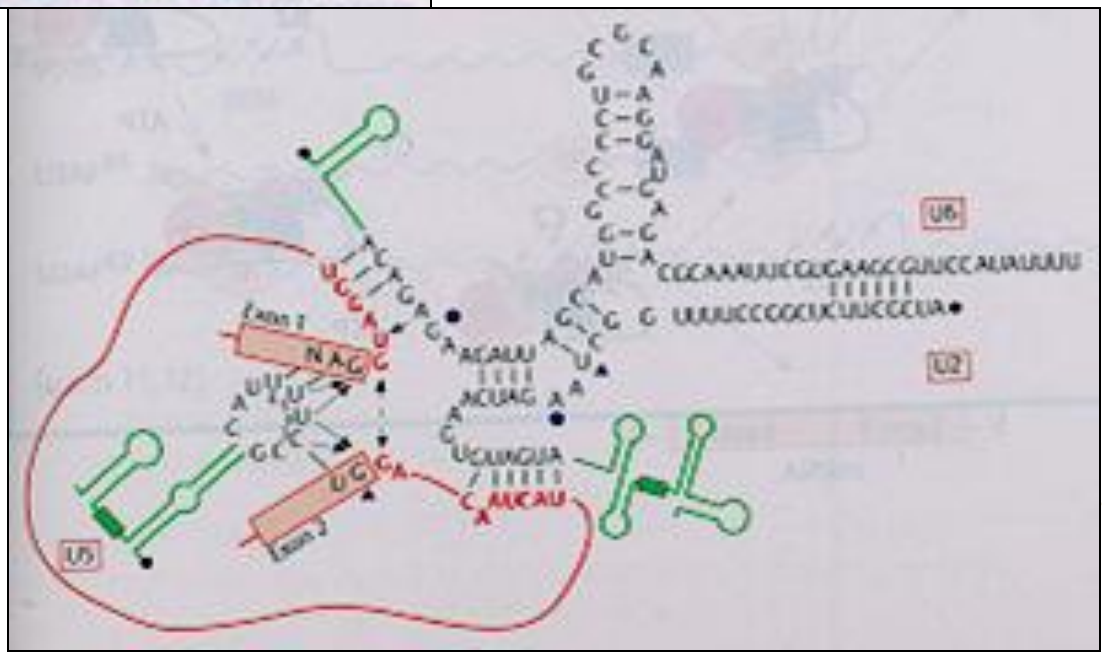


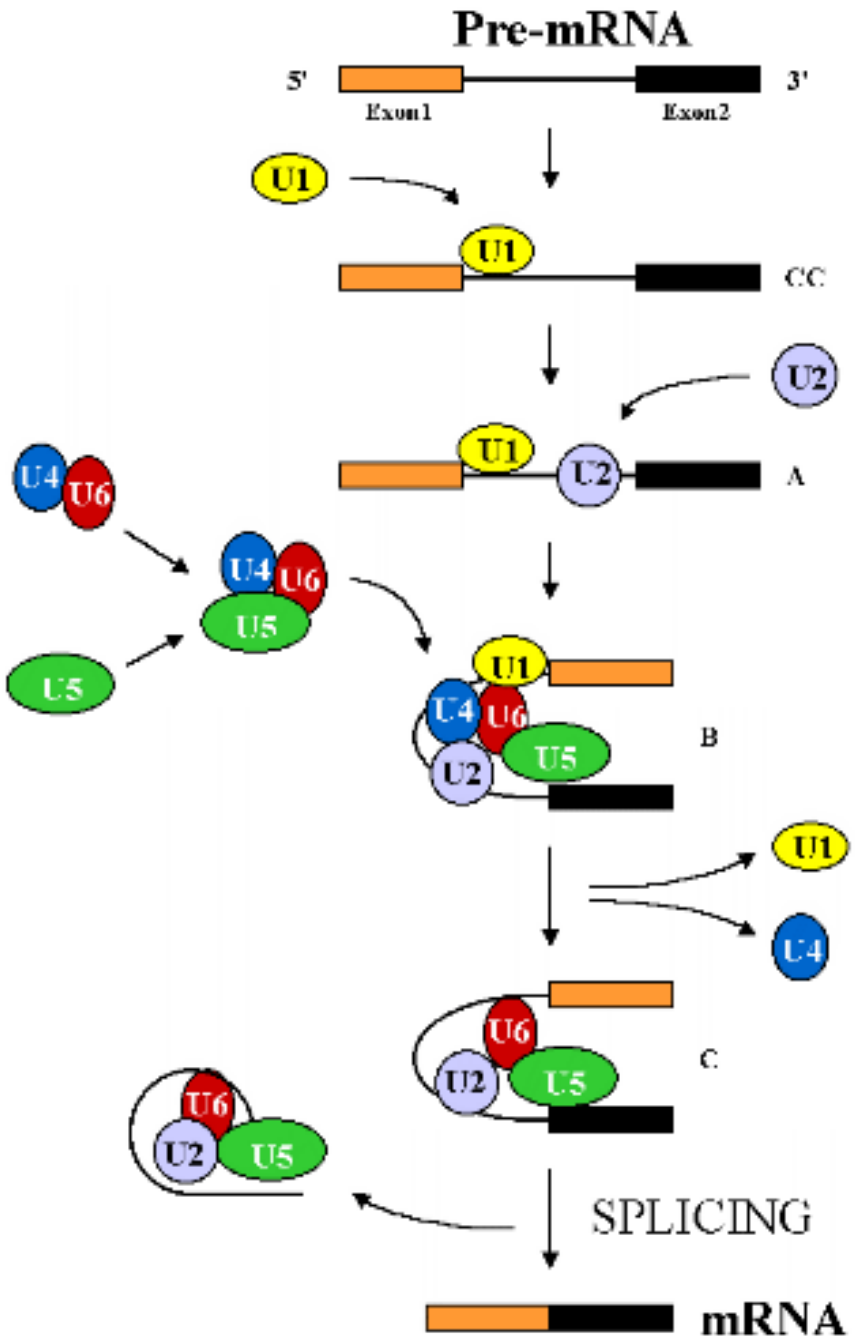


Spleißen – Entfernen von Introns aus mRNAs bei Eukaryoten

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.







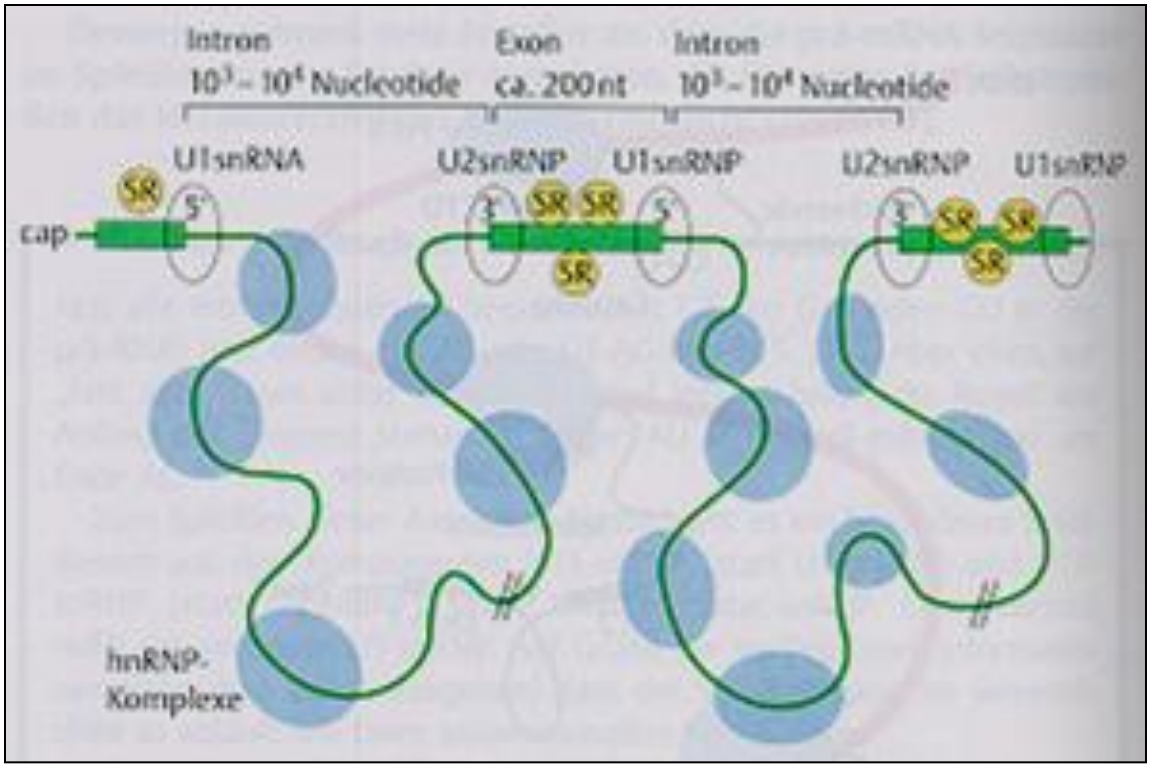
Spleißen – Entfernen von Introns aus mRNAs bei Eukaryoten

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

Pflanzenphysiologie
PUR
Universität Rostock

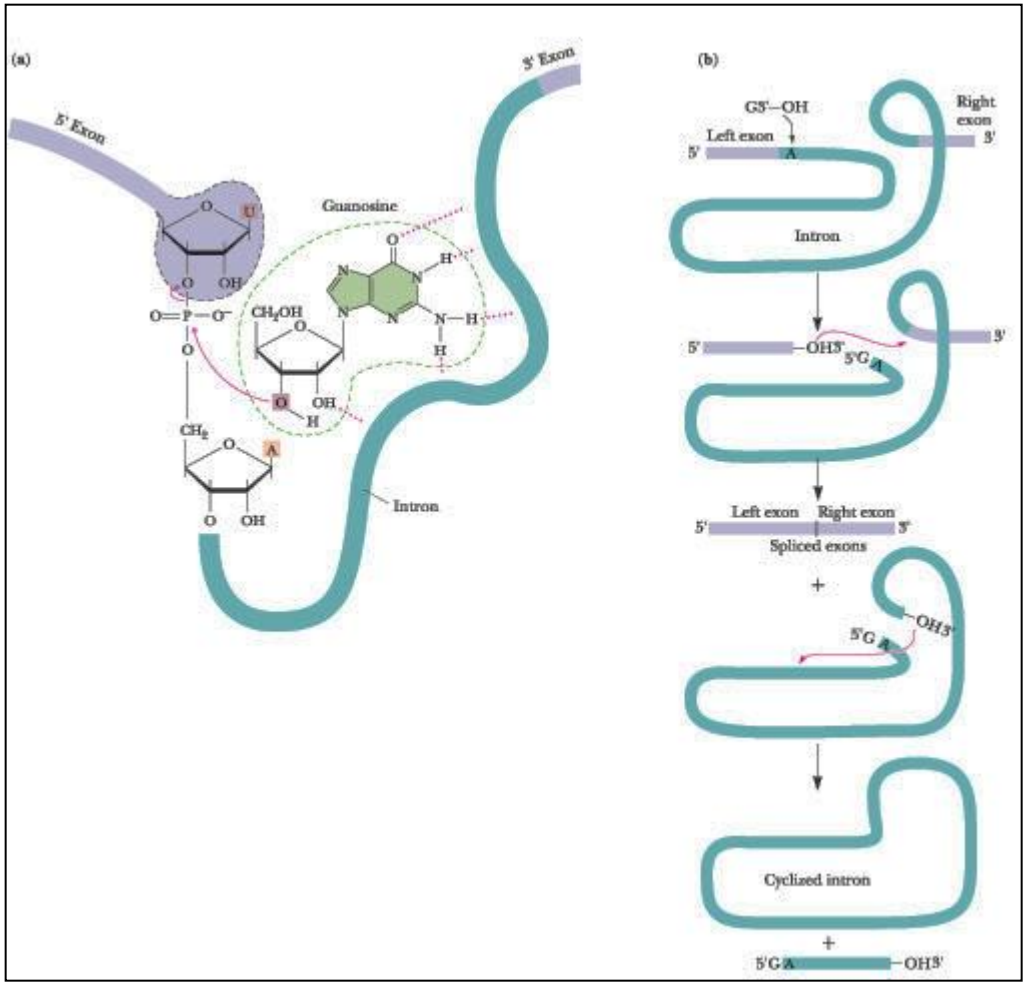
Spleißen – Entfernen von Introns aus mRNAs bei Eukaryoten

Am Spleißen sind weitere Spleißfaktoren beteiligt,
die an so genannte Exon-Spleiß-Enhancer binden können



Selbstspleißen – Entfernen von Introns aus rRNA bei Eukaryoten

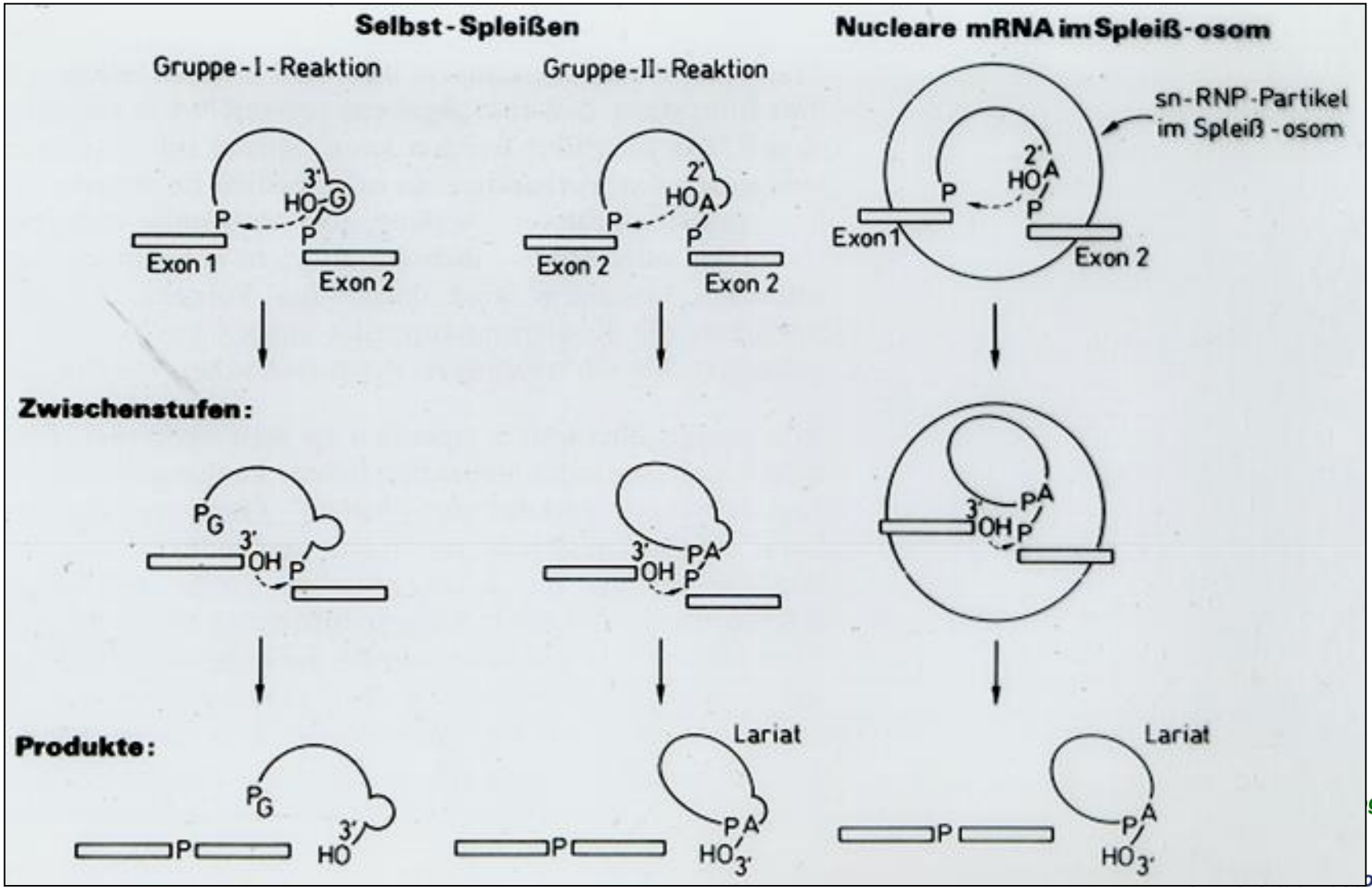
Prä rRNA aus Tetrahymena reift durch Selbstspleißen (basal)!
Am Selbstspleißen ist zusätzlich zur RNA nur Guanidin beteiligt.
Der Hilfsfaktor koordiniert die Sekundärstruktur und schneidet am 5‘-Ende



Pflanzenphysiologie
PUR
Universität Rostock

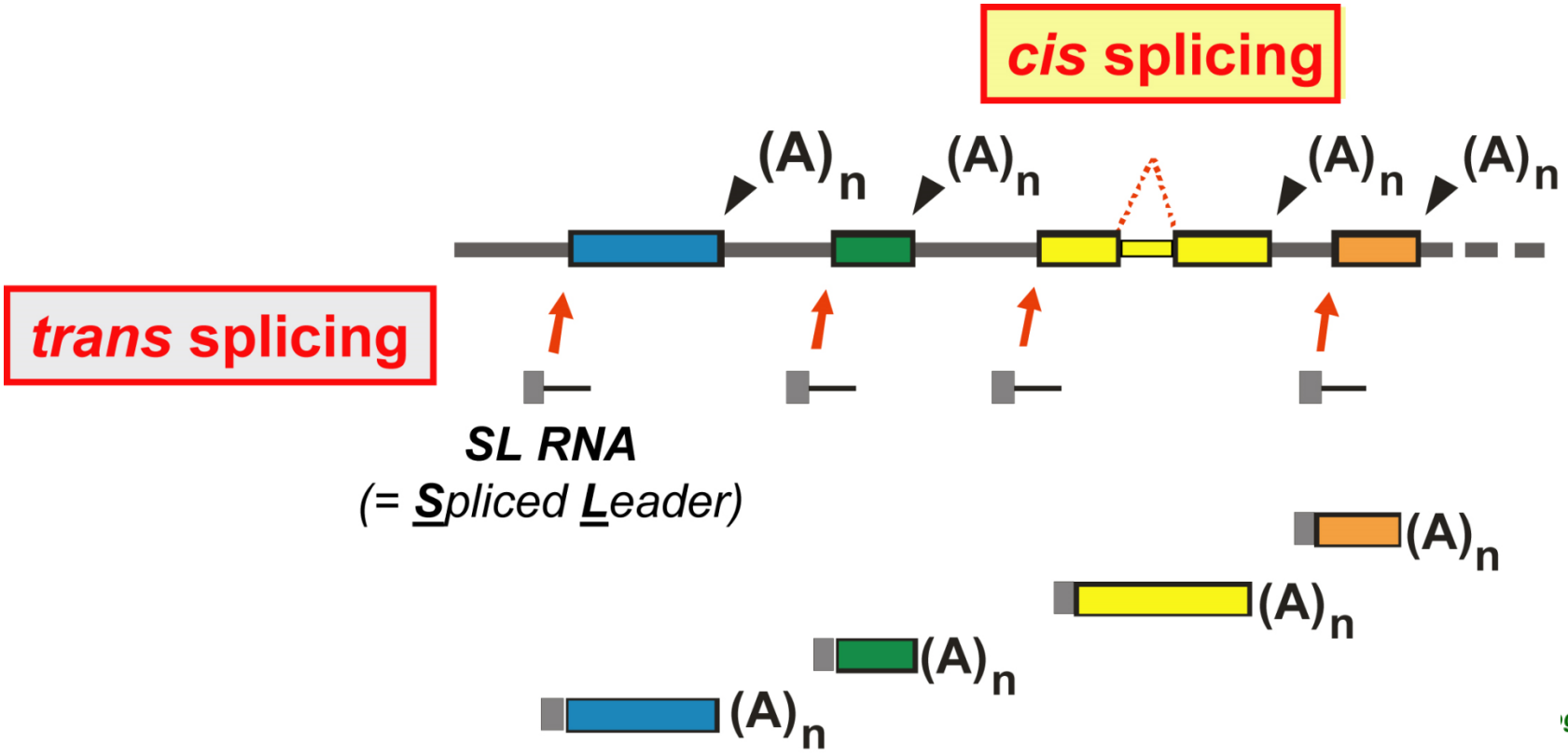
Spleißen

Vergleich von Selbstspleißen und der Reaktion im „Spliceosom“



Trans-Spleißen

Verbinden von RNA Molekülen seperater 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)

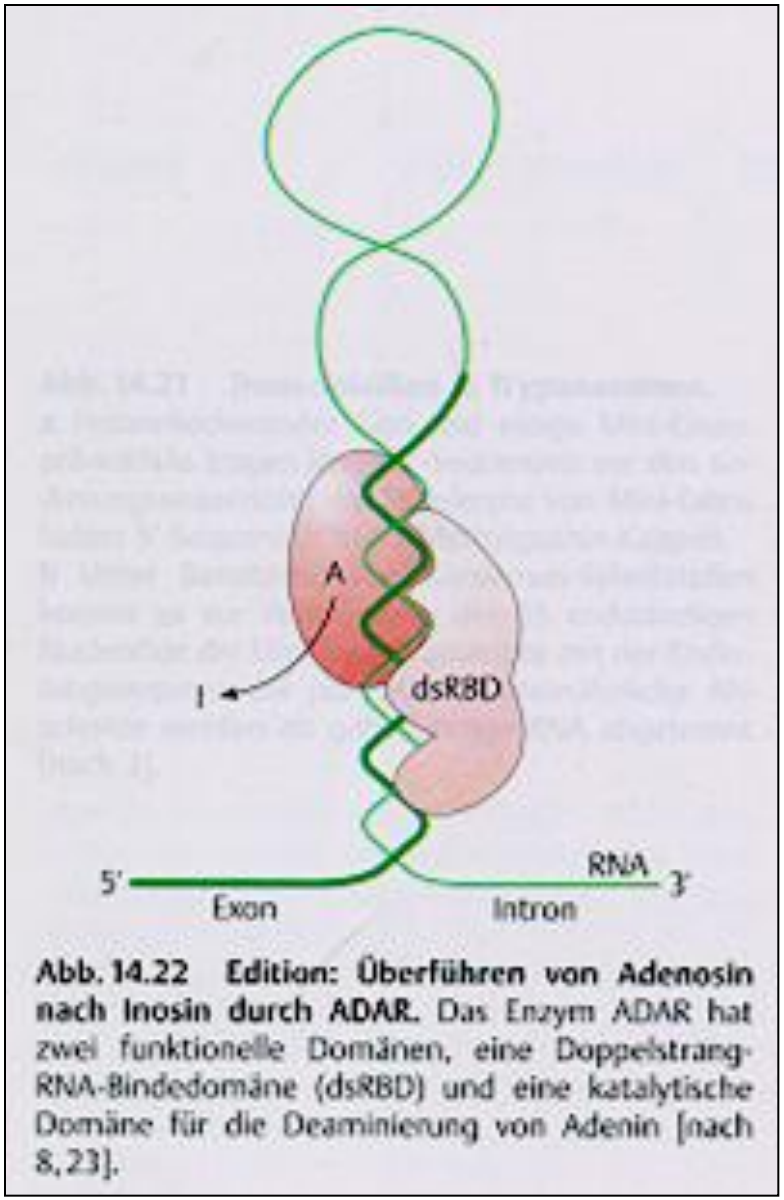
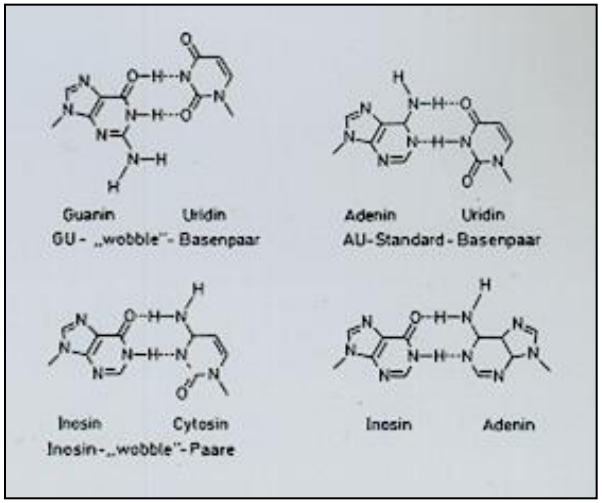
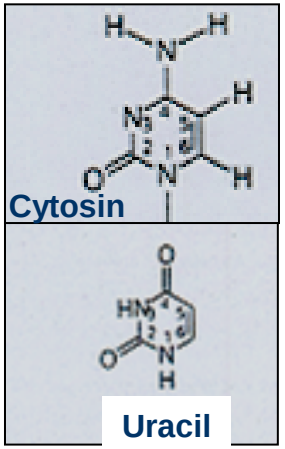


Abb. 14.22 Edition: Überführen von Adenosin nach Inosin durch ADAR. Das Enzym ADAR hat zwei funktionelle Domänen, eine Doppelstrang-RNA-Bindedomäne (dsRBD) und eine katalytische Domäne für die Deaminierung von Adenin [nach 8, 23].

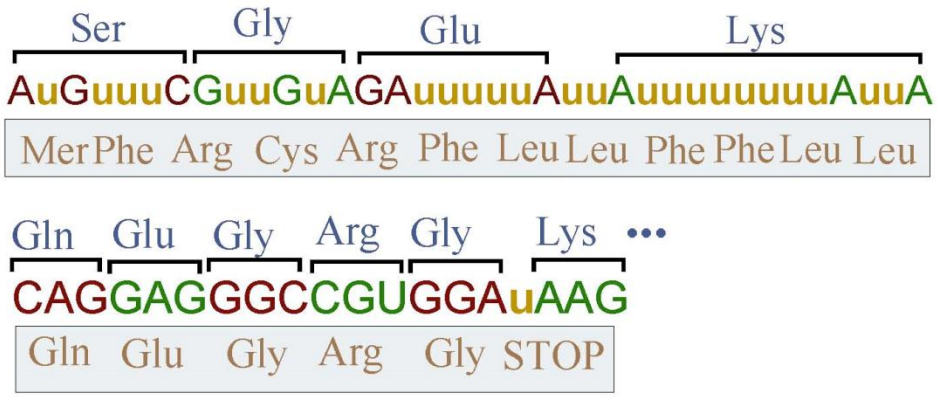


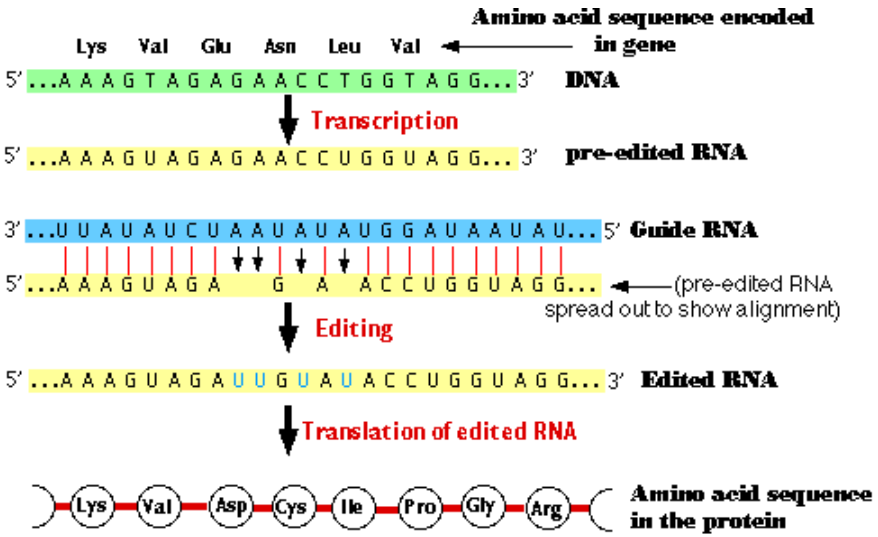


Pflanzenphysiologie
PUR
Universität Rostock

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





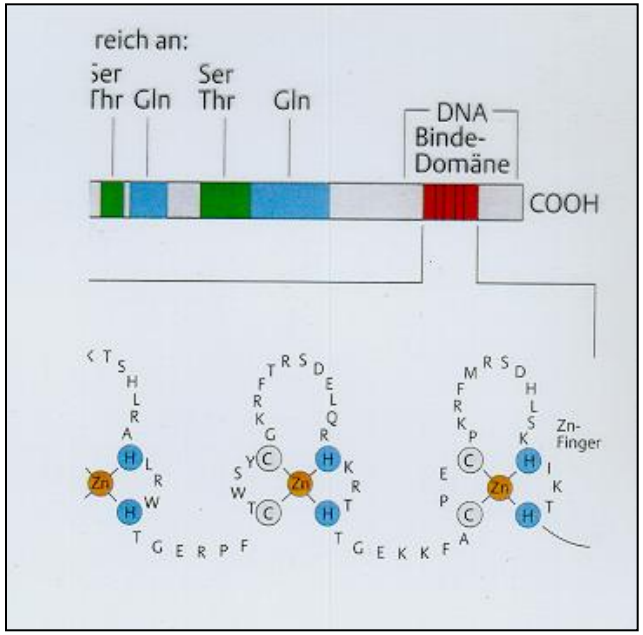
Pflanzenmitochondrien – alternativer genetischer Code?

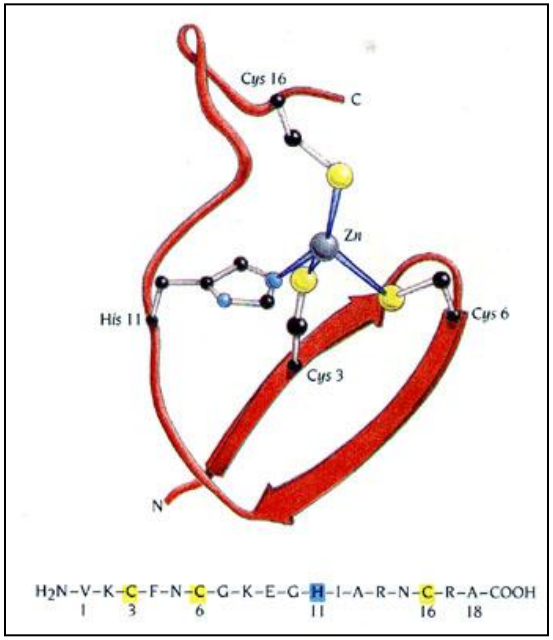
Arg-Codon CGG = Trp?
Trp-Codon UGG
Serin-Codon UCG = Leu?
Leu-Codon UUG

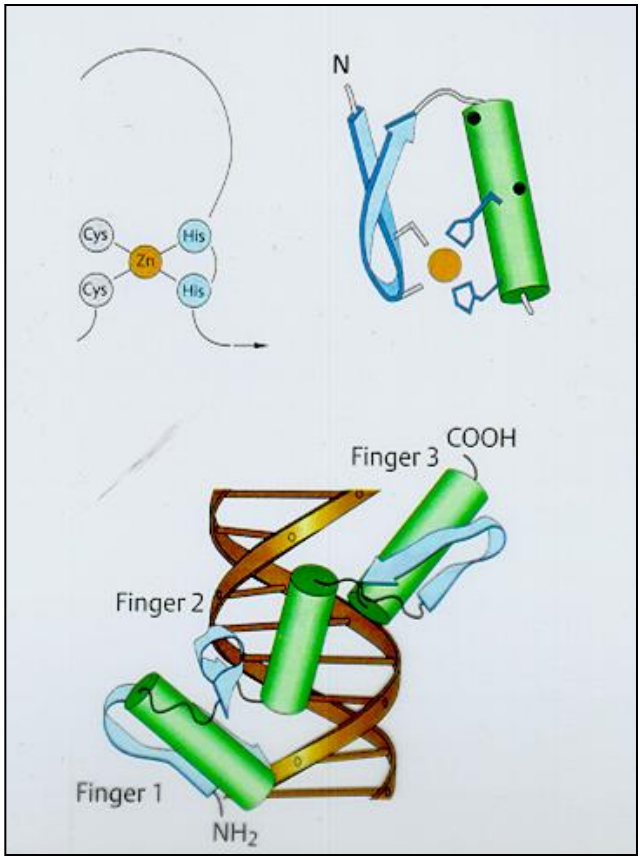
Pflanzenphysiologie
PUR
Universität Rostock

DNA-Bindedomänen – Zink Finger

TATA-Box freie Promotoren enthalten vor allem GC-Boxen.
GC-Boxen werden von SP1 gebunden (+TFII-I)
SP1 ist ein Zinkfingerprotein, das dann TFII-D bindet
Domäne versus Motiv

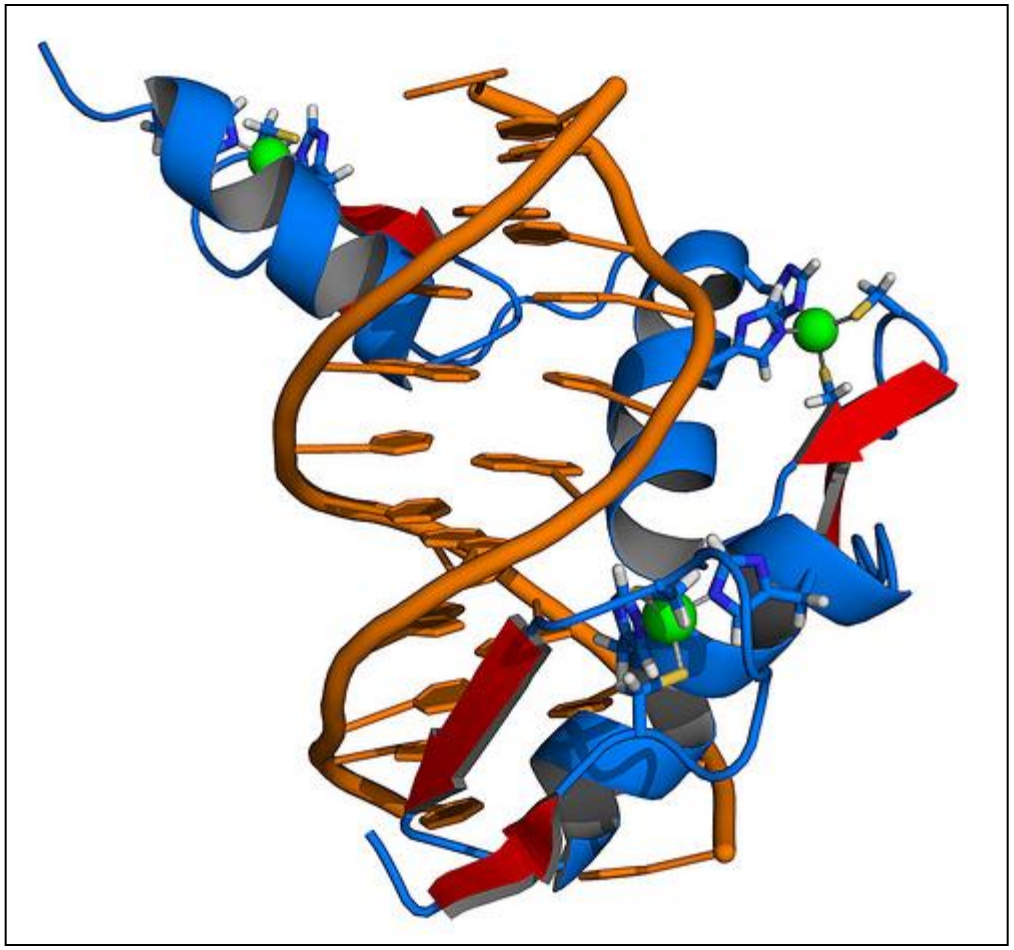


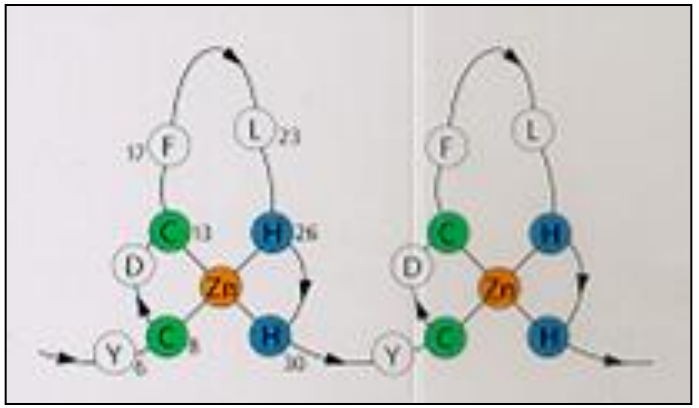




DNA-Bindedomänen – Zink Finger

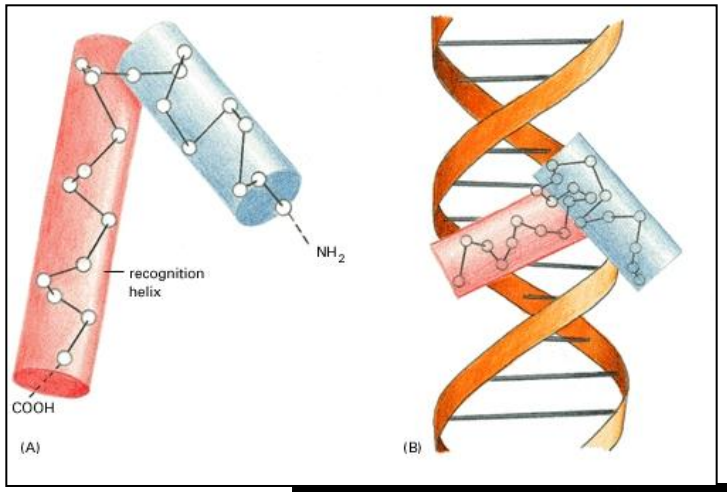
Initiation der Transkription in Eukaryoten - RNAPIII
TFIII-A, bindet sequenzspezifisch an BoxC in 5s rRNA Gen,
DNA-Erkennung durch 9 Zinkfingermotive

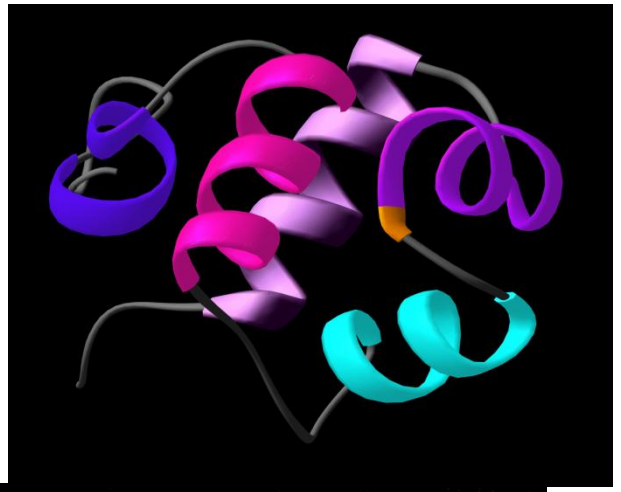


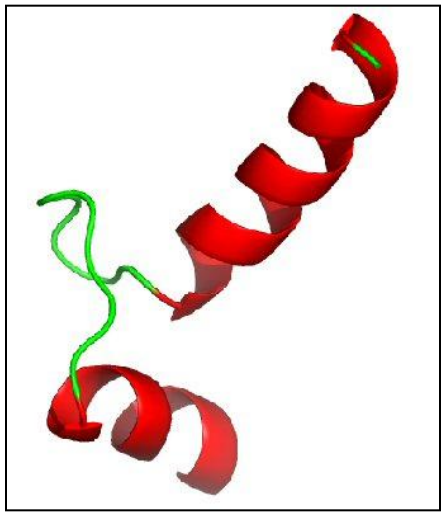


DNA-Bindedomänen - Helix-Turn-Helix

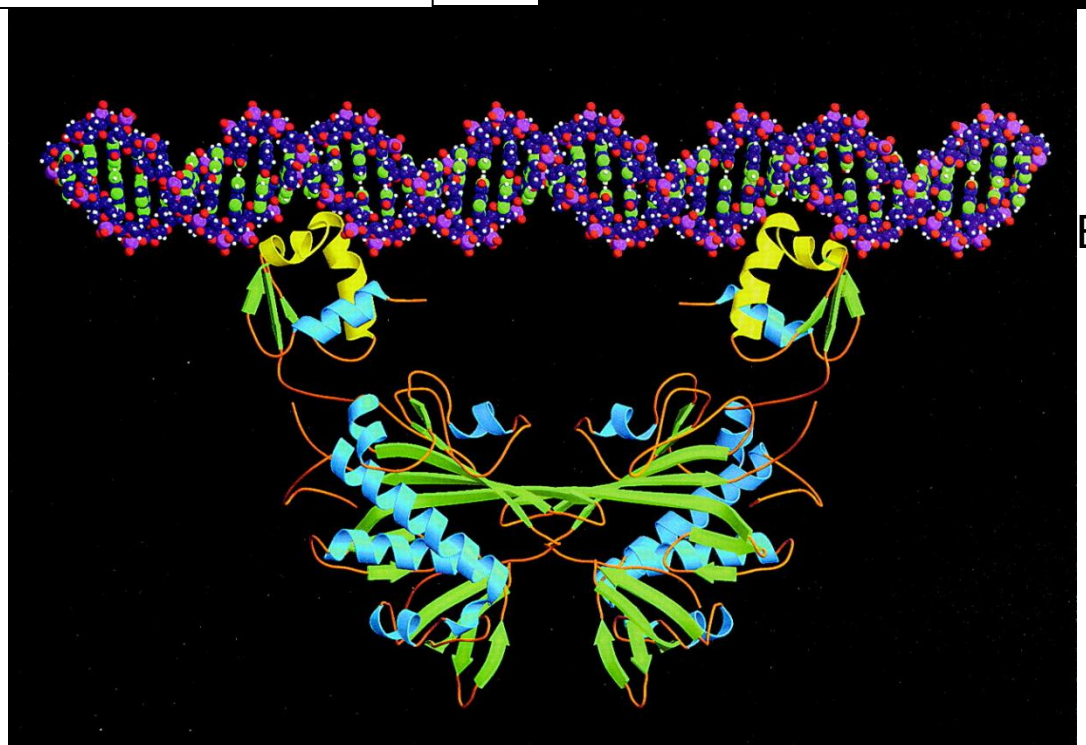
Binde- und Stabilisierungshelix verbunden durch „turn“







Helix-loop-helix

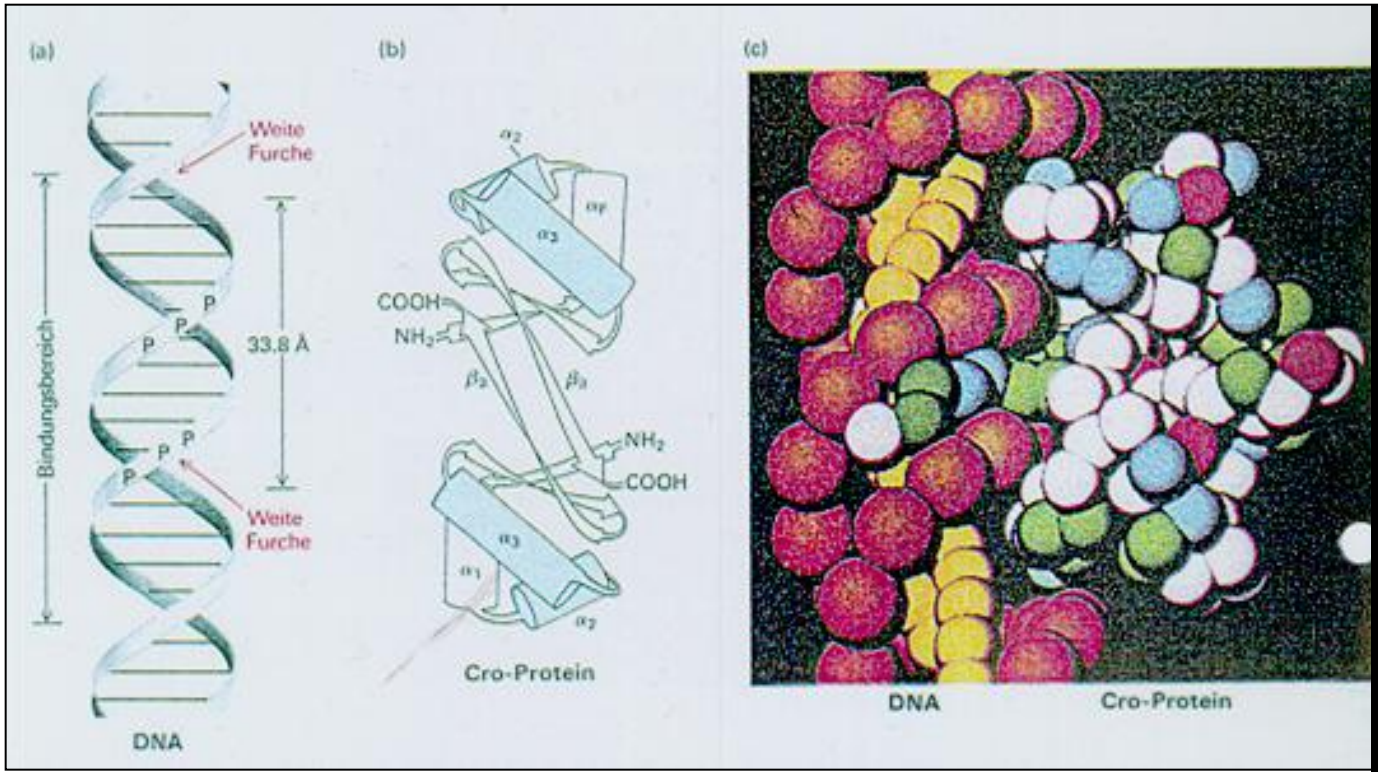


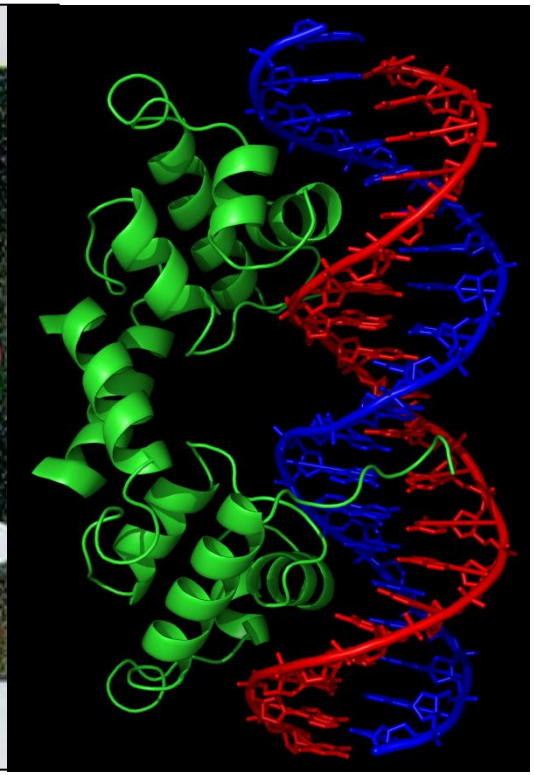
Biotin-Repressor

Pflanzenphysiologie
PUR
Universität Rostock

DNA-Bindedomänen - Helix-Turn-Helix

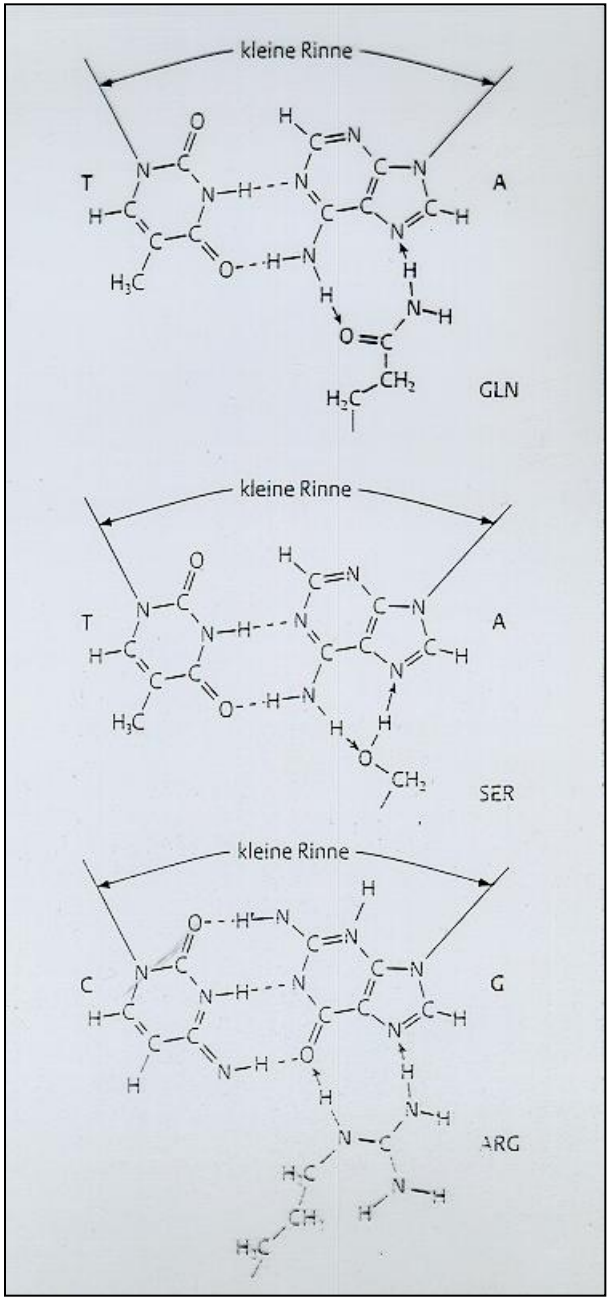
Eine Bindehelix legt sich in die große Furche der DNA
z.B. Lac-Repressor LacI, Cro-Repressor des Phagen Lambda

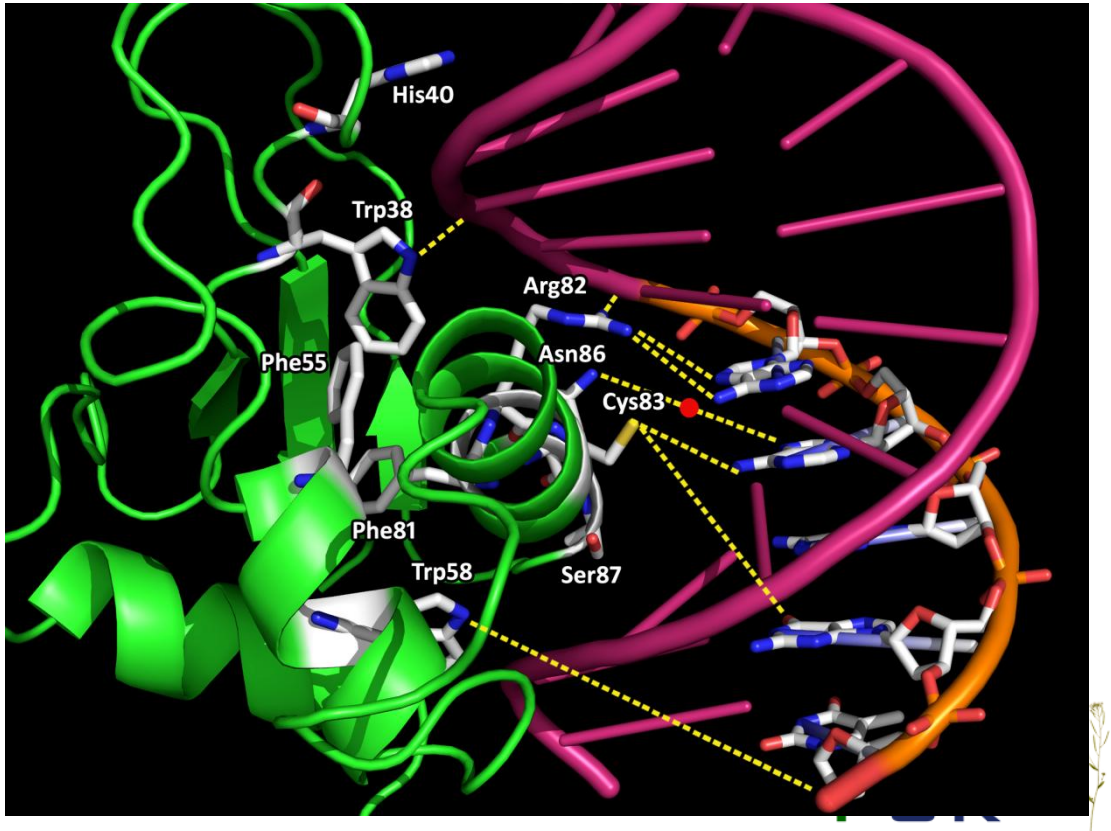




DNA-Bindedomänen

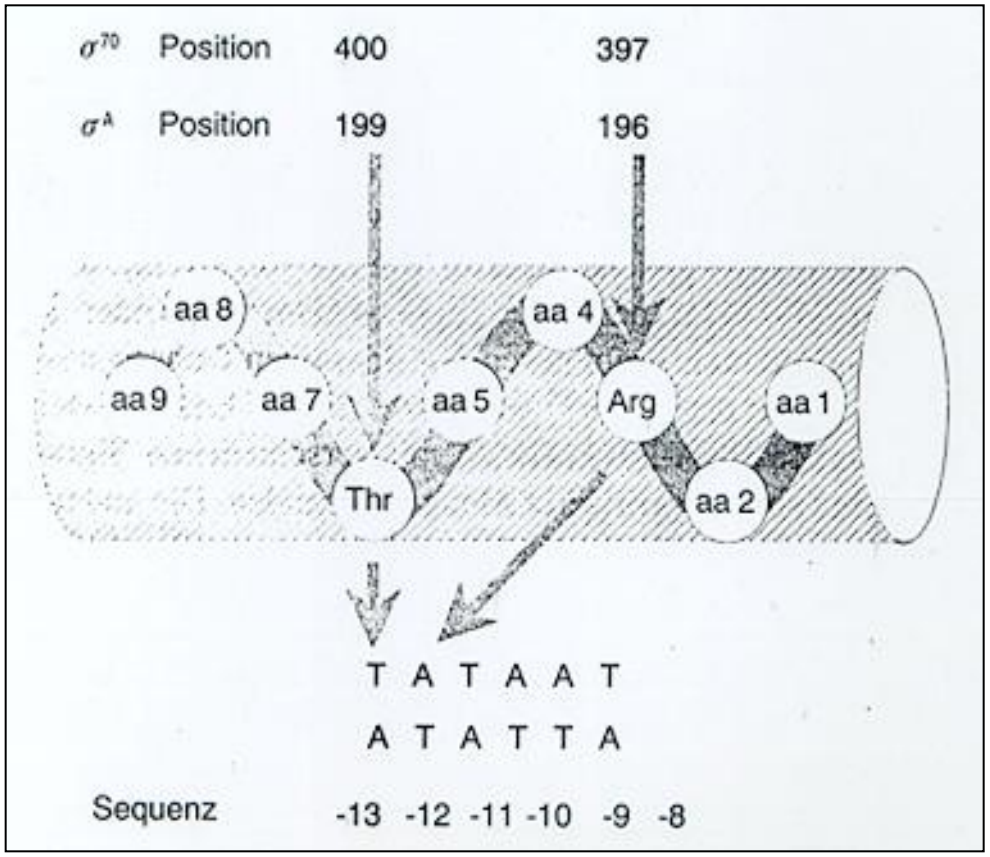
Polare AS-Seitenketten der Bindehelix können spezifisch mit bestimmten Basen über H^+ - Brückenbindungen interagieren.

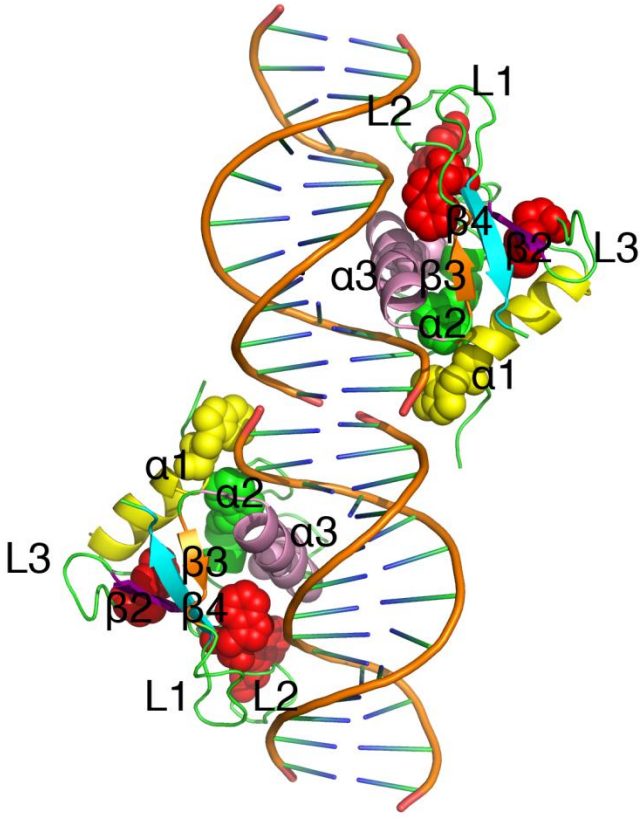




DNA-Bindedomänen

Helix-Turn-Helix-Motif
z.B. AS-Reste in der Bindehelix von Sigmafaktoren





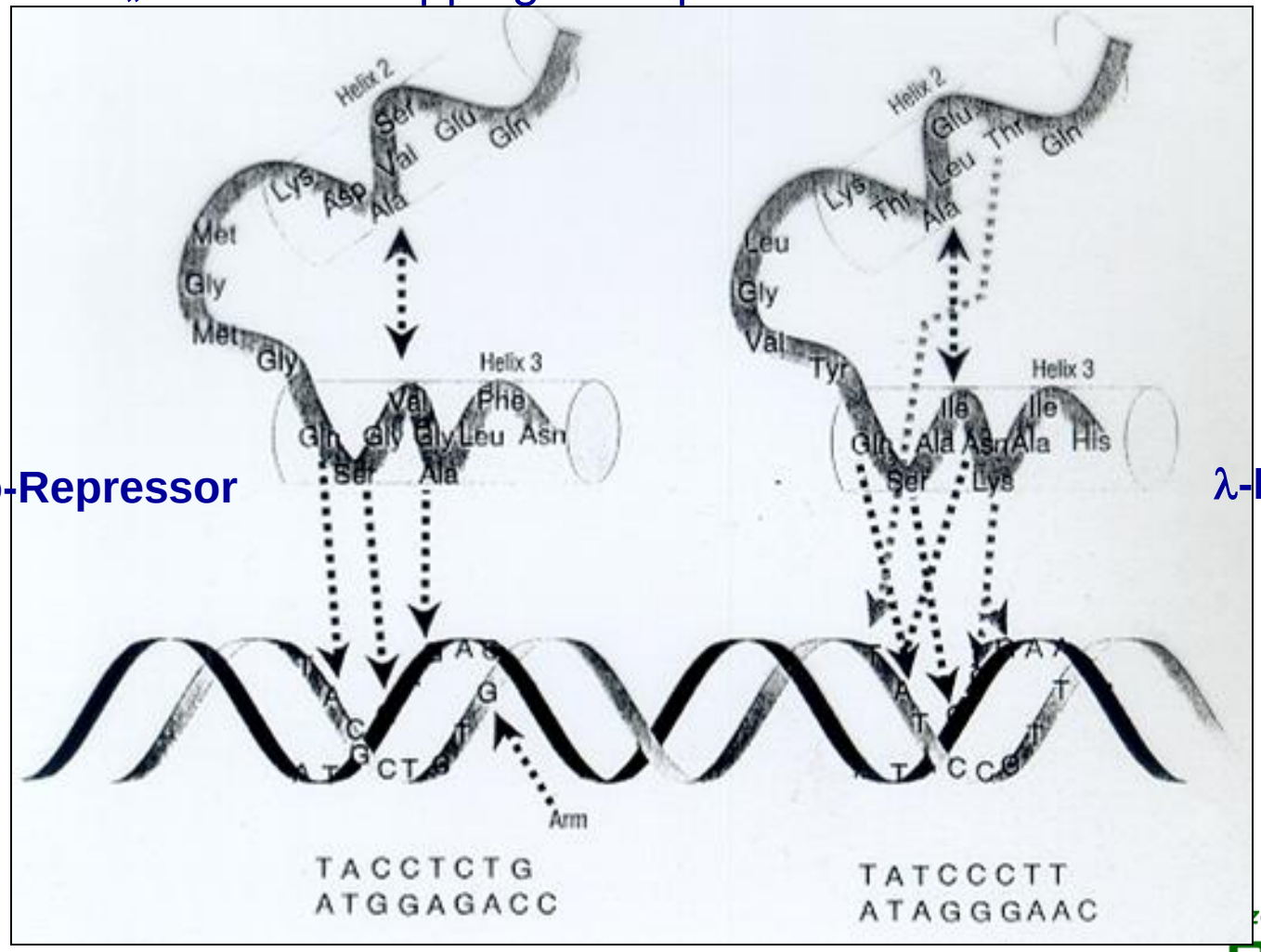
DNA-Bindedomänen

Helix-Turn-Helix-Motif

z.B. AS-Reste in weiteren HTH-Proteinen

„Domain-swapping“ zum positiven Nachweis

Cro-Repressor



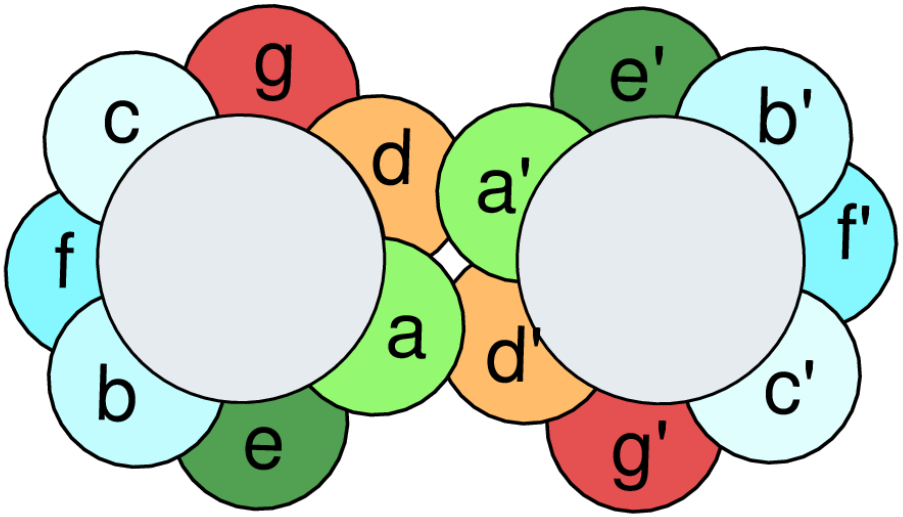
λ-Repressor

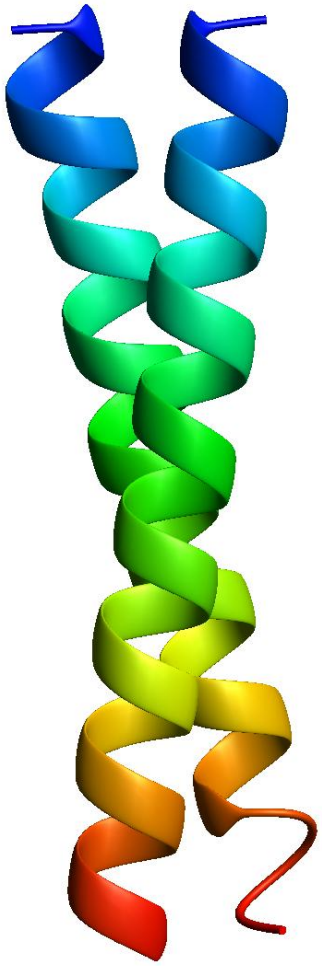
Gln-Ser-Gly-Val-Gly-Ala-Leu-Phe

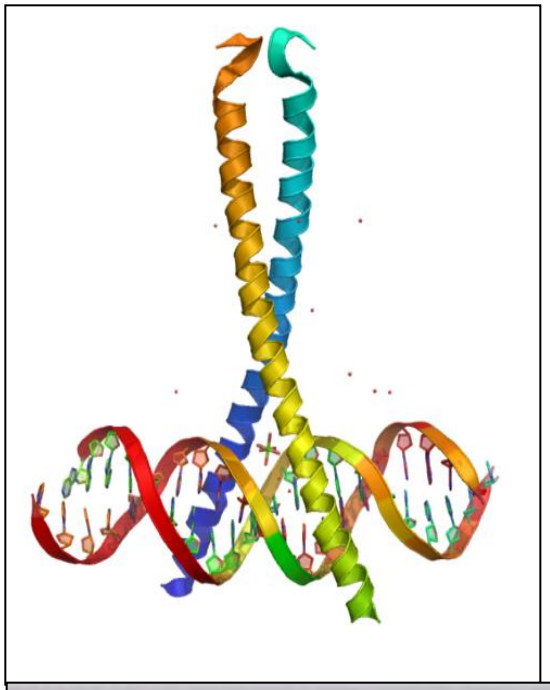
Gln-Ser-Ala-Ile-Asn-Lys-Ala-Ile

Proteindomänen bei Transkriptionsfaktoren
Leucin-Zipper

Ein Proteinmotif zur Dimerisierung von Proteinen und nicht zur DNA-Bindung!
z.B. C-terminale Domäne von LacI u.v.a.m.

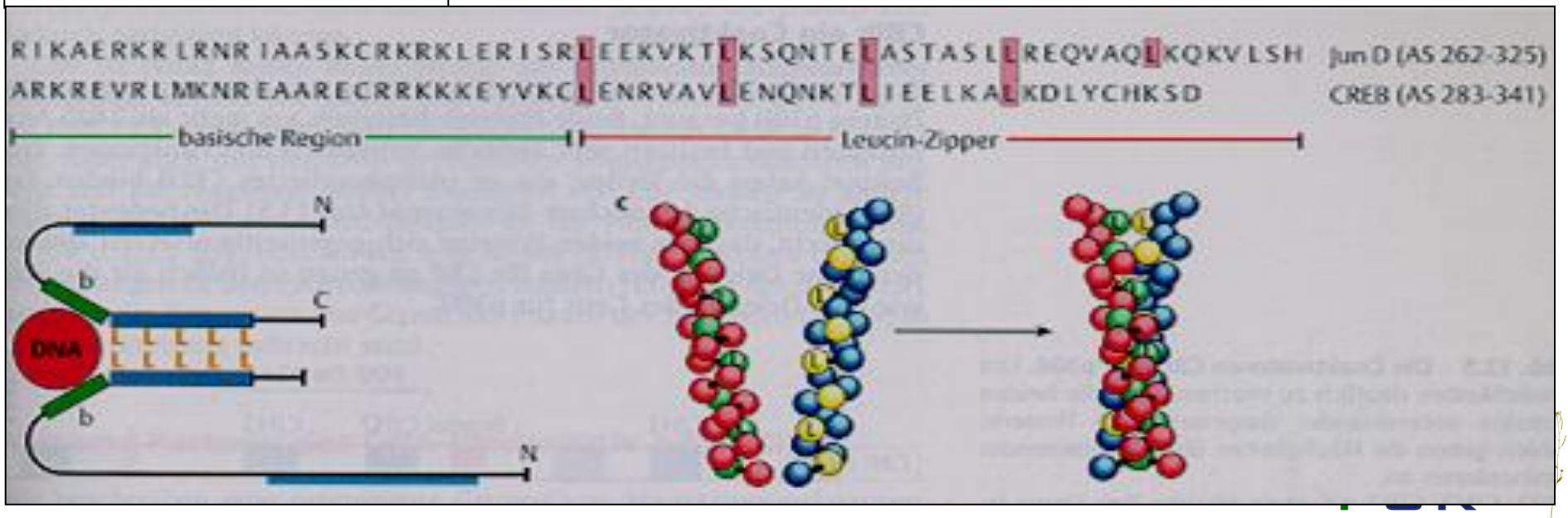






Entstehung von DANN-Bindedomänen nach Protein-Protein-Interaktion - B-Zip

z.B. der TF CREB interagiert mit anderen Transkriptionsfaktoren über einen Leu-Zipper und es entsteht eine gemeinsame, basische DNA-Bindedomäne B-Zip-Motif (basic-zipper)



Regulation der Transkription – bei Prokaryoten

Wichtigste Regulationsebene ist Initiation der Transkription

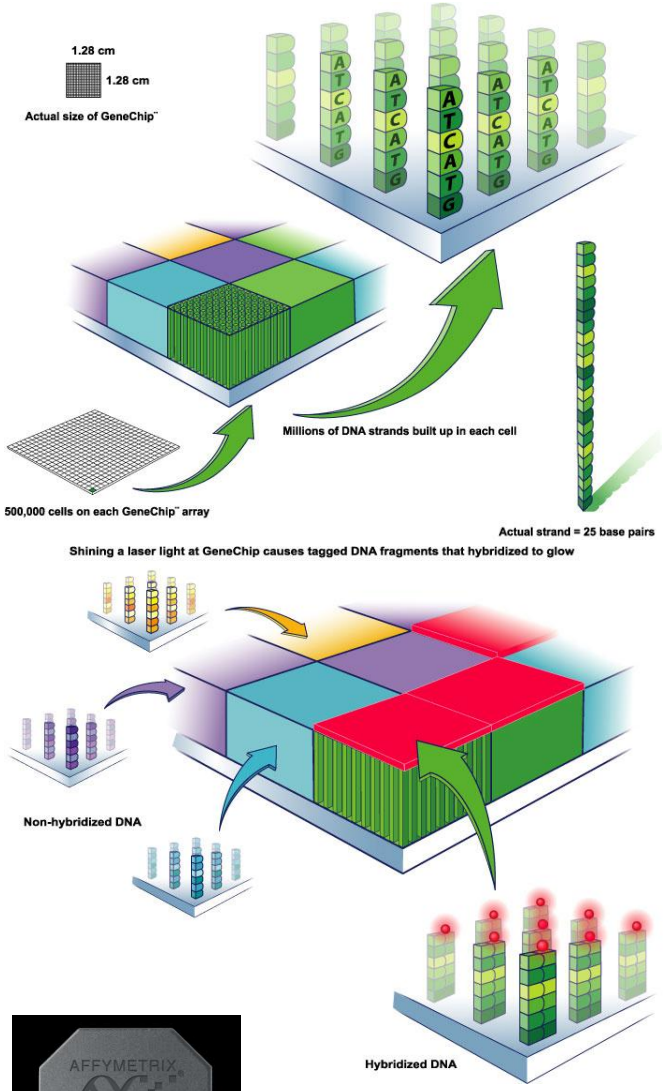
Stimmt weitgehend bei Bakterien – Transkription direkt mit Translation gekoppelt

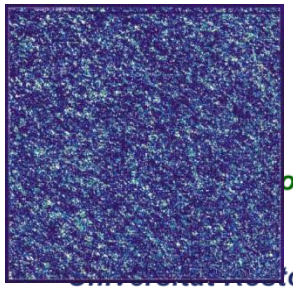
Bei Eukaryoten auch so bisher dargestellt – evtl. fraglich!

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

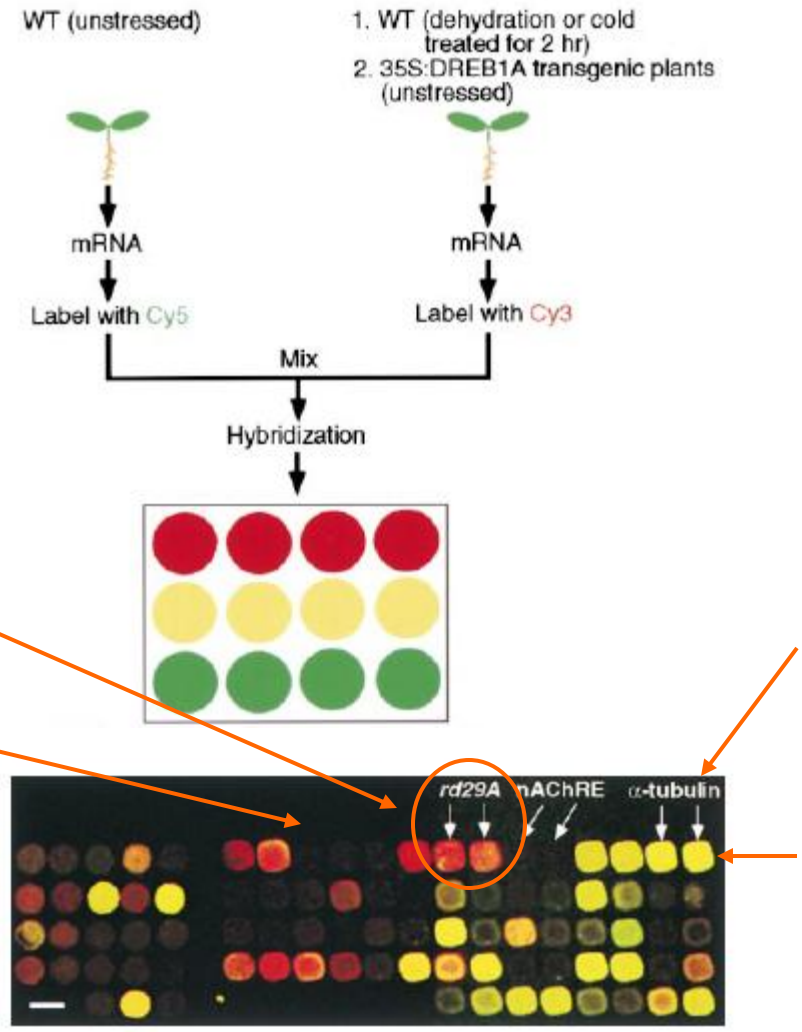


Figure 1. cDNA Microarray Analysis of Gene Expression under Cold Stress.

Tubulin als interne Kontrolle

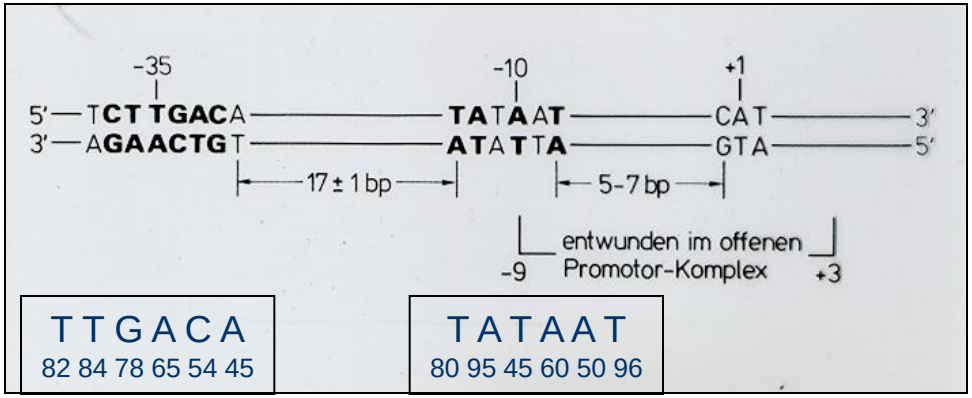
Auslöschung des Signals durch gleich starke Expression in beiden Zuständen

Pflanzenphysiologie
PUR
Universität Rostock

Regulation der Transkription bei Prokaryoten

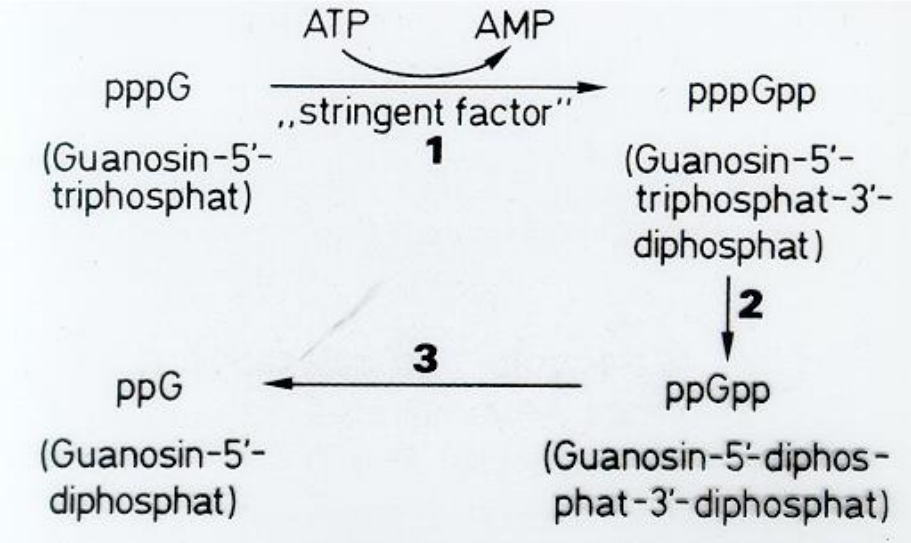
1. **Promotorsequenz** – starke Promotoren ähneln der consensus-Sequenz

Ergebnis einer langen Adaptation (Kurzzeit – Akklimation)
Biotechnologie



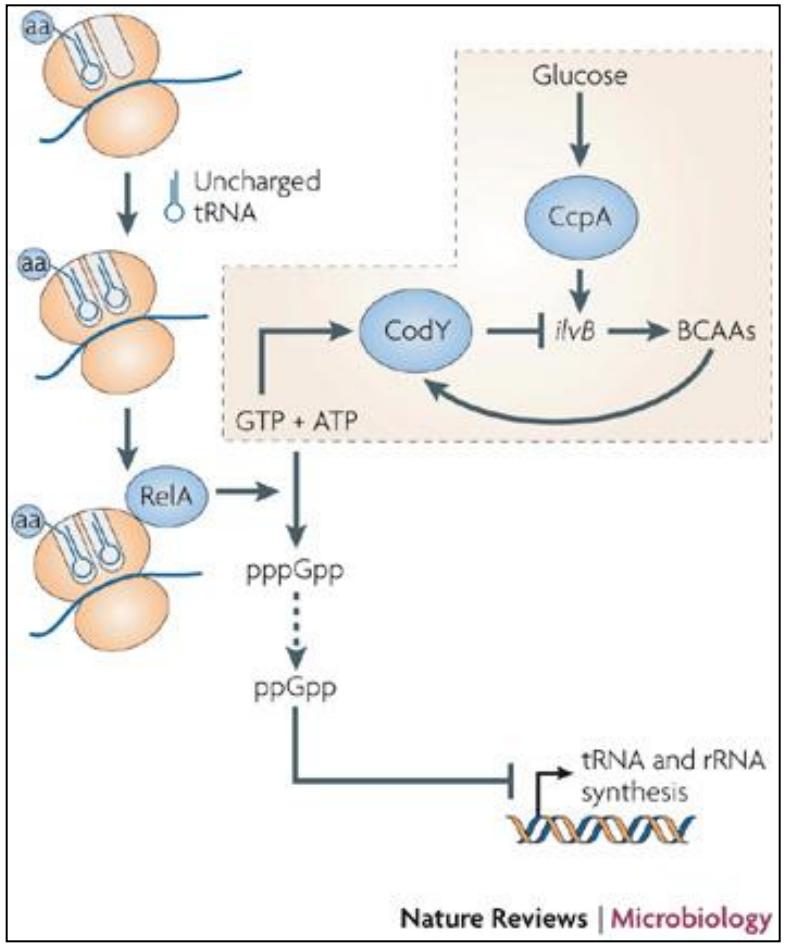
Regulation der Transkription bei Prokaryoten

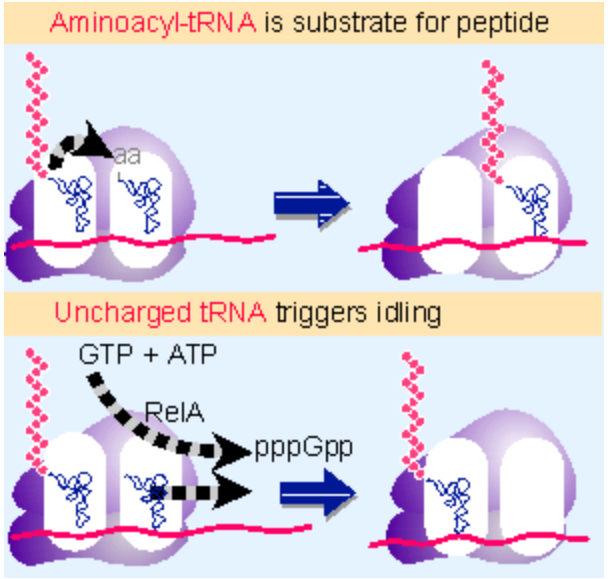
2. „stringent – response“, generelle Beeinflussung der Transkriptionsrate
niedermolekularer Faktor beeinflusst RNAP
Generelle Reaktion auf Nahrungs-(AS)-Mangel



Regulation der Transkription bei Prokaryoten

2. „stringent – response“, generelle Beeinflussung der Transkriptionsrate
niedermolekularer Faktor beeinflusst RNAP



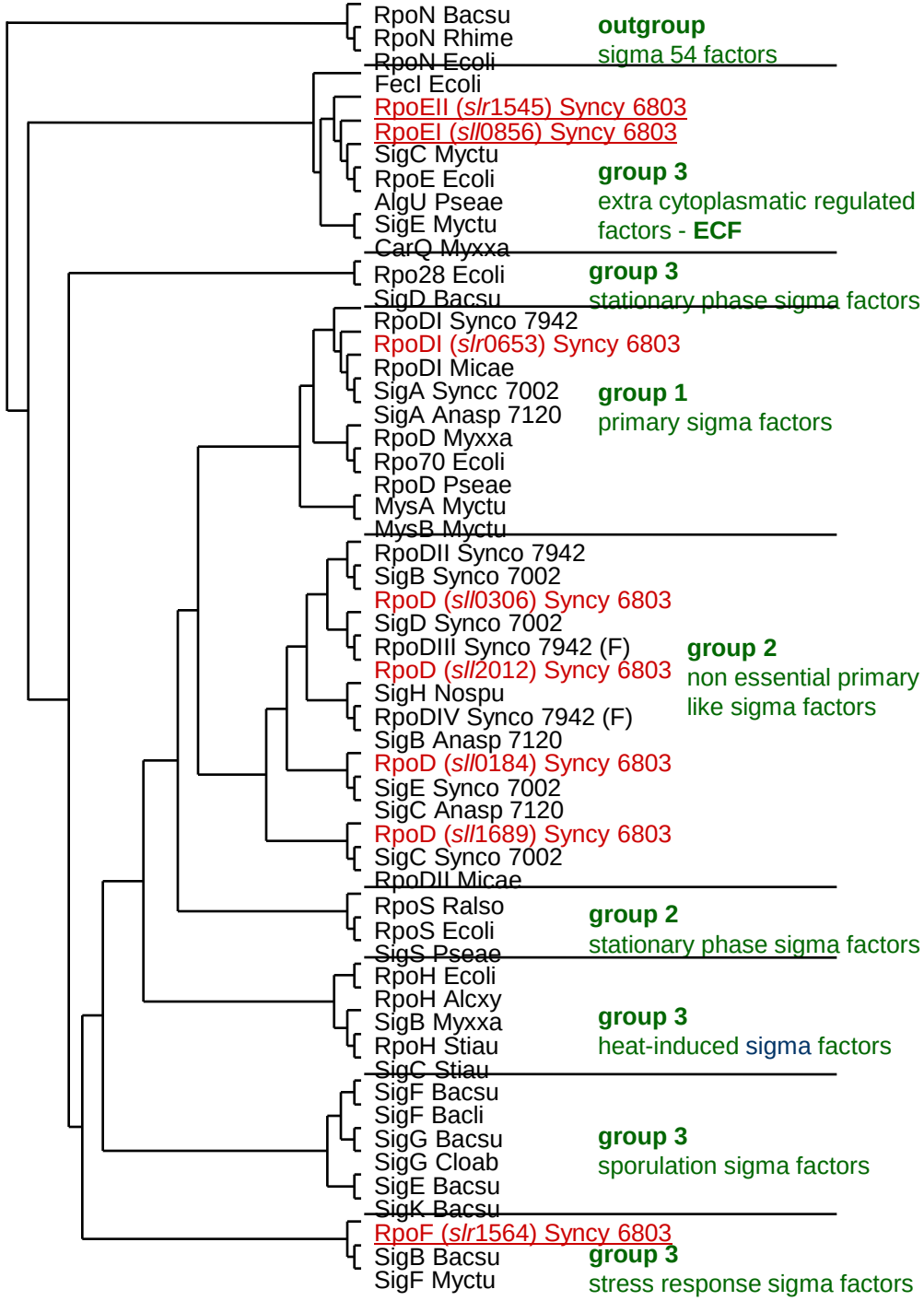


Regulation der Transkription bei Prokaryoten

3. Alternative Sigmafaktoren

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

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



Regulation der Transkription bei Prokaryoten

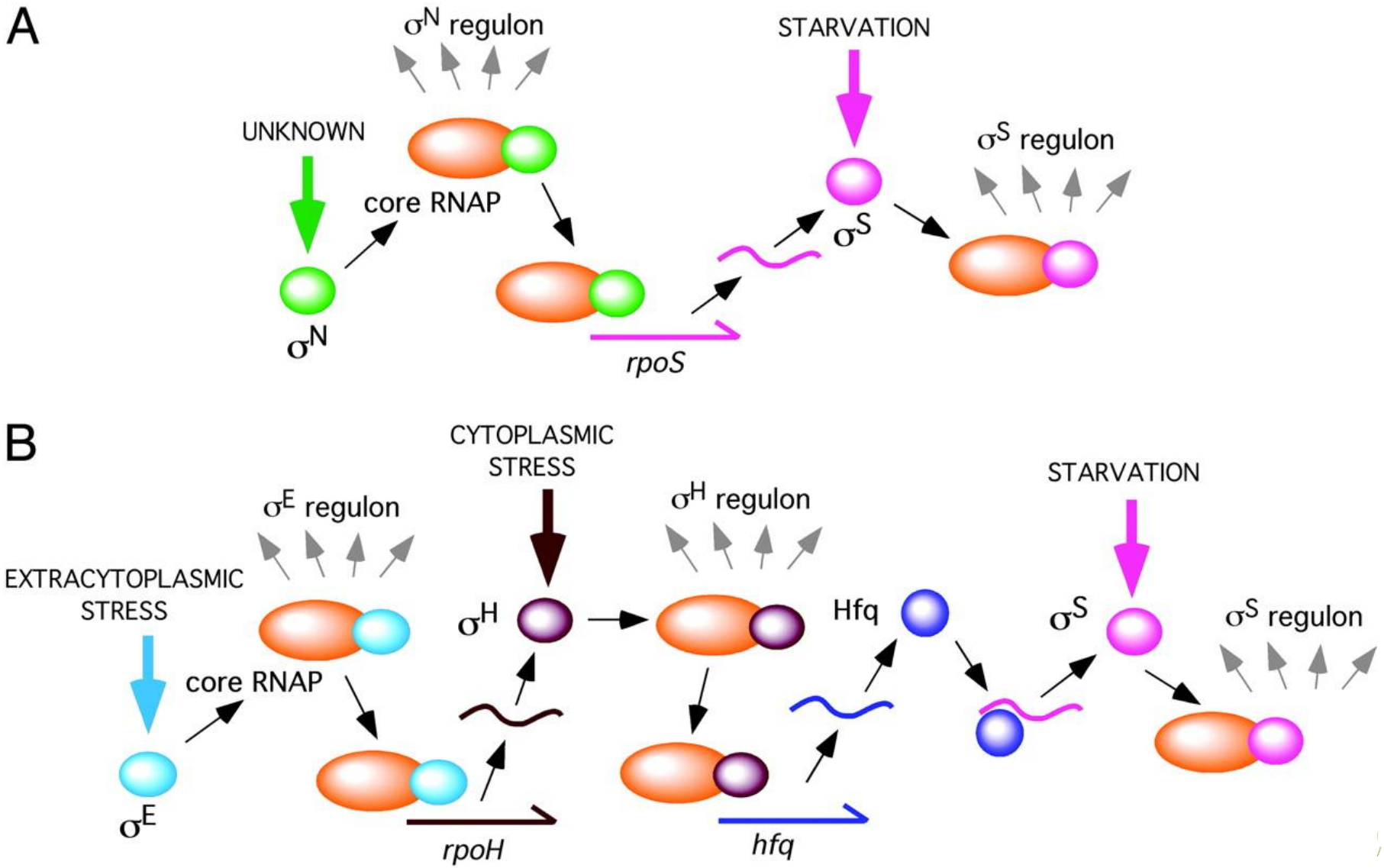
3. Alternative Sigmafaktoren

lassen sich in Gruppen einteilen

Sig70 versus Sig54

Sig70 Group 1
Sig70 Group 2
Sig70 Group 3 (ECF)

Pflanzenphysiologie
PUR
Universität Rostock



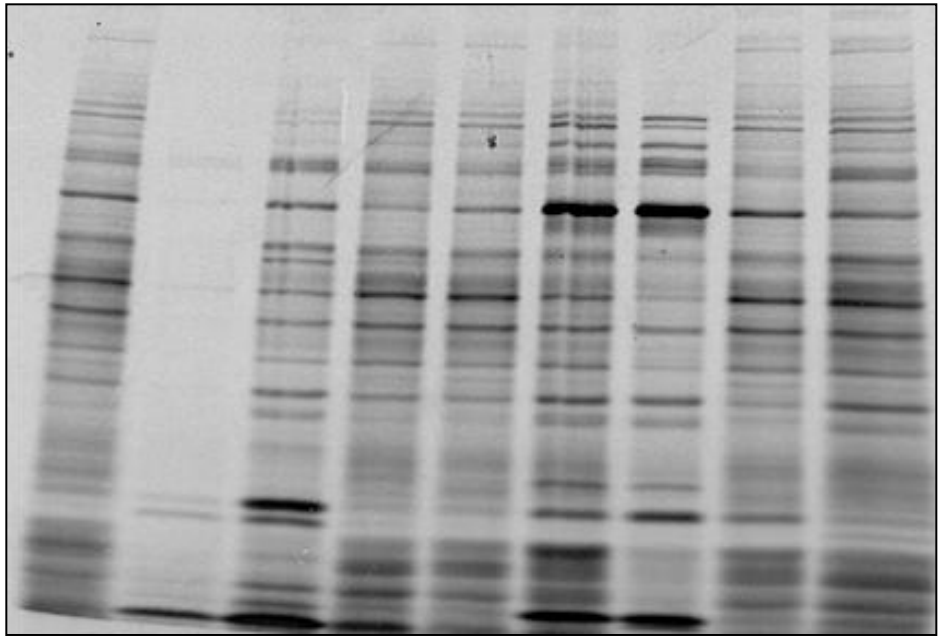
Pflanzenphysiologie
PUR
Universität Rostock

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

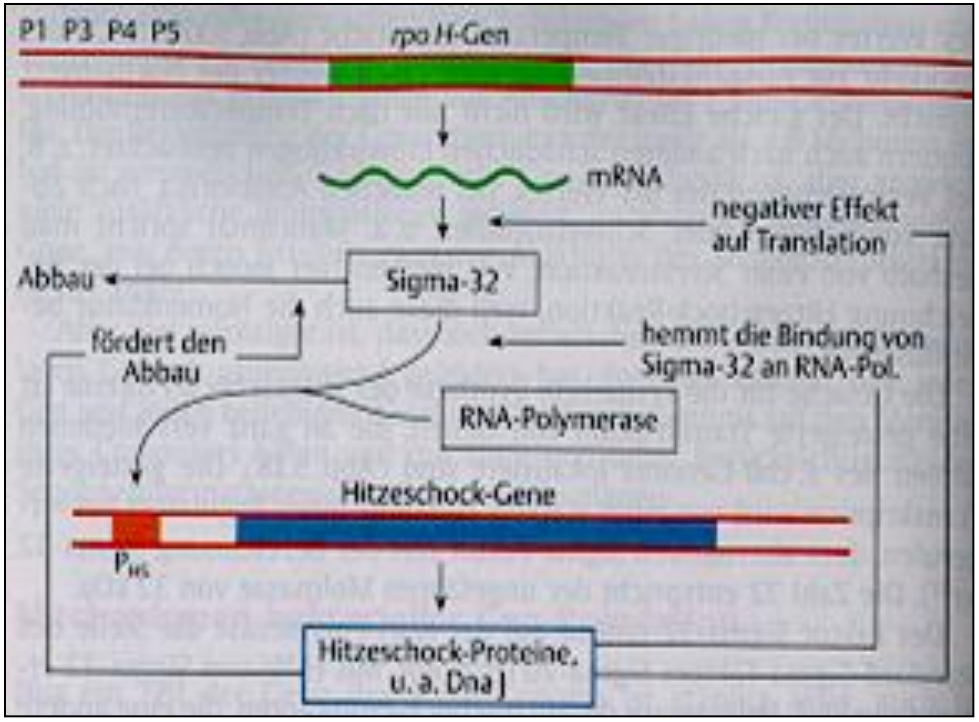
Pflanzenphysiologie
PUR
Universität Rostock

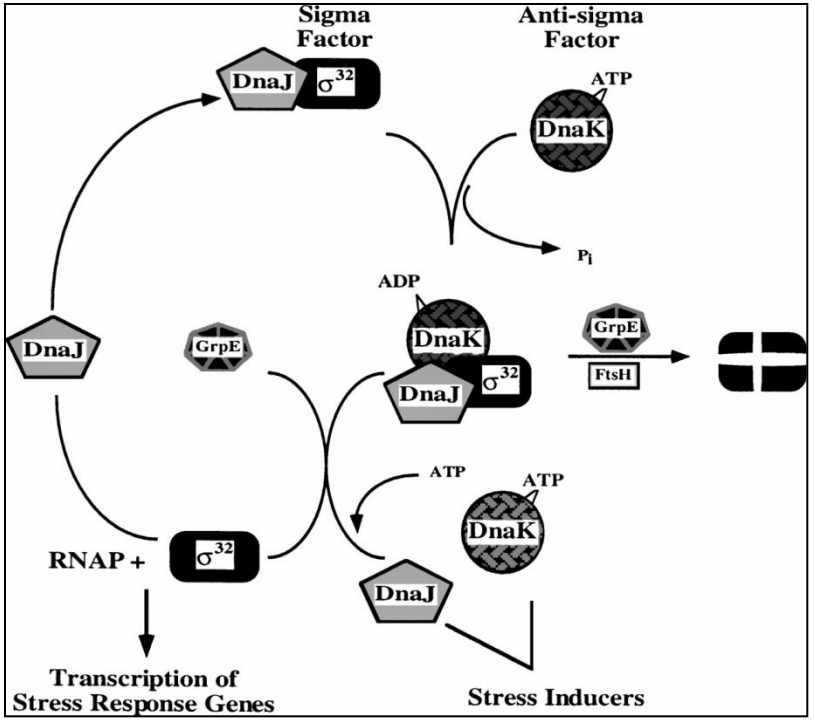
Regulation der Transkription bei Prokaryoten

3. Alternative Sigmafaktoren

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

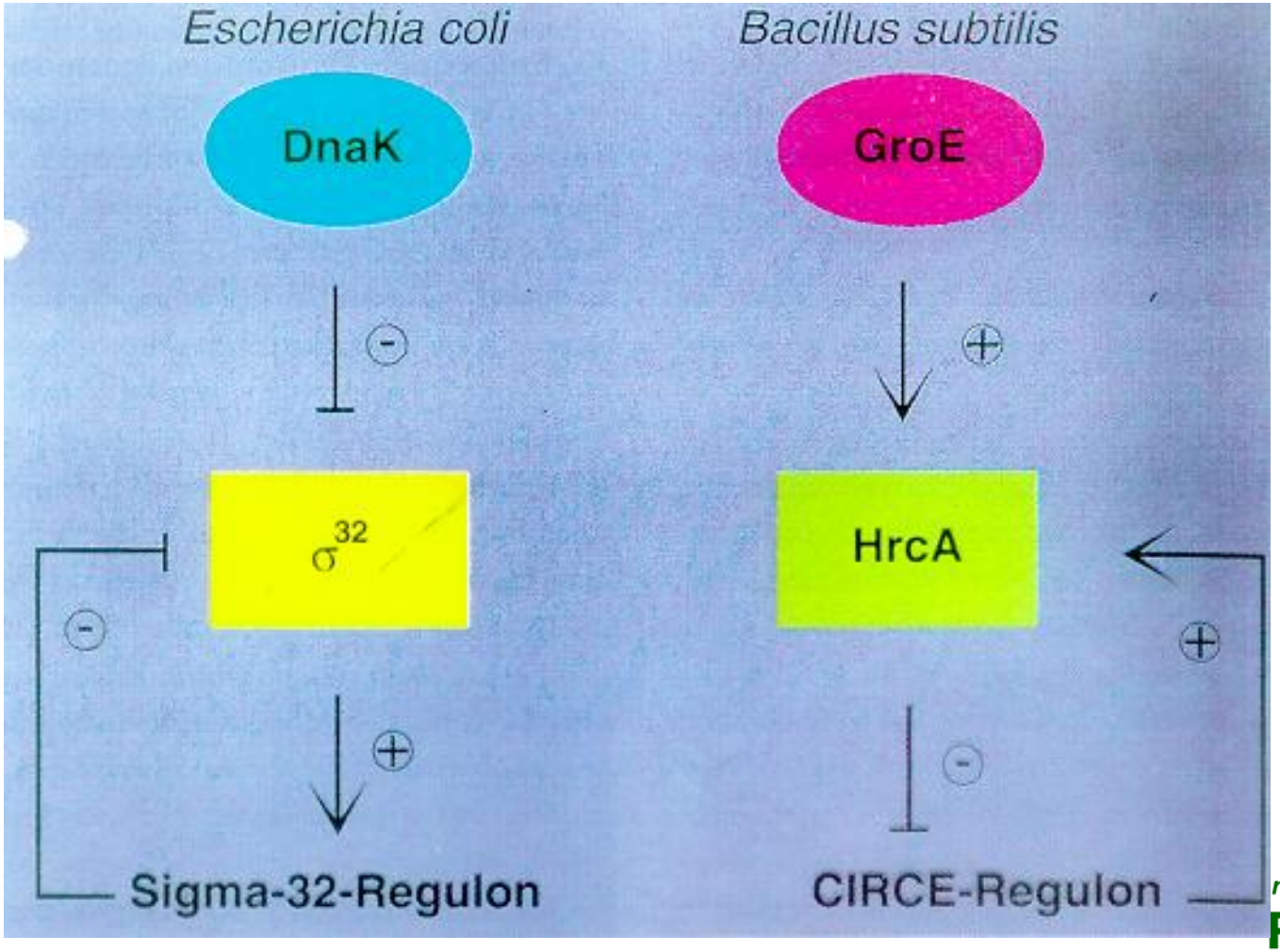
Hitzeschockgene haben mehrere Promotoren





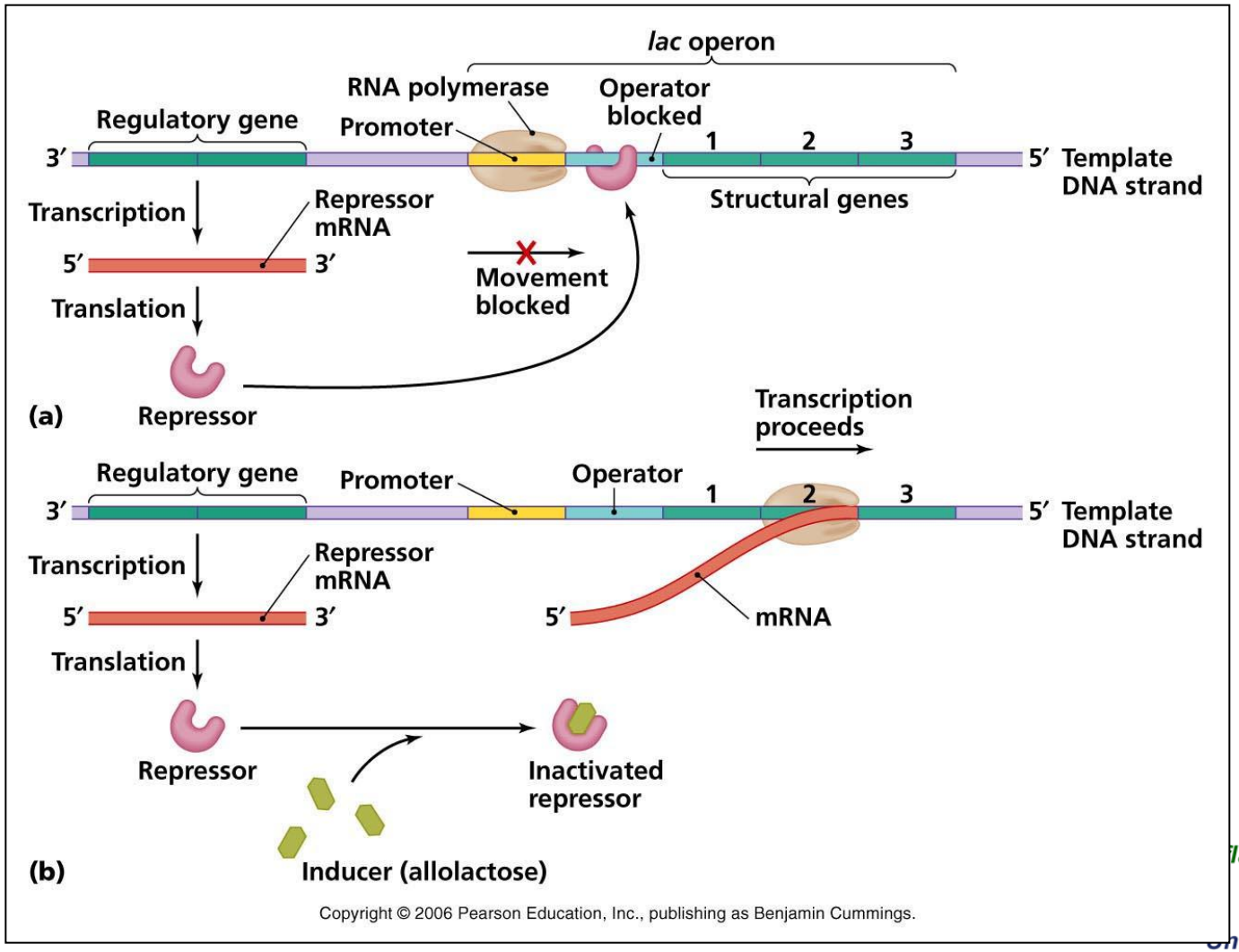
Regulation der Transkription bei Prokaryoten

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



Regulation der Transkription bei Prokaryoten
4. Regulatorproteine Repressoren/Aktivatoren

z.B. Modell zur Regulation des *lac* Operons
(ß-Galactosidase, Lac-Permease, Transacetylase) in *E. coli*



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Regulation der Transkription bei Prokaryoten

4. Regulatorproteine Repressoren/Aktivatoren

z.B. Modell zur Regulation des *lac* Operons in *E. coli*

Struktur des Lac-Repressorproteins – LacI

Unter Kontrolle eines schwachen Promotors

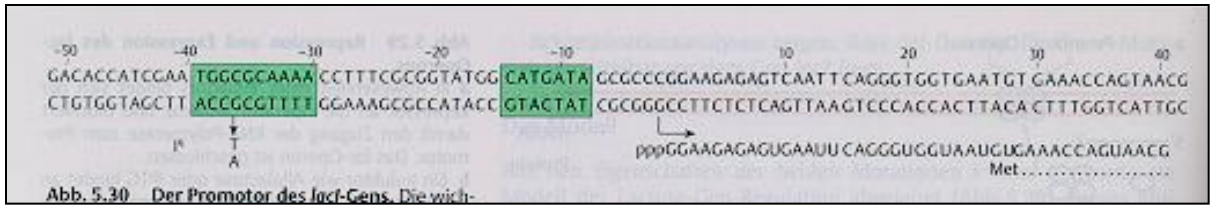
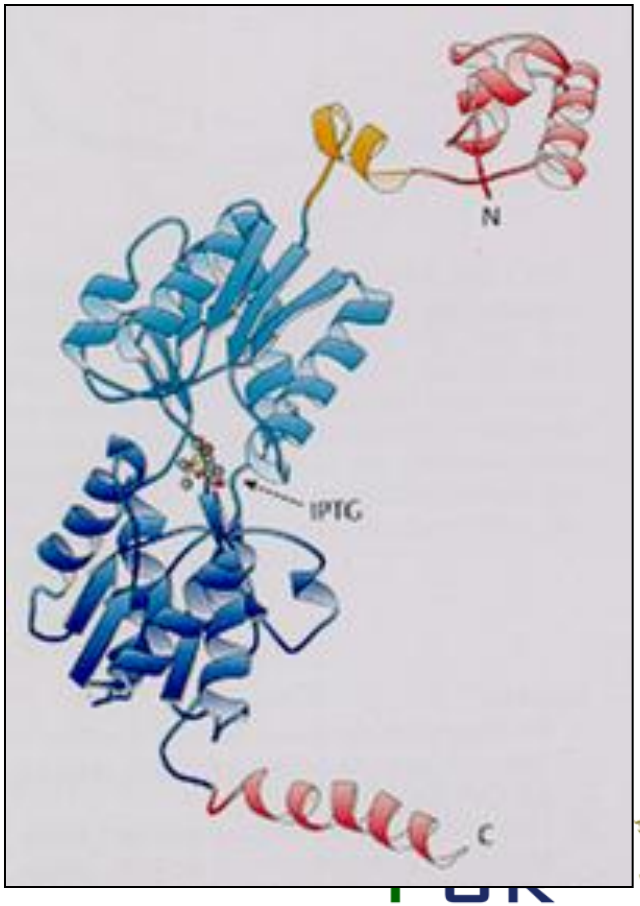


Abb. 5.30 Der Promotor des *lacI*-Gens. Die wich-



LacI mit drei Domänen:

N-terminal ist die DNA-Bindedomäne

Zentral ist die Induktorbindedomäne

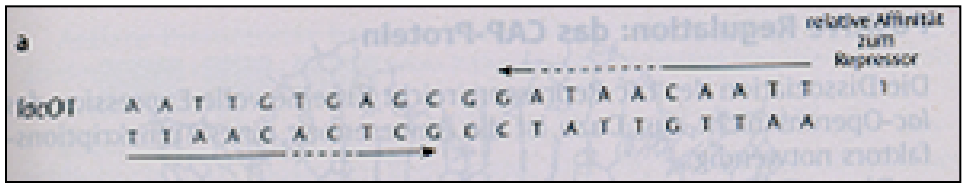
C-terminal ist die Dimerisierungsdomäne

Regulation der Transkription bei Prokaryoten

4. Regulatorproteine

Repressoren/Aktivatoren
z.B. Modell zur Regulation des *lac* Operons in *E. coli*

Modell zur Bindung des Repressors LacI an den Operator

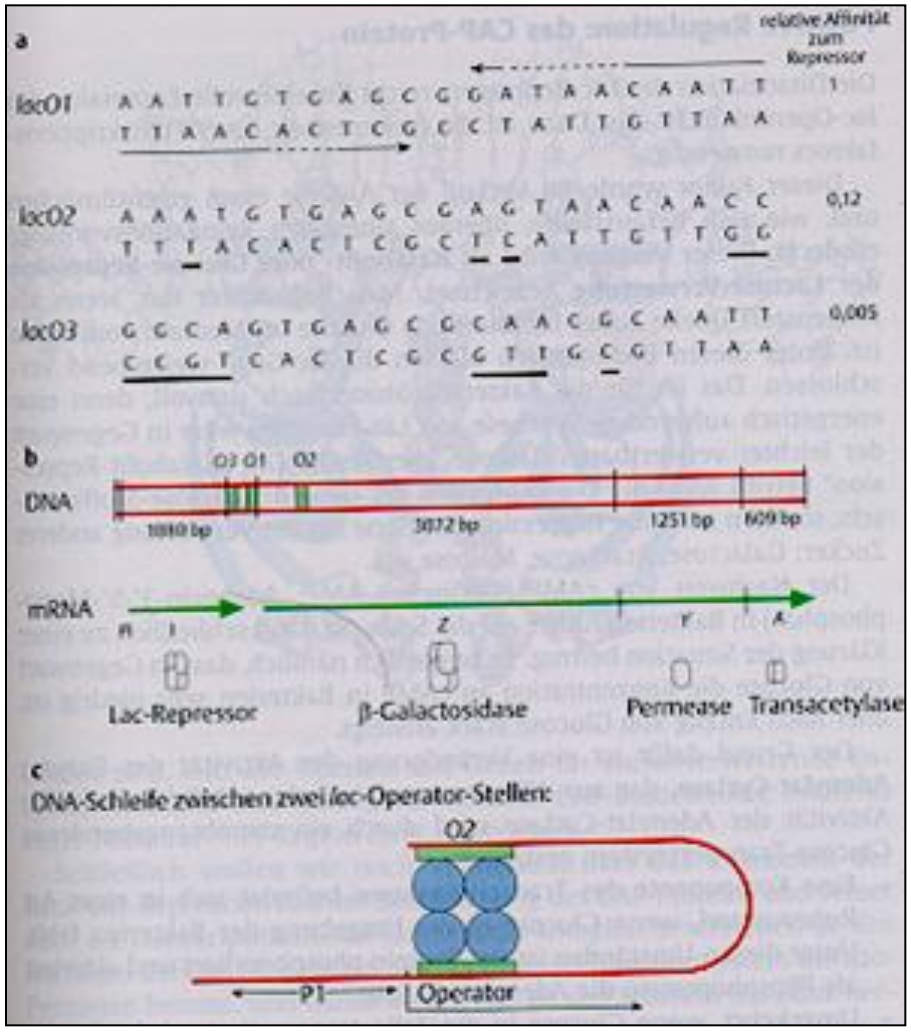


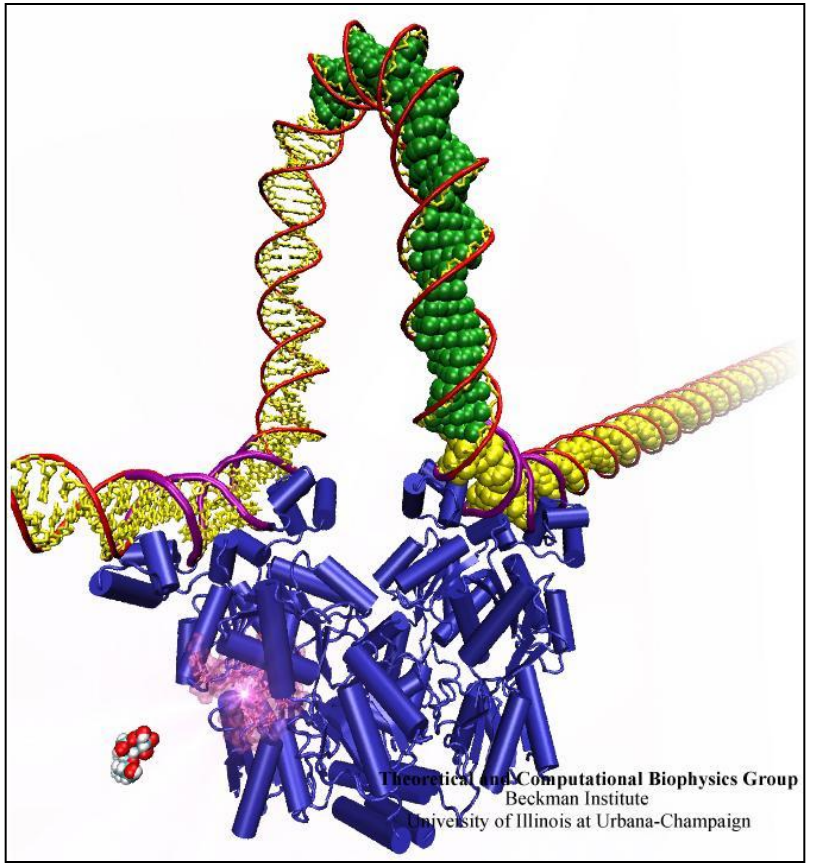
Pflanzenphysiologie
PUR
Universität Rostock

Regulation der Transkription bei Prokaryoten

4. Regulatorproteine Repressoren/Aktivatoren

z.B. Modell zur Repression des *lac* Operons am Operator(en)

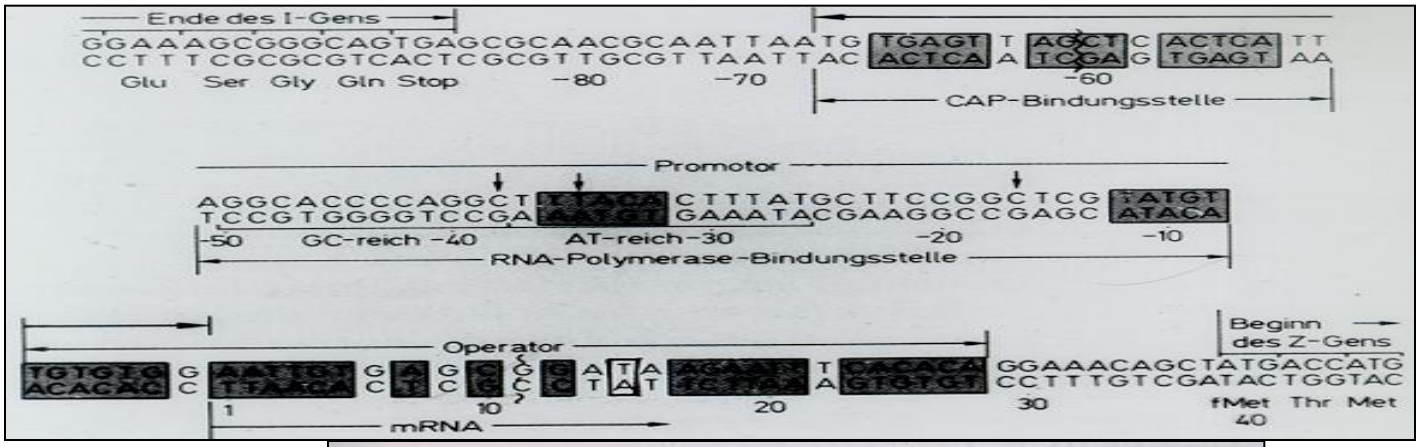


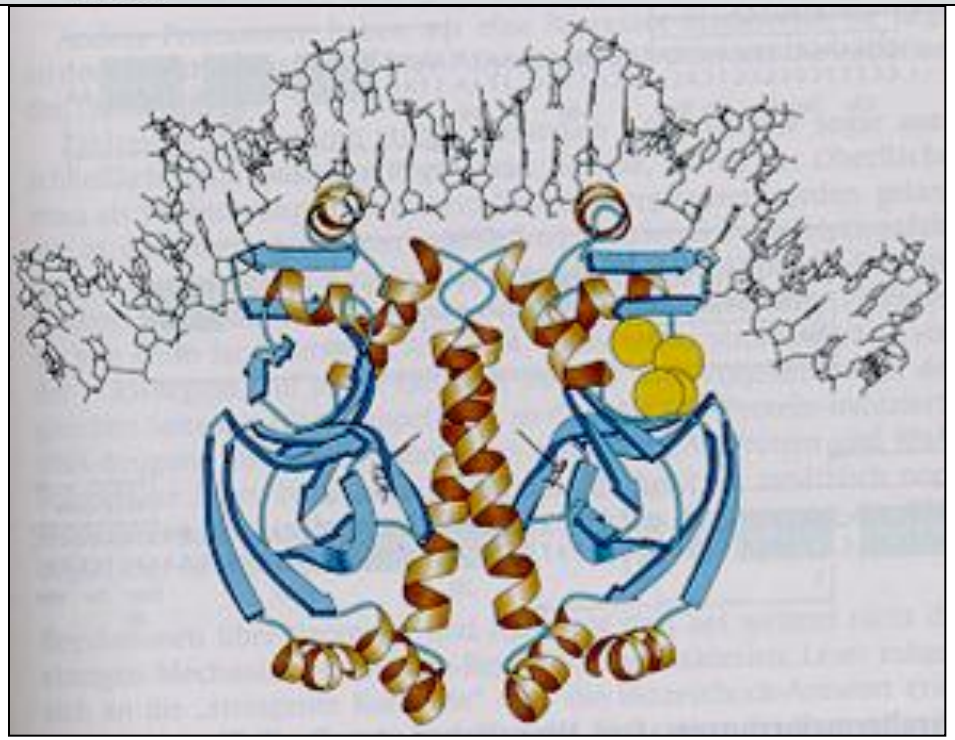


Regulation der Transkription bei Prokaryoten

4. Regulatorproteine Repressoren/Aktivatoren

Das *lac* Operon in *E. coli* unterliegt zusätzlich einer positiven Kontrolle!

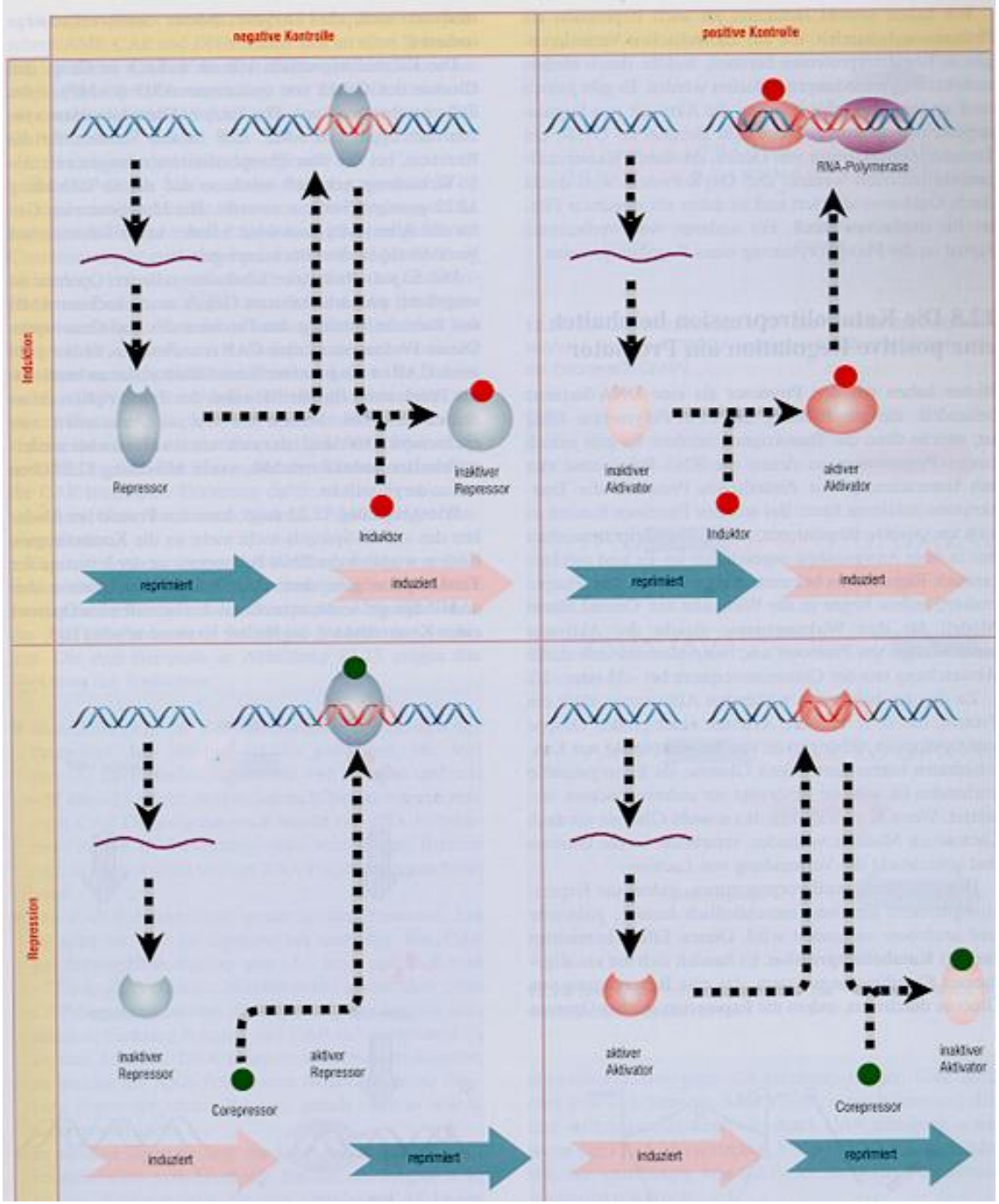




Bindung des CAP am Aktivatorelement

Aktiviert durch cAMP bei Glucosemangel

Pflanzenphysiologie
PUR
Universität Rostock



Regulation der Transkription bei Prokaryoten

4. Regulatorproteine Repressoren/Aktivatoren

Zusammenhang
Induktion/Repression
und
negative sowie positive
Kontrolle

Pflanzenphysiologie
PUR
Universität Rostock