

Thema: Eukaryotische Genregulation und RNA- Prozessierung

Spleißen, Capping, Polyadenylierung,
RNA-Editieren

Erwin R. Schmidt

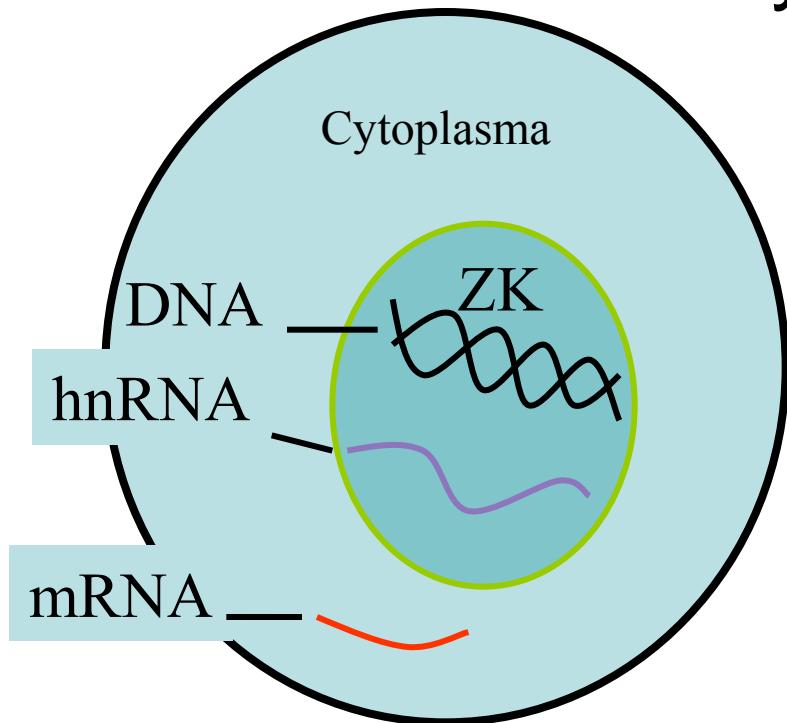
11. 01. 2013

Worin unterscheiden sich die Gene bzw. die Genprodukte von Eukaryoten und Prokaryoten?

Prokaryoten	Eukaryoten
Keine Introns (i. d. Regel)	Exon-Intron-Struktur (i. d. Regel)
Gene in Operons	Keine Operons*
mRNA polycistronisch	mRNA monocistronisch*
Nur eine RNA-Polymerase	3(4) RNA-Polymerasen
Shine-Dalgarno Sequenz	Capping
Keine Polyadenylierung	Polyadenylierung (i. d. Regel)
Transkription + Translation simultan	Transkription + Translation zeitl. u. räumlich getrennt
Kein Chromatin	Gene in Chromatin

* Ausnahme mikroRNAs

Transkription der Gene im Zellkern(ZK) als Primärtranskripte (hnRNA), Prozessierung der RNA im ZK, reife mRNA und Translation im Cytoplasma



hnRNA: heterogene **nukleäre RNA**

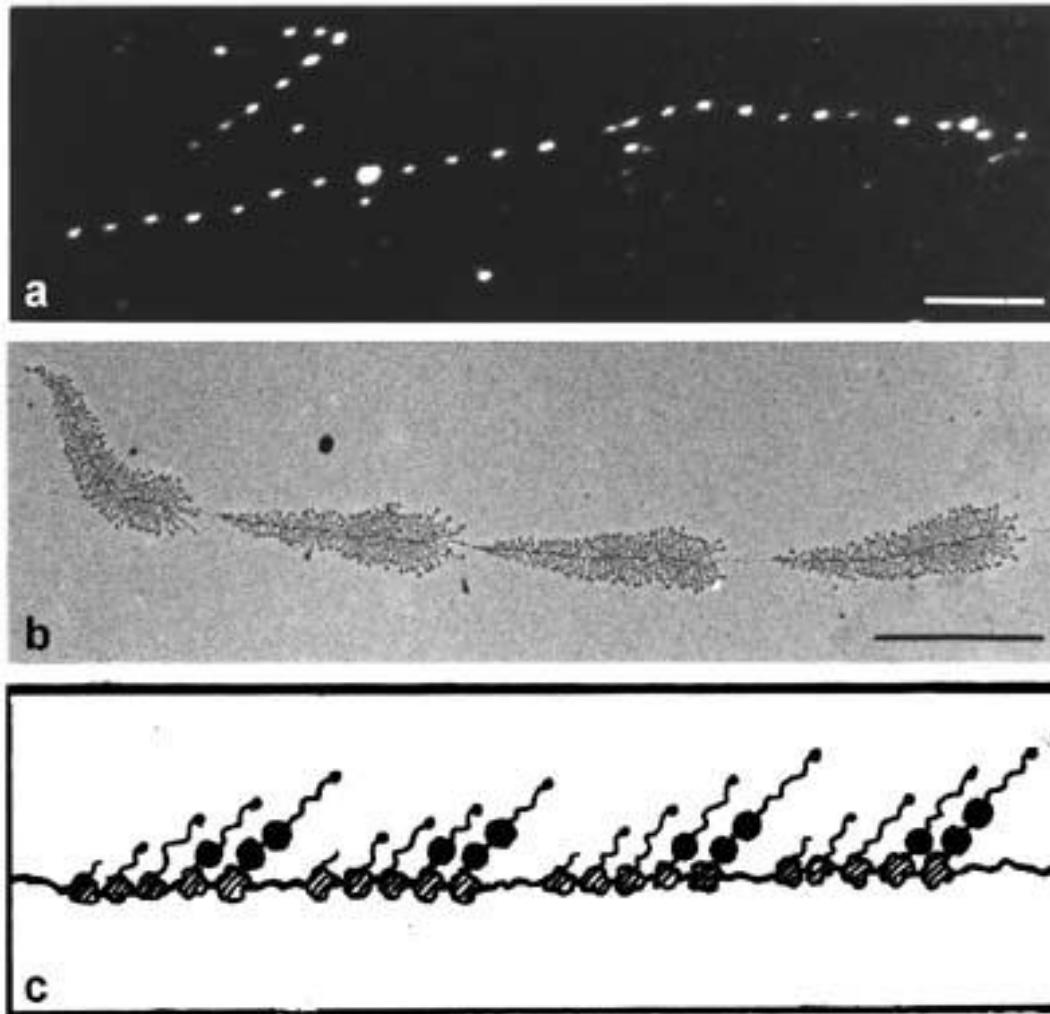
mRNA: messenger **RNA**

Genstruktur der Eukaryoten

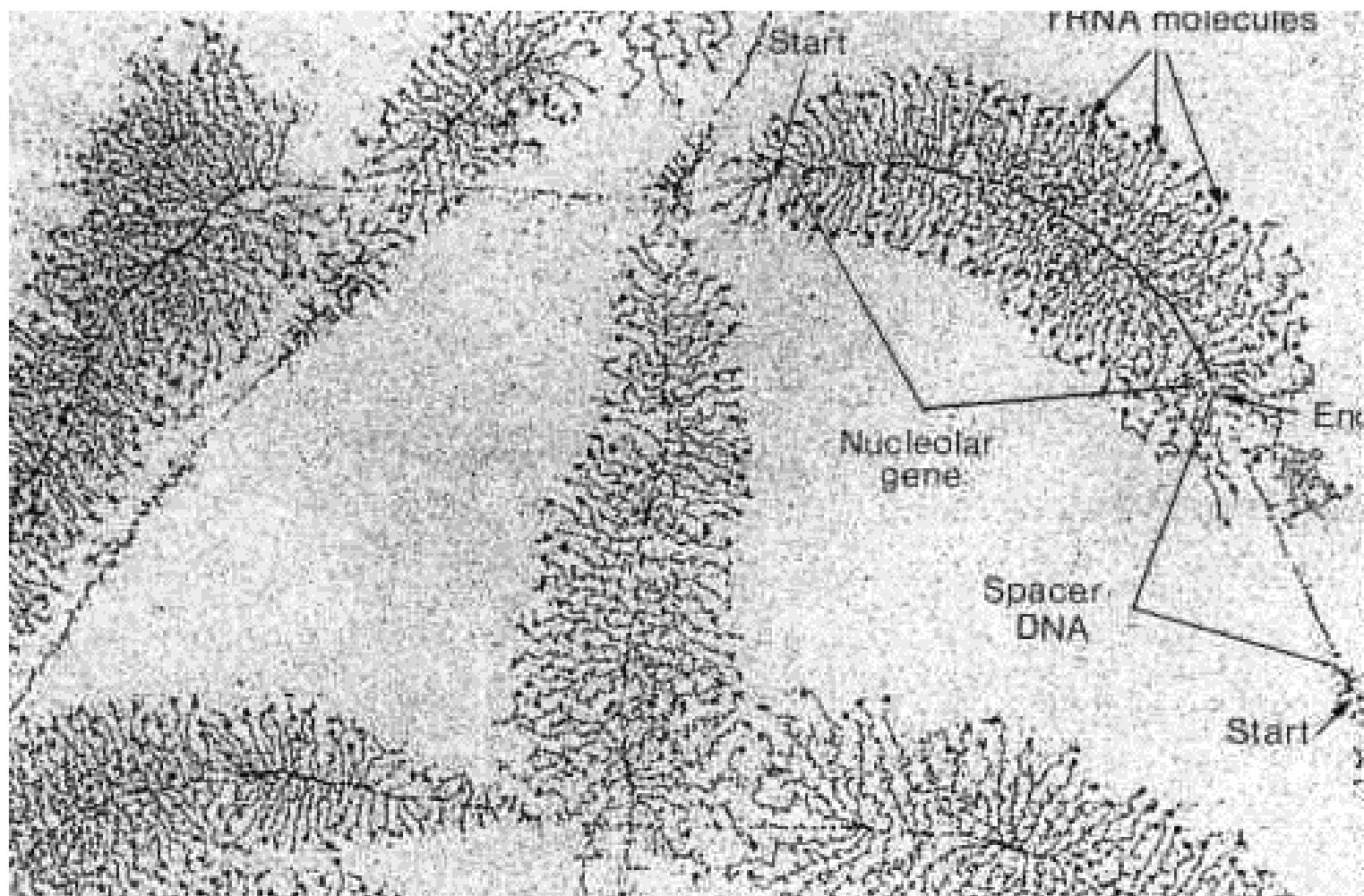
je nach Genklasse ist die Struktur verschieden:

1. RNA Pol I – Gene für 18S, 5,8S, 28S rRNA
2. RNA Pol II – Gene für alle mRNAs
3. RNA Pol III – Gene für tRNAs, 5S rRNA, einige snRNAs
4. RNA Pol IV mi/siRNAs

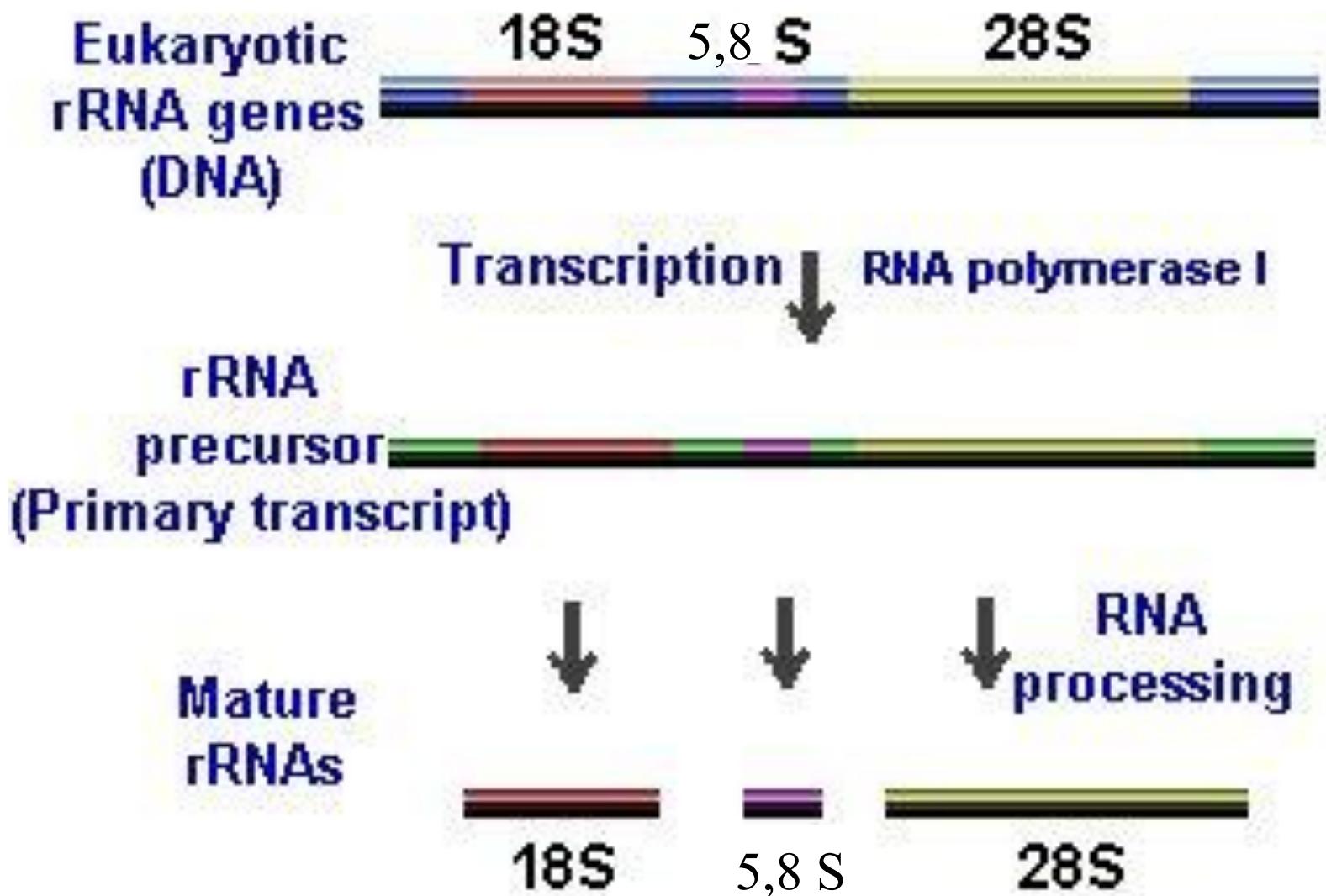
RNA-Polymerase I-Gene sind tandem-repetitiv organisiert



Elektronenmikroskopische Darstellung der rDNA-Transkription durch RNA-Pol I



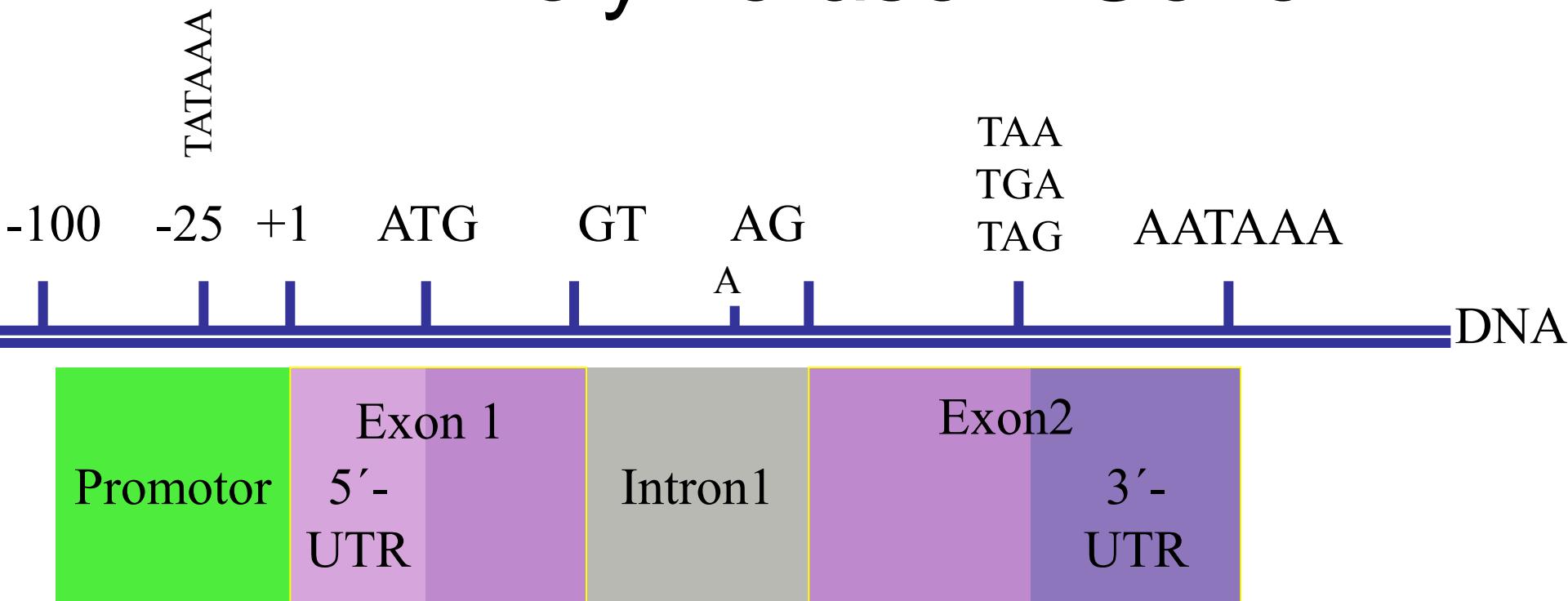
RNA-Polymerase I Gene:



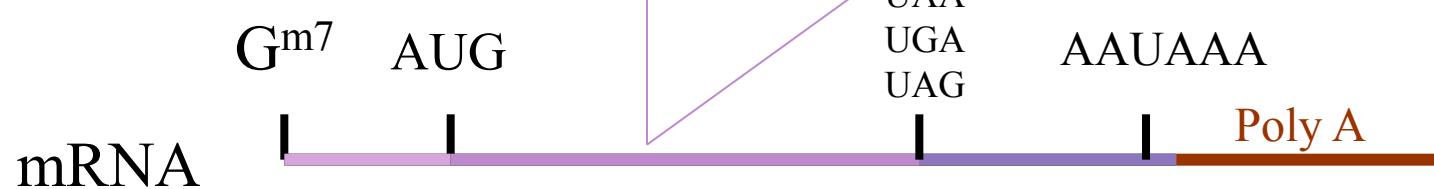
RNA-Polymerase I Gene

- Promotor 5'stromaufwärts
- Primärtranskript enthält 18S, 5,8S und 28S rRNA sowie interne „spacer“ RNA
- Gene immer repetitiv vorhanden
- Gene in Gruppen („cluster“) tandemartig angeordnet (i. d. Regel „head to tail“)
- nur bei manchen Organismen:
„Gen-Amplifikation“ (= zusätzliche, extrachromosomal Genkopien in speziellen Geweben)

RNA Polymerase II Gene



Primär-
transkript



UTR = „untranslatierte Region“

RNA – Polymerase II Gene

- 5-‘stromaufwärts Promotor (oft TATA-Box bei -25)
- Intron – Exon – Struktur (i. d. Regel)
- Primärtranskript („hnRNA“) enthält 5’UTR, alle Exons und Introns, 3’- UTR
- Transkriptionsstart = +1, = „Cap-Site“
- An Intron/Exongrenzen „consensus splice sites“ (Exon/ GT..Intron..AG/Exon)
- Polyadenylierungssignal
- Termination oft ungenau definiert
- Regulation durch „Enhancer“

RNA Pol II Promotorelemente

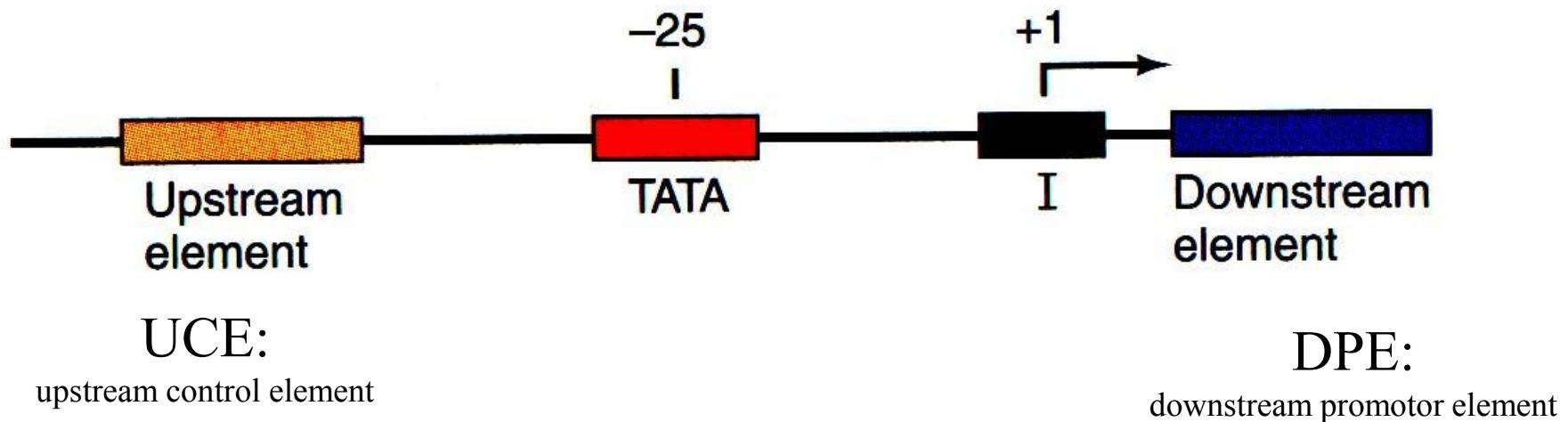
Sequenz: Position: Funktion

Name	Sequenz	Position	Funktion
TATA-Box Hogness- Box	TATAAA	-25 bis -30	Definiert Transkript- startpunkt
CAT-Box	GGCCAATC	-60 bis -80	Polymerase- Bindung via CBP
GC-Box	GGGCG	Variabel und mehrfach -1 bis -167	Definiert RNA- Pol Bindungstelle

Regulierte und unregulierte Gene

„Luxusgene“ und „Haushaltsgene“

Promotor Elemente RNA-Pol II



Beispiele für eukaryotische Promotoren



β -globin



SV40, early



thymidine kinase



histone H2B

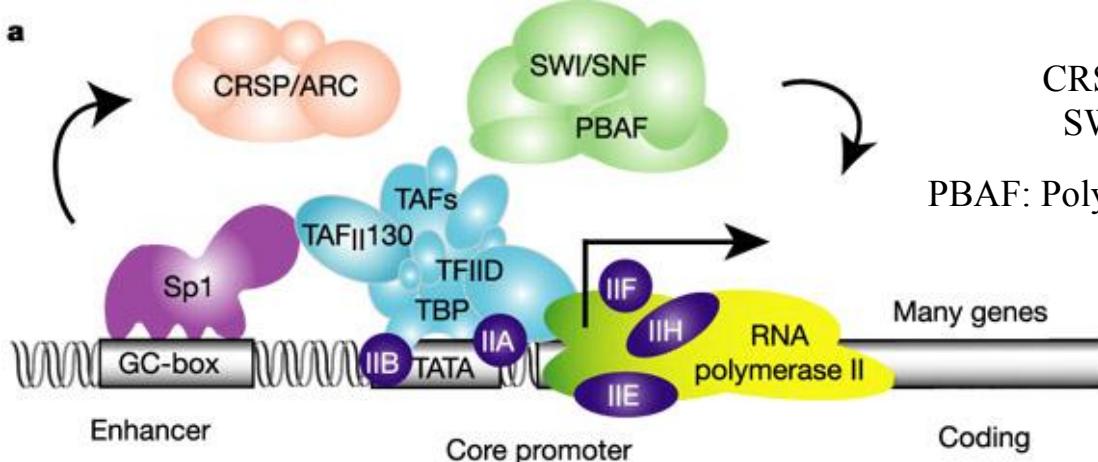


TATA box = (TATAAAA)

GC box = (GGGCGGG)

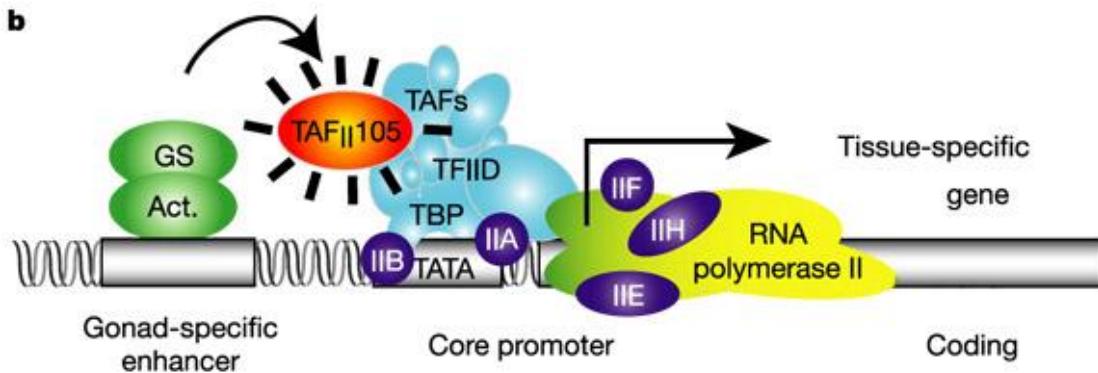
CAAT box = (GGCCAAATCT)

Octamer = (ATTTGCAT)

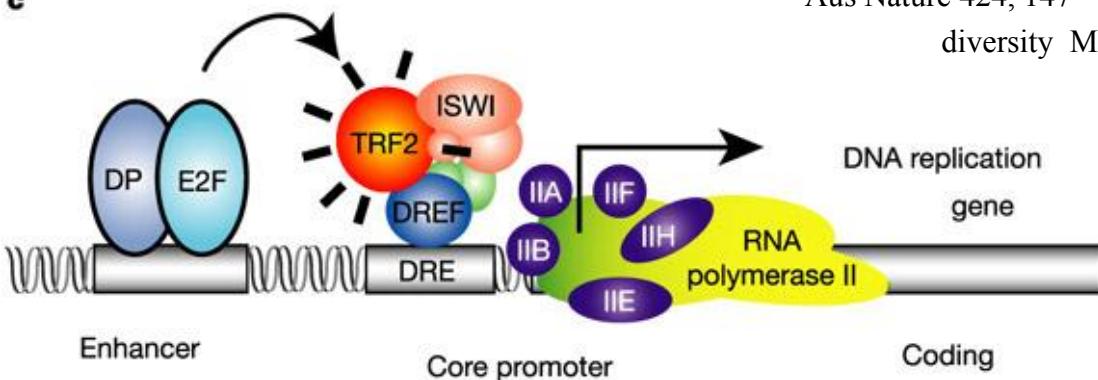
a

ARC: activator recruited cofactor
 CRSP: Cofactor required for SP1 activation
 SWI/SNF: sucrose non fermenting factor

PBAF: Polybromo- and BRG1 (603254)-associated factor

b

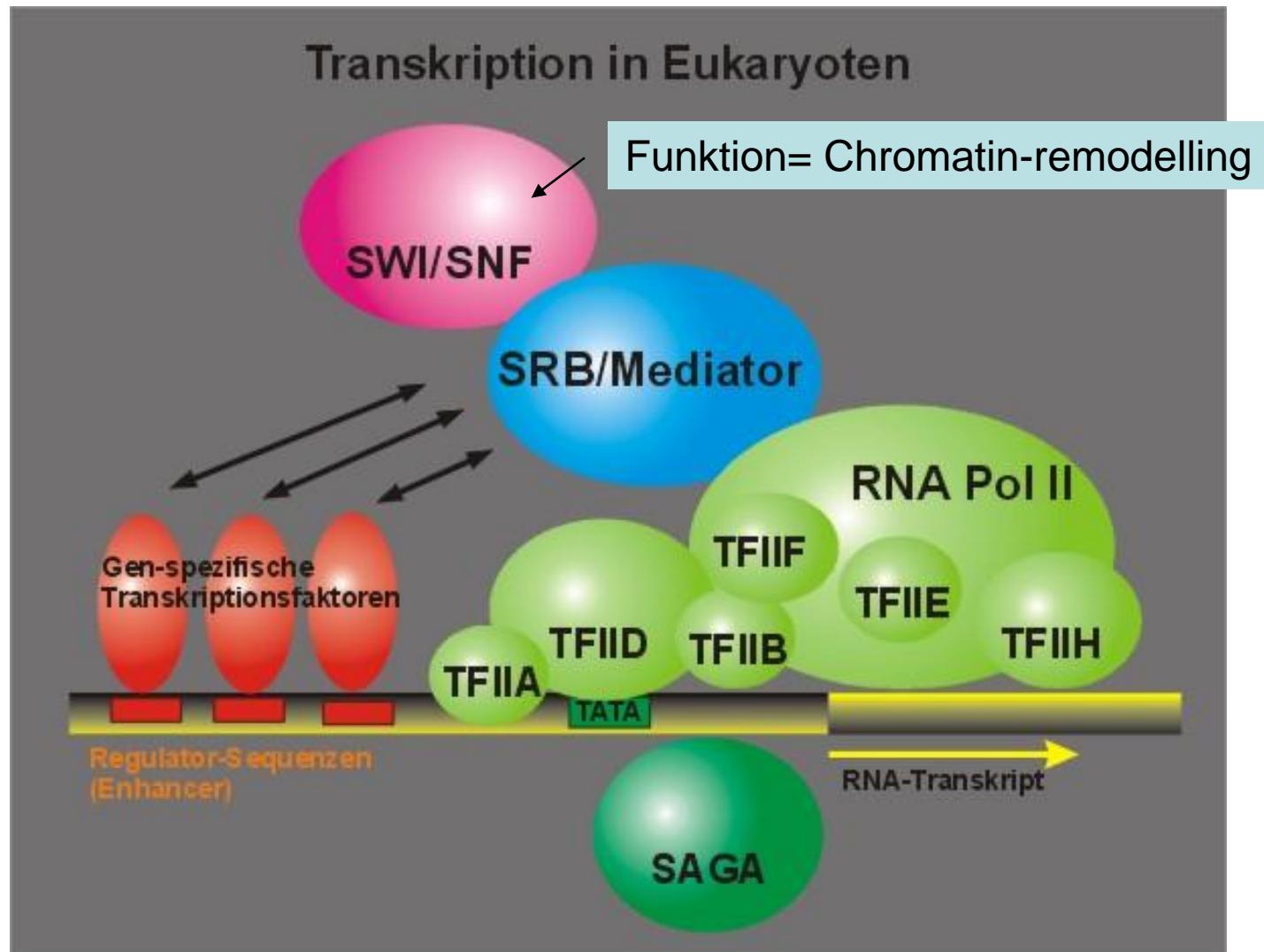
TAFs: TBP-associated factors

c

Aus Nature 424, 147 - 151 (10 July 2003); Transcription regulation and animal diversity MICHAEL LEVINE* AND ROBERT TJJIAN*†

DRE: DNA replication related element
 WSTF: Williams Syndrome Transcription Factor
 TRF: TBP-related factor

An der Aktivierung von Pol II-Genen beteiligte Komplexe

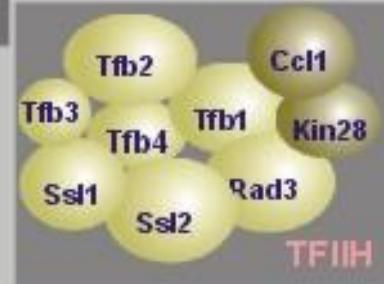
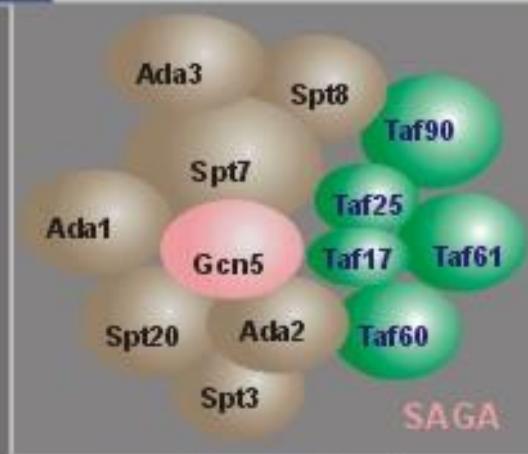
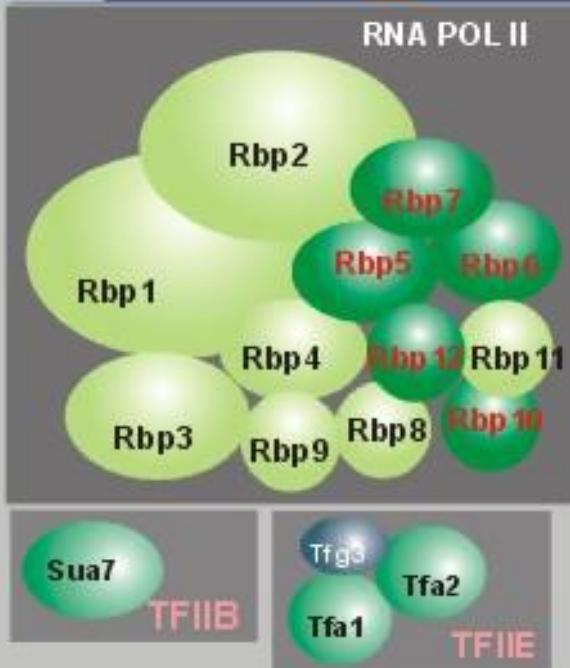
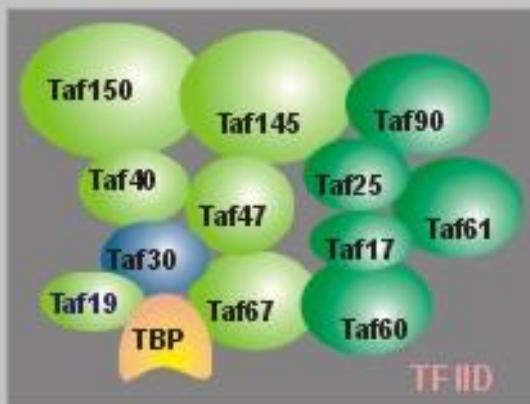
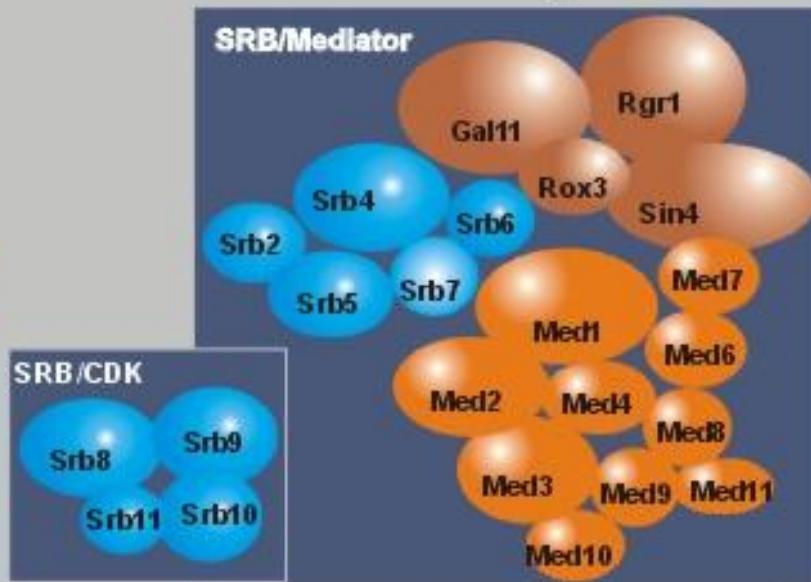
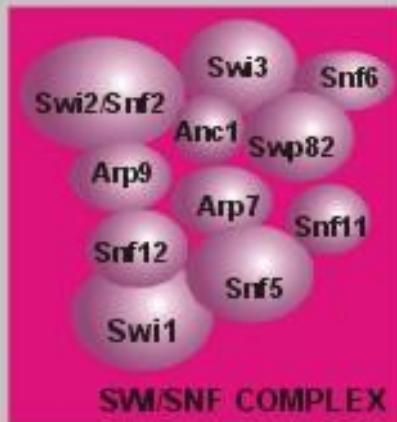


The multiprotein **Mediator complex** is a coactivator required for transcriptional activation of **RNA polymerase II** transcribed genes by DNA binding **transcription factors**.

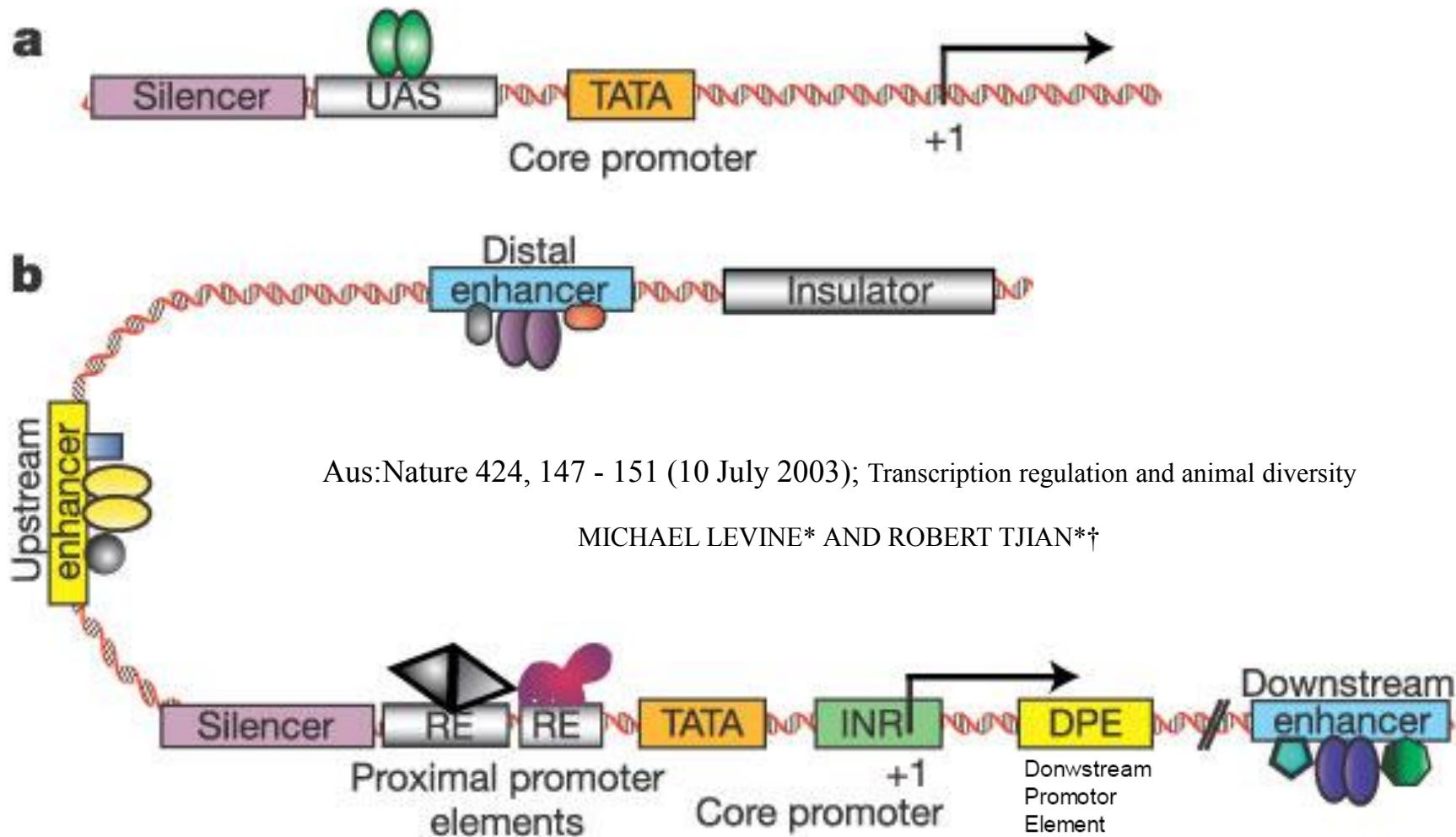
SAGA: Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase

SRB: Suppressor of RNA-PolymeraseII

Untereinheiten der RNA-Polymerase II- Komplexe



Die Kontrollregion bei Eukaryoten kann sehr komplex sein



Enhancer

sind cis-regulatorische Kontrollelemente,
die unabhängig von ihrer Orientierung,
Lage oder Distanz zum Gen
die Aktivität eines Gens steigern können

Silencer

Wirkungsweise wie negativer Enhancer,
setzt Genaktivität herab

Promoters and enhancers

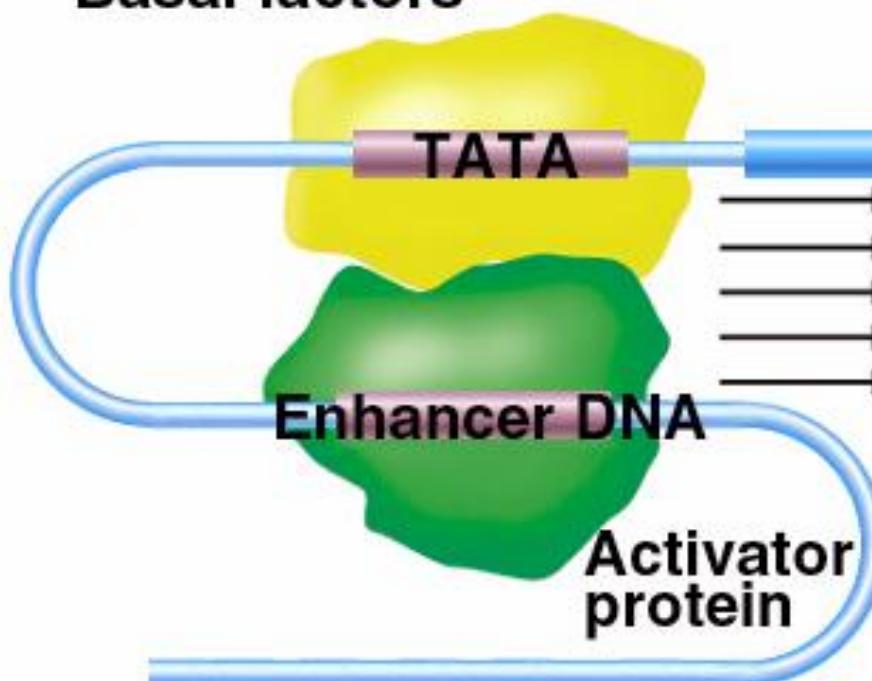
Basal factors

Enhancer DNA



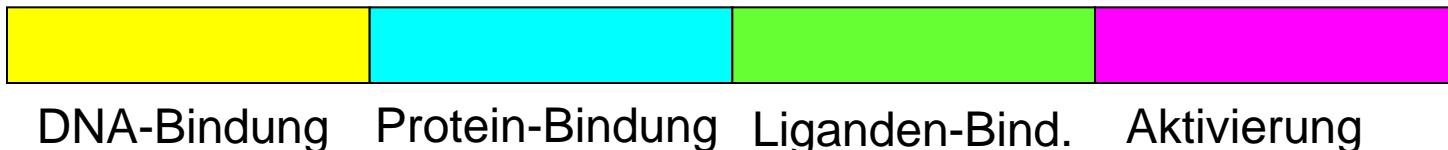
Low-level transcription occurs with only basal factor bound to DNA.

Basal factors



When basal factor and activator are bound to DNA, rate of transcription increases.

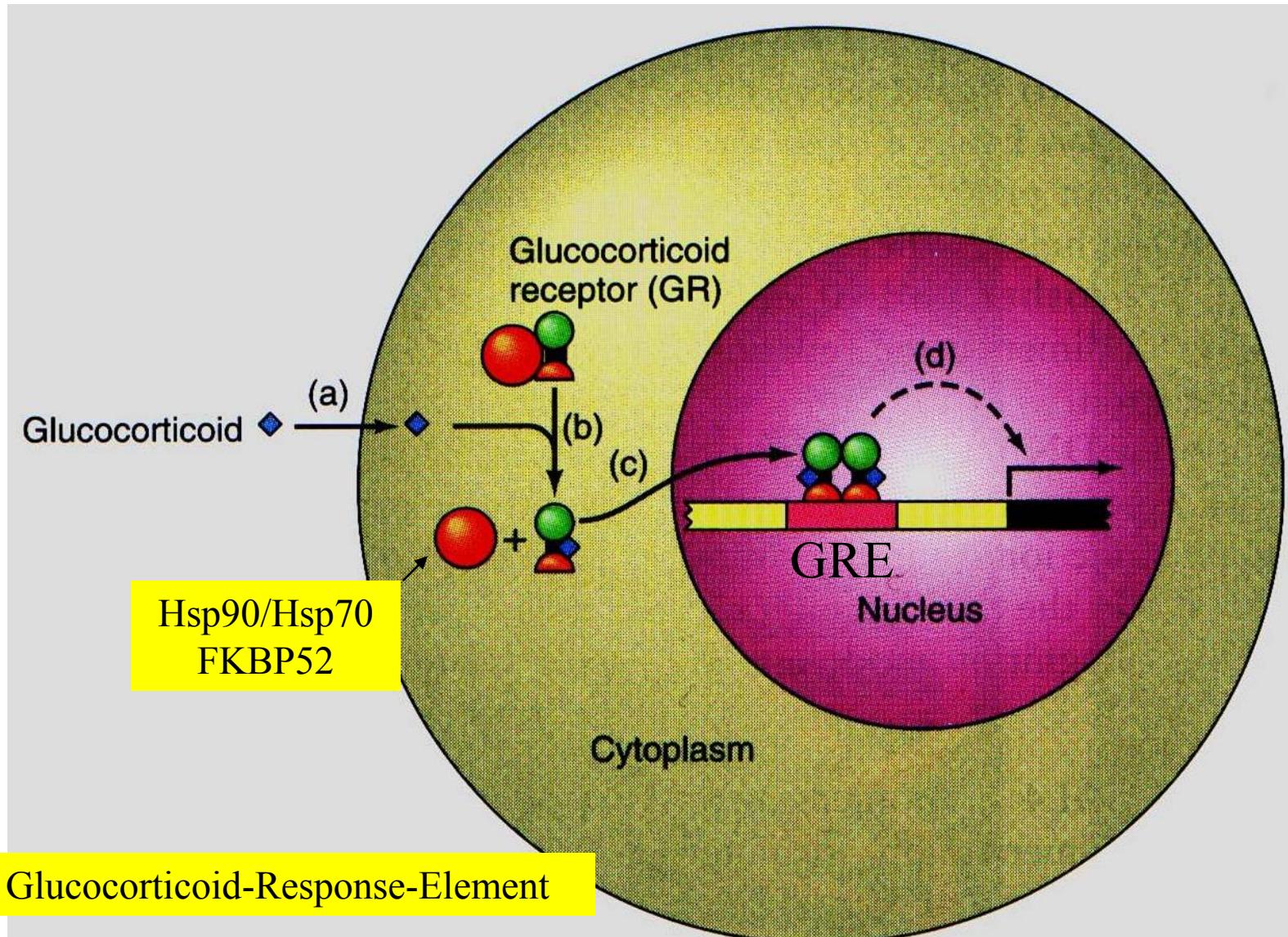
Typische Aktivatorproteine sind DNA-Bindepoteine mit mehreren Domänen



- DNA-binde-Domäne
- Dimerisierungsdomäne
- Aktivatordomäne
- Liganden-binde-Domäne

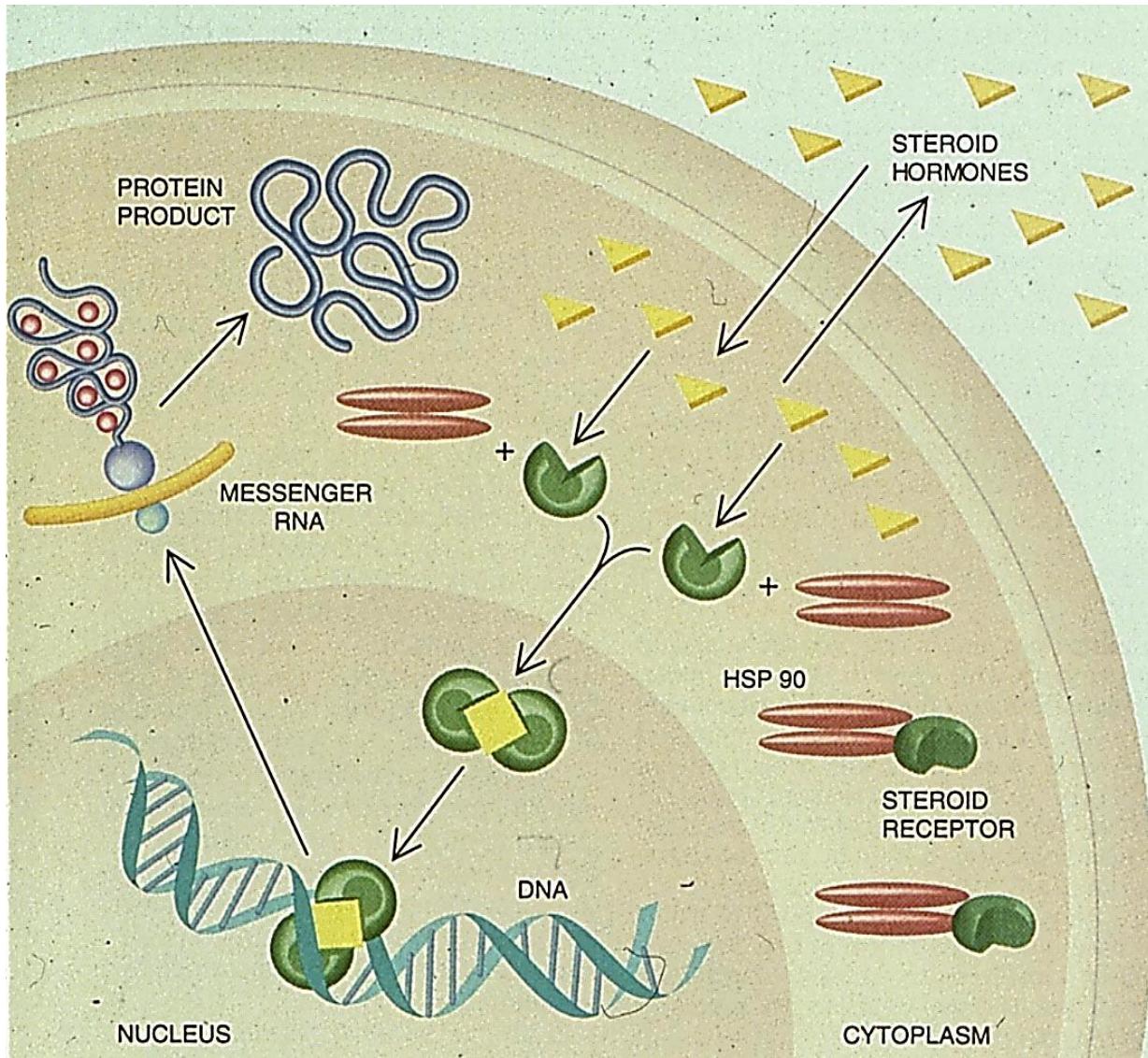
Hormon induzierte Genaktivität

Beispiel für Genaktivierung durch externe Signale

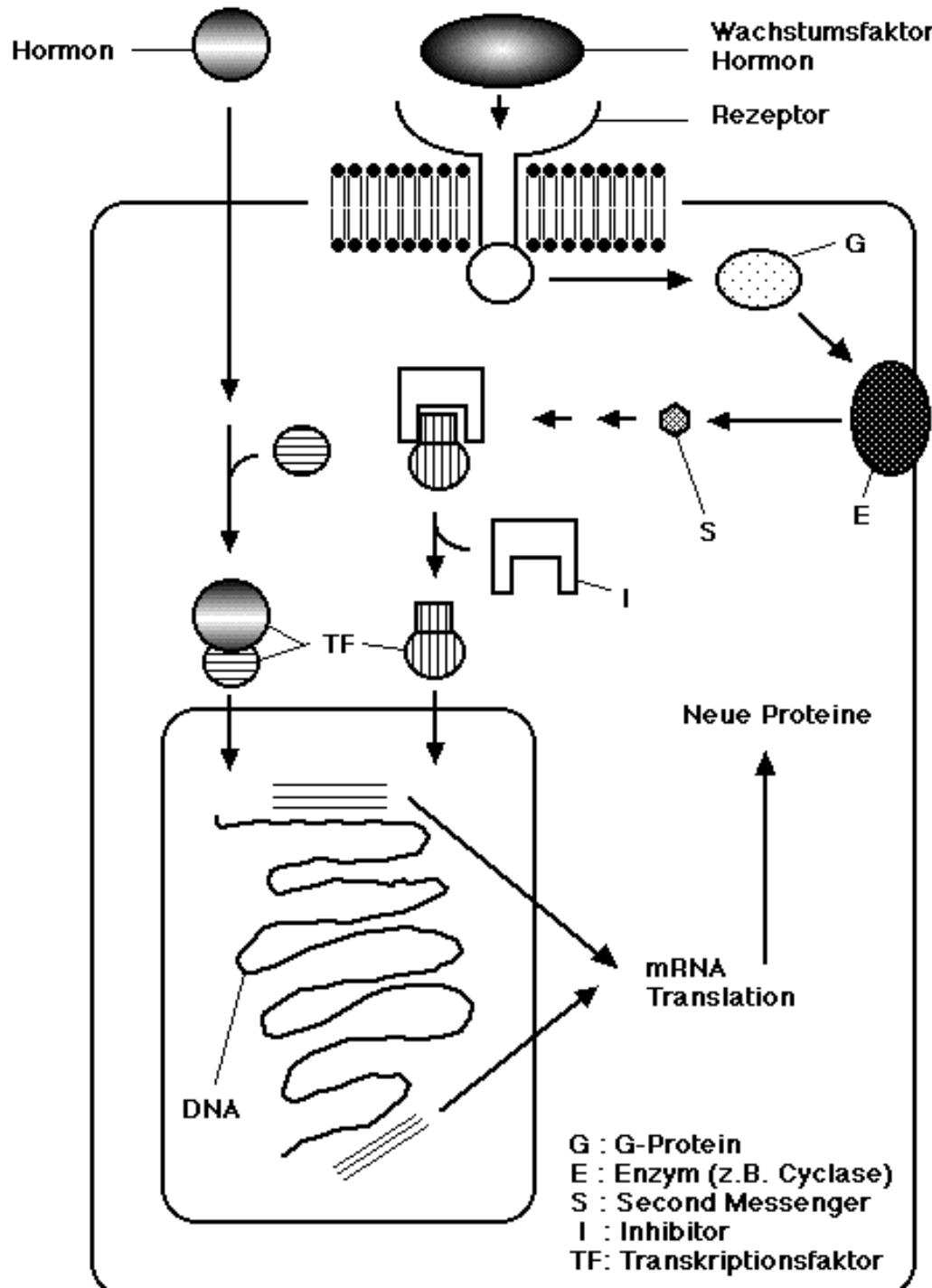


Hormon induzierte Genaktivität

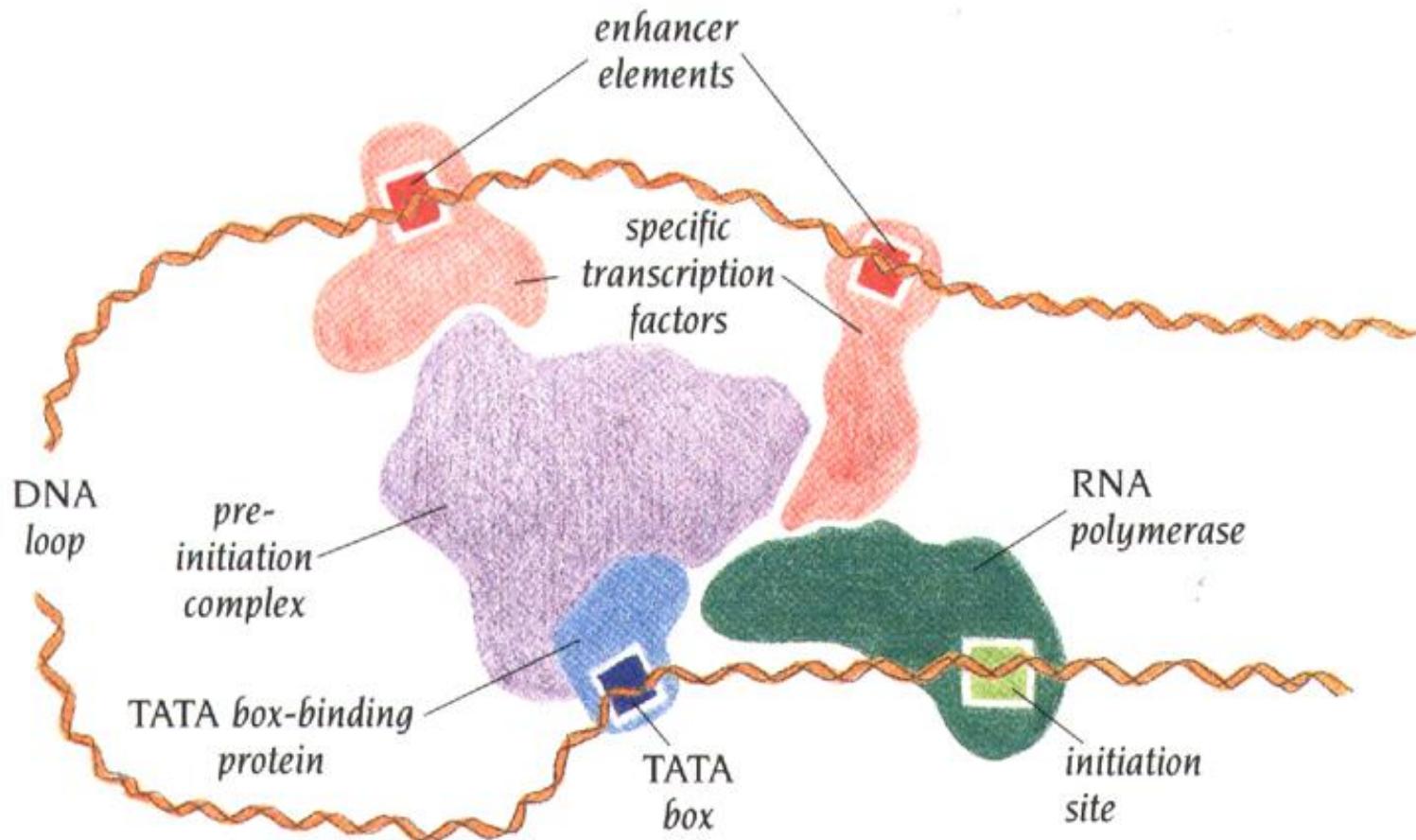
Beispiel für Genaktivierung durch externe Signale



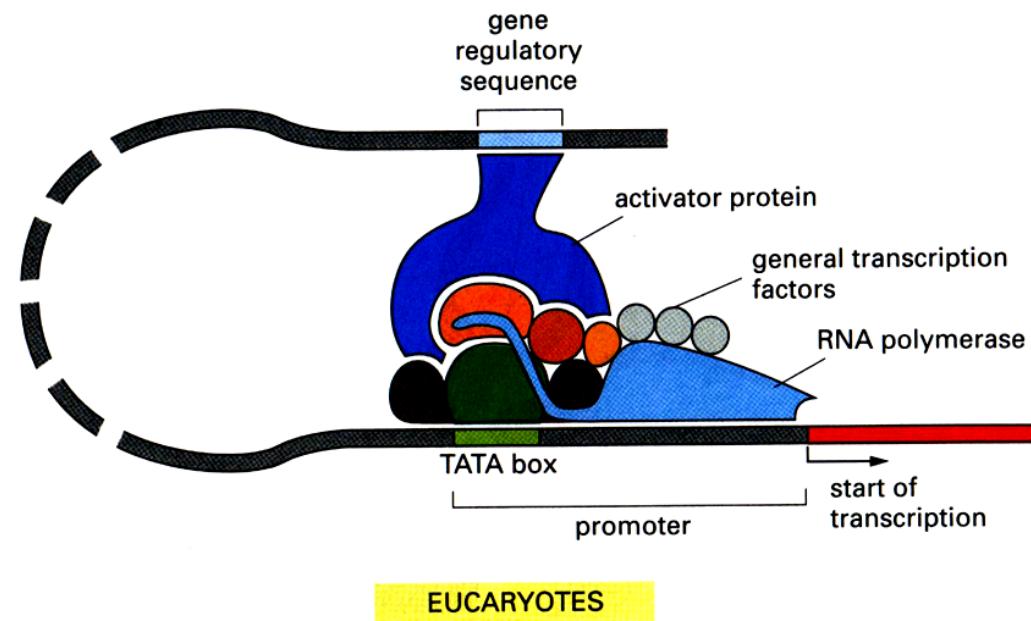
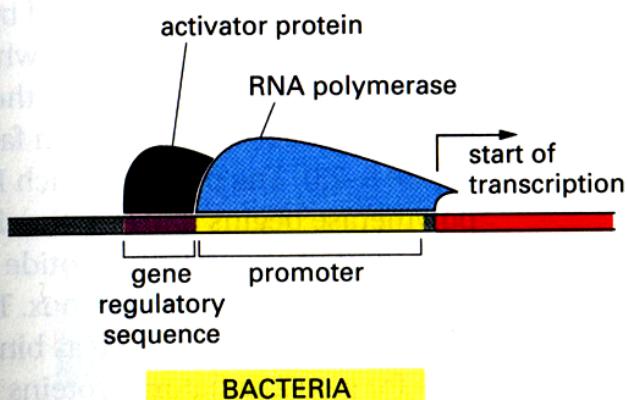
Hormon-regulation von Genen durch Membranrezeptoren und „second messenger“



Schema der eukaryotischen Genregulation („loop“-Modell)

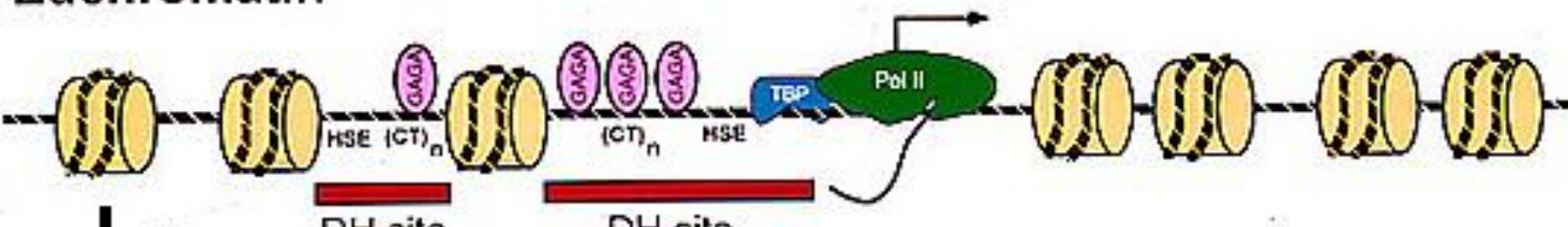


Vergleich Prokaryoten - Eukaryoten



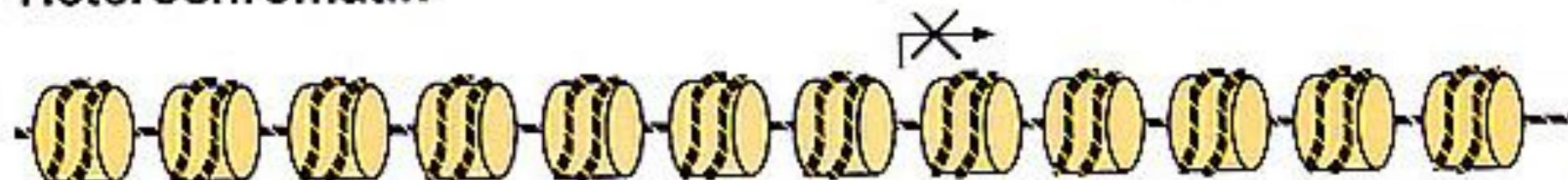
Chromatin und Genaktivität

Euchromatin

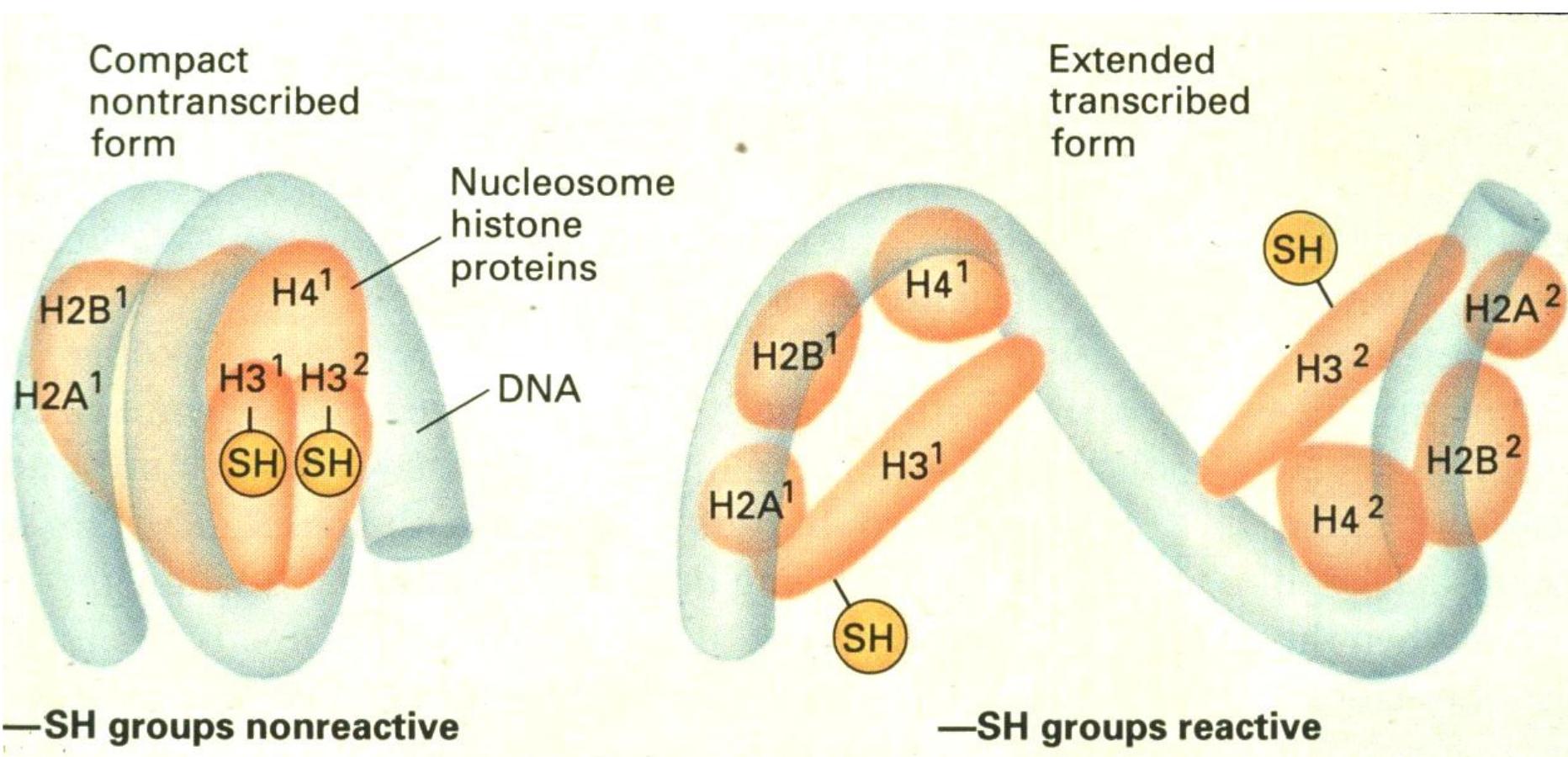


?

Heterochromatin



Inaktives / Aktives Chromatin



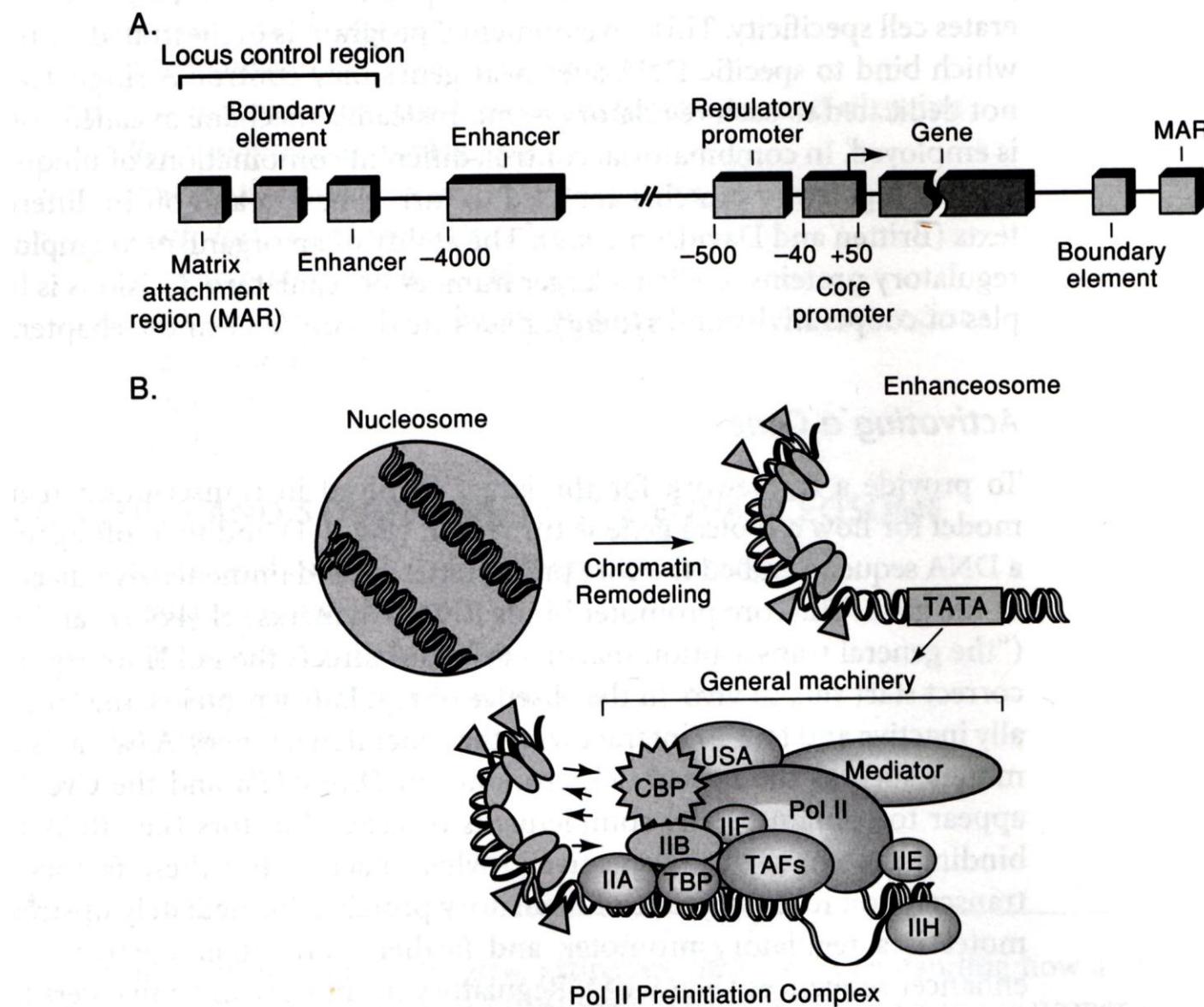
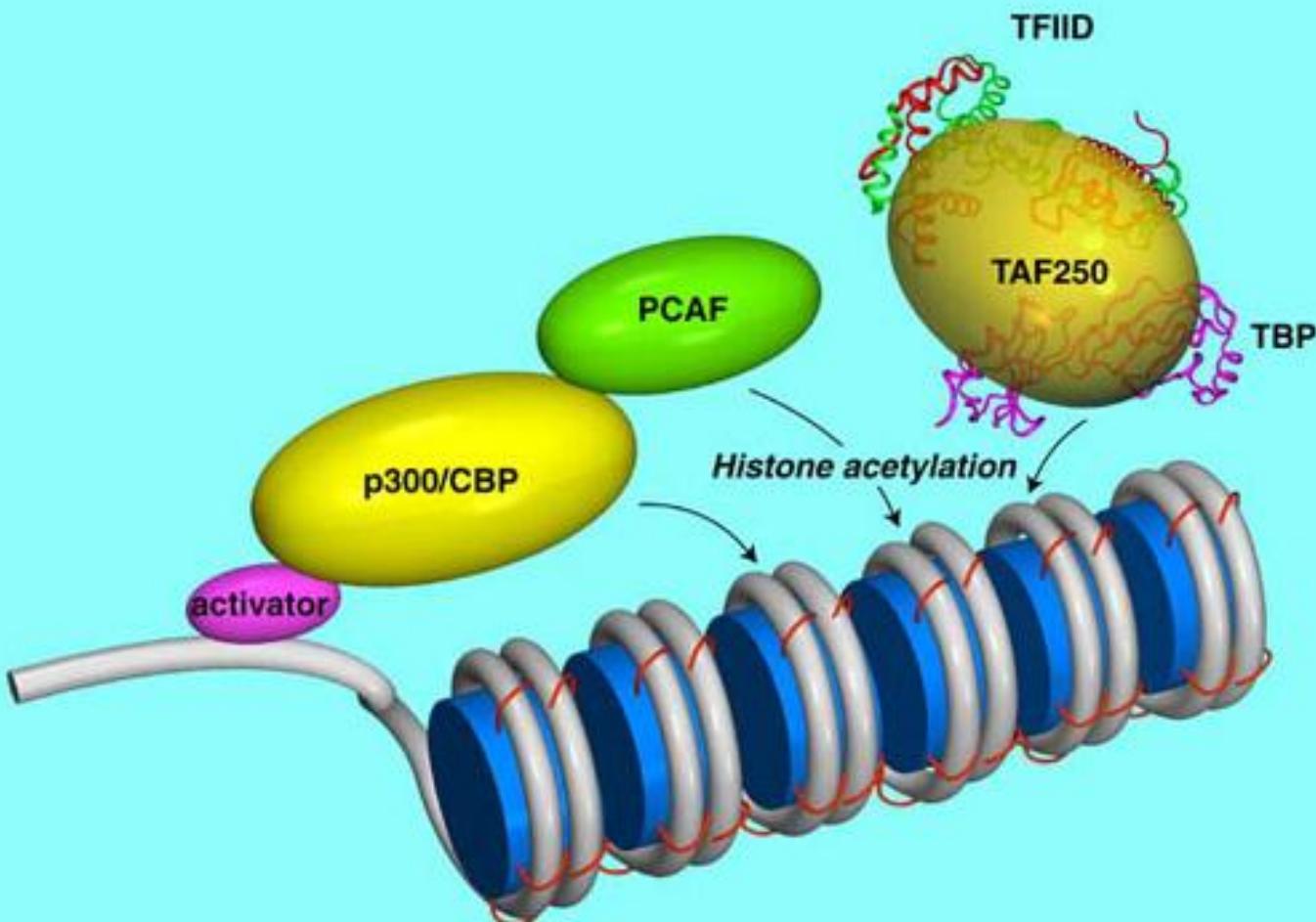
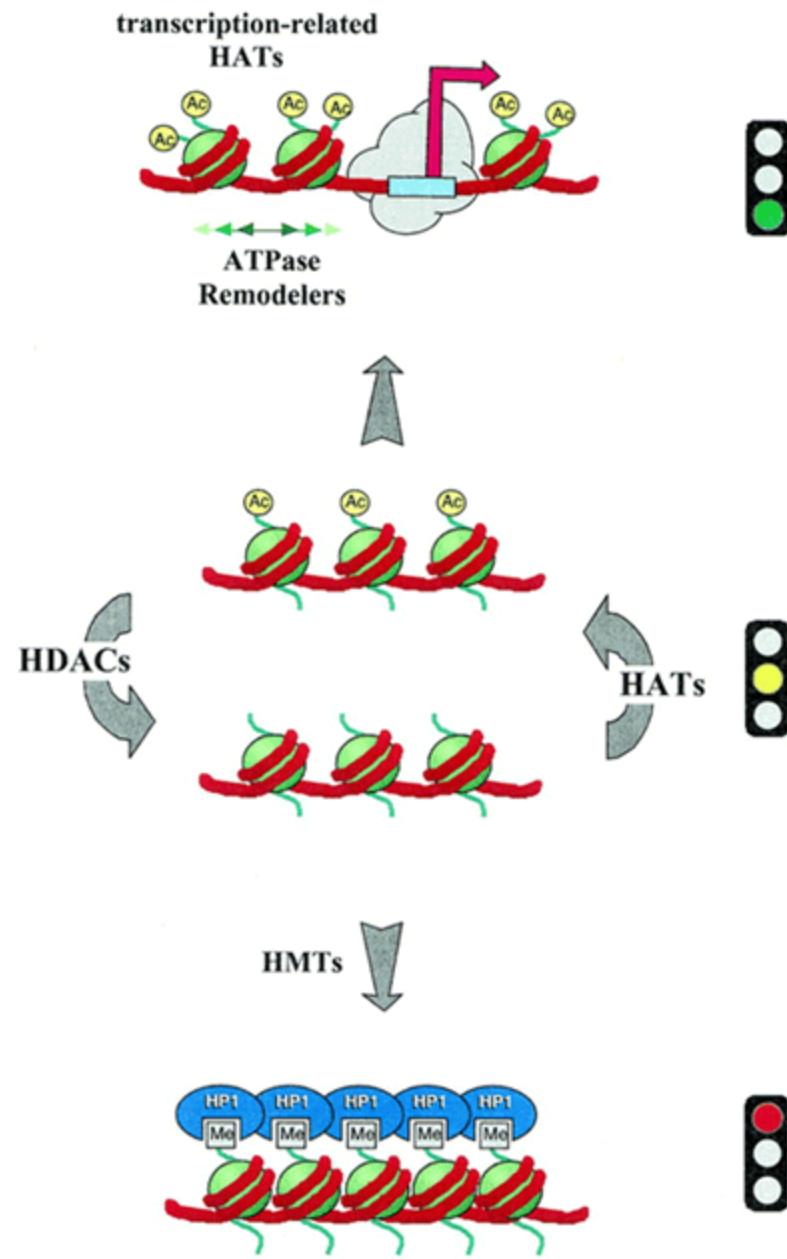


FIGURE 1.1. (A) Model of typical gene and components involved in gene activation and inactivation. (B) Activation of a gene and assembly of the Pol II preinitiation complex. (Redrawn, with permission, from Carey 1998 [copyright Cell Press].)

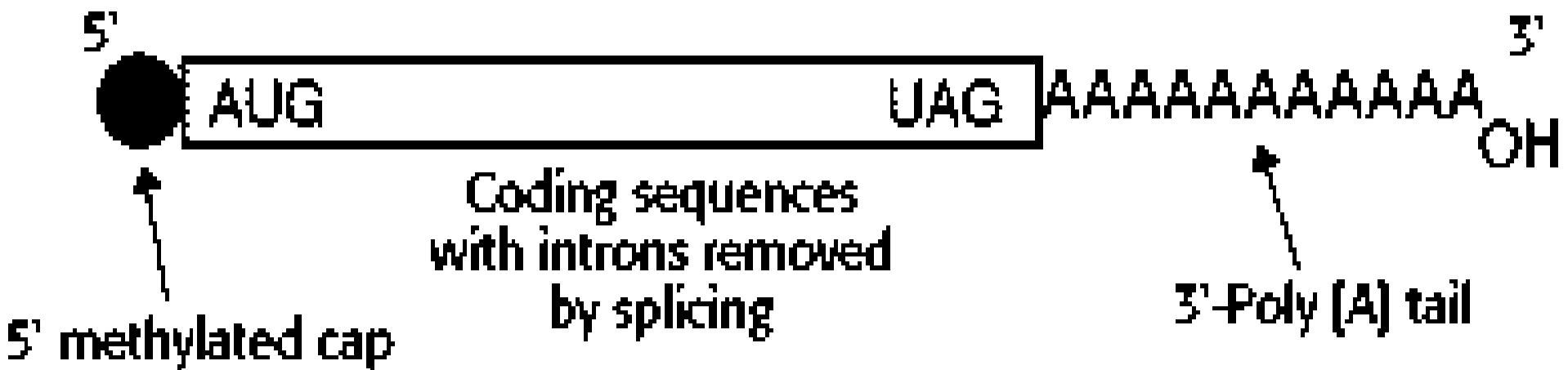
Remodellierung der Chromatinstruktur während der Transkription



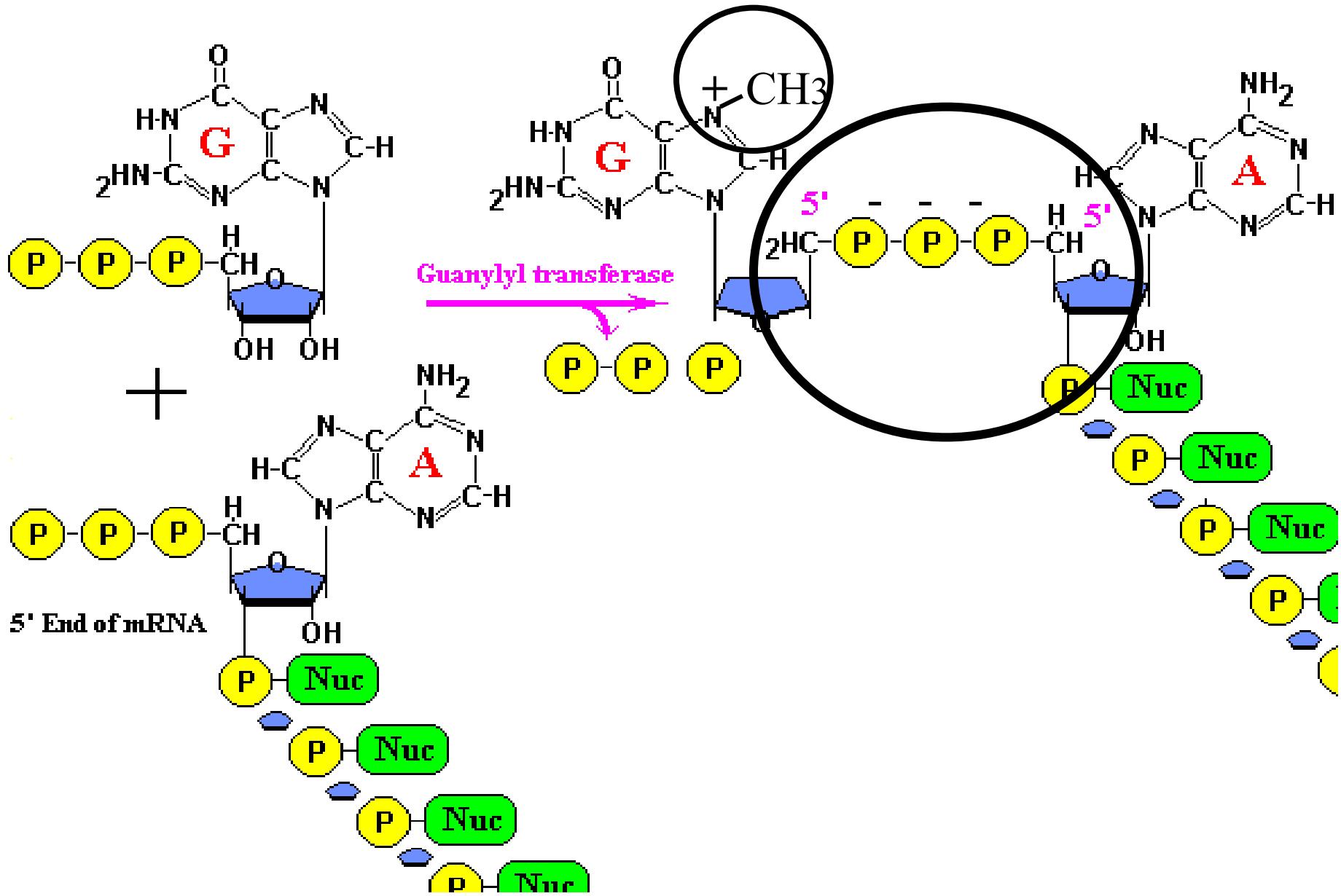


Nach der Transkription: „posttranskriptionelle“ Modifikationen

typisch für eukaryotische mRNA:
„Capping“, „Splicing“, Polyadenylierung,



„Capping“ der mRNA



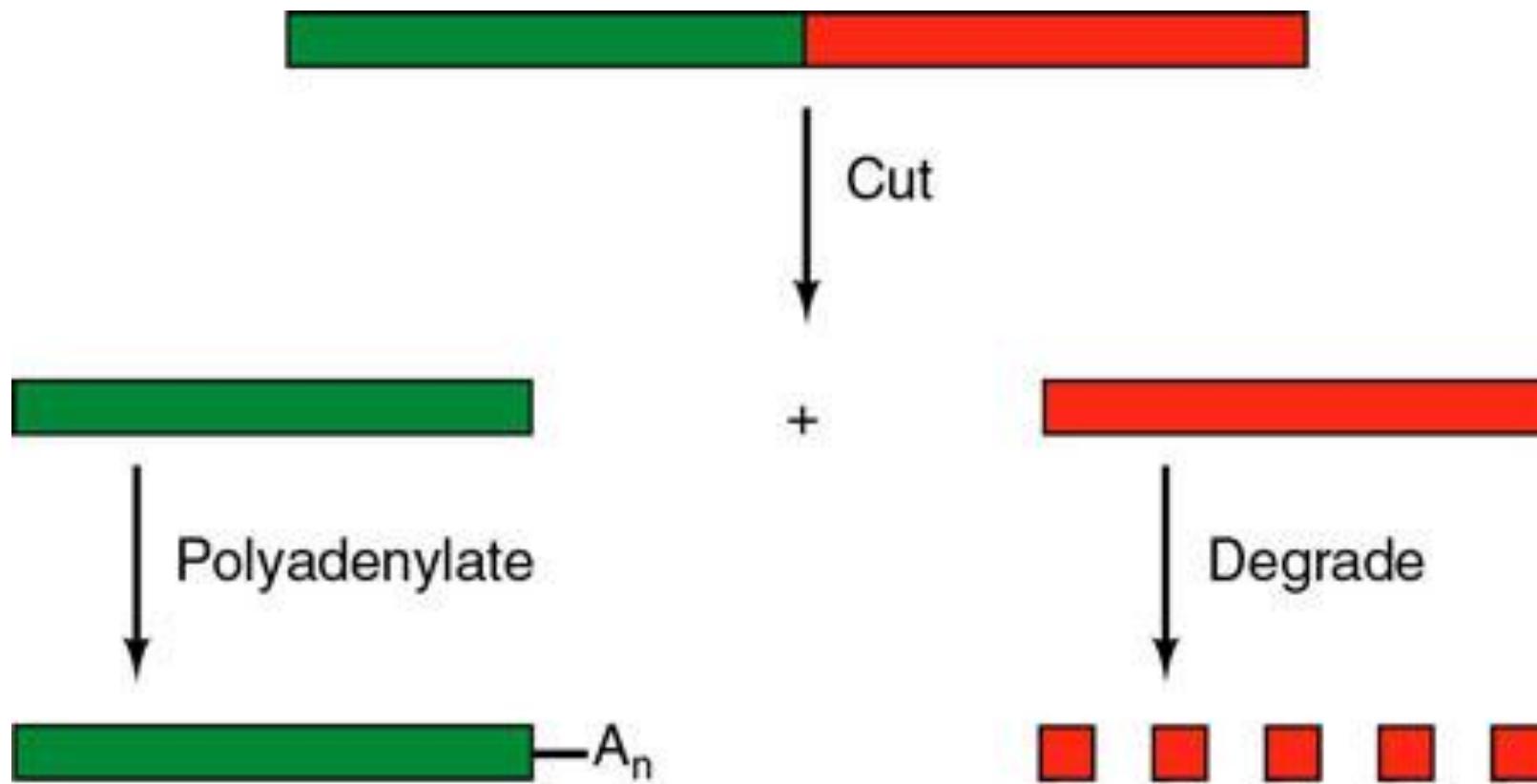
Funktion der Cap-Struktur

- erhöht Stabilität der mRNA
- induziert Splicing
- fördert Export aus dem Nukleus
- vermittelt Bindung der Ribosomen an mRNA und macht Translation möglich

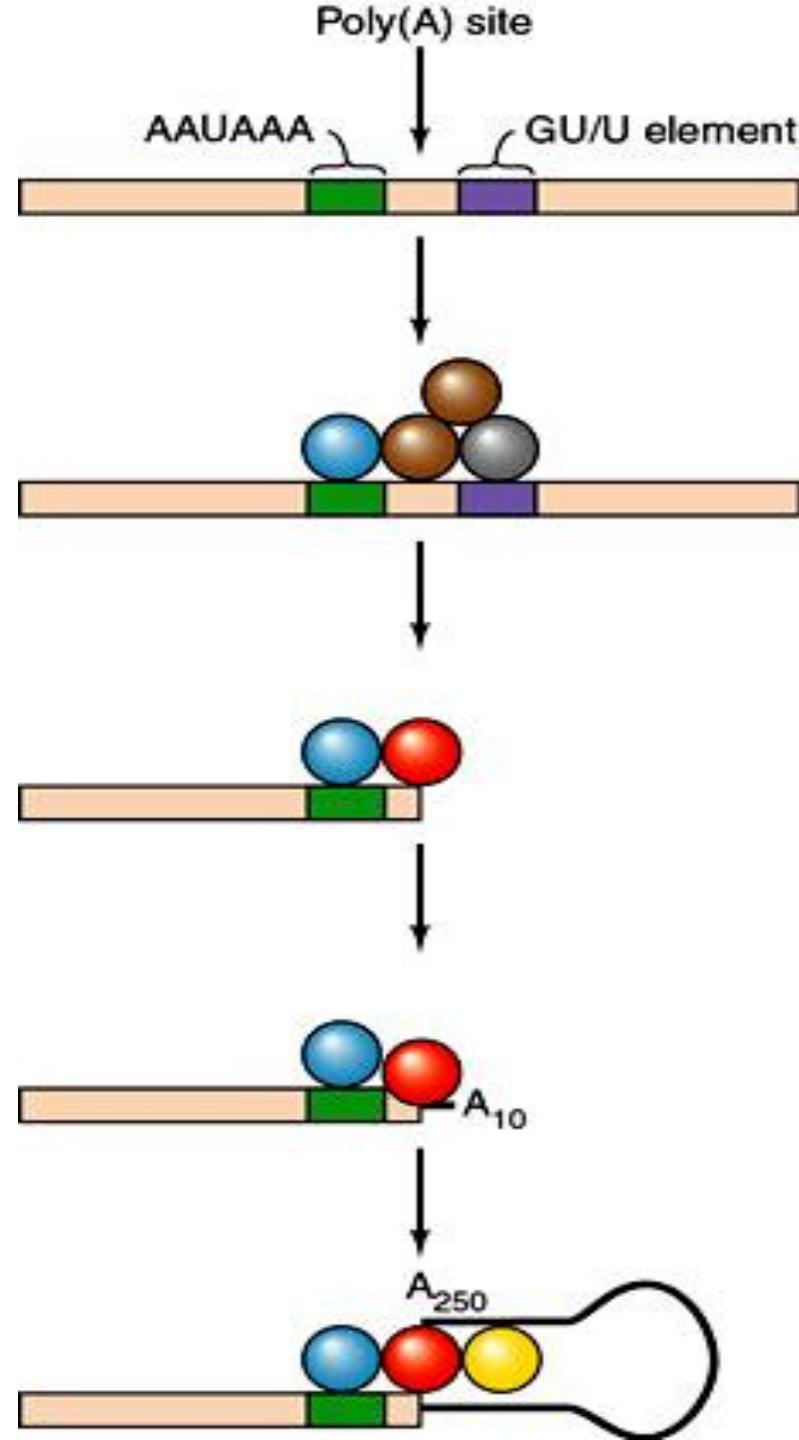
Poly-Adenylierung am 3'Ende der mRNA

1. „Trimmen“ des Primärtranskripts an definierter Stelle (23-24 Basen stromabwärts des Poly A-Signals AAUAAA)
2. Anfügen von ca. 100-250 Adenin-Nukleotiden

„Polyadenylierung“: Trimmen der mRNA und Anhängen von mehreren Adeninnukleotiden



Die Polyadenylierung wird von einem Enzymkomplex aus mehreren Enzymen erledigt



Die Polyadenylierung ist ähnlich komplex wie die Initiation!

Aus: Strange bedfellows: polyadenylation factors at the promoter
Olga Calvo1 and James L. Manley, GENES & DEVELOPMENT 17:1321–1327 © 2003

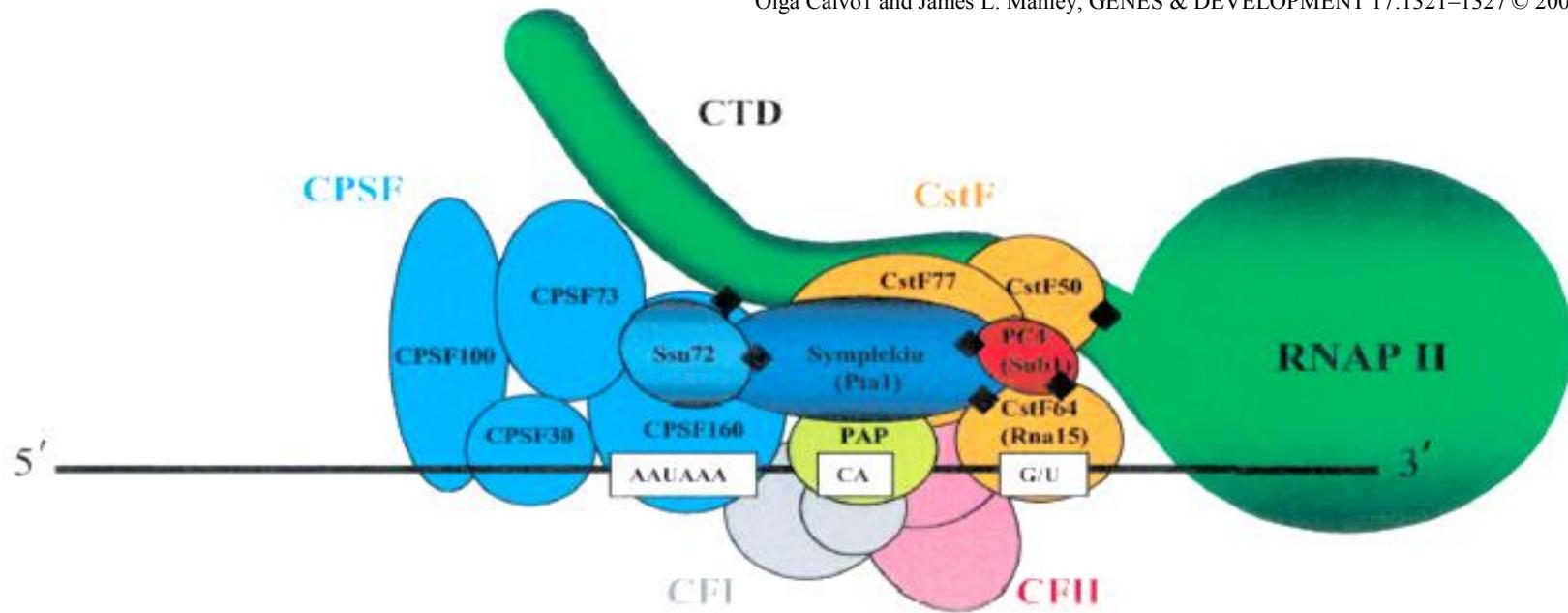


Figure 2. Schematic representation of the polyadenylation machinery. The majority of the components of the mammalian and yeast polyadenylation complexes are conserved, including all currently known factors that function in the transcription connection. For simplicity, only the mammalian nomenclature is depicted; the yeast names of factors that have important roles in the events described here are also indicated. (Note that although an apparent human homolog of Ssu72 exists, it has not yet been characterized functionally). ♦, documented protein–protein interactions that help link transcription and 3' processing (see text). Polyadenylation signal sequences (upstream AAUAAA, CA cleavage site consensus, and downstream G/U-rich region) are boxed. CPSF, cleavage-polyadenylation specificity factor; CstF, cleavage stimulation factor; CFI and CFII, cleavage factors I and II, respectively; PAP, poly(A) polymerase.

Funktion der Poly- Adenylierung?

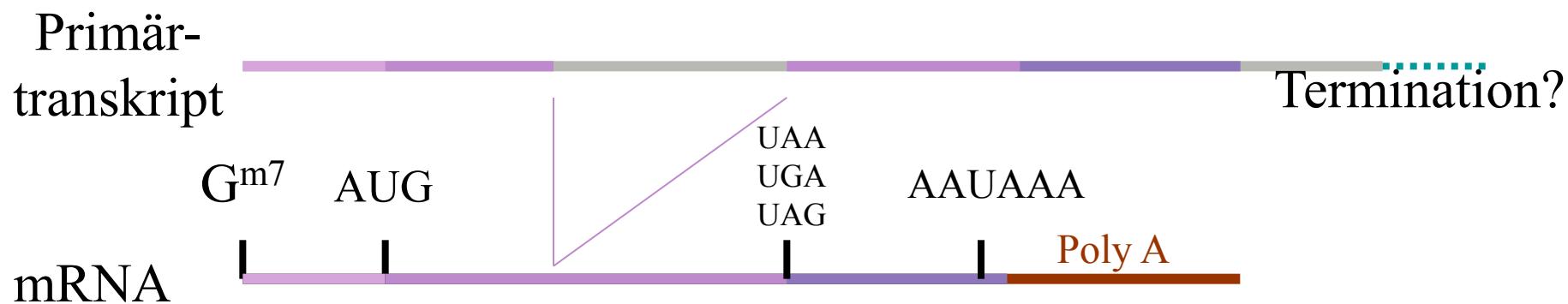
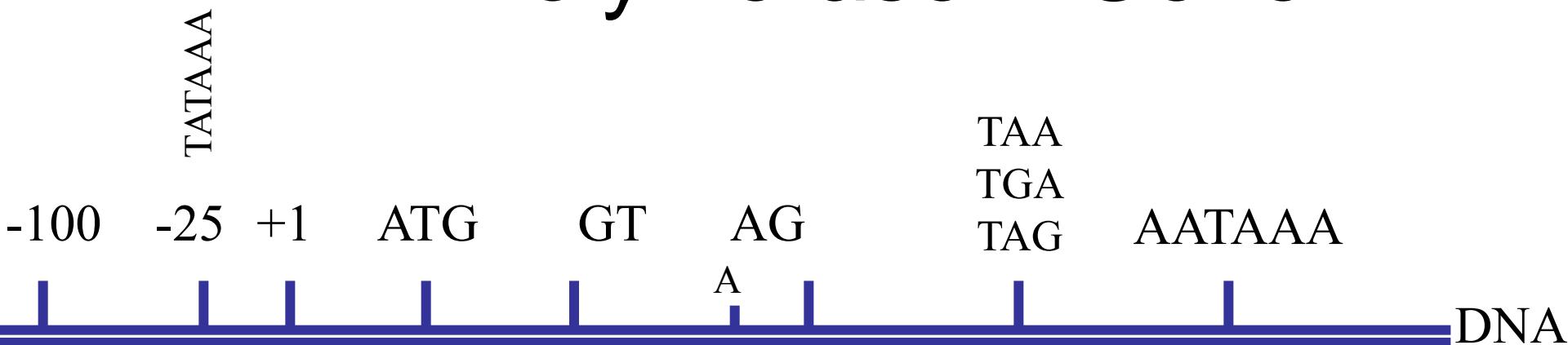
- Stabilität der mRNA
- Translatierbarkeit



„Splicing“/Spleißen

- Intronabschnitte werden aus dem Primärtranskript entfernt
- Die Exons werden miteinander zur „funktionsfähigen“ RNA verbunden
- „funktionsfähig“ kann aber auch bedeuten, dass ein nicht funktionsfähiges Protein gebildet wird

RNA Polymerase II Gene



Je nach Spleißmechanismus werden vier verschiedene Gruppen von Introns unterschieden:

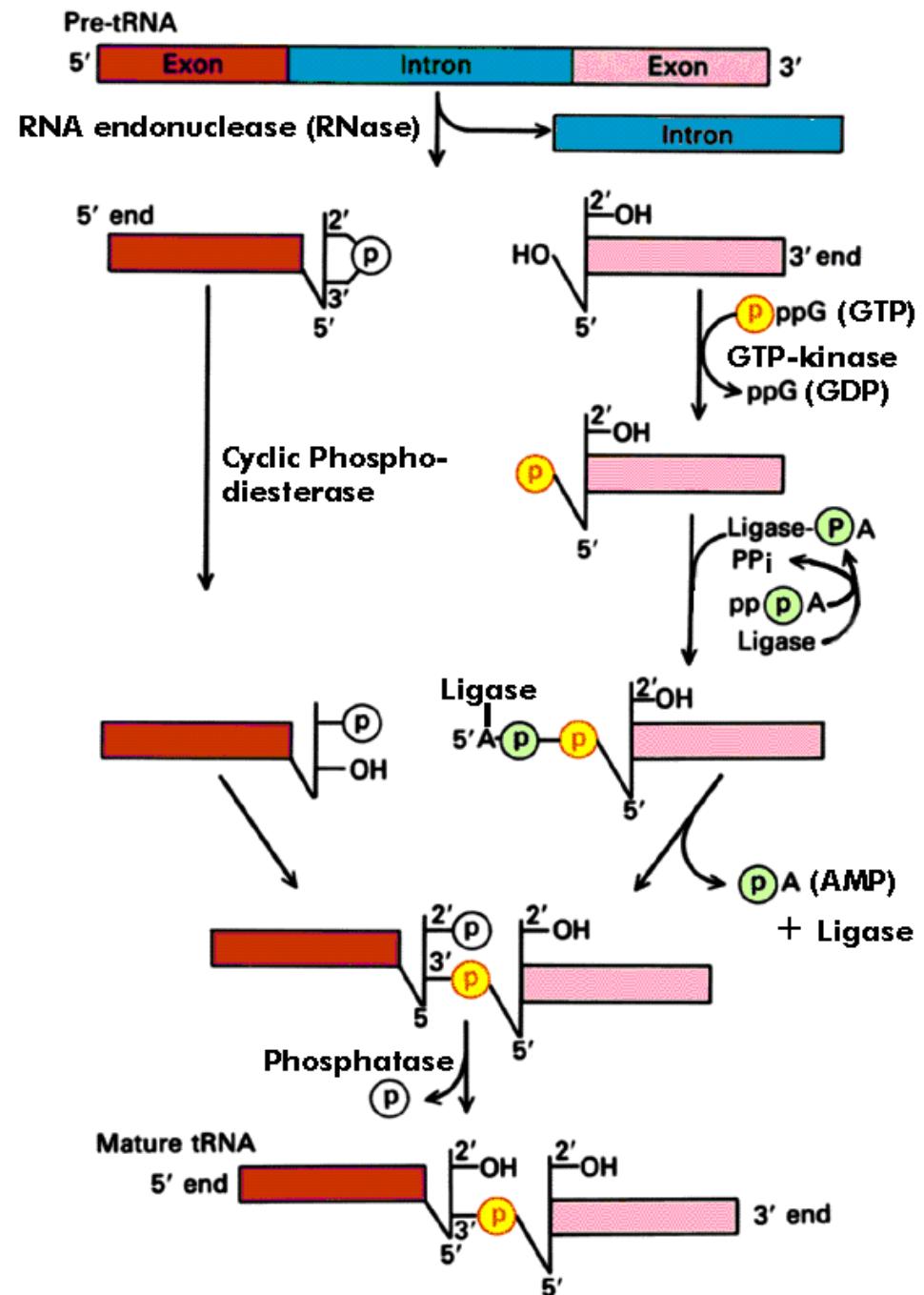
- tRNA Introns
- Autokatalytische Introns Gruppe I
- Autokatalytische Introns Gruppe II
- hn-/mRNA Introns

pre-tRNA splicing

tRNA Splicing: = zwei Stufenprozess

1. Herausschneiden
des Introns durch
RNA- Endonuklease

2. Verknüpfen der
Exons durch DNA-
Ligase

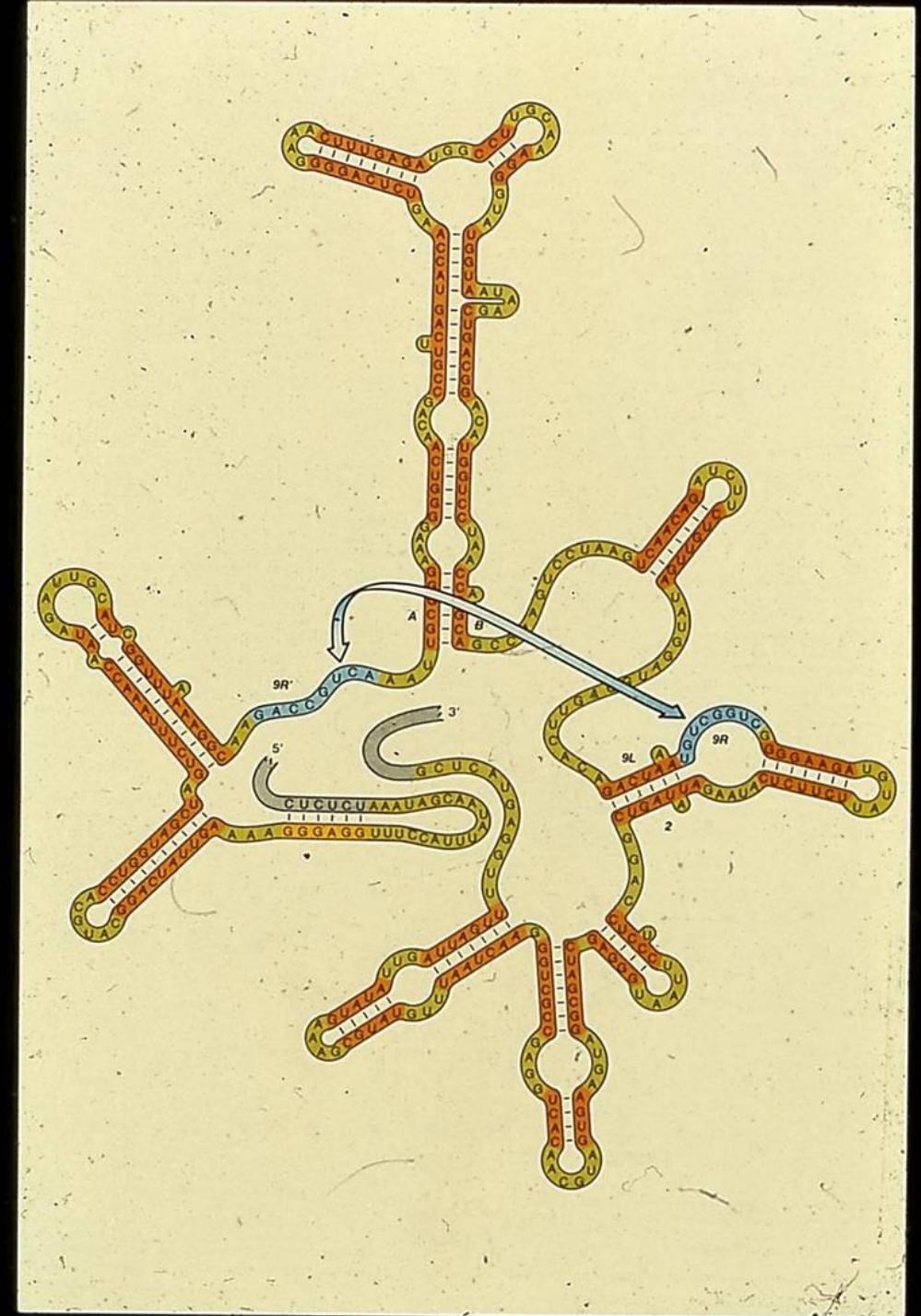
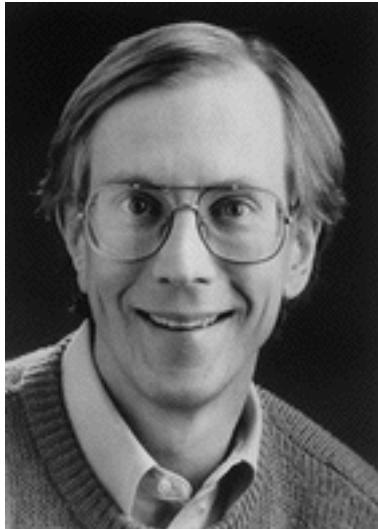


Autokatalytisches Splicing/ Ribozyme

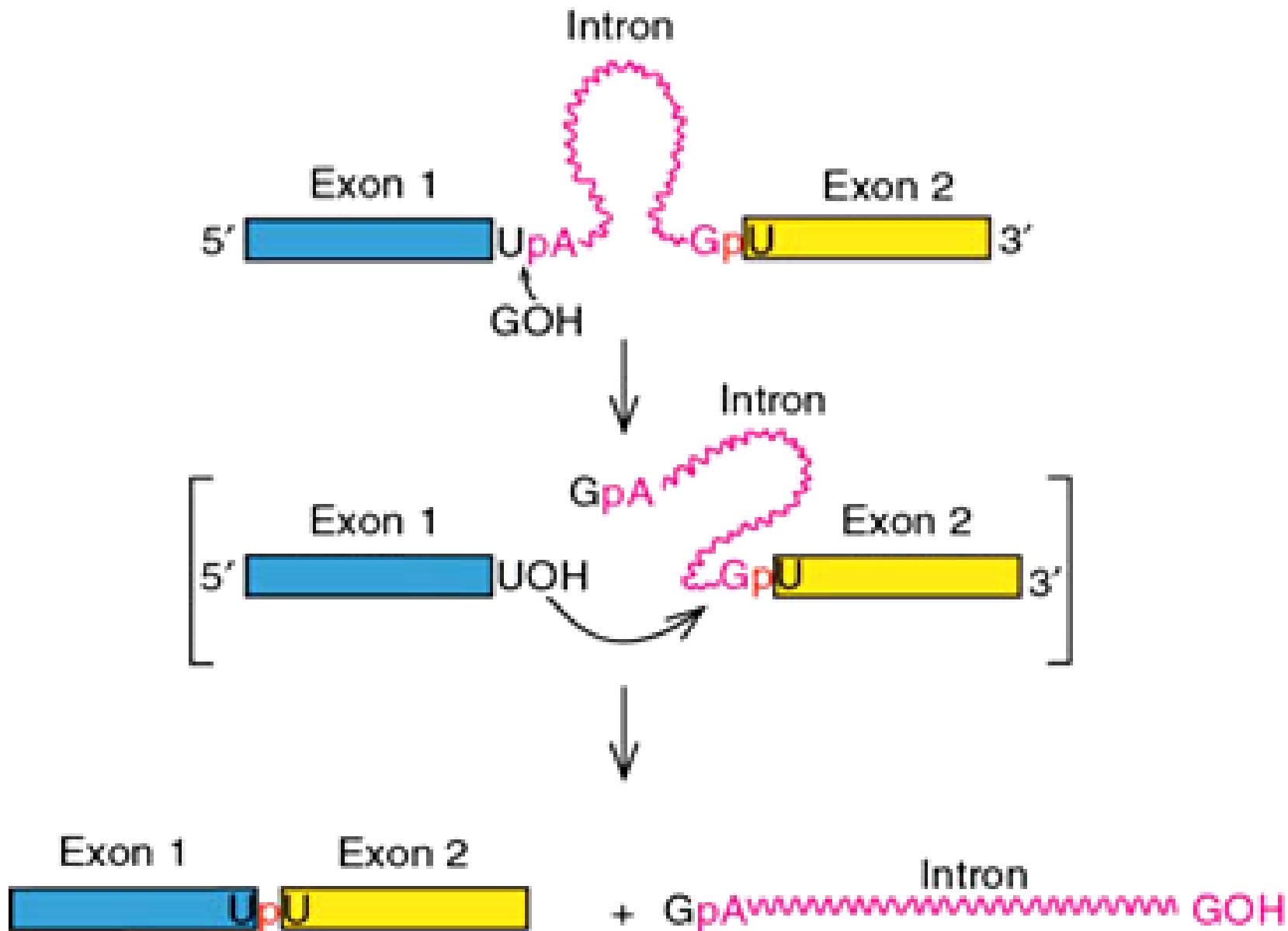
Beim **autokatalytischen Spleißen** sorgt die Intron-
RNA selbst (autokatalytisch) dafür, dass die RNA an den
Intron-Exon-Grenzen geschnitten und die beiden Exon-
Enden (3'-Ende von Exon n mit dem 5'-Ende von Exon m)
über eine Phosphodiester-bindung verknüpft werden. Weil
die RNA bei diesem Prozess wie ein Enzym katalytisch
aktiv ist, werden diese RNAs auch als **Ribozyme**
bezeichnet

Ribozym- Struktur

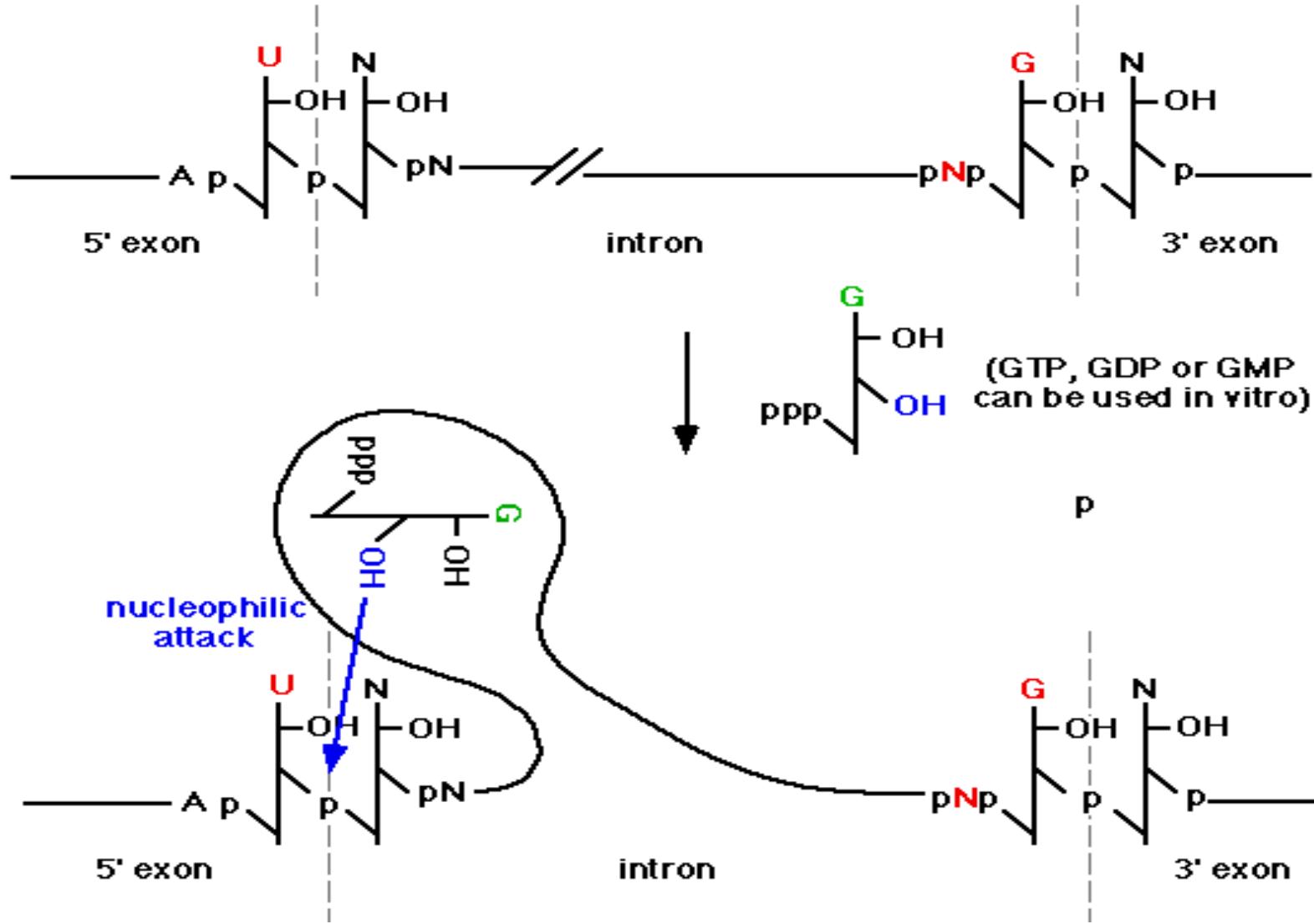
Entdecker der Ribozyme
Th. R. Cech; Sydney Altman
Nobelpreis 1989



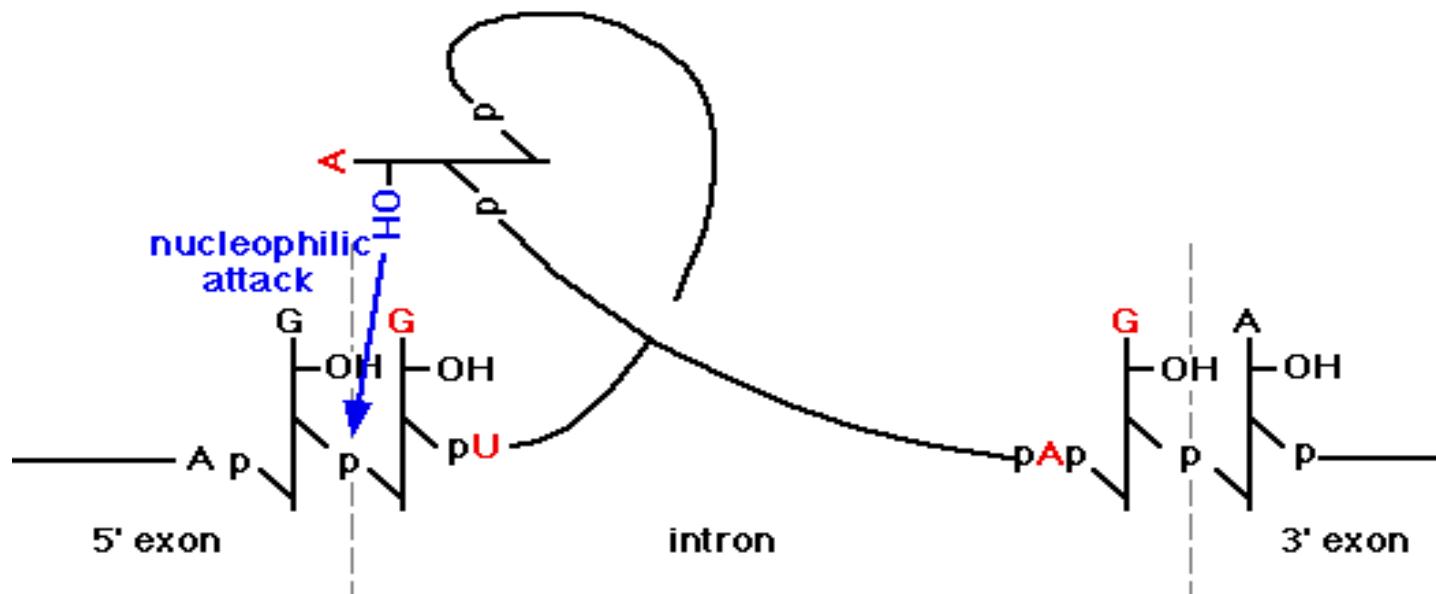
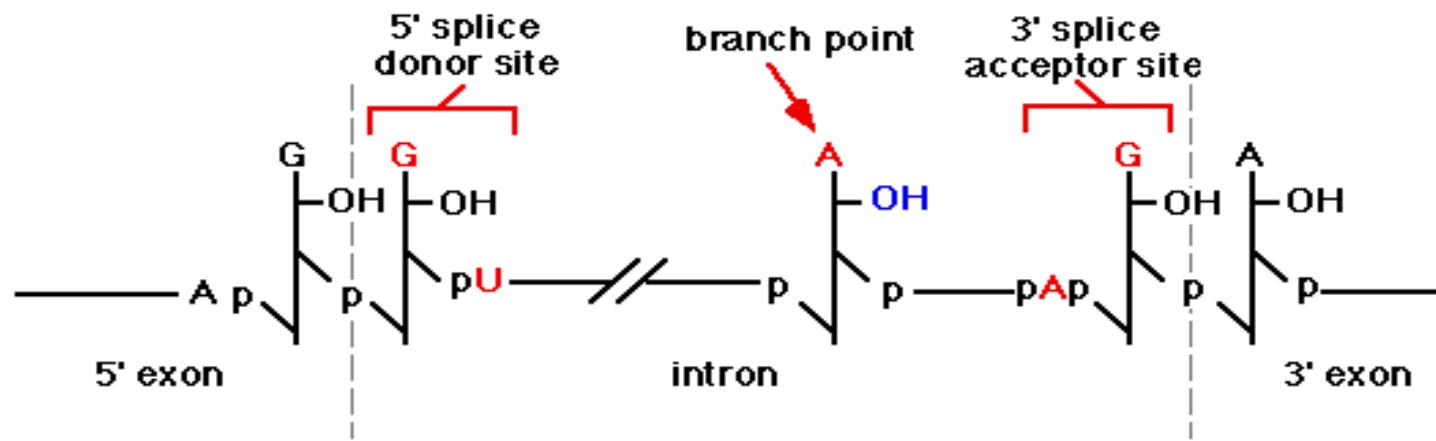
Autokatalytisches Spleißen der Gruppe I Introns bei Prä-rRNA von Tetrahymena



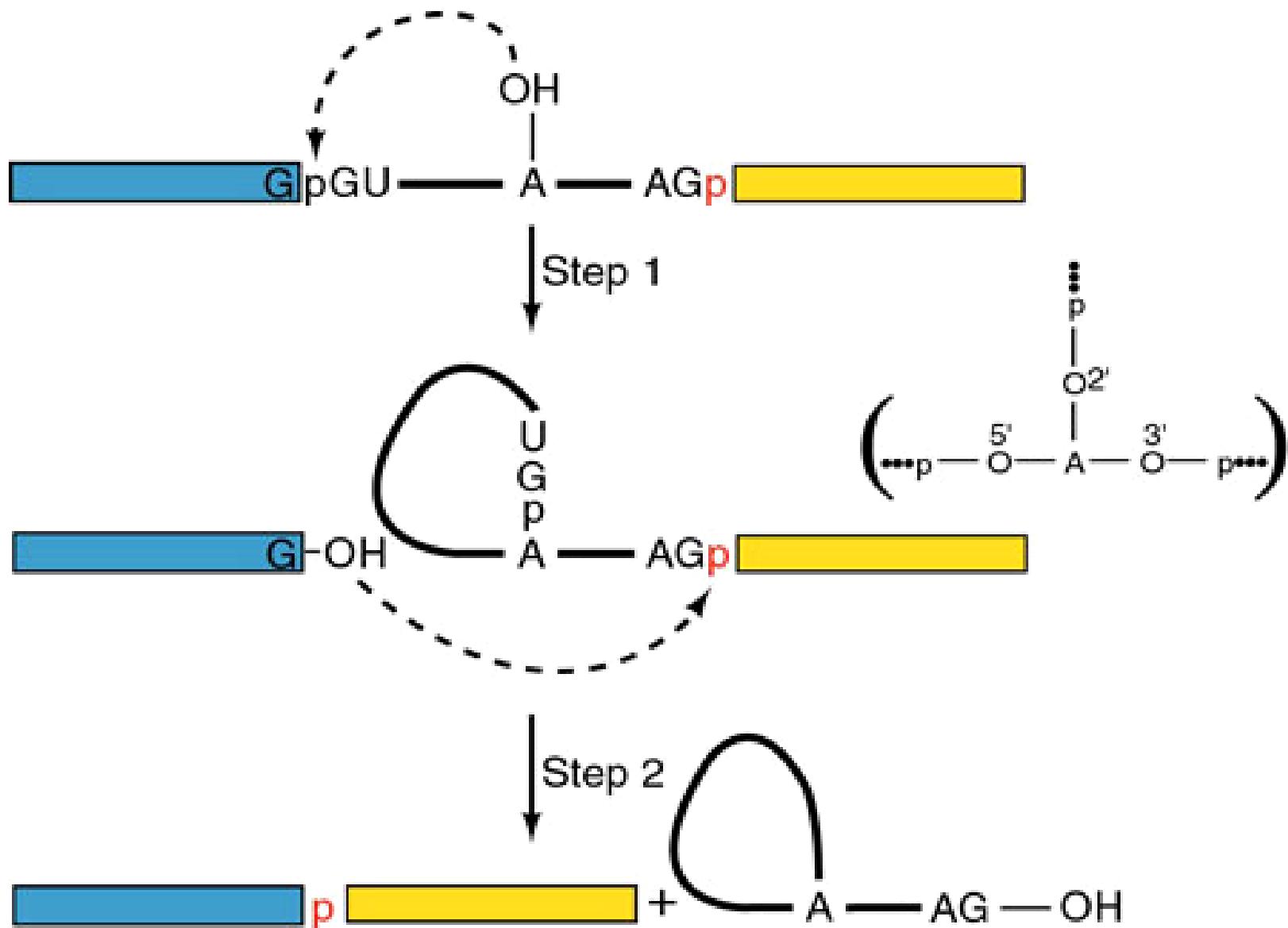
Mechanismus der autokatalytisch spleißenden Gruppe I Introns



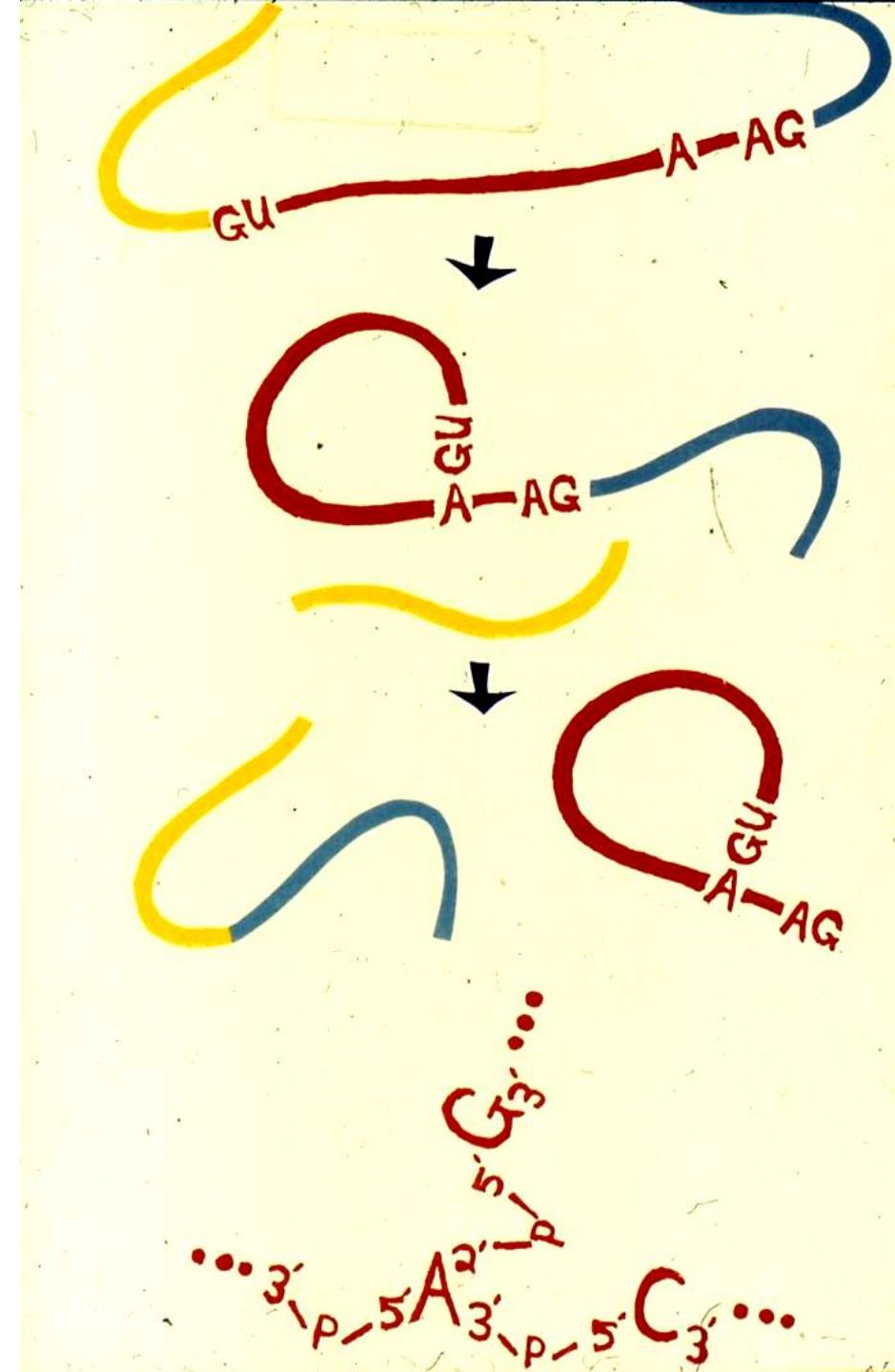
Autokatalytisches Splicing Gruppe II Introns



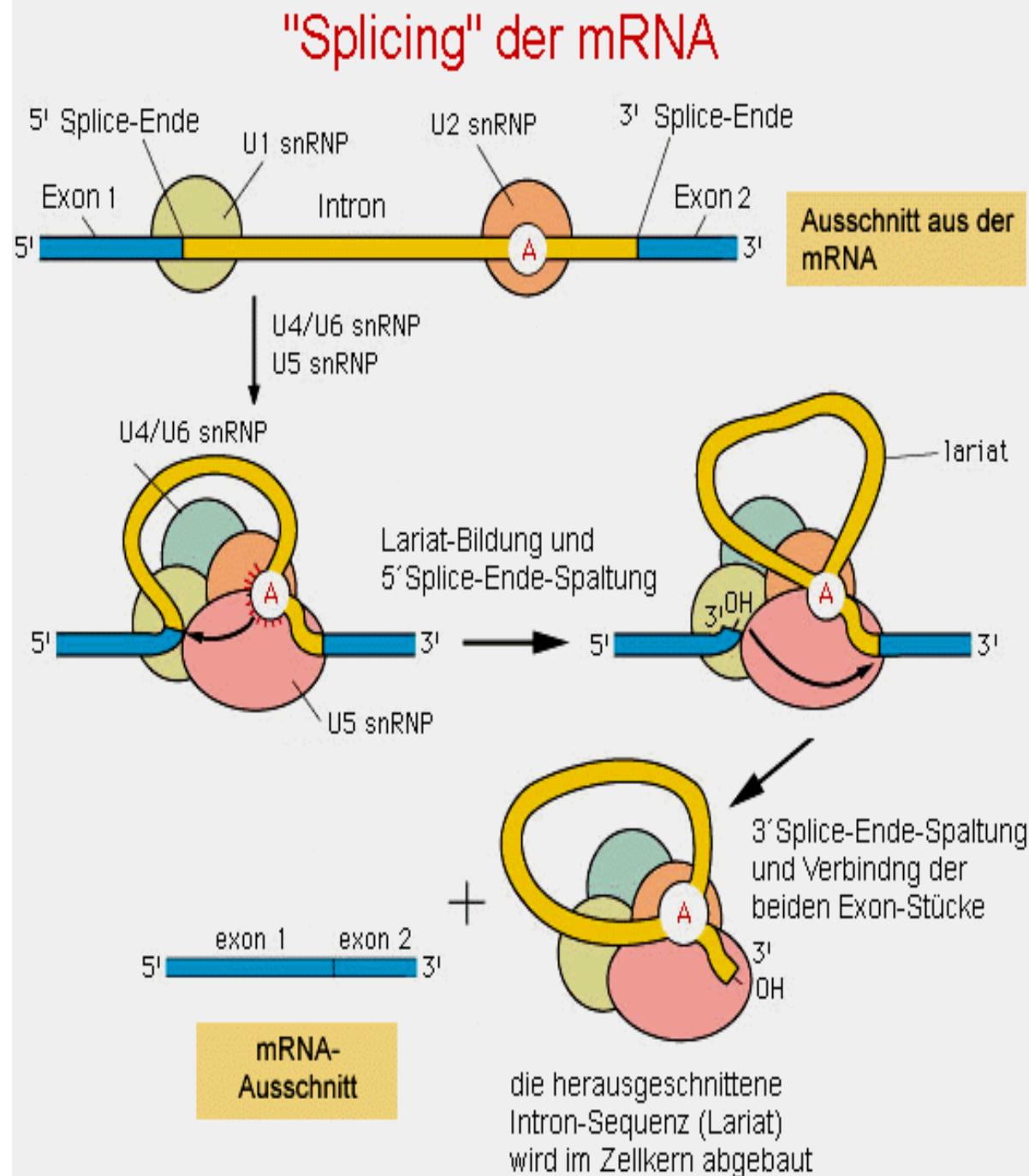
mRNA-Spleißen an der „Consensus Splice Site“ /GU...A..AG/



Beim Spleißen
bildet sich ein
„Lariat“(Lasso)
im heraus-
gelösten Intron
über eine
2'-5'-Phospho-
diesterbindung



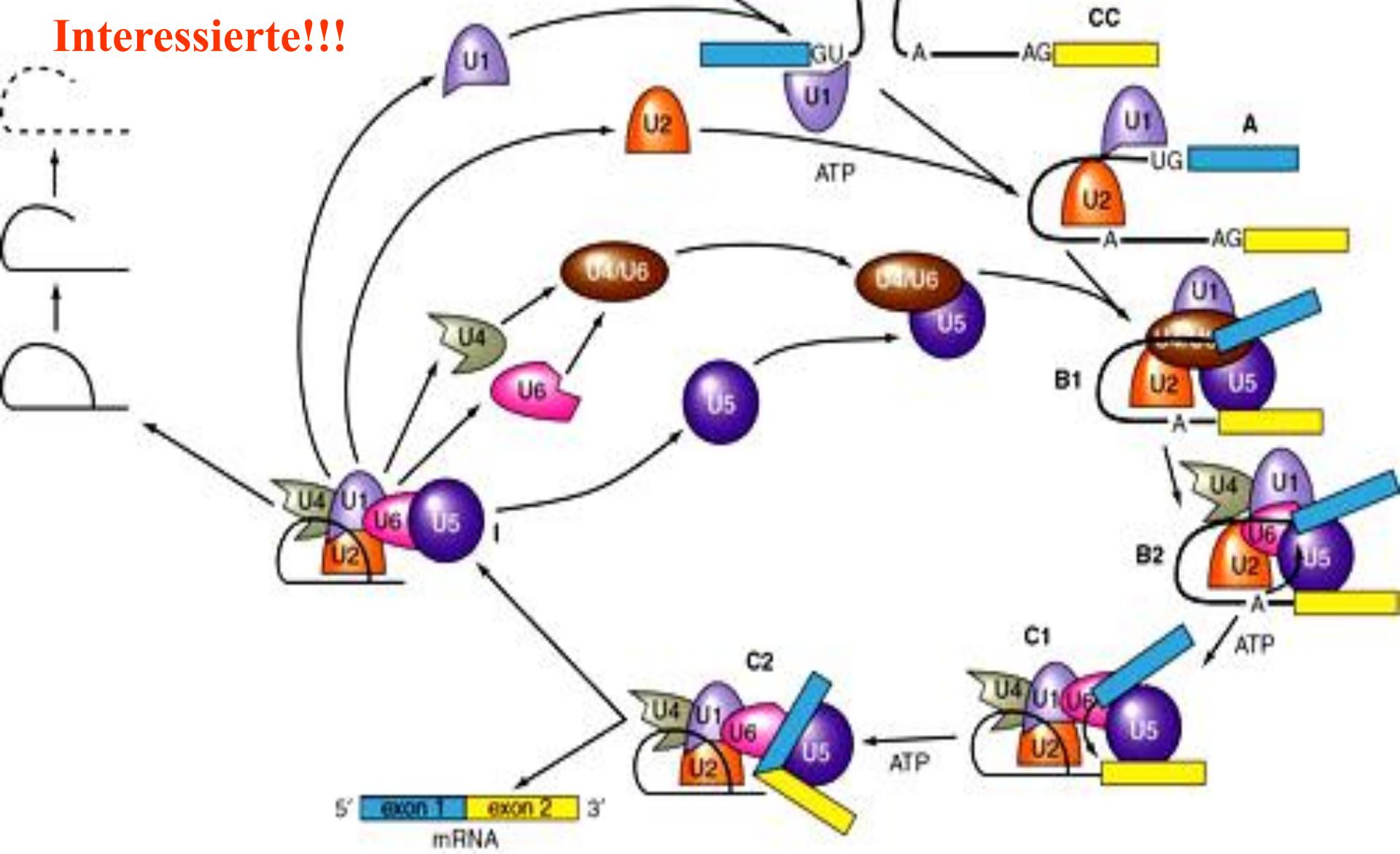
Am Spleißen von mRNAs sind Spliceosome n mit „SN(U)RPS“ beteiligt



snRNPs (SNURPS) enthalten
die
snRNAs (sn = „small nuclear“)
U1, U2, U4/6 und U5
(snRNPs= **small nuclear**
ribonucleoprotein)

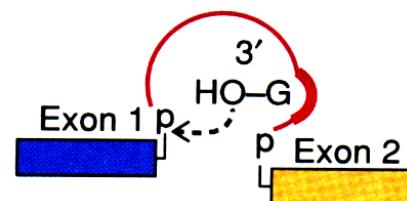
Zeitliche Abfolge der Vorgänge am Spliceosom

Nur für
Interessierte!!!

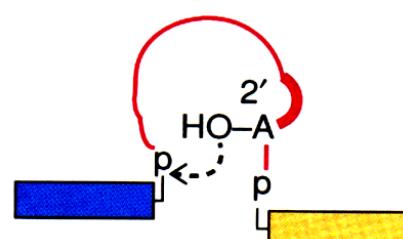


Zusammenfassung

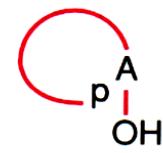
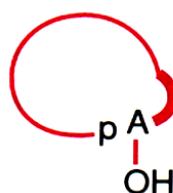
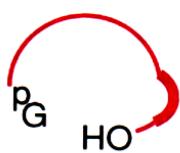
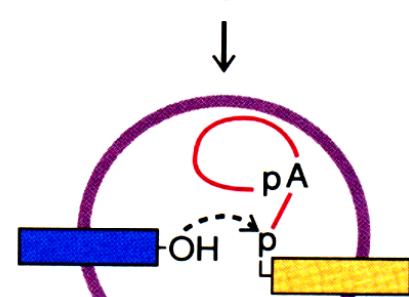
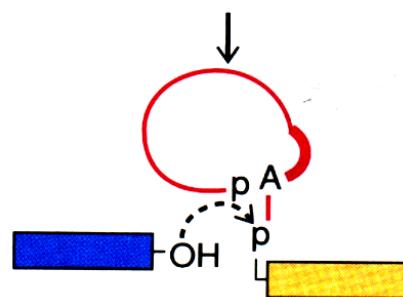
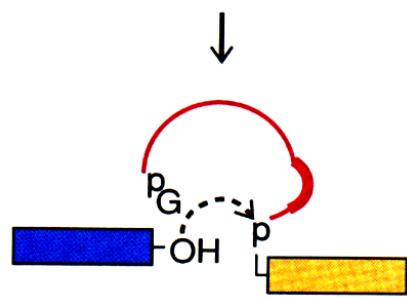
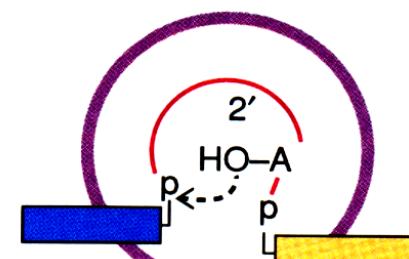
(a) Group I



(b) Group II



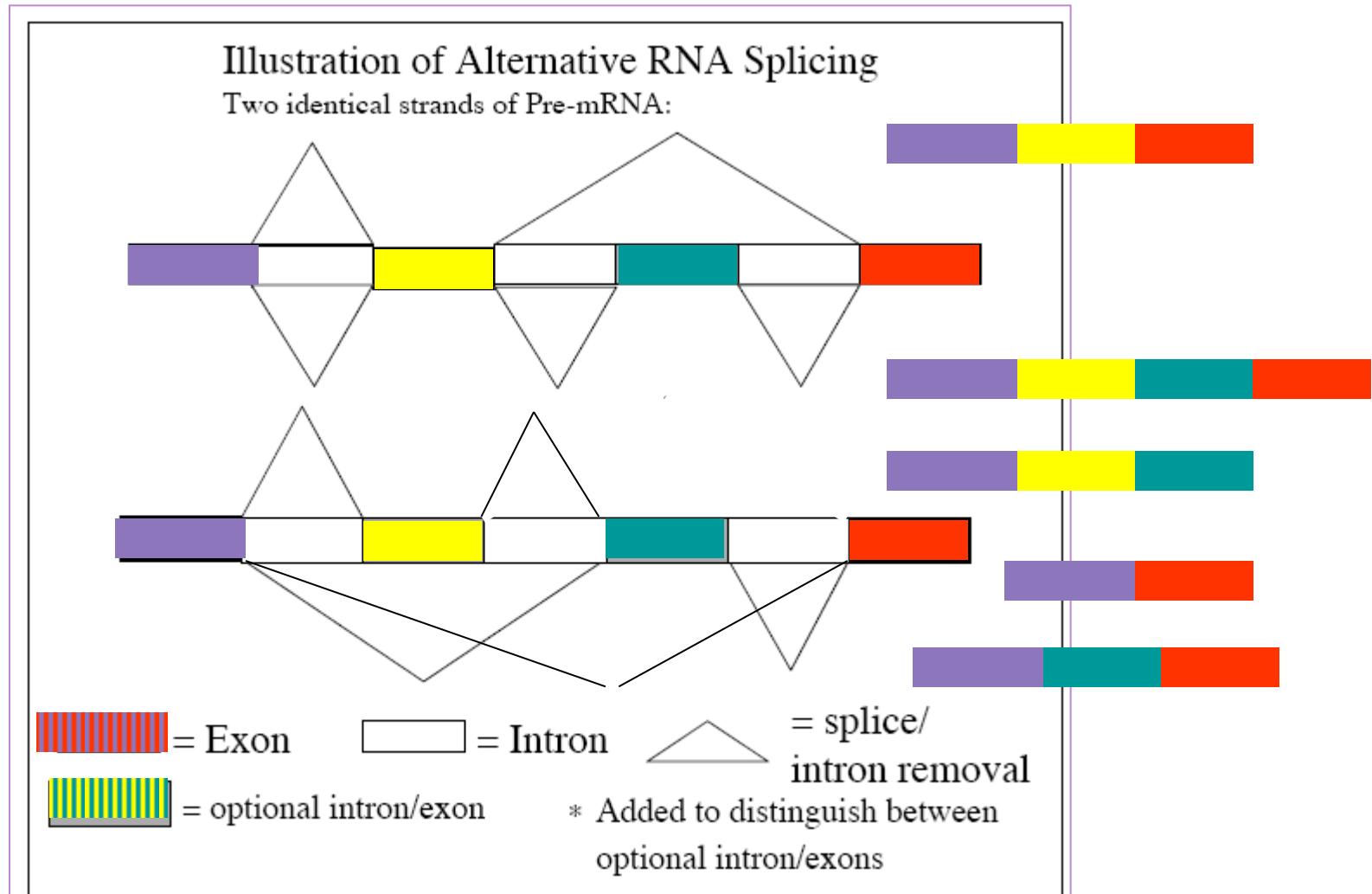
(c) Nuclear mRNA



Warum überhaupt Introns?

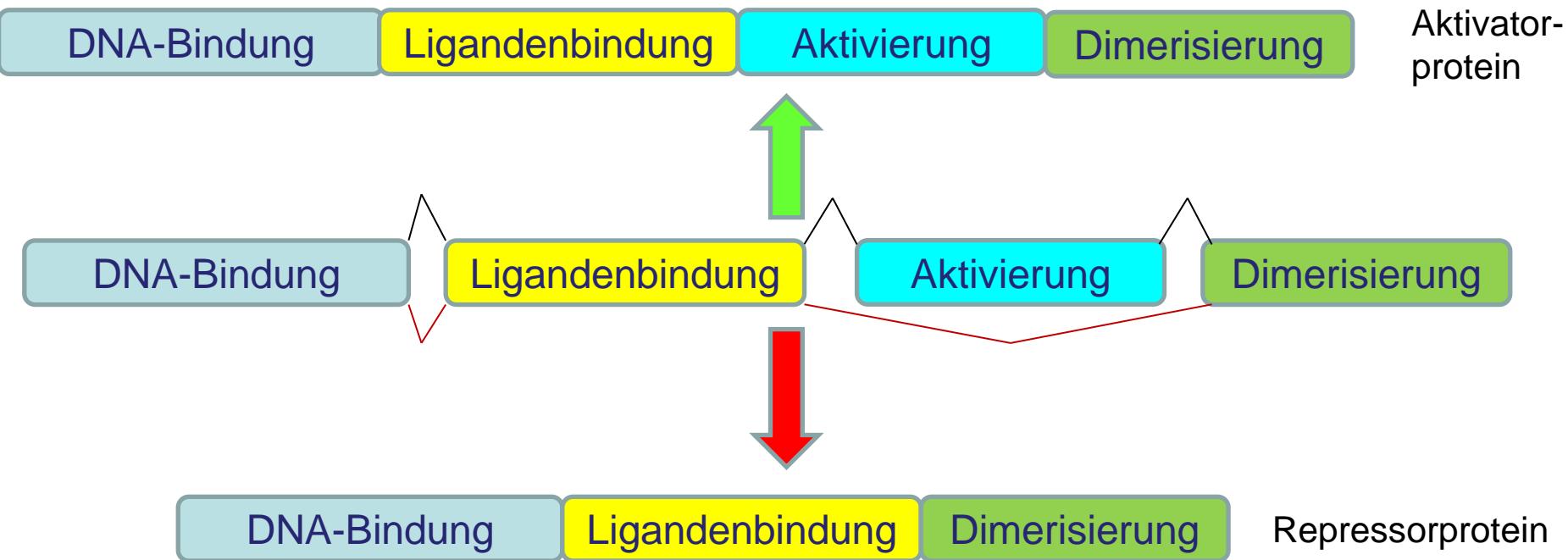
- Erleichtern die Entstehung komplexer Gene!
- (mehrere Minigene = Exons werden zu Makrogene zusammengepackt)
- „Exon shuffling“
- (einzelne Exons kodieren für Proteindomänen)“Module“, verschiedene Module ergeben zusammen immer wieder neue Proteine)
- Alternatives Spleißen
- (durch Kombination verschiedener Exons auf Ebene der RNA kann ein Gen für viele Proteine kodieren)
- Transspleißen

Prinzip des alternativen Spleißen



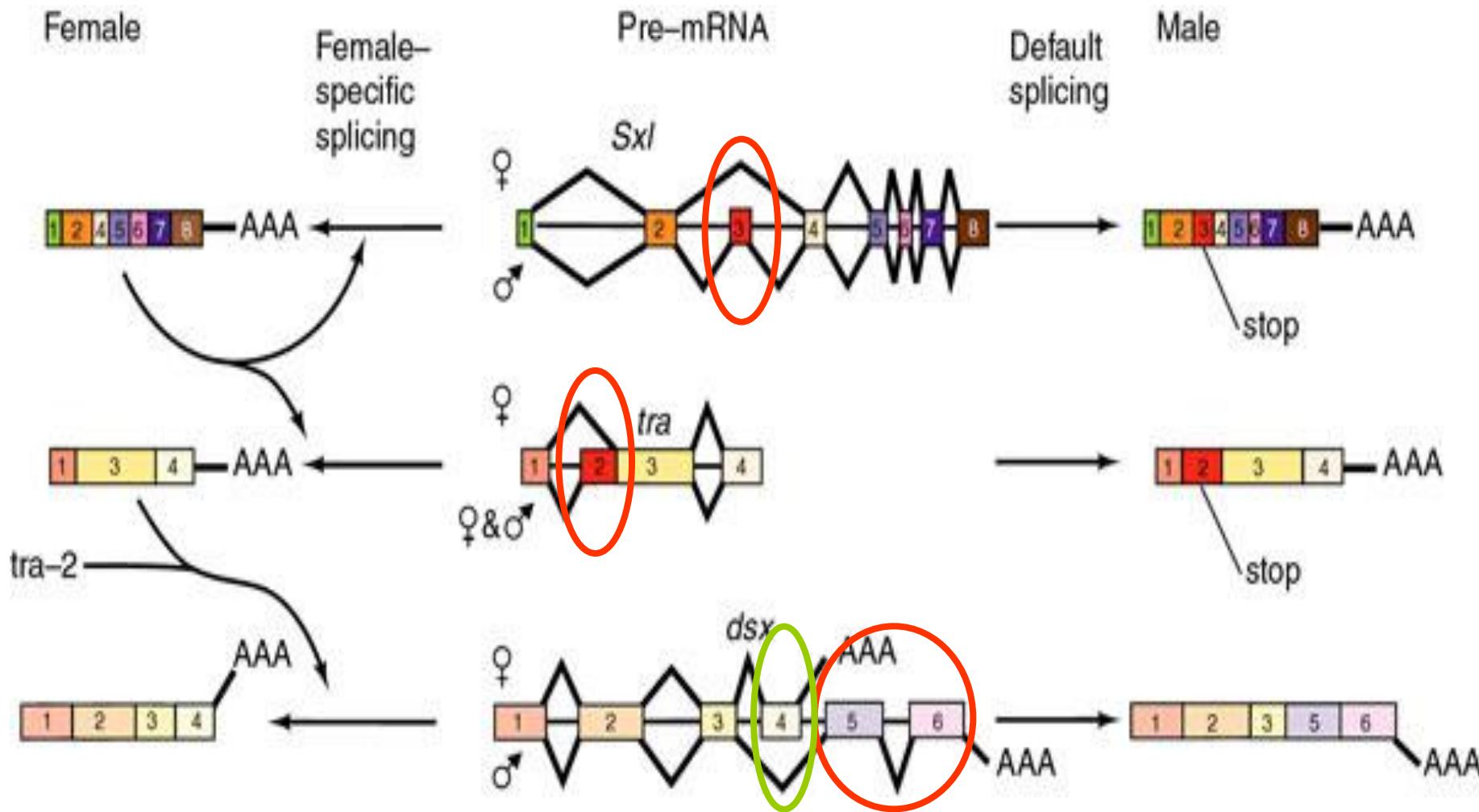
Alternatives oder differenzielles
Spleißen erhöht die Zahl der Proteine:

aus einem Aktivatorprotein kann sogar ein Repressor
werden!!

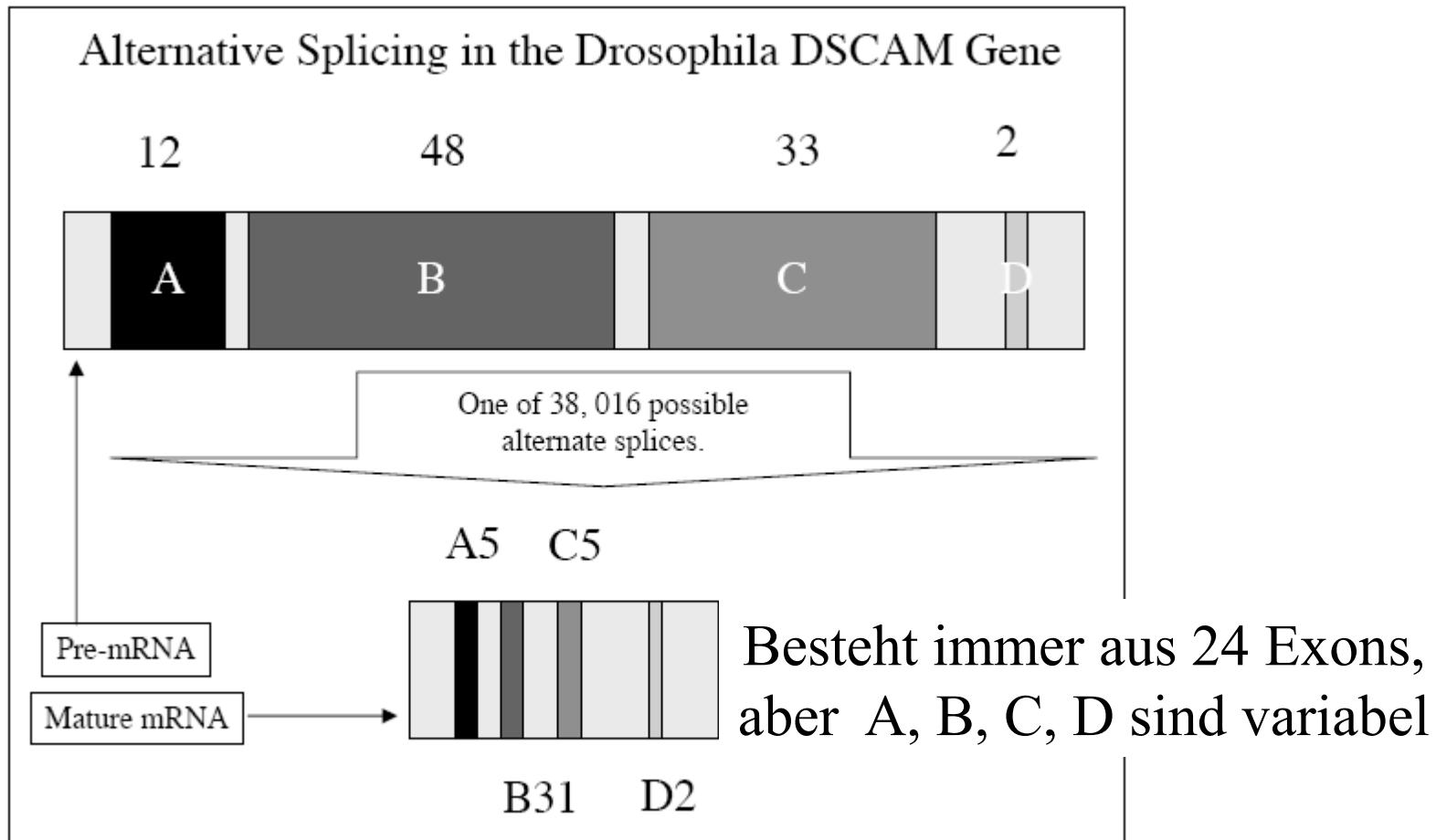


Nur für Interessierte!

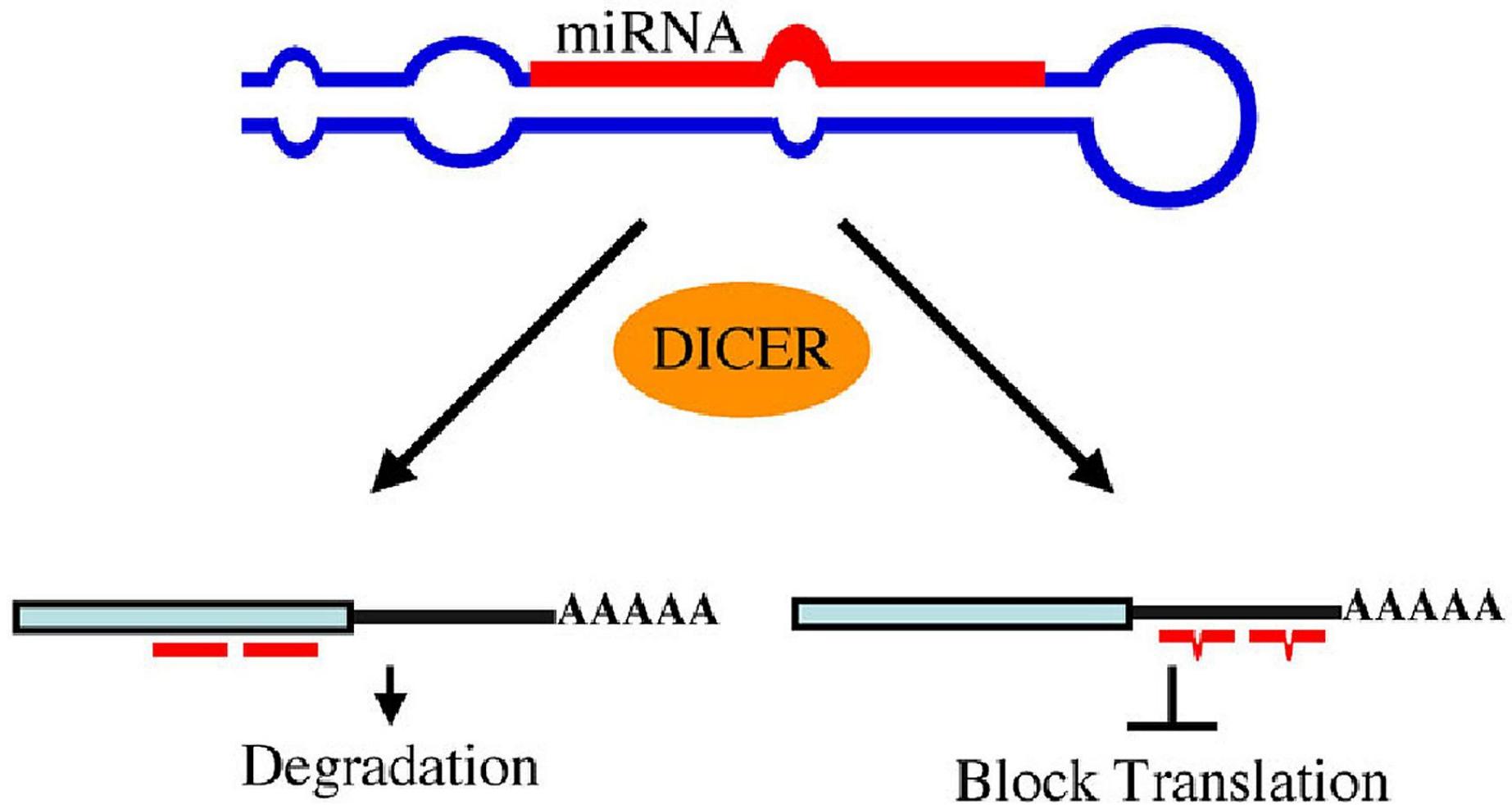
Alternatives Spleißen bestimmt bei *Drosophila melanogaster* das Geschlecht



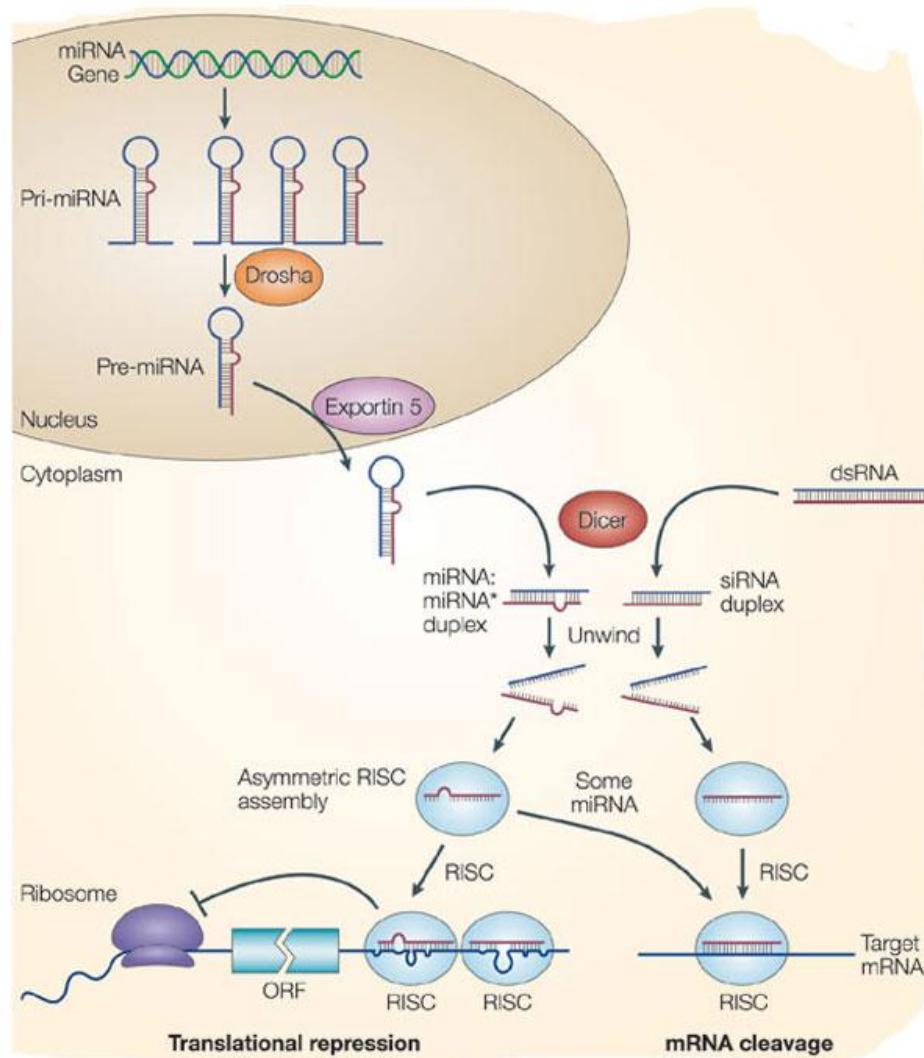
Beim DSCAM-Gen (115 Exons) gibt es bis zu **38.016** verschiedene Spleißvarianten



Genregulation durch miRNA

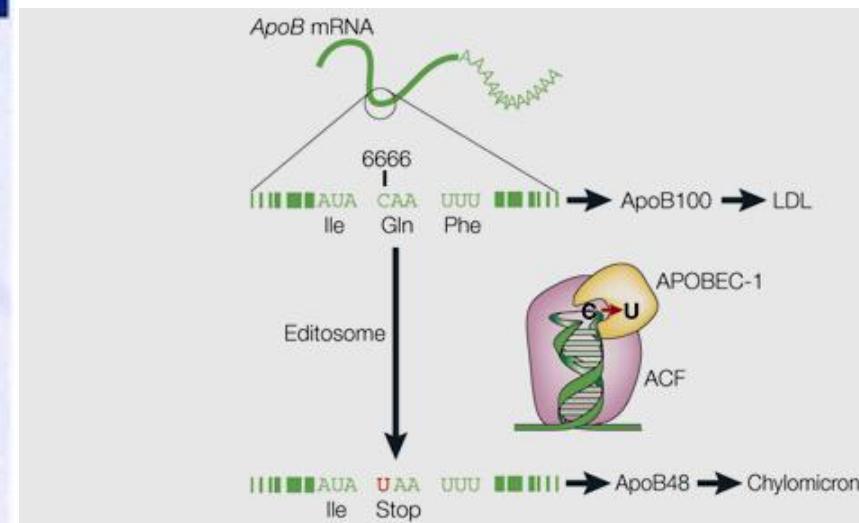
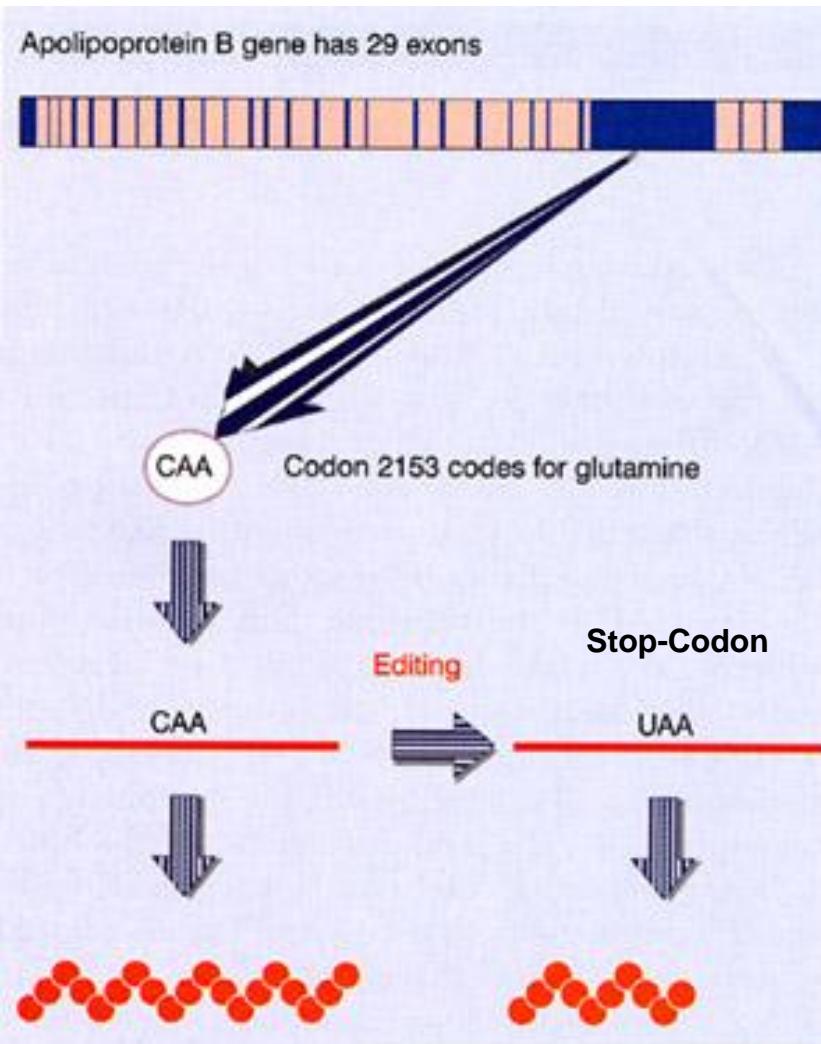


Entstehung der miRNA



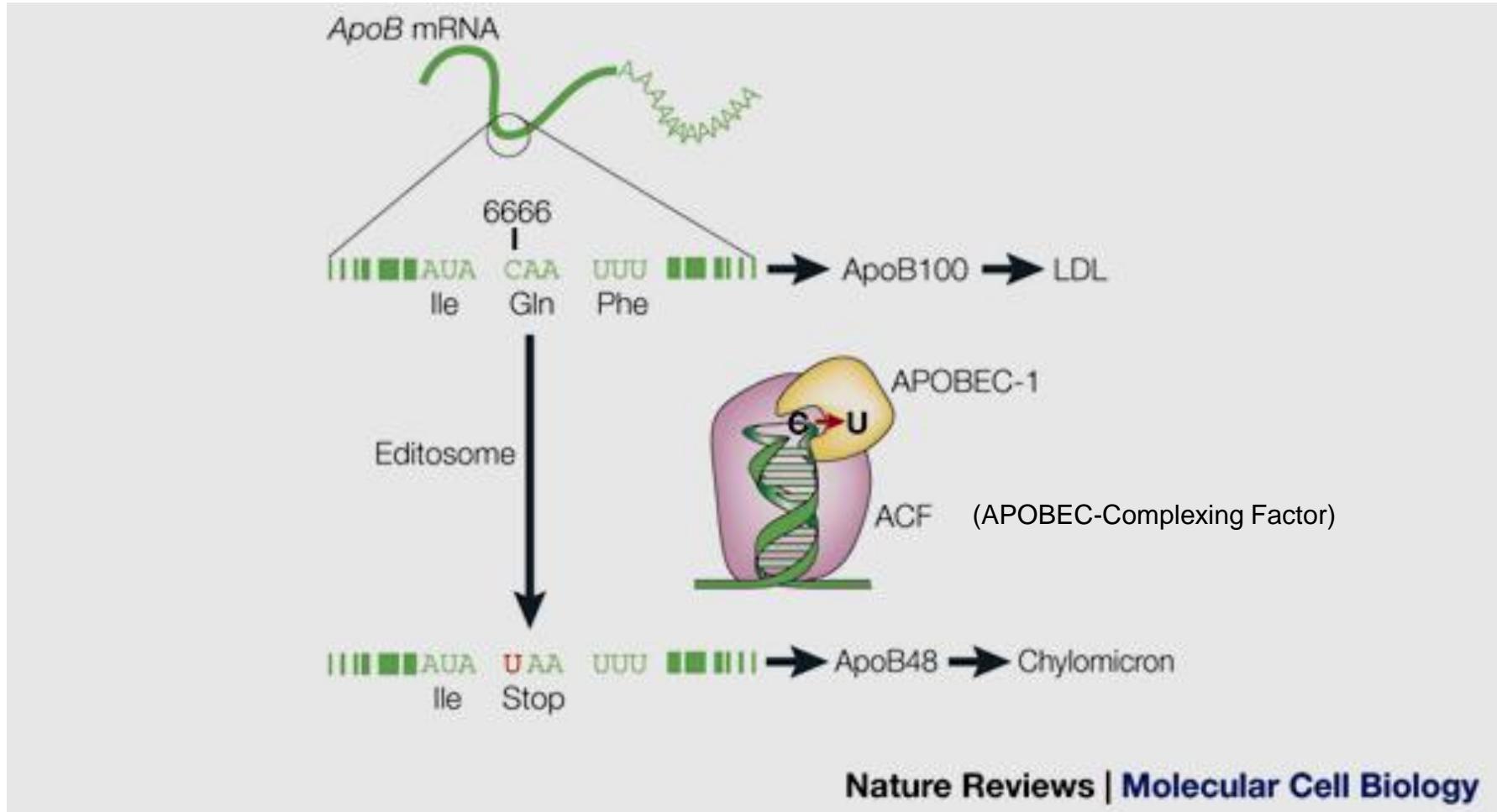
RNA-Editierung

<http://dna.kdna.ucla.edu/rna/index.aspx>



RNA-Editierung

<http://dna.kdna.ucla.edu/rna/index.aspx>



RNA-Editierung bei ca. 5- 6 % der menschlichen Gene der Fall

"Nature Biotechnology" (Bd. 22, S. 1001, August 2004)

Vielen Dank für's Zuhören und vielleicht ein
Wiedersehen in der Molekulargenetik (Modul 13)
oder in der Gentechnologie (Master Modul 8)

