

WS 2016/17  
Grundvorlesung „Allgemeine und Molekulare Genetik“

**Genstruktur und Genregulation**  
**bei Pro- und Eukaryoten**  
**(Pt.3)**

Kap. 35, 36



An animated primer on the basics of DNA, genes, and heredity.

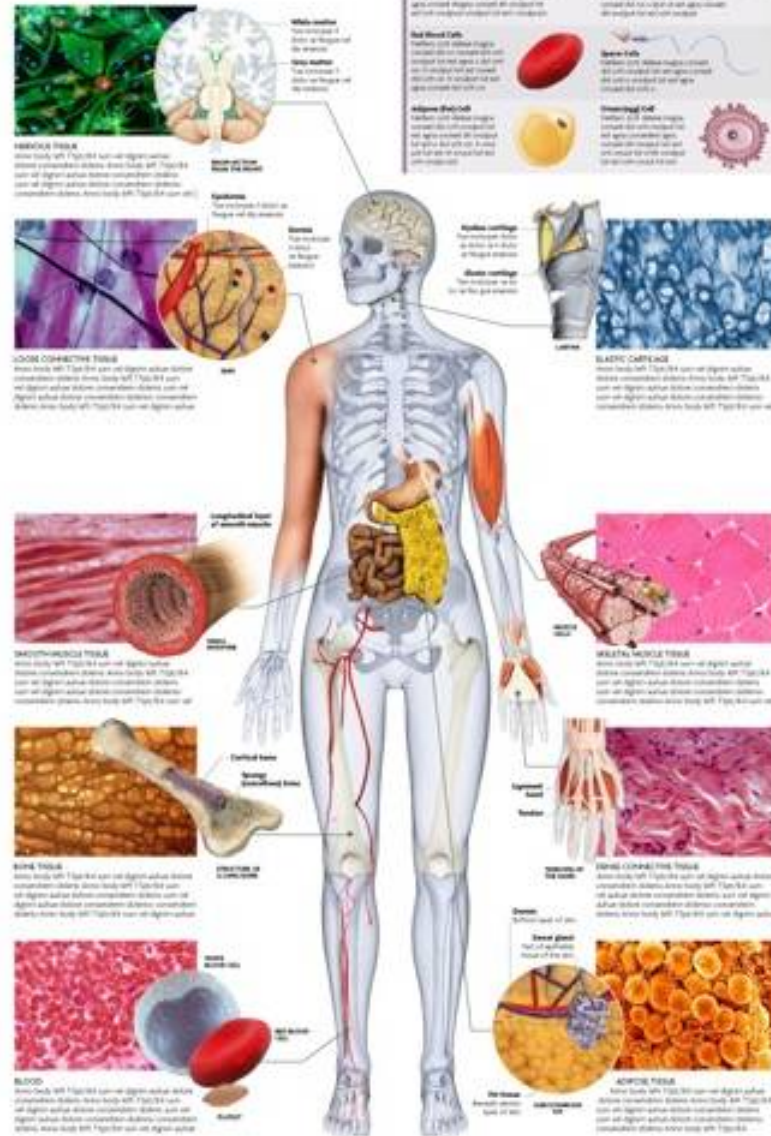
# Gleiches Genom, aber...



## CELL TYPES AND TISSUES








STERNENT SUPTVS TENED MENT ADIPULI SANCIE MAGNA FACILLI  
PRTS NULLA FACCOM DEL EULI ULLA RELICIT DOLEPO EU REI EXCOMM  
ODOLORITE TE AME LUS ET AD ESSENH EXERIS EUS ET EA AFUM VER  
SUM RILRE DO CORRE CORRET NIMACENAM DIC ELEGAT UT VENT LUM

### TABLE TYPES

[illegible]

10<sup>14</sup> (100 Billionen) Zellen  
& ca. 270 Zelltypen

# Blutzellen

Monocyte	Neutrophil	Eosinophil	Basophil
			
Platelets	Macrophage	Erythrocyte	
			

Schon mal gehört.....

# Genregulation in Eukaryoten

**Kompartimentierung** der Zelle (Nukleus-Cytoplasma)

Aufteilung der Gen-Information auf **Chromosomen**

Verpackung der DNA in **Chromatin**

**DNA-Methylierung**

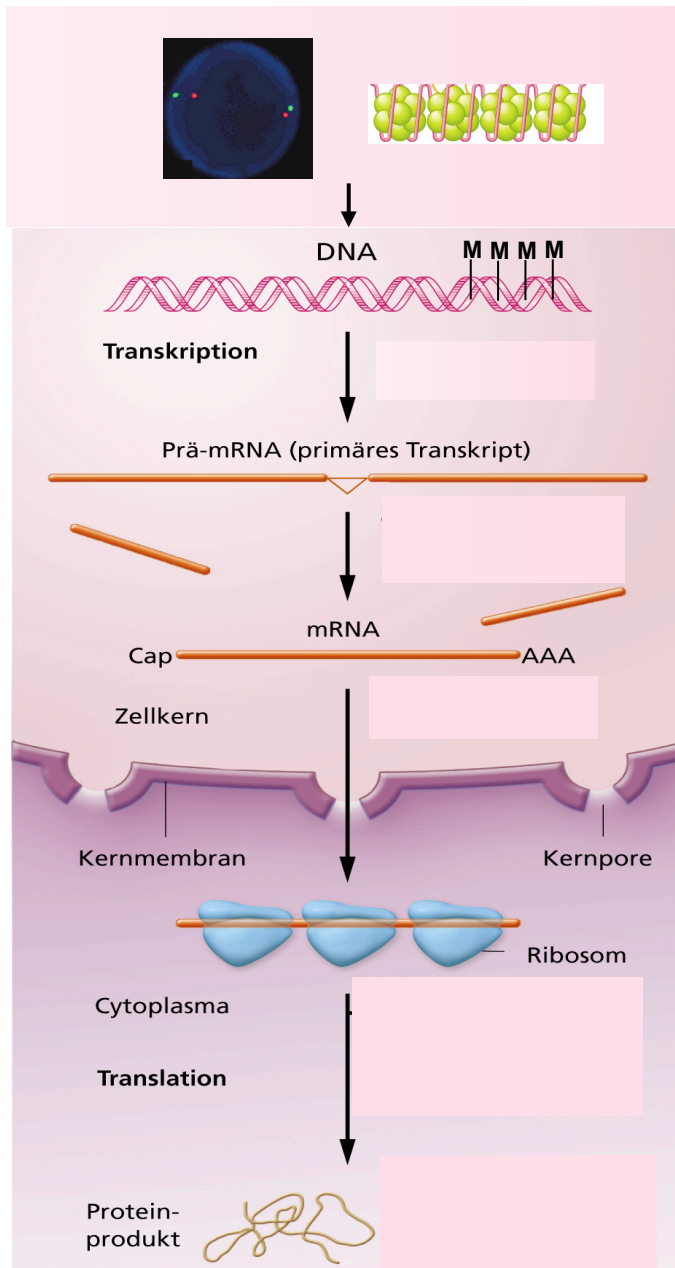
Mosaik-**Genstruktur** (Introns-Exons)

**mRNA-Prozessierung**





# Ebenen der Genregulation in Eukaryoten



Kern-Lokalisation

& Chromatin • Histon-Modifikationen



DNA-Methylierung • DNA-Amplifikation  
• DNA-Rearrangements



Transkription • cis-Kontrollelemente  
• Transkriptionsfaktoren



RNA-Prozessierung • Spleißen  
• Capping, Polyadenylierung  
• RNA Editing



RNA-Transport  
RNA-Stabilität & Abbau



Translation

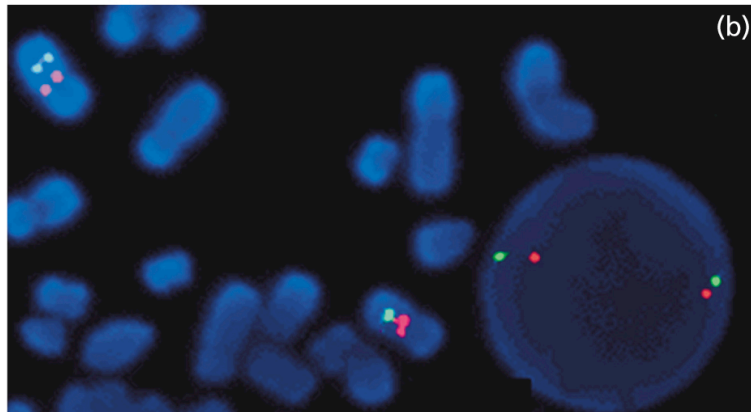
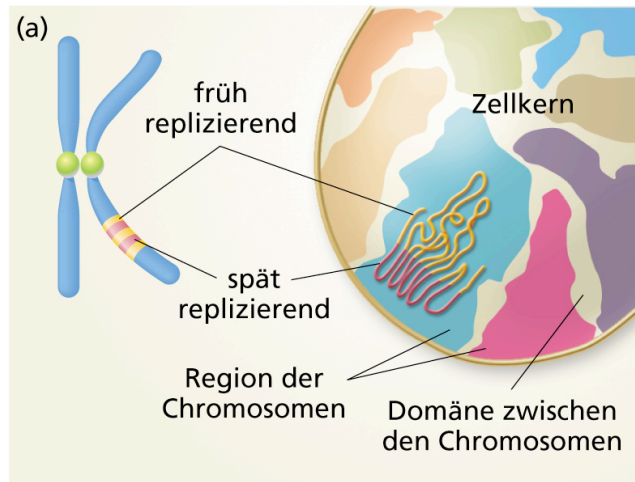


Protein-Reifung & Modifikation

Gen-  
aktivierung



# Kern-Kompartimente bestimmen Genaktivität



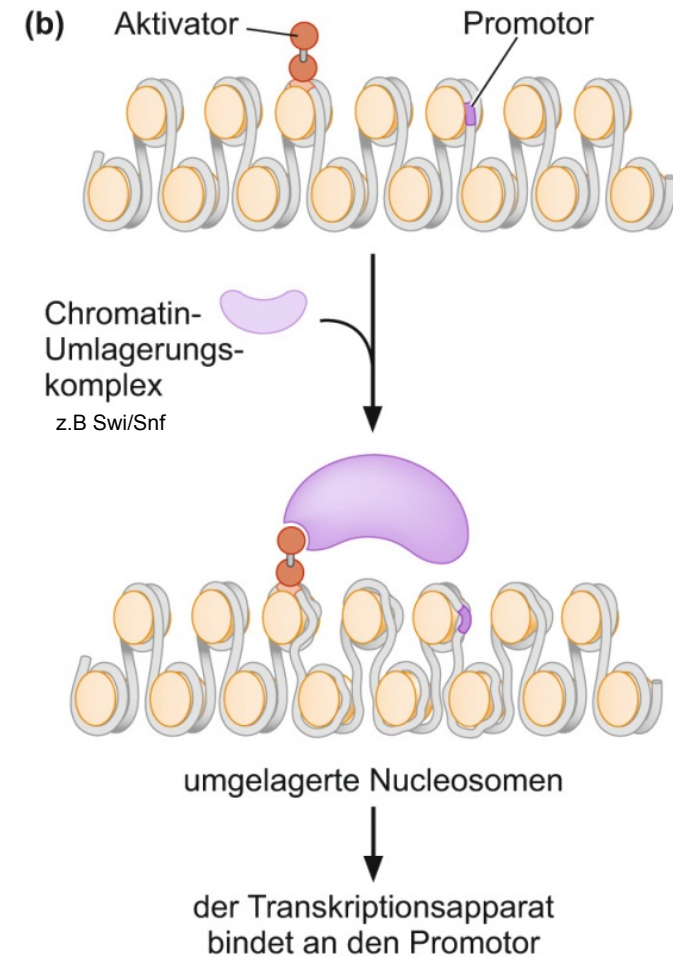
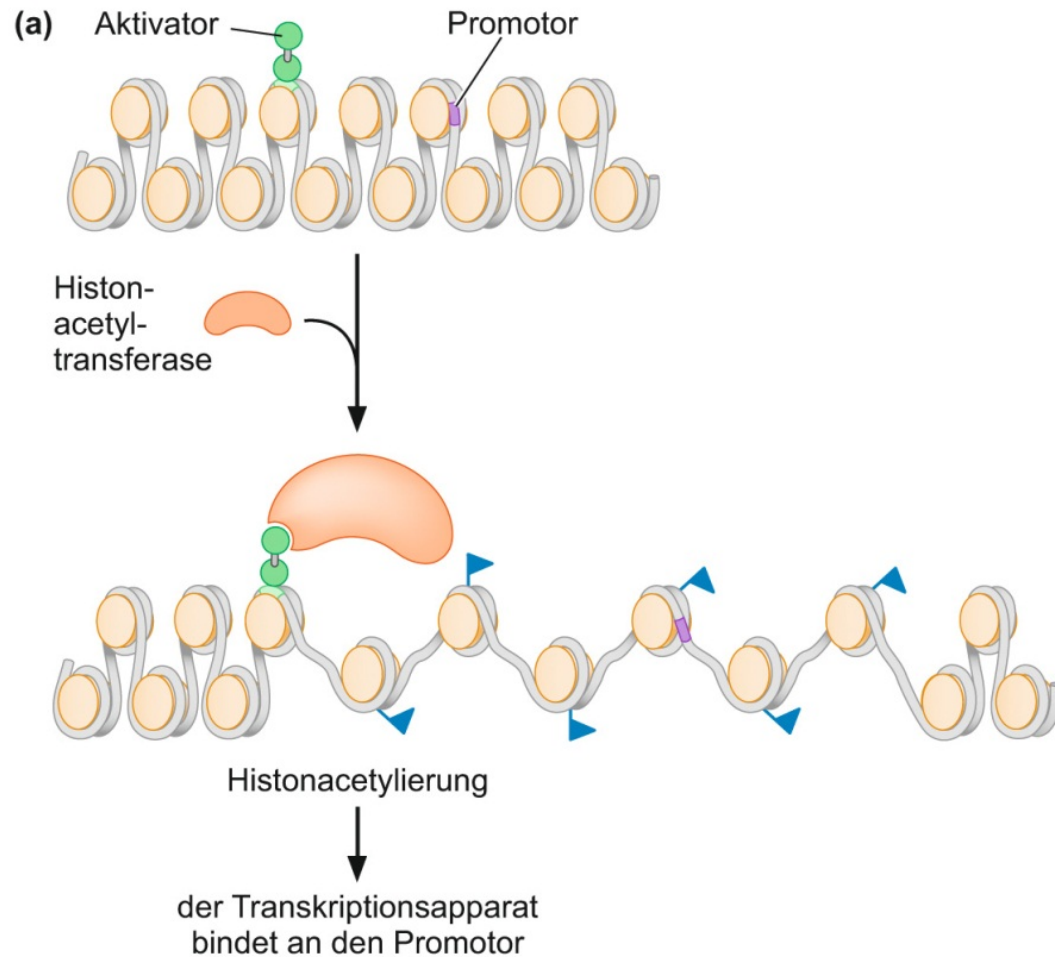
Im Zellkern besetzt jedes Chromosom ein eigenes Territorium und ist von anderen Chromosomen durch eine interchromosomale Domäne getrennt. Man nimmt an, dass in dieser Domäne die mRNA-Transkription und mRNA-Prozessierung ablaufen.

FISH-Sonden binden an das menschliche Chromosom 7.

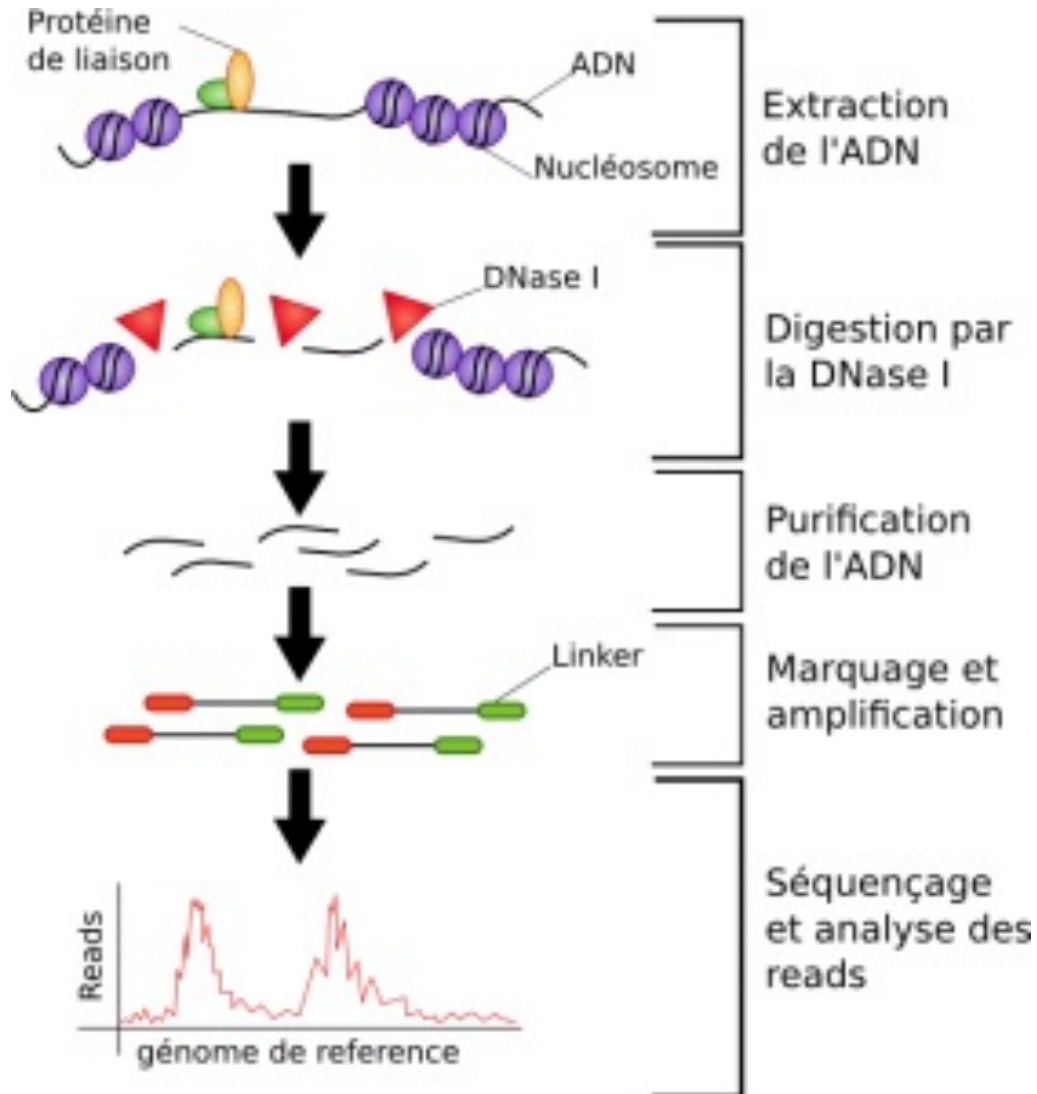
Links: Bindung an Metaphasechromosomen.

Im Interphase-Zellkern (rechts) identifiziert die Sonde die Position des Territoriums, das die beiden Chromosomen 7 besetzen.

# Lokale Veränderungen der Chromatin-Struktur



# Detektion von offenem Chromatin



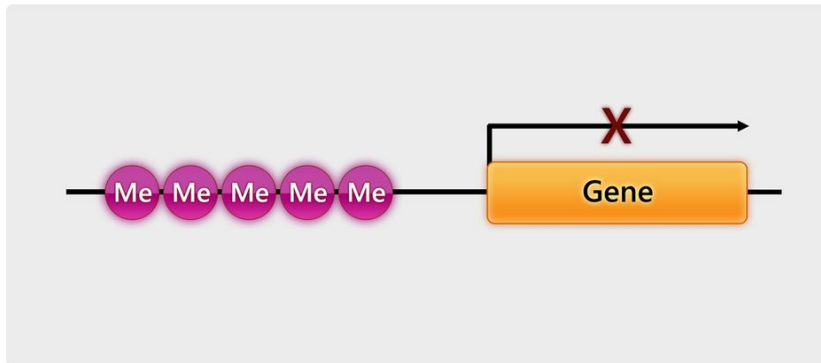
**DNase-hypersensitive *sites* (DHS) markieren offenes, aktives Chromatin.**

Schneiden von Chromatin mit DNaseI erzeugt Strangbrüche in ungeschützten, Nukleosomen-freien Bereichen der DNA.

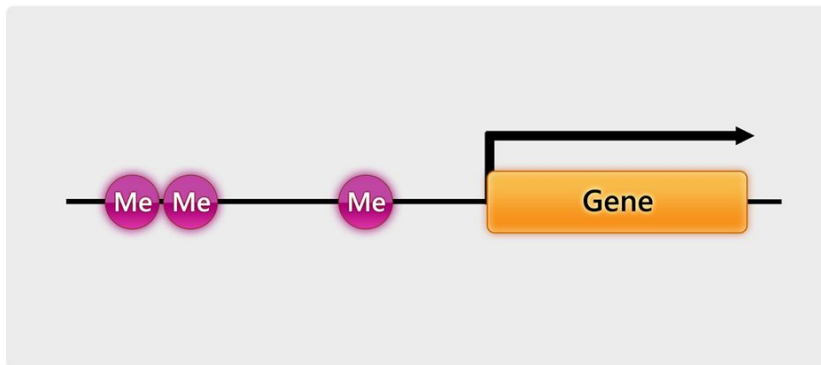
Angereicherte ungeschützte DNA-Abschnitte werden massenhaft sequenziert und bioinformatisch auf die Genom-Referenzsequenz kartiert. („**DNaseI-Seq**“)



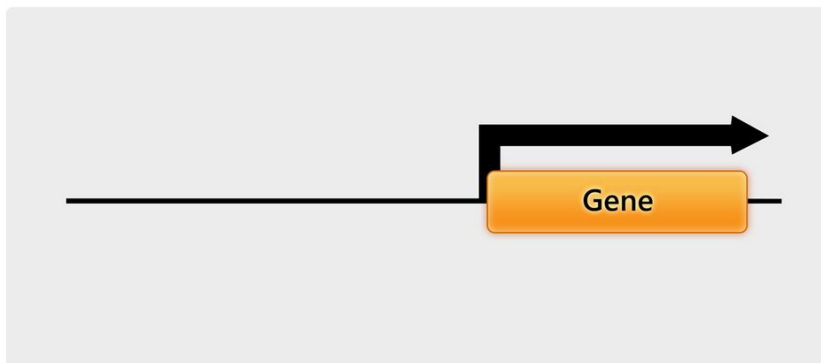
# DNA-Methylierung bestimmt Genaktivität



In Säugetieren wird Cytosin-Methylierung (nur in **CpG-Dinukleotiden**) als regionaler Mechanismus der Genregulation verwendet.



**C<sup>m</sup>pG** im Promoterbereich (hier als **Me** markiert) korreliert mit **Repression**.



**Demethyliertes CpG** dort korreliert mit **aktiver Transkription!**



# CpG-Inseln im Genom sind potenzielle Genschalter

```

CATTCCGCTTCTCTCCGAGGTGGCGCGTGGGA
GGTGTCTTGGCTCGGTTCTGTAAGAATAGGCCAGG
CAGCTTCCCGCGGGATGCGCTCATCCCTCTCGG
GGTTCGGCTCCACCGCGCGCGTTCCGCCGTT
CGCCTGCGAGATGTTTTCCGACGACAATGATTC
CACTCTCGGCGCTCCCATGTTGATCCAGCTCCT
CTGCGGGCGTCAGGACCCCTGGGCCCGCCCCG
CTCCACTCAGTCAATCTTTGTCCCCTATAAGGCG
GATTATCGGGTGGCTGGGGCGGCTGATTCGGA
CGAATGCCCTTGGGGGTCACCCGGGAGGGAAGTC
CGGGCTCGGCTTTGGCCAGCCCGCACCCCTGGT
TGAGCCGGGCCAGGGCCACAGGGGGCGCTCG
ATGTTCTGCAGCCCCCGCAGCAGCCCCACTCC
CGGCTCACCTACGATTGGCTGGCCCGCCCGAG
CTCTGTGCTGTGATTGGTCACAGCCCGTGTCGGTC
GGCGGCGCGGGCGGATGAGGTGACCGCCCA
GAGGCCAGCTCGGGCGGTGTCCCGCGCGCGC
GACTCGGGCGGAGTTTCCCGAGGGCGGAAGCG
GGGCAGTGTGACGGCAGCGGTCTGGGAGGCGC
CGCGCGCGCTCGGAGCAGCTCCCCTCCTCGCA
GCCTCACCGCGCGCGGTCCCGCGCGCCTGGCC
TCCCGCACTCGCGCACTCCTGTCCCGCCACCG
CGCCACCTCCACCTCGATGCGGTGCCTGGCTGC
TGCGTGATGGGGCTGCGGAGCGGCGCCTGCGG
CTCGCGCGCGGCGCTGCTCGCGCTGAGGTGCGT
CGGTGCCCGCCCCCGCGCCCCCGCGCGCGC
CGCTCCTGTTGACCCTGTCGCGCCGTCGCTGTC
AGCGCGGCTGAGGTAAGGCGCGGGGCTGGCCCG
CGGTTGGCGCGCGGTGCGCGGGGTTGGGGAGGG
GGCGCTTCGCGCGGGGAGGAGCGCGCGGCCG
GGTCGCGGGCGGGTCTGAGGGGA
CTCTTAGTTTTGGGTGCATTTGTCTGGTCTTCCAAA
CTAGATTGAAAGCTCTGAAAAAACTATCTTGT
GTTTCTATCTGTTGAGCTCATAGTAGGTATCCAGGA
AGTAGTAGGGTTGACTGCATTGATTTGGGACTACAC
TGGGAGTTTTCTTCCCATCTCCCTTTAGTTTTCT
TTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTTCTTTTTTTTT
TTGAGATGTCTTGTCTCAGTCCCCCAGGCTGGA
GTGCAGTGGTGATCTTGGCTCACTGTAGCCTCC
ACCTCCCAGGTTCAAGCAATTCTACTGCCTTAGCCT
CCCGAGTAGCTGGGATTACAAGCACCCTCCACCAT
TCCTGGCTAATTTTTTTTTTTGTATTTTAGTTGAGA
CAGGGTTTCACCATGTTGGTGTGCTGGTCTCAGA
CTCTGGGGCCTAGCATCCCCCTGCCTCAGCCT
CCCAGAGTGTTAGGATTACAGGCATGAGCCACTGT
ACCCGCCTCTCTCCAGTTTCCAGTTGGAATCCAA
GGGAAGTAAGTTTAAGATAAAGTTACATTTTGAAT
CTTTGGATTGAGAAGAATTTGTACCTTTAACACCT
AGAGTTGAATTCATACCTGGAGAGCCTTAACATT
AAGCCCTAGCCAGCCTCCAGCAAGTGGACATTGGT
CAGGTTTGGCAGGATTCTCCCTGAAGTGGACT
GAGAGCCACACCCTGGCCTGTACCATACCCATCC
CCTATCCTTAGTGAAGCAAACTCCTTTGTTCCCTT
CTCCTTCTCCTAGTGACAGGAAATATTGTGATCCTA
AAGAATGAAATAGCTTGTACCTCTGGCCTCAG
GCCTCTTGAATTACAGCGGTTCTGTTTAATCAAGT
GACATCTTCCAGGCTCCCTGAATGTGGCAGATG
AAAGAGACTAGTTCAACCCTGACCTGAGGGGAAAG
CCTTTGTGAAGGGTCAGGAG

```

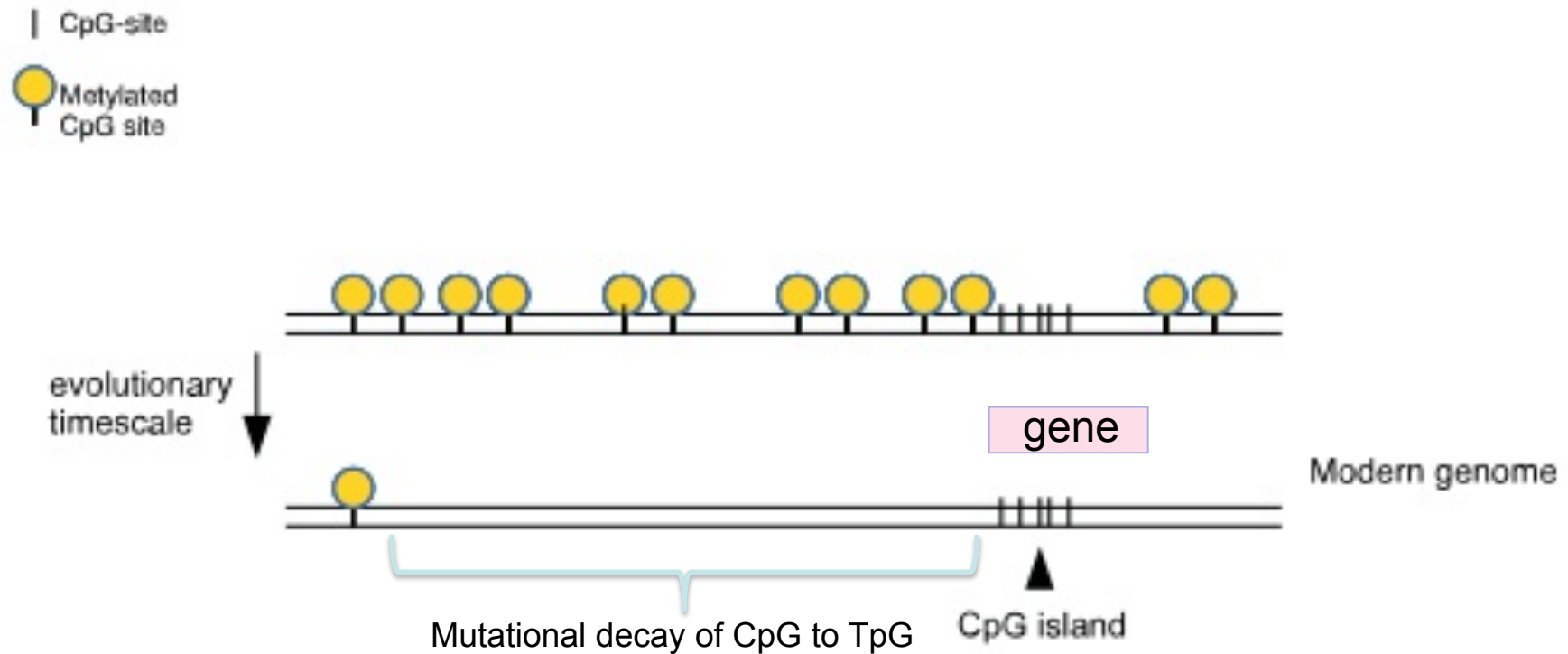
**Left:** CpG sites at 1/10 nucleotides, constituting a CpG island. The sample is of a gene-promoter, the highlighted ATG constitutes the start codon.

**Right:** CpG sites present at every 1/100 nucleotides, constituting a more normal example of the genome, or a region of the genome that is commonly methylated.

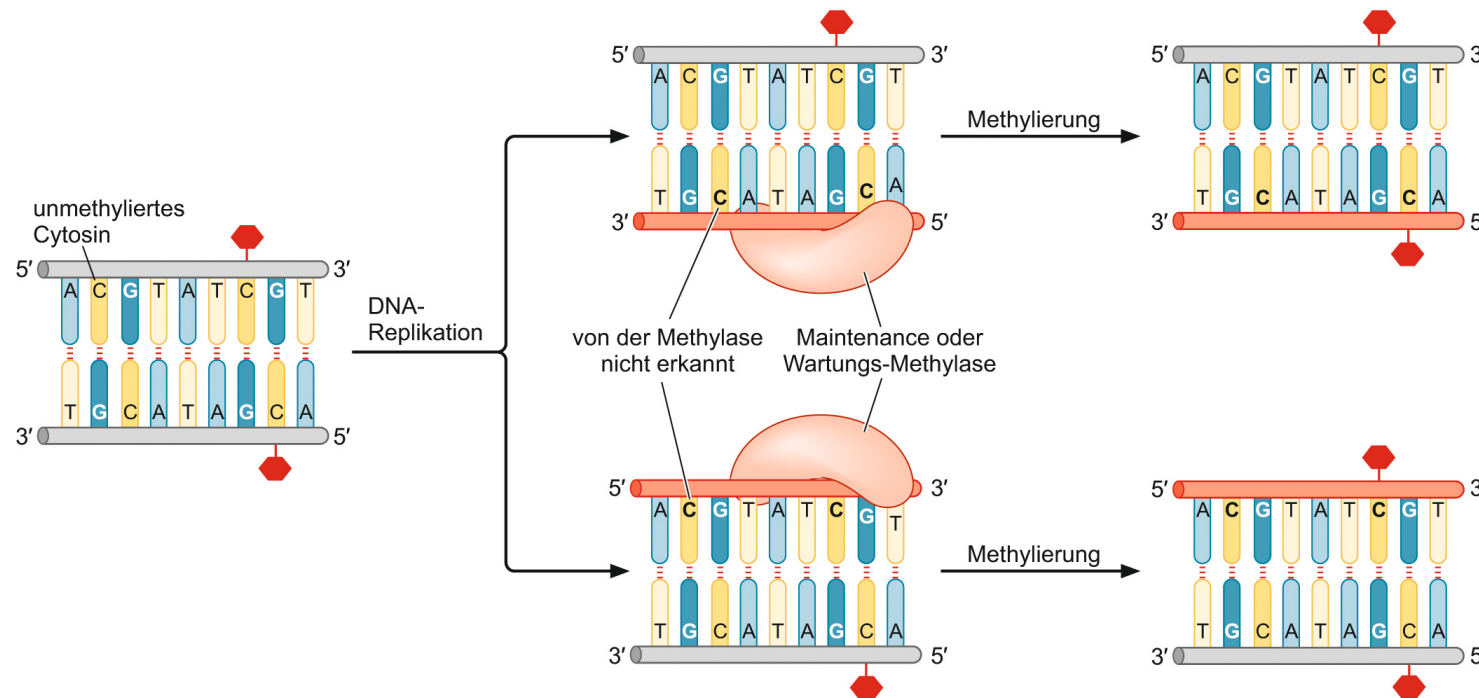
# Entstehung von CpG-Inseln

CpG > Desaminierung > **U**pG > Reparatur nach Entfernung von **U**

<sup>5m</sup>CpG > Desaminierung > TpG > Mutation bleibt...



# DNA-Methylierung wird vererbt!

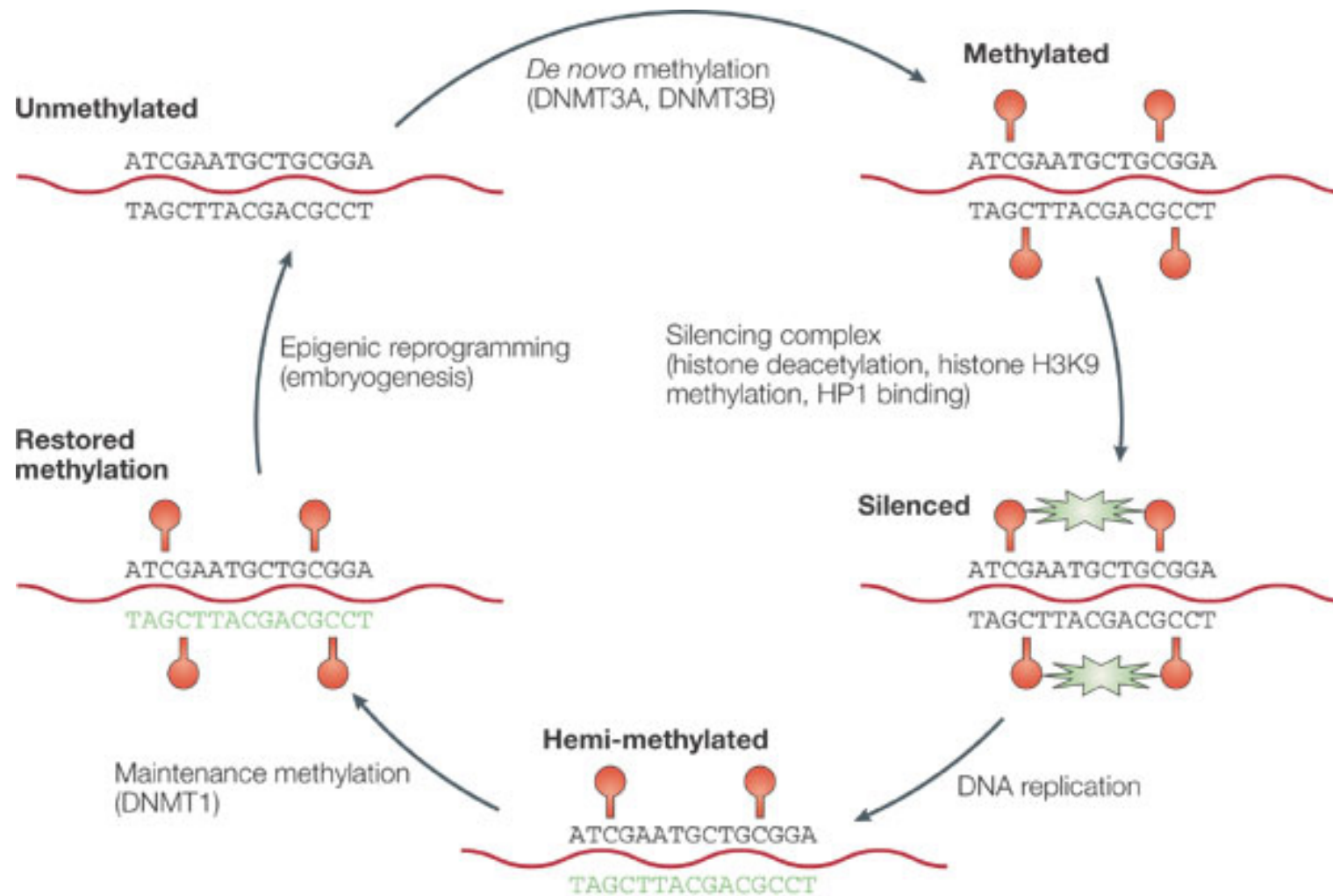


Vererbung des Methylierungsmusters bei der Zellteilung

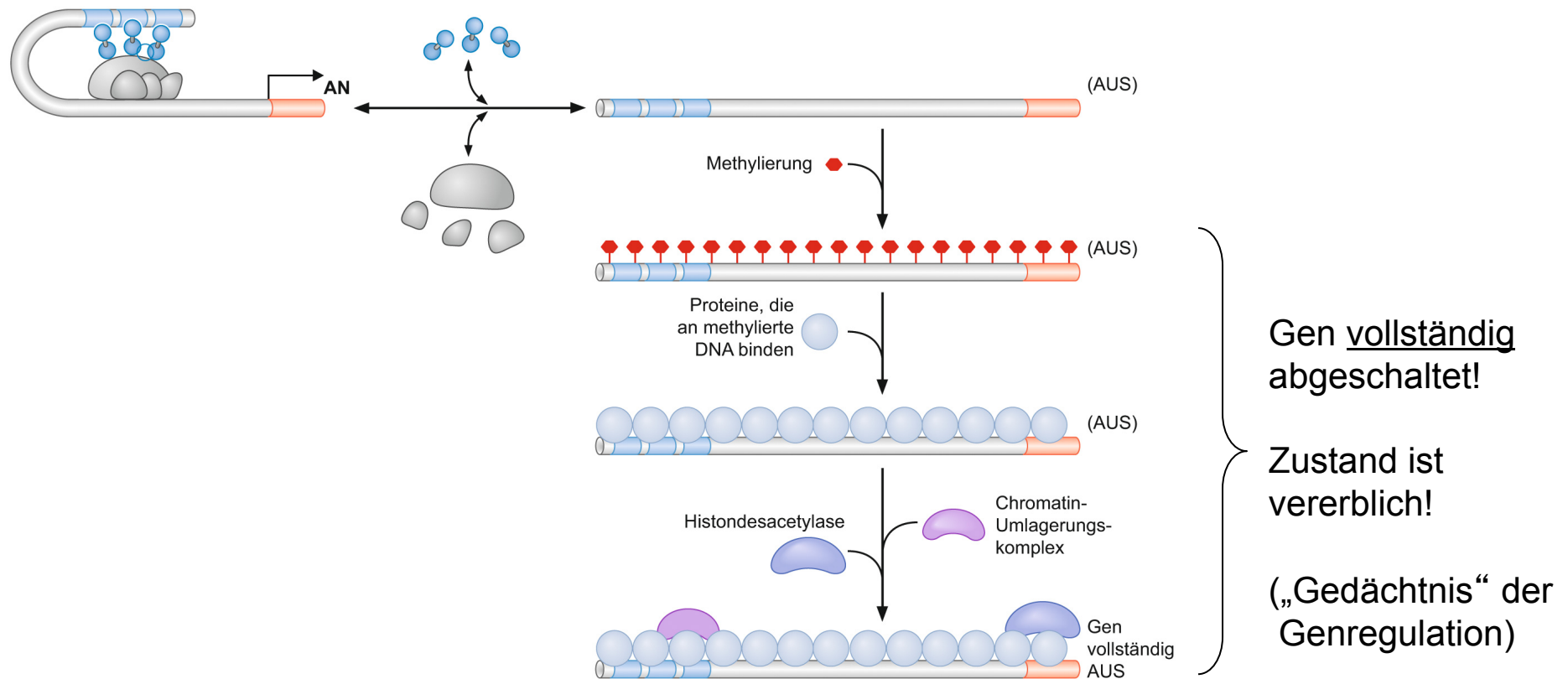
- „Gedächtnis der Genregulation“
- aber auch reversibel...



# DNA-Methylierung & Demethylierung



# DNA-Methylierung & Chromatinstruktur



**Abbildung 17.25: Abschaltung eines Gens durch DNA-Methylierung und Histonmodifikation.** Im nicht modifizierten Zustand kann das schematisch dargestellte Gen einer Säugetierzelle in Gegenwart von Aktivatoren und dem Transkriptionsapparat leicht zwischen dem exprimierten und nicht exprimierten Zustand hin- und herschalten (im Bild ganz oben). Unter diesen Umständen ist die Expression niemals gänzlich abgeschaltet; man sagt: Das Gen ist nicht dicht (engl. *leaky*). Oftmals reicht dies jedoch nicht aus. Manchmal muss ein Gen vollständig abgeschaltet werden – unter Umständen sogar auf Dauer. Dies wird durch eine Methylierung der DNA und eine Modifikation der Nucleosomen am Genort erreicht. Wenn das Gen nicht exprimiert werden soll, methyliert eine DNA-Methyltransferase (eine Methylase) sowohl Cytosinreste des Promotorbereichs als auch in der codierenden Region des Gens und stromaufwärts gelegenen Aktivatorbindungsstellen. Die Methylgruppen werden in der 5-Position in den Molekülring des Cytosins eingeführt; es entsteht 5-Methylcytosin (siehe Kapitel 6). Diese Modifikation allein kann die Anlagerung der Transkriptionsmaschinerie und von Aktivatoren verhindern. Sie kann aber auch im Gegenteil zur verstärkten Bindung bestimmter Proteine wie MeCP2 führen, die an methylcytosinhaltige Sequenzen binden. Diese Proteine rekrutieren dann Molekülkomplexe an die Stelle, die am Ort befindlichen Nucleosomen modifizieren und umlagern. Dadurch wird die Expressionsfähigkeit des Gens gänzlich abgeschaltet.

Wir erinnern uns...  
X-Inaktivierung  
bei Säugetieren

Nochmal...

# EPIGENETIK!

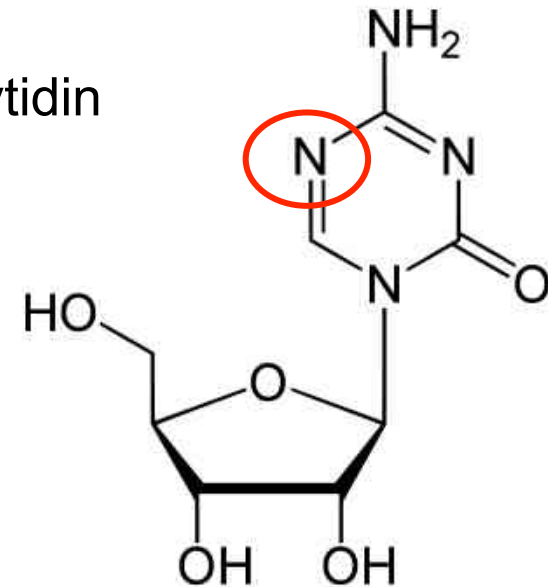
- Vererbung des ***Aktivitätszustandes*** von Genen
- über DNA-Methylierung & Chromatin-Status (d.h. Histon-Modifikationen)
- reversibel



# DNA-Methylierung & Krebstherapie

- in zahlreichen Tumor-Arten sind die **Tumor-Suppressorgene** durch Methylierung abgeschaltet
- mögliche Chemo-Therapie:

**Aza**-Cytidin

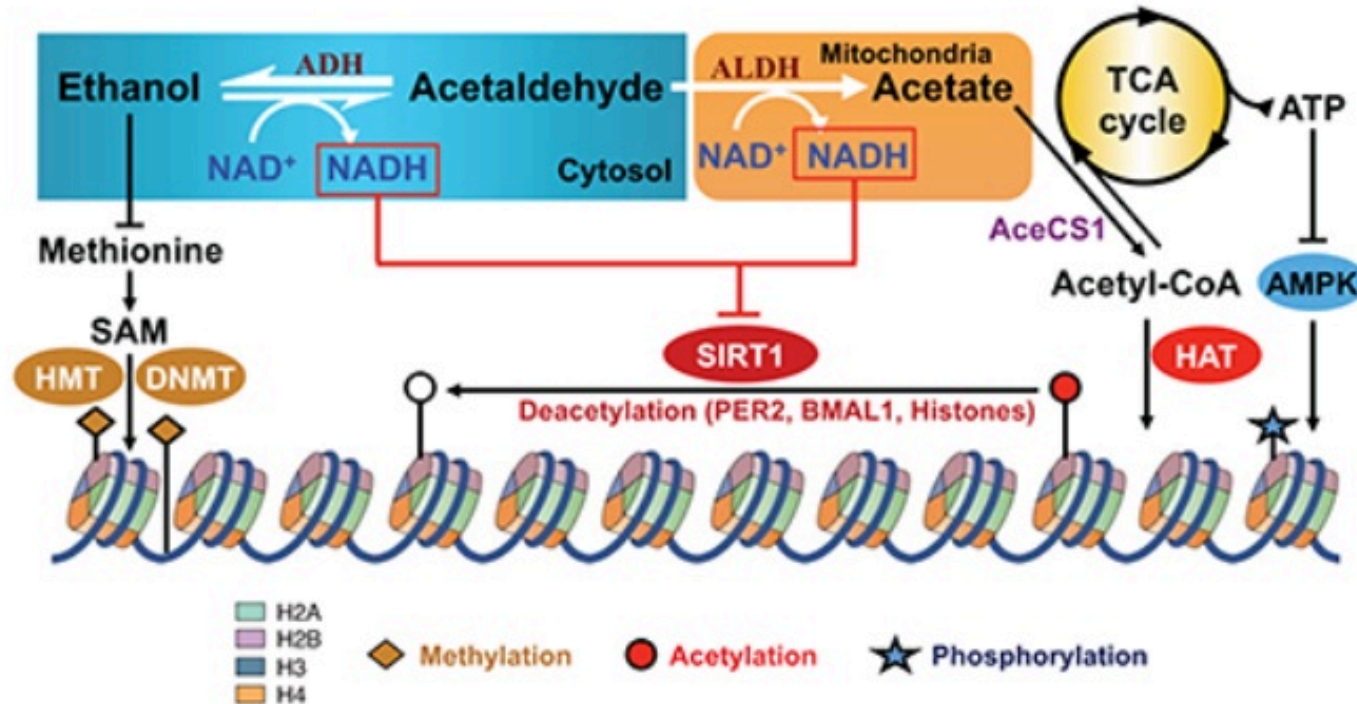


DNA-Methyltransferasen werden inhibiert

- Demethylierung des Genoms
- Reaktivierung von Tumorsupp.-Genen



# Epigenetik & Alkohol

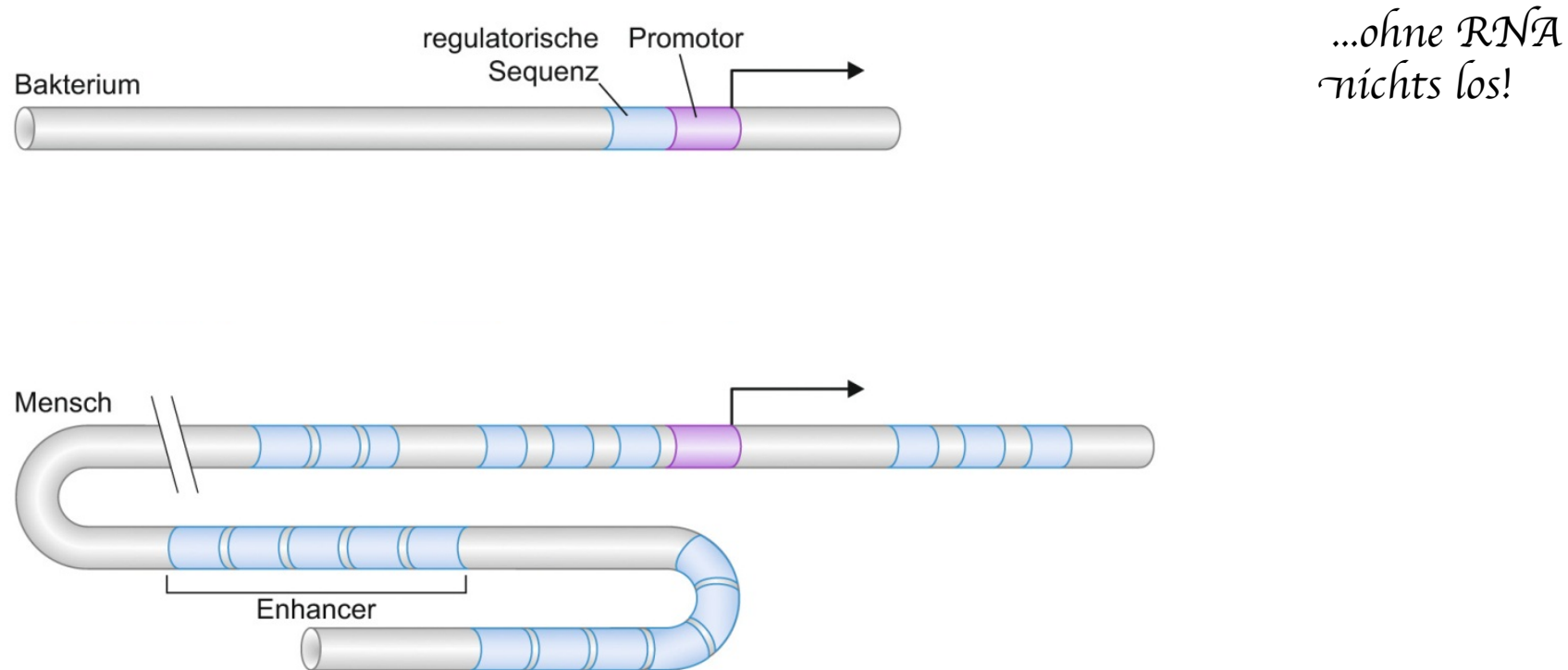


**Figure 5** Interactions between alcohol metabolism and epigenetic mechanisms. Chronic alcohol consumption leads to lower-than-normal methylation (i.e., hypomethylation) by decreasing the levels of S-adenosylmethionine (SAM), which is used by DNA methyltransferases (DNMTs) and histone methyl transferases (HMTs) to methylate DNA and histones, respectively. Furthermore, alcohol metabolism increases the ratio of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) to the oxidized nicotinamide adenine dinucleotide ( $NAD^+$ ); this inhibits SIRT1, thereby interfering with normal histone acetylation patterns.

NOTES: ATP = Adenosine triphosphate; AMPK = AMP-activated protein kinase; HAT = histone acetyl transferase; TCA = tricarboxylic acid cycle.

<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arcr351/6-16.htm>

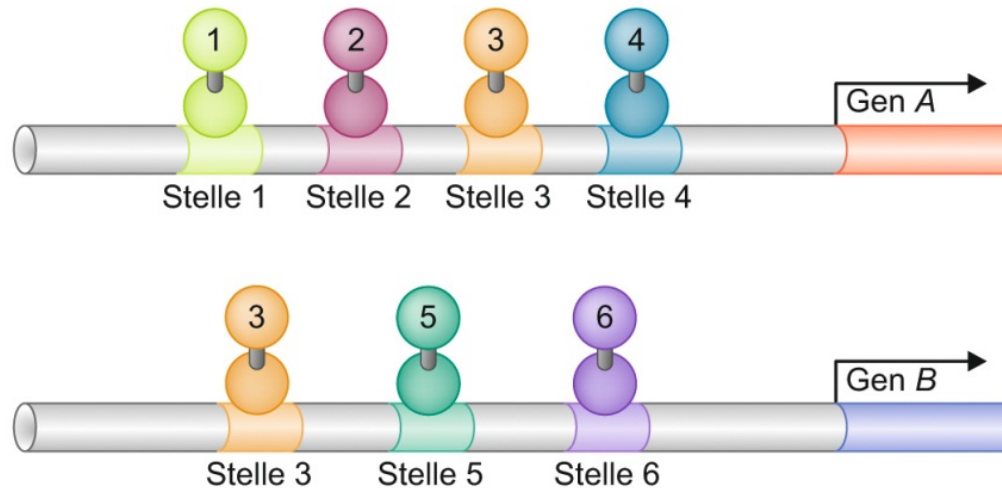
# Genregulation auf Ebene der **TK-Initiation** !!



**Abbildung 17.1: Die regulatorischen Genelemente bei Bakterien, Hefen und Menschen.** Dargestellt ist die zunehmende Komplexität der regulatorischen Sequenzen, beginnend mit einem einfachen Bakteriengen, das von einem Repressor gesteuert wird, bis hin zu einem Gen des Menschen, das von mehreren Aktivatoren und Repressoren gesteuert wird. Der Promotor als Initiationspunkt der Transkription ist jeweils rechts (lila) eingezeichnet. Dies gilt für den bakteriellen Fall streng, bei den eukaryotischen Beispielen setzt die Transkription erst etwas stromabwärts vom anfänglichen Bindungsort der Transkriptionsmaschinerie ein (siehe Kapitel 12). Manche der Gruppen von Regulatorbindungsstellen (Cluster) des menschlichen Gens wirken als Enhancer-Bereiche, einer davon ist markiert.

# Genregulation auf TK-Ebene:

## Grundprinzip „Kombinatorik“

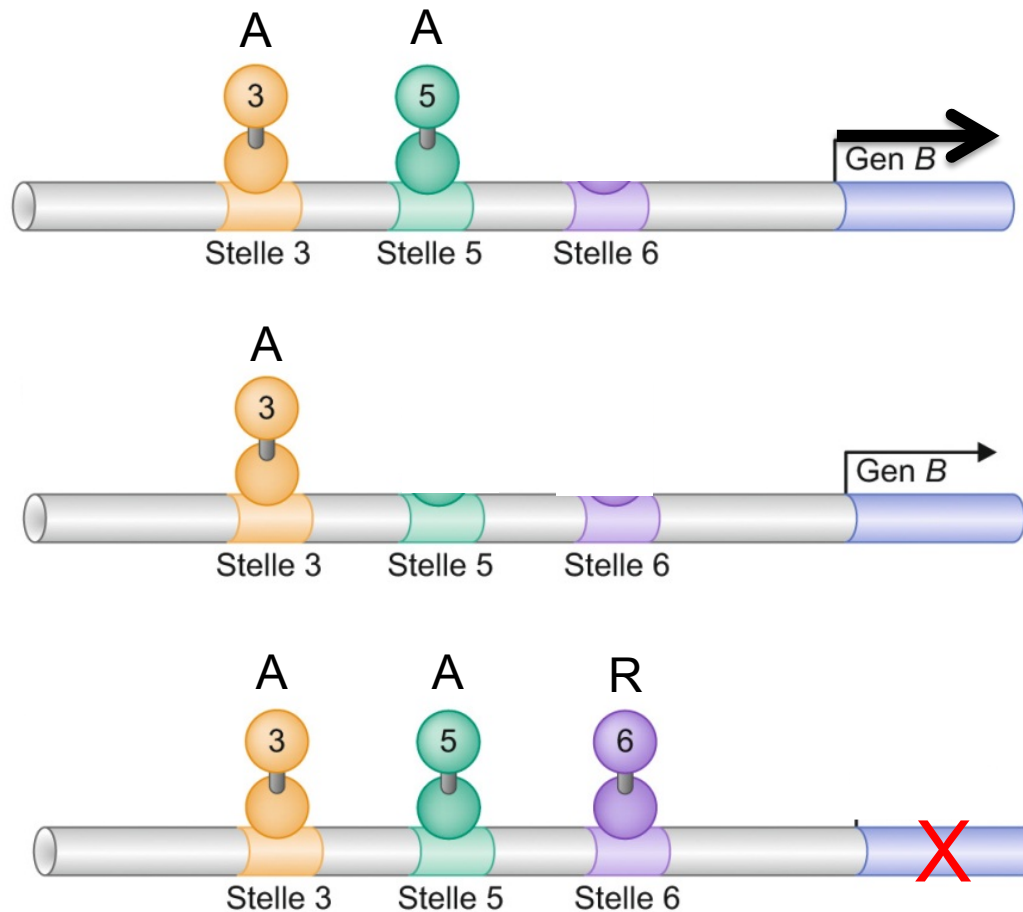


*Kombinatorische* Steuerung durch mehrere, interagierende Transkriptionsfaktoren

**> Repression oder Aktivierung**

# Genregulation auf TK-Ebene:

## Grundprinzip „Kombinatorik“



**Gen B wichtig für Zell-Teilung in Haut...**

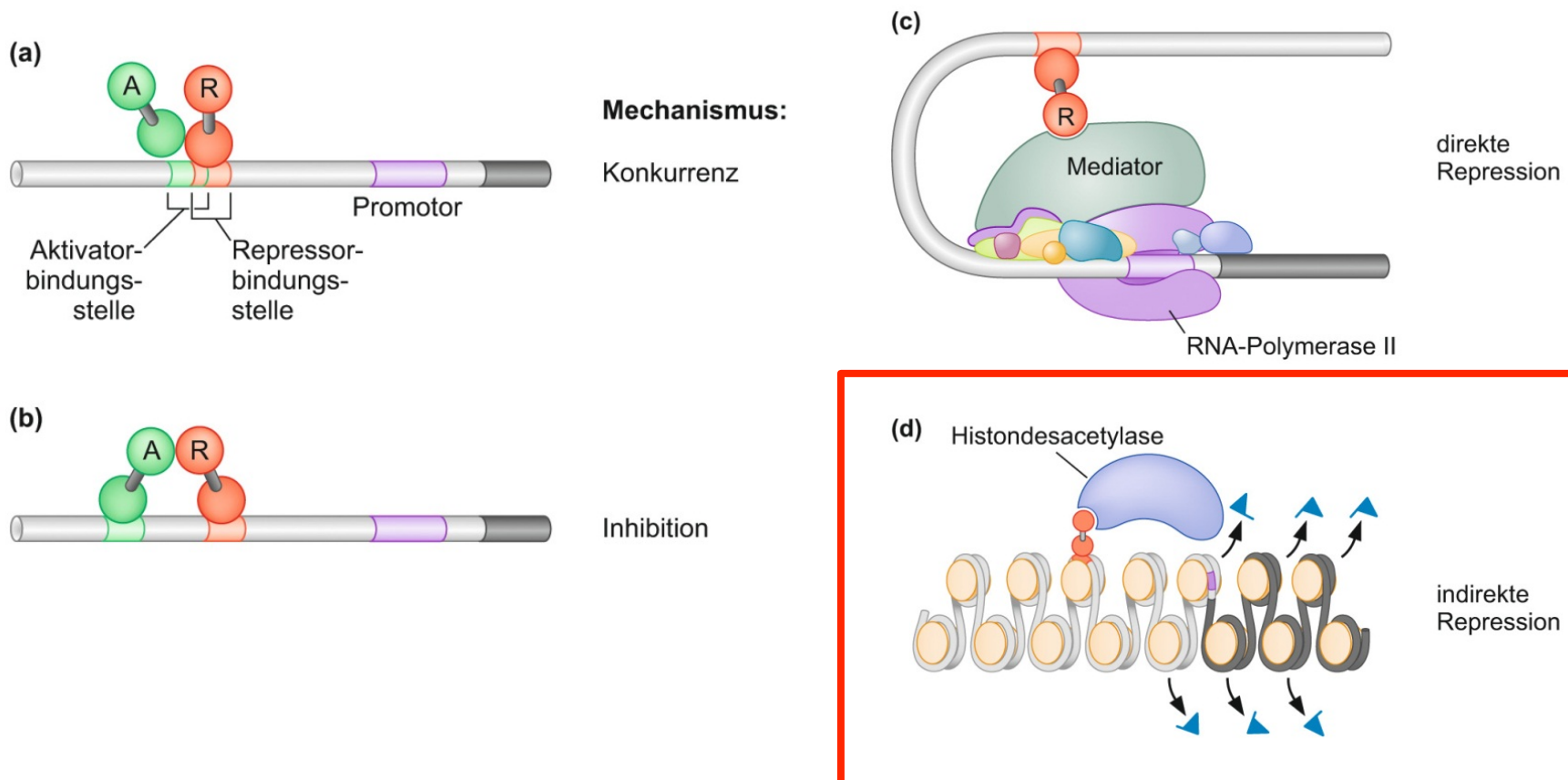
- Akt3 nur in Hautzellen
- Akt5 vermittelt Signal von Nachbarzellen und sagt „Teilen“
- Rep6 nur in Zellen mit DNA-Schaden

A = Aktivator, R = Repressor



# Genregulation auf TK-Ebene: Repression

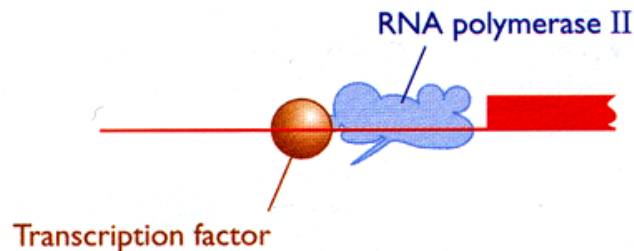
- verschiedene Mechanismen der Gen-Repression
- Bakterien-Option (Repressor-Bindung an Promotor/Operator) fehlt



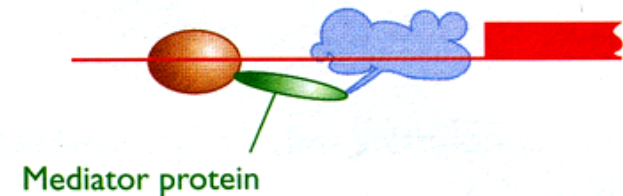
# Genregulation auf TK-Ebene: Aktivierung!

- die basale TK-Aktivität von Eukaryoten-Genen ist sehr niedrig und bedarf einer **Aktivierung** durch **Transkriptionsfaktoren**.

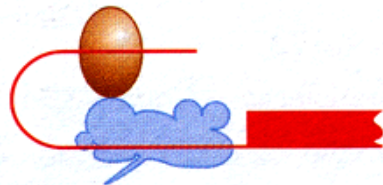
(A) Direct contact with the RNA polymerase preinitiation complex



(B) Contact via a mediator protein



(C) Contact via DNA bending



Transkriptionsfaktoren (TF) können auf mechanistisch unterschiedlichen Wegen die TK stimulieren...

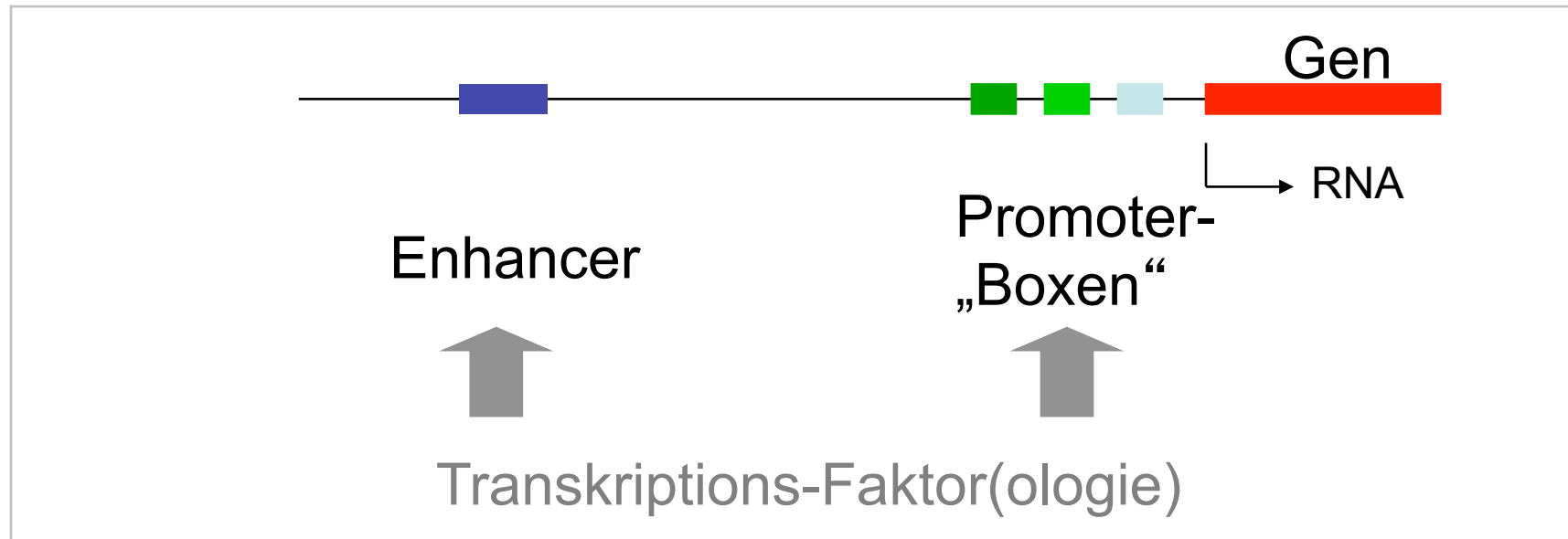


# Für den Mechanismus von Aktivatoren und Repressoren gilt...

Transkriptionsfaktoren können direkt an **DNA** binden, oder aber **Protein-Protein**-Wechselwirkungen eingehen.

TK-Faktoren wirken entweder schon auf Ebene des **Chromatins** oder aber auf **DNA-Ebene** bei der Initiation der Transkription.

# Wo binden Transkriptionsfaktoren?



- „konstitutive“, basale TF
  - nicht-reguliert
  - binden in variabler Kombination an ‚Boxen‘ in vielen Promotern
  - erhöhen TK als Aktivatoren
- Zell/Gewebe-spezifische TF
  - induzierbar
  - binden an Enhancersequenzen



# TF und ihre Bindestellen



	DNA-binding site		
Factor	Name	Consensus sequence	Comments
<b>'Constitutive' transcription factors</b>			
CTF/NFI	CAAT box	5'-GCCAATCT-3'	Ubiquitous
CP family	CAAT box	5'-GCCAATCT-3'	Ubiquitous
C/EBP	CAAT box	5'-GCCAATCT-3'	Ubiquitous
	Enhancer core	5'-TGTGGWWWG-3'	
Sp1	GC box	5'-GGGCGG-3'	Ubiquitous
Oct-1	Octamer	5'-ATGCAAAT-3'	Ubiquitous
Oct-2	Octamer	5'-ATGCAAAT-3'	Found in B lymphocytes
<b>Response factors</b>			
Heat shock factor	HSE	5'-CNNGAANNTCCNNG-3'	Responds to heat shock
Serum response factor	SRE	5'-CCATATTAGG-3'	Responds to growth factors in serum
STAT 1	IGRE	5'-TTNCNNNAA-3'	See Section 11.1.2
<b>Cell-specific factors</b>			
GATA-1	—	5'-GATA-3'	Erythroid cell-specific
Pit-1	—	5'-ATATTCAT-3'	Pituitary-specific
MyoD1	E-box	5'-CANNG-3'	Myoblast-specific
NF-κB	κB site	5'GGGACTTTCC-3'	Lymphoid cell-specific
<b>Developmental regulators</b>			
Bicoid	—	5'-TCCTAATCCC-3'	See Section 11.3.3
Antennapedia	—	5'-TAATAATAATAATAA-3'	See Section 11.3.3
Fushi tarazu	—	5'-TCAATTAAATGA-3'	See Section 11.3.3

Based on Twyman RM (1998).

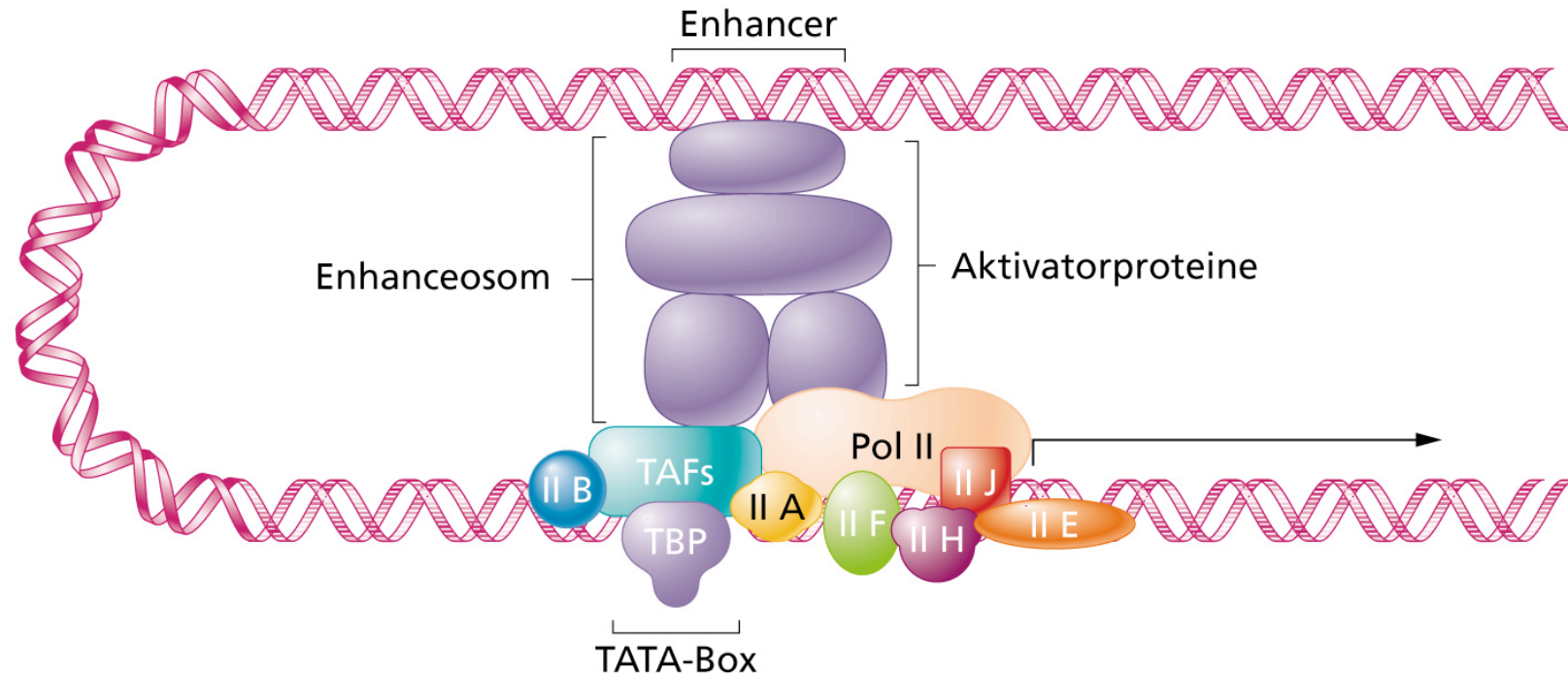
Transcription factors: C/EBP, CAAT/enhancer binding protein; CP, CAAT-binding protein; CTF/NFI, CAAT transcription factor/nuclear factor 1; STAT, signal transducer and activator of transcription. DNA-binding sites: HSE, heat shock element; SRE, serum response element; IGRE, interferon-γ response element. Nucleotide sequences: N = any nucleotide; W = A or T.

# Enhancer und Silencer

- Sequenzabschnitte, die die Transkription verstärken oder reprimieren und ihre **zeitliche und räumliche Spezifität** bestimmen
- arbeiten (im Gegensatz zum Promoter !!)  
**orientierungs- und positionsunabhängig!**
- binden Aktivator- oder Repressorproteine, die wiederum mit den basalen Transkriptionsfaktoren am Promoter interagieren
- Protein-Interaktionen vermitteln oft „Loop“-Bildung der DNA



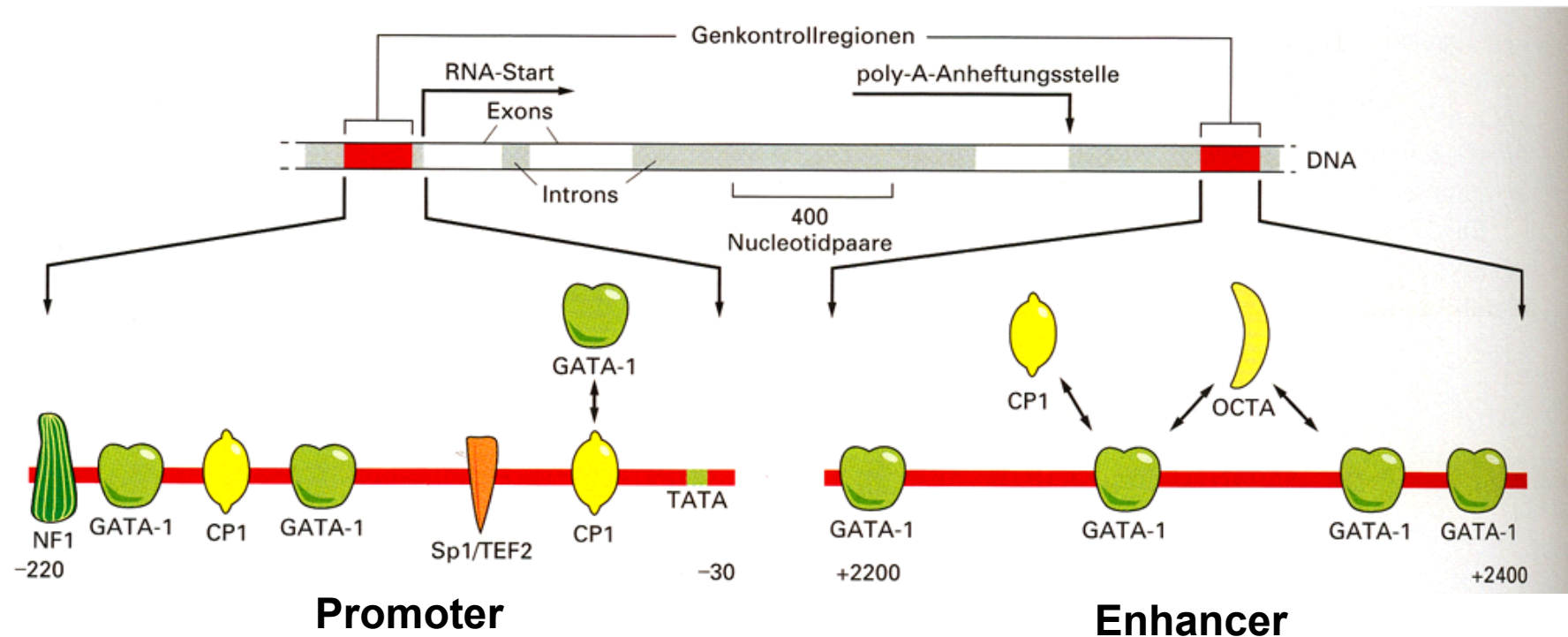
# Fernwirkung von Enhancern



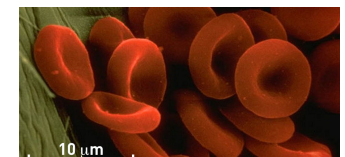
Enhancer können vor, in oder hinter dem zu regulierenden Gen sitzen.  
Ihr Abstand zum Gen kann beträchtlich sein.



## Beispiel: Kontrolle des humanen $\beta$ -Globingens



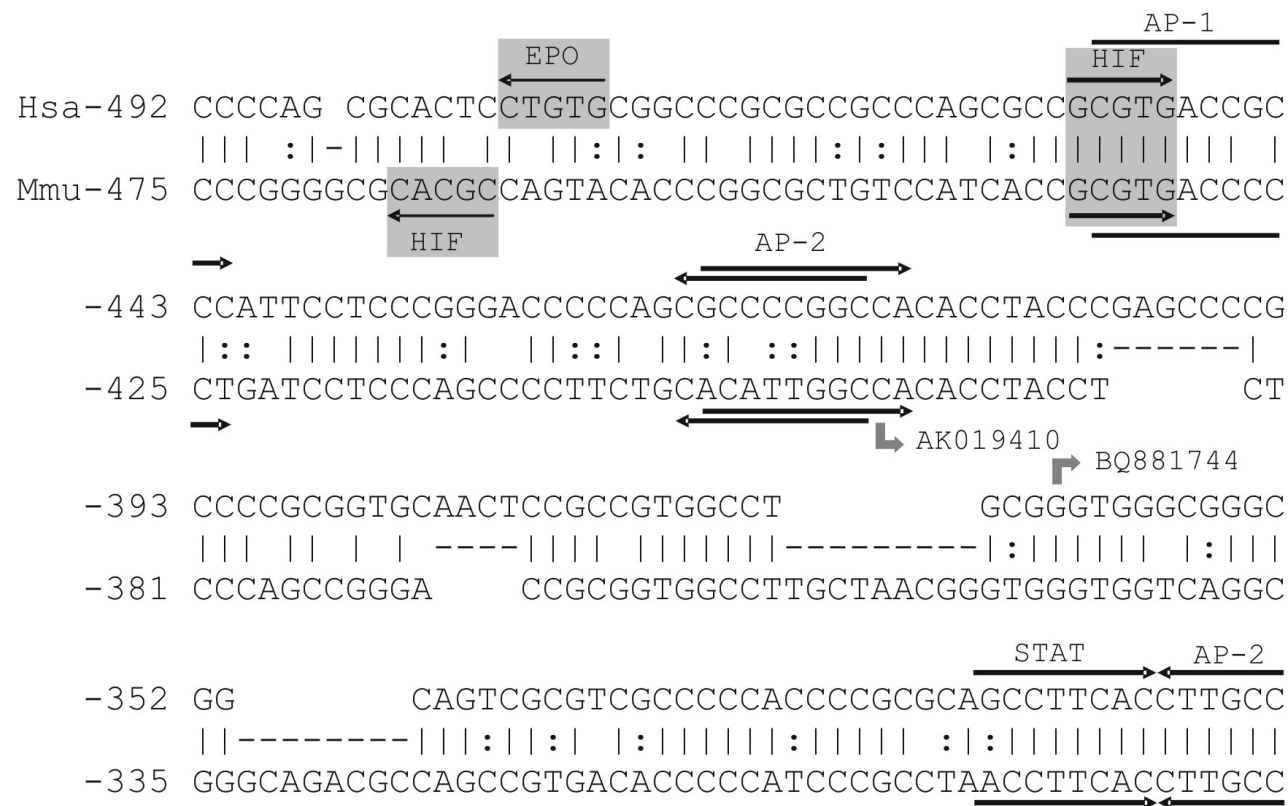
Nur in Erythrocyten-Vorläuferzellen im Knochenmark ist die richtige Kombination an TF vorhanden, um das Globingen zu aktivieren...





# Identifizierung von Enhancer-Regionen

Bioinformatische Suche nach **evolutionär konservierten** TFBS  
z.B durch einen DNA-Sequenzvergleich Maus - Mensch

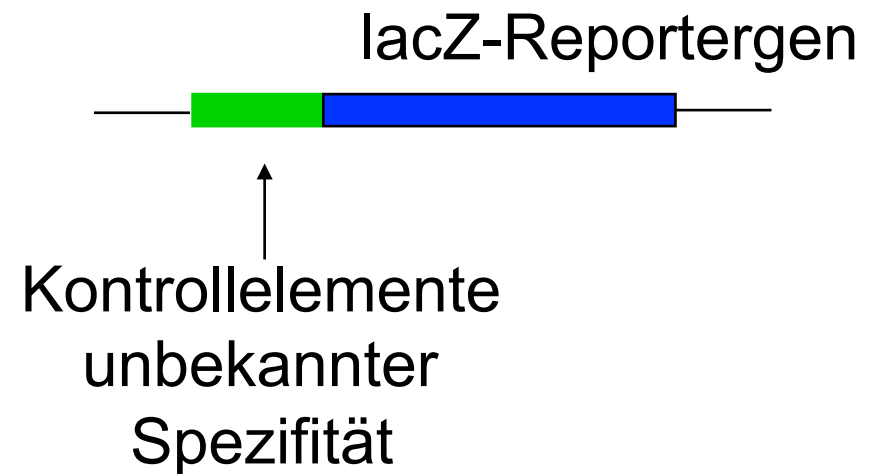




# Identifizierung von Enhancer-Regionen



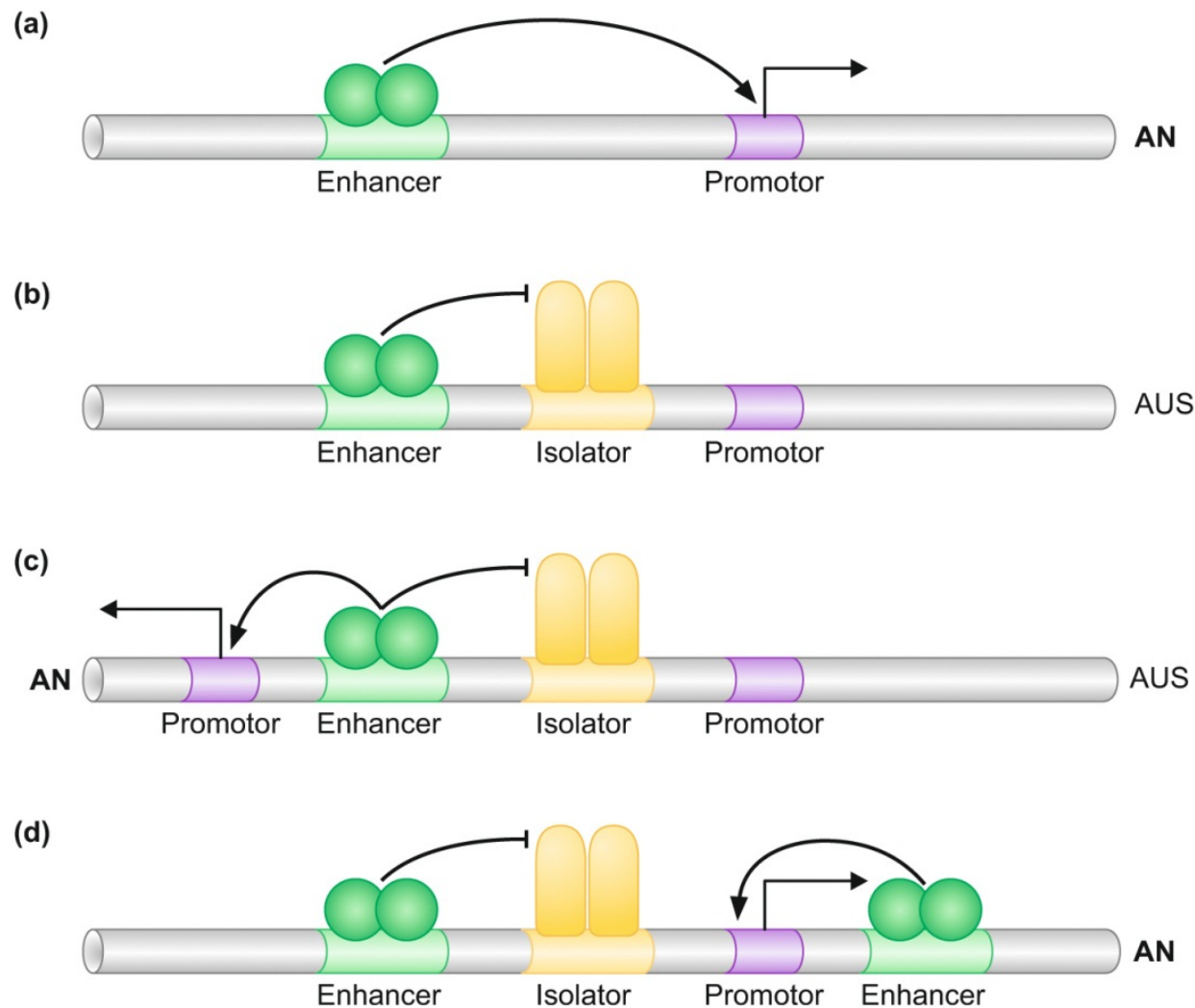
Maus-Embryo nach Anfärbung  
mit Substrat für  $\beta$ -Galaktosidase  
> Blaufärbung



„transgene“ Maus

(wir erinnern uns: „enhancer trap“  
Versuche im Kursteil AG Technau)

# Enhancer & Isolatoren



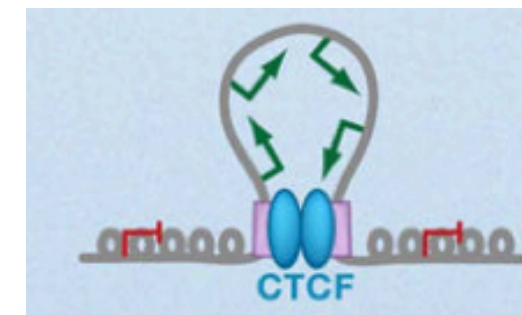
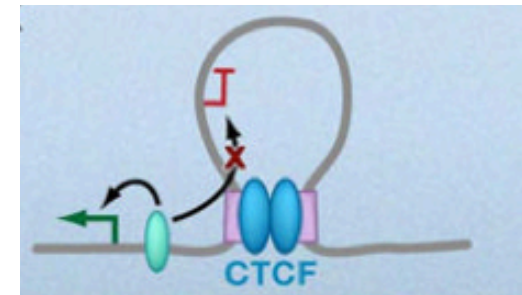
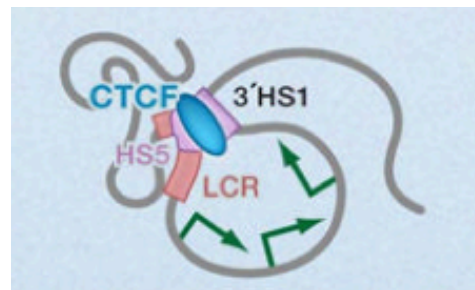
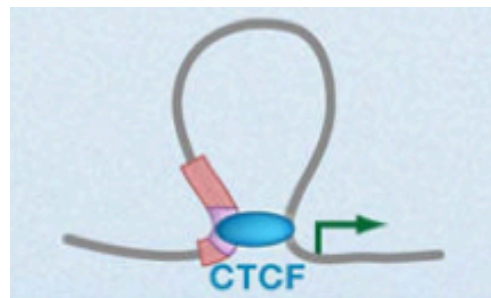
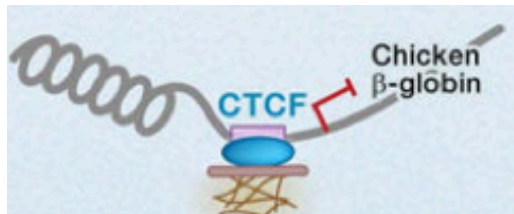
**Abbildung 17.12: Isolatoren blockieren die Aktivierung von Genen durch Enhancer.** (a) Ein Promotor, der durch Aktivatorproteine, die an einen Enhancer-Bereich gebunden sind, aktiviert wird. (b) Zwischen Promotor und Enhancer wird ein Isolator gesetzt. Wenn sich in diesem Bereich Isolatorbindungsproteine anlagern, blockiert das die Aktivierung des Promotors durch den Enhancer auch dann, wenn Aktivatorproteine an ihn gebunden sind. (c, d) Weder die Aktivatoren am Enhancer noch der Promotor werden durch den Isolatorbereich inaktiviert. Der Aktivator kann einen in der Nähe gelegenen anderen Promotor aktivieren (c). Der weiter entfernte Promotor kann durch einen anderen, stromabwärts gelegenen Enhancer aktiviert werden (d).





# CTCF: Isolator, Aktivator, Repressor...

- Zinkfinger-Protein
- ca 60 000 Bindestellen im Säuger genom
- wichtigstes Protein der Chromatinarchitektur bei Vertebraten?
- verknüpft verschiedene Ebenen der Genregulation:  
Nukleosomenmodifikationen – DNA-Methylierung - Chromosomenarchitektur



# „Anatomie“ von Transkriptionsfaktoren



**Aktivierungs-  
domäne**

**Proteininteraktions-  
domäne**

**DNA-Binde-  
domäne**



...interagiert mit anderen  
Proteinen des TK-  
Initiationskomplexes

- Glutamin- oder Prolin-reich
- „saure“ Domänen (Asp, Glu)
- werden selbst aktiviert durch  
Phosphorylierung / Dephosph.  
(an OH von Ser, Thr, Tyr).

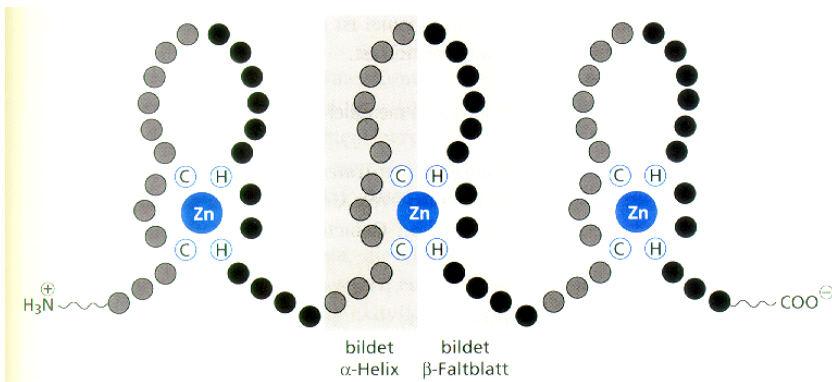
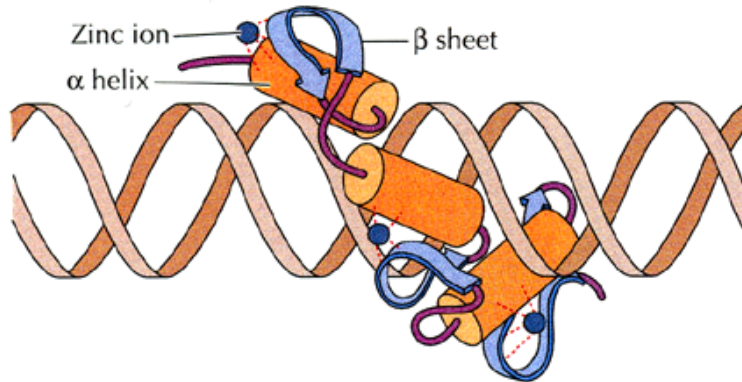


- **Zink-Finger** (z.B. Steroid-Hormonrezeptor)
- **Helix-turn-Helix (HTH)** (z.B. Homöobox-Domäne)
- **basic Helix-Loop-Helix (bHLH)**  
**HLH macht Prot-Prot-Interaktion**  
**basische Domäne für DNA-Bindung**
- **Leucin-Zipper**  
**LZ macht Prot-Prot-Interaktion**  
**basische Domäne für DNA-Bindung**

...und andere...

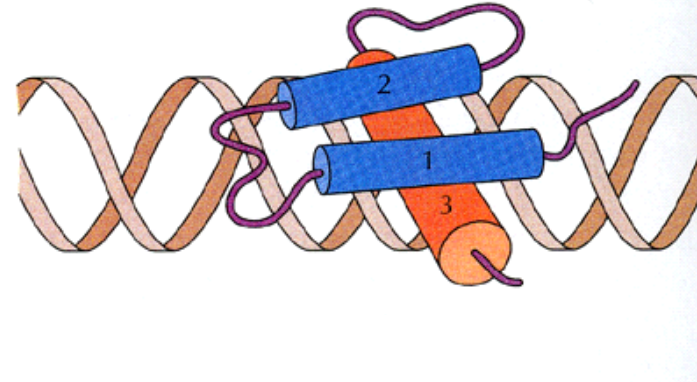
# „Anatomie“ von Transkriptionsfaktoren

## Zink-Finger:



- Finger aus  $\alpha$ -Helix/ $\beta$ -Faltblatt
- mehrere Finger möglich
- Zn-Ion zwischen Cys<sub>2</sub>/His<sub>2</sub> oder Cys<sub>2</sub>/Cys<sub>2</sub>

## Helix-turn-Helix:

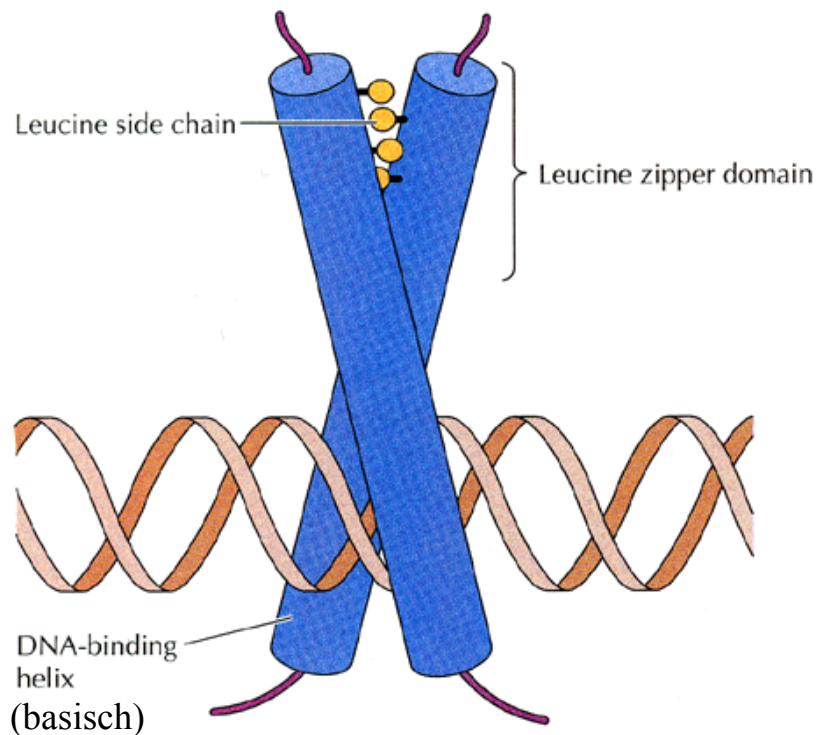


### z. B. „Homöobox“:

- in homöotischen Entwicklungsgenen bei Drosophila entdeckt
- 60 Aminosäuren mit 3  $\alpha$ -Helices, Helix 3 bindet DNA in großer Furche

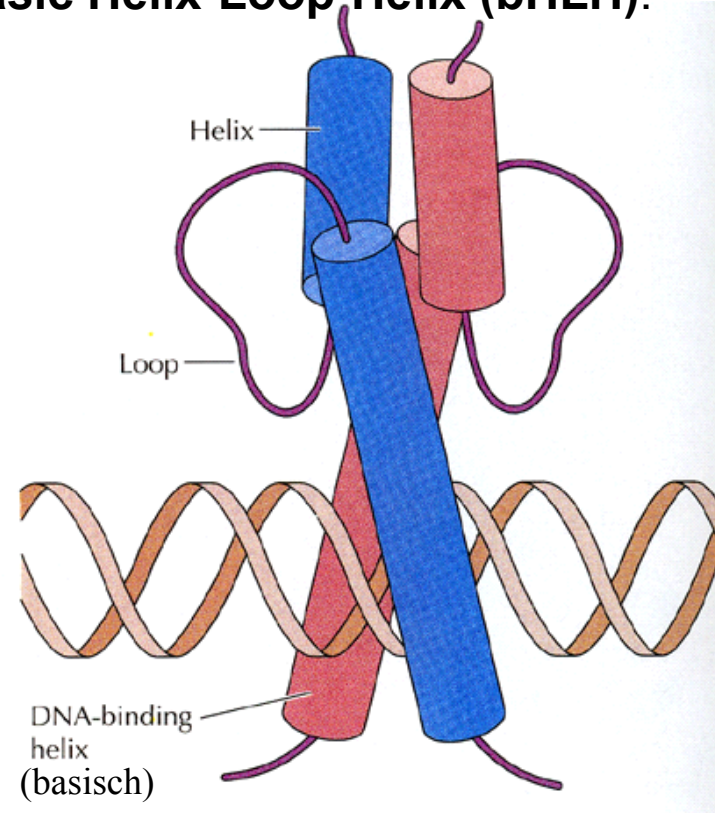
# „Anatomie“ von Transkriptionsfaktoren

## Leucine-Zipper:



- zwei antiparallele amphipatische Helices; auf der hydrophoben Seite in jeder zweiten Windung ein Leucin → Dimerisierung
- basische DNA-Bindedomäne (Lys, Arg-reich)

## basic Helix-Loop-Helix (bHLH):

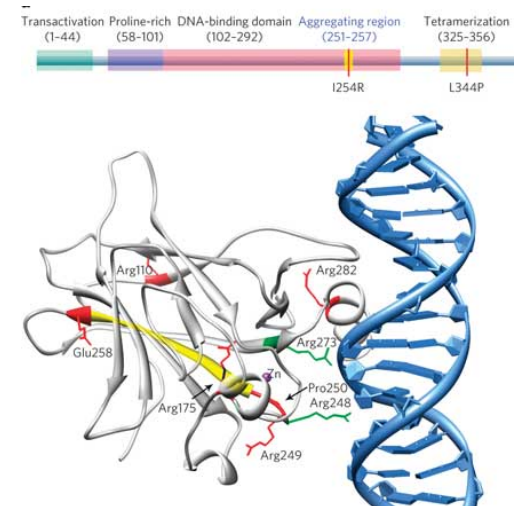


- 40-50 As langer Abschnitt aus zwei amphipatischen  $\alpha$ -Helices, getrennt durch Loop.
- Homo- oder Heterodimere durch Interaktion der hydrophoben Helixseiten
- basische DNA-Bindedomäne

# Welche wichtigen TFs kennen wir schon...?

- p53

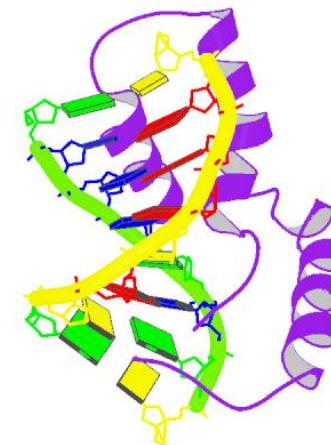
„Guardian of the Genome“,  
Tumor-Suppressor-Gen,  
überwacht Zellzyklus



Nature Chemical Biology 7, 285–295 (2011)

- SRY

männlicher Geschlechtsbestimmer



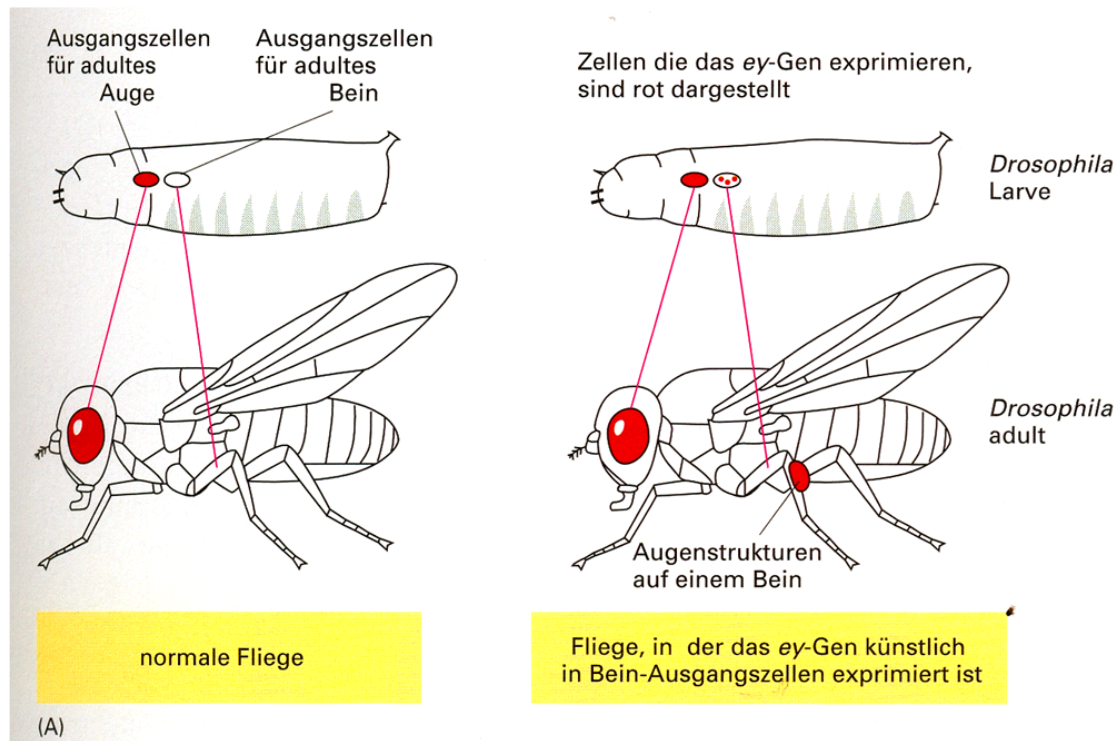
HMG-Box





# TF als *master genes* der Ontogenese

- Bsp. „*eyeless*“ :
- TK-Faktor mit Homöobox-Domäne
  - kann selbst bei ‚ektopischer‘ Expression Augen erzeugen (die allerdings nicht funktionieren)

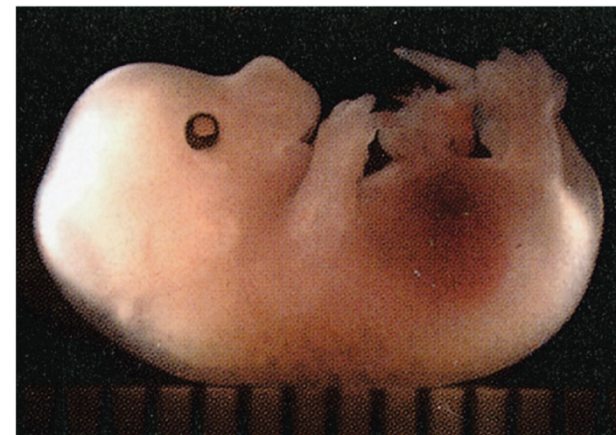
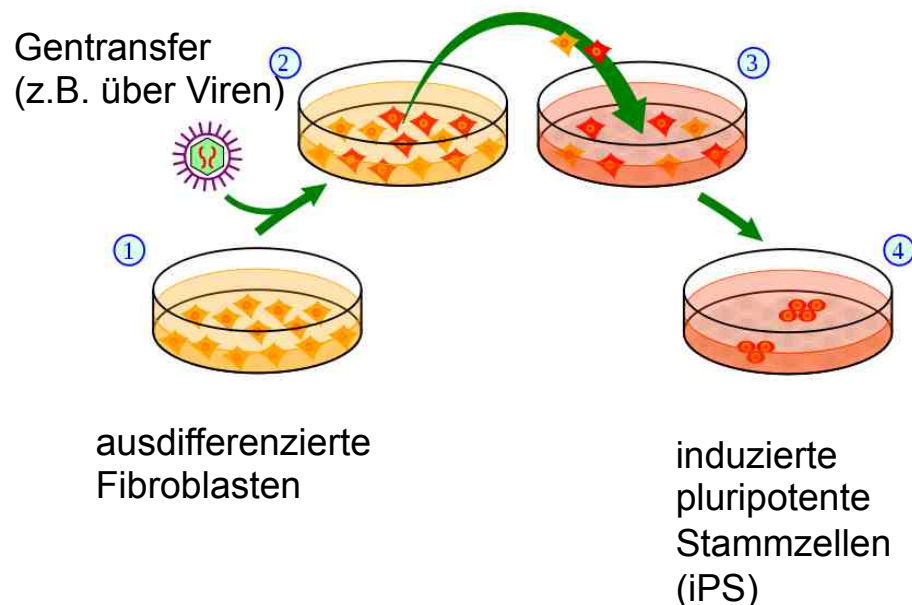


(B)



# TF als *master genes* der Ontogenese

Bsp. Stammzellen: nur **vier aktive TFs** reichen, um eigentlich ausdifferenzierte Fibroblasten erneut *pluripotent* zu machen und einen kompletten Embryo zu regenerieren!!!



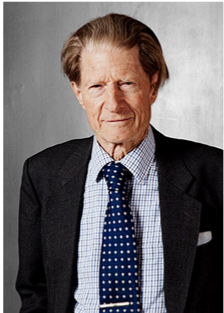
**Abbildung 1:** Spätes Embryonalstadium einer Maus, die sich vollständig aus Fibroblasten durch Expression von vier embryonalen Transkriptionsfaktoren (Oct4, Soc2, c-Myc und Klf4) entwickelt hat.



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012  
Sir John B. Gurdon, Shinya Yamanaka

Share this:

## Sir John B. Gurdon - Facts



**Sir John B. Gurdon**  
Born: 2 October 1933, Dippenhall, United Kingdom  
Affiliation at the time of the award: Gurdon Institute, Cambridge, United Kingdom  
Prize motivation: "for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent"  
Field: genetics  
Prize share: 1/2



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012  
Sir John B. Gurdon, Shinya Yamanaka

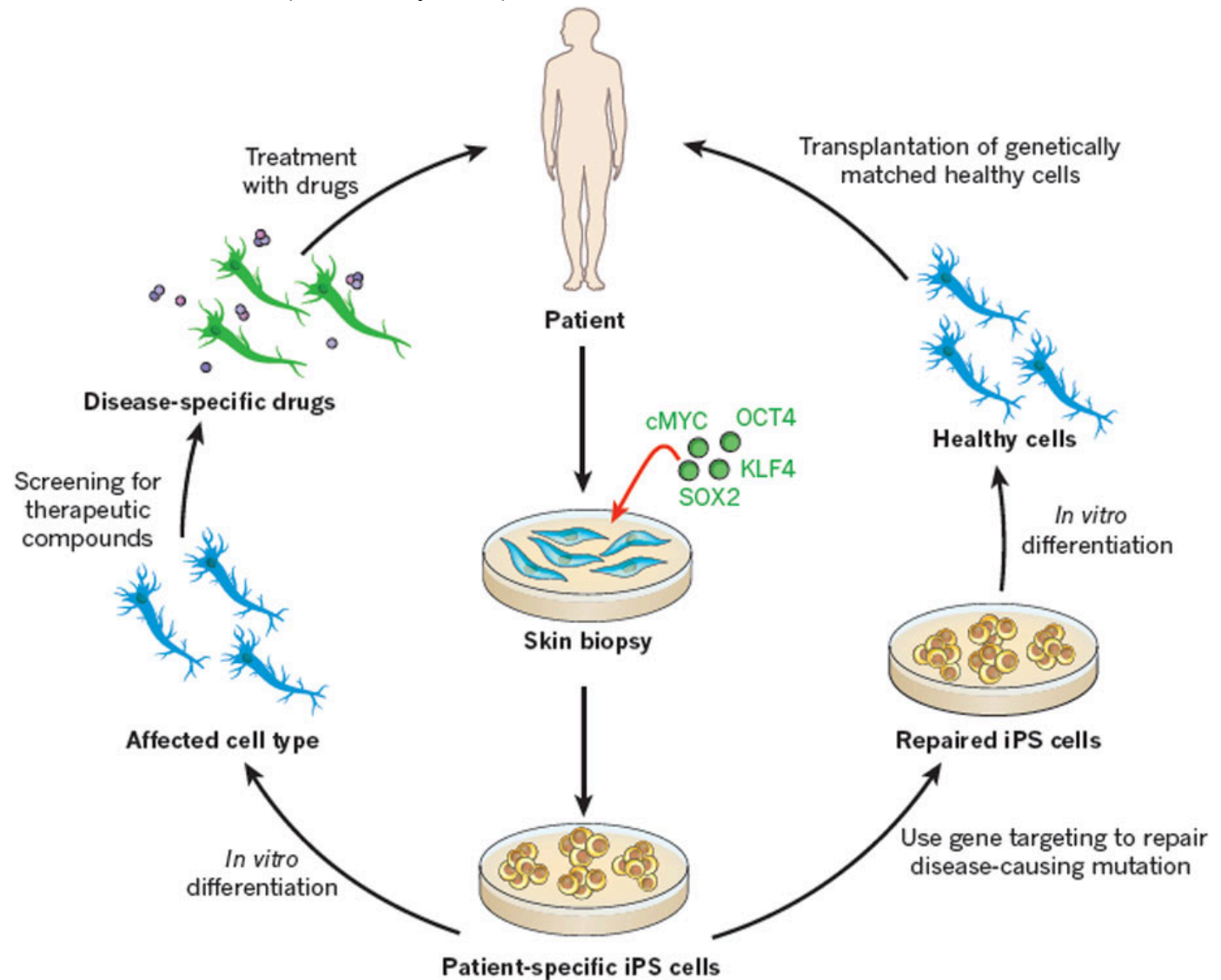
Share this:

## Shinya Yamanaka - Facts



**Shinya Yamanaka**  
Born: 4 September 1962, Osaka, Japan  
Affiliation at the time of the award: Kyoto University, Kyoto, Japan, Gladstone Institutes, San Francisco, CA, USA  
Prize motivation: "for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent"  
Field: genetics  
Prize share: 1/2

Photo: U. Montan



Reprogramming technology and iPS cells have the potential to be used to model and treat human disease. In this example, the patient has a neurodegenerative disorder. Patient-specific iPS cells — in this case derived by ectopic co-expression of transcription factors in cells isolated from a skin biopsy — can be used in one of two pathways. In cases in which the disease-causing mutation is known (for example, familial Parkinson's disease), gene targeting could be used to repair the DNA sequence (right). The gene-corrected patient-specific iPS cells would then undergo directed differentiation into the affected neuronal subtype (for example, midbrain dopaminergic neurons) and be transplanted into the patient's brain (to engraft the nigrostriatal axis). Alternatively, directed differentiation of the patient-specific iPS cells into the affected neuronal subtype (left) will allow the patient's disease to be modelled *in vitro*, and potential drugs can be screened, aiding in the discovery of novel therapeutic compounds.





# TF & Molekulare Medizin



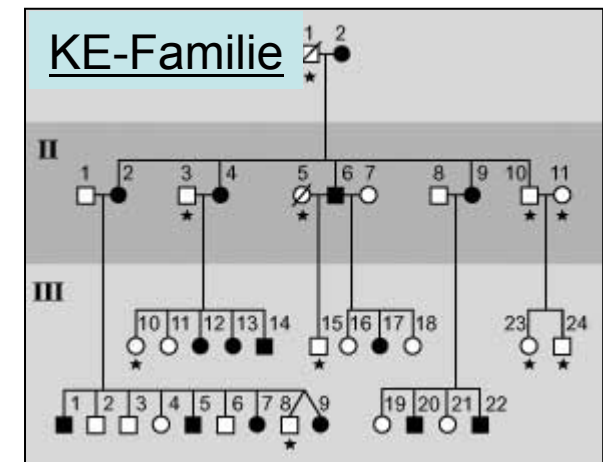
- Wachstumshormon-Defizienz (Hypophyse)
- 1/5000 – 1/10000 Geburten
- Maus-Modelle zeigen: Mutationen in TF **Pit-1** verantwortlich
- Pit-1 enthält Homöodomäne
- Effiziente Therapie: Injektion von Humanem Wachstumshormon (aus Gehirn!)
- Schon seit 1979: „rekombinantes“ HGH



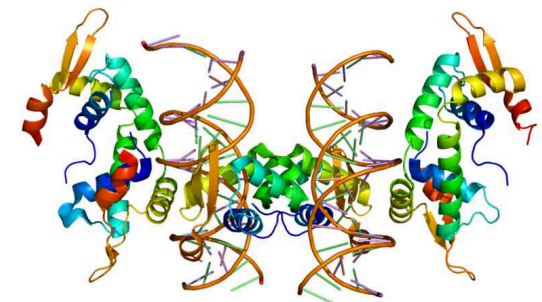
# TF & Molekulare Medizin

## VERBALE ENTWICKLUNGSDYSPRAXIE

- autosomal dominante, seltene Erkrankung
  - fehlende Grammatik
  - fehlendes Satz-Verständnis
  - unverständliche Sprache
  - mangelnde Gesichts-Feinmotorik
  - z. T. verminderter non-verbaler IQ
- 
- Größenreduktion des Nukleus caudatus



➔ **Mutation: G>A (Arg > His) in Exon 14 von **FoxP2** (TF mit forkhead-Domäne)**

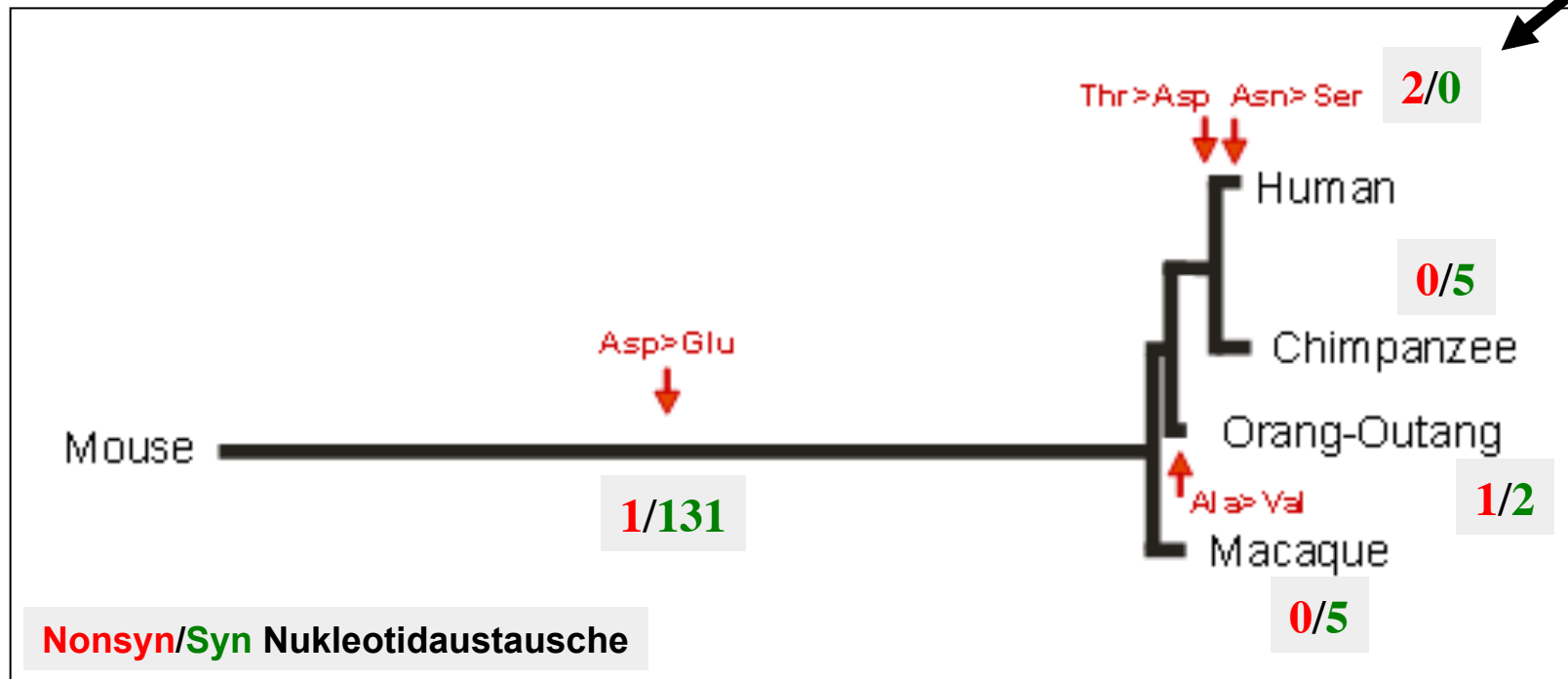




# TF & Evolution



FoxP2 ist sehr stark zwischen Spezies konserviert, aber...



- 2 Aminosäure-Austausche in der Mensch-Linie, aber nur ein As-Unterschied zwischen Mensch und Maus

> ist FoxP2 das „GEN für SPRACHE“??





# Genregulation in Eukaryoten

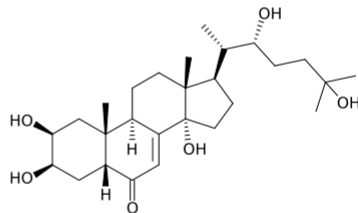
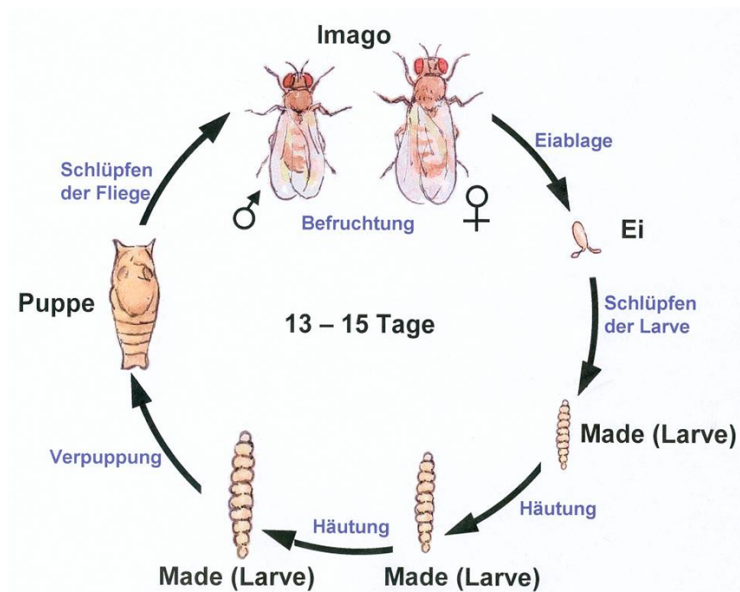
- viele **Regulationsebenen** > mehr Möglichkeiten
- zentraler Schalter: Aktivierung der **Transkription**
- **Kombinatorik** von Aktivatoren und Repressoren
- **Transkriptionsfaktoren** als Schlüsselmechanismus

Genregulation muss innerhalb von Geweben und zwischen Geweben abgestimmt sein!

Genregulation muss auf Signale von außen reagieren!

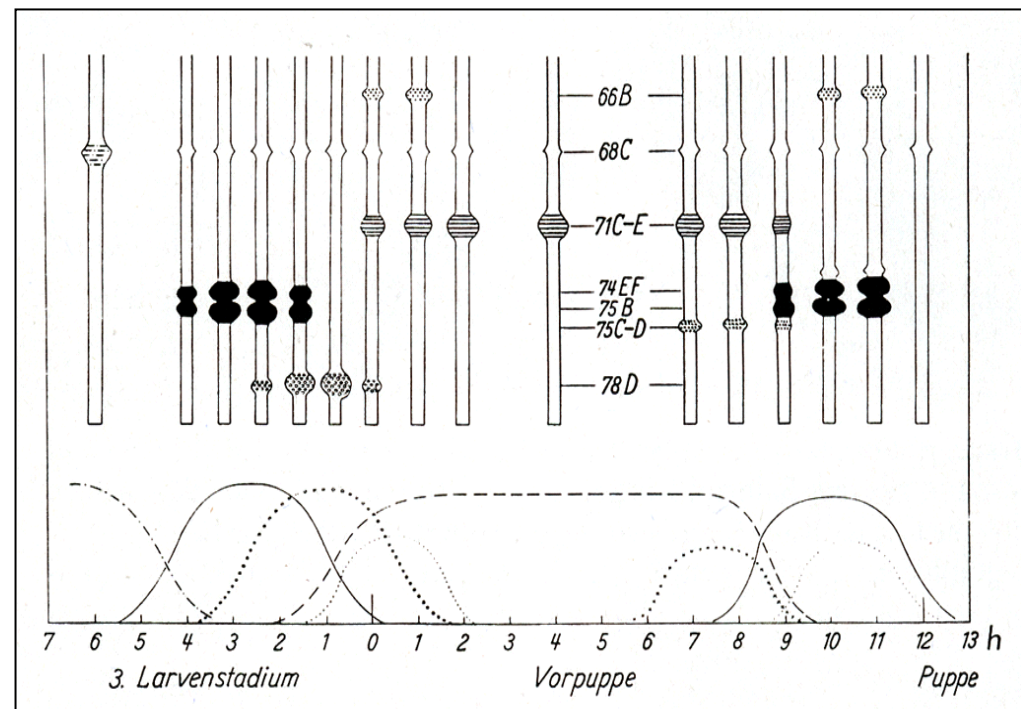
**Wie erfolgt Signalweiterleitung und Koordination?**

# Koordinierte Regulation der Genaktivität durch Hormone



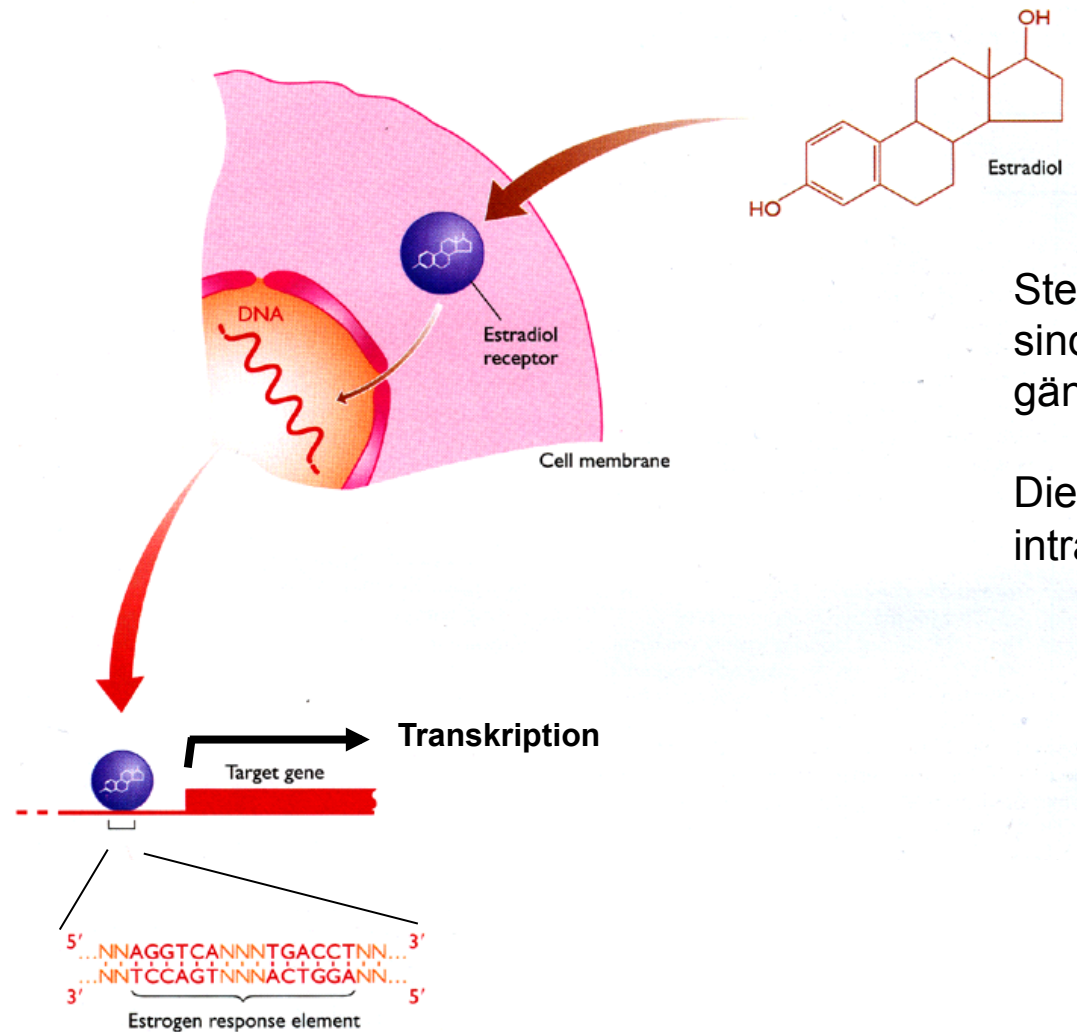
Ecdyson

Hormone steuern Puffmuster (=Genaktivierung) bei Polytänchromosomen



Kaskadenwirkung!

# Hormonelle Regulation der Genaktivität



Steroid-Hormone  
sind membran-  
gängig!

Die Rezeptoren sind  
intrazellulär.



# Der Steroidhormon-Rezeptor ist ein Transkriptionsfaktor

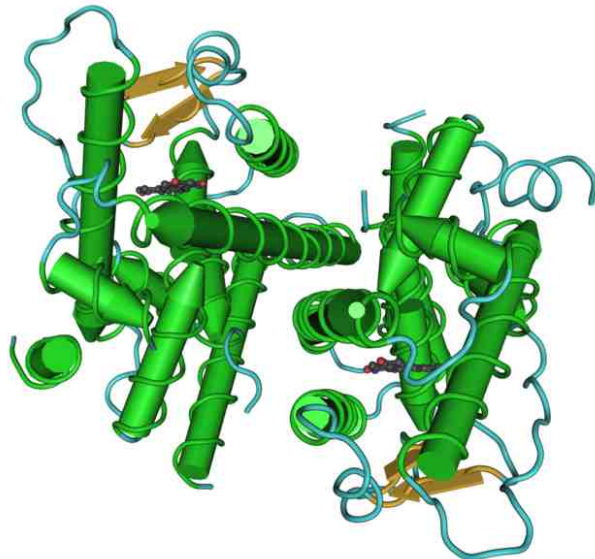


Aktivierungs-  
domäne

DNA-  
Bindung

Hormon-  
Bindedomäne

Zink-Finger (Cys2-Cys2)



Steroidhormon-Rezeptoren  
agieren als Protein-Dimere

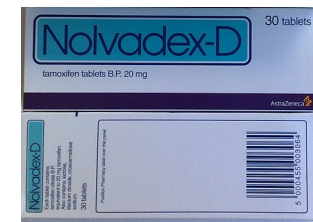
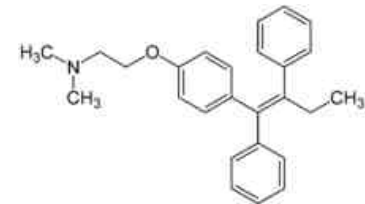


# TF als Zielstrukturen für Medikamente

- 10% aller *drug targets* sind Transkriptionsfaktoren

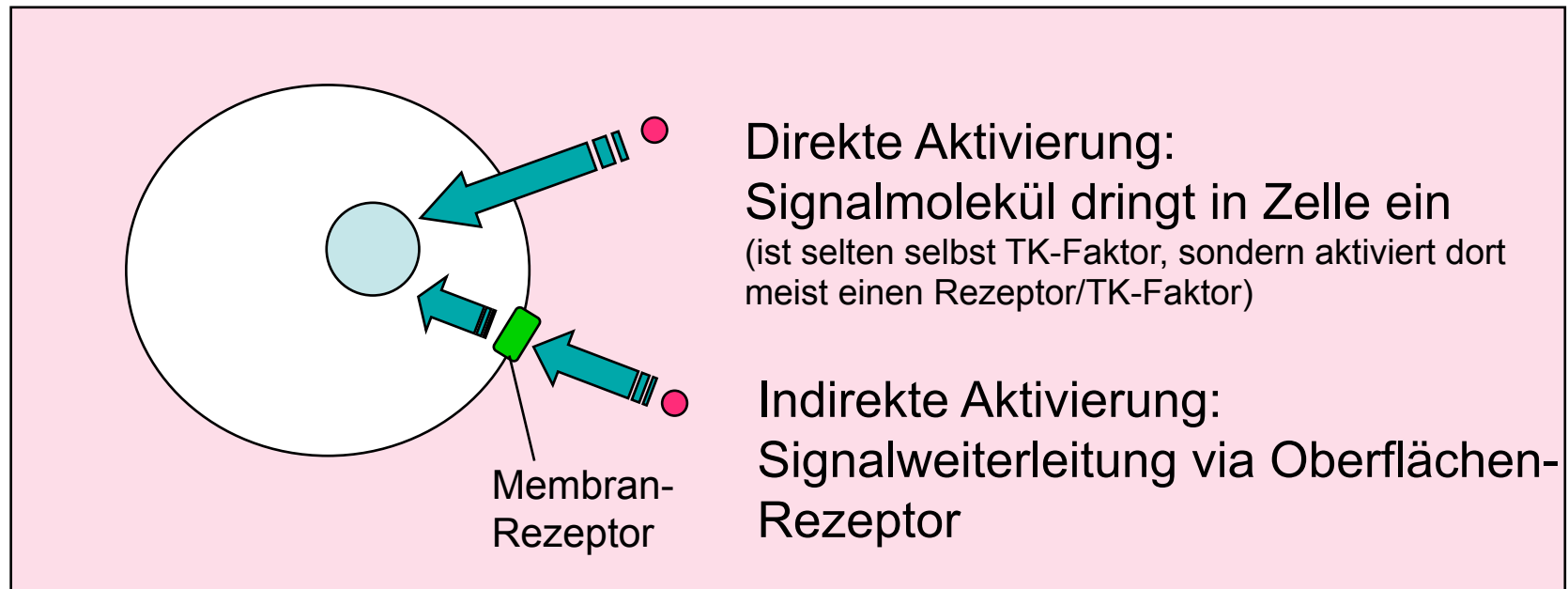
- Bsp. **Tamoxifen**

- > Antagonist des Östrogen-Rezeptors (ER)
- > bindet also an ER, blockiert diesen und verhindert so ER-abhängige Transkription
- > 70% aller Brust-Tumore exprimieren ER und brauchen ER-aktivierte Genregulation
- > Tamoxifen ist also Medikament gegen ER-abhängige Brusttumore
- > Jahresumsatz USA 1 Milliarde \$

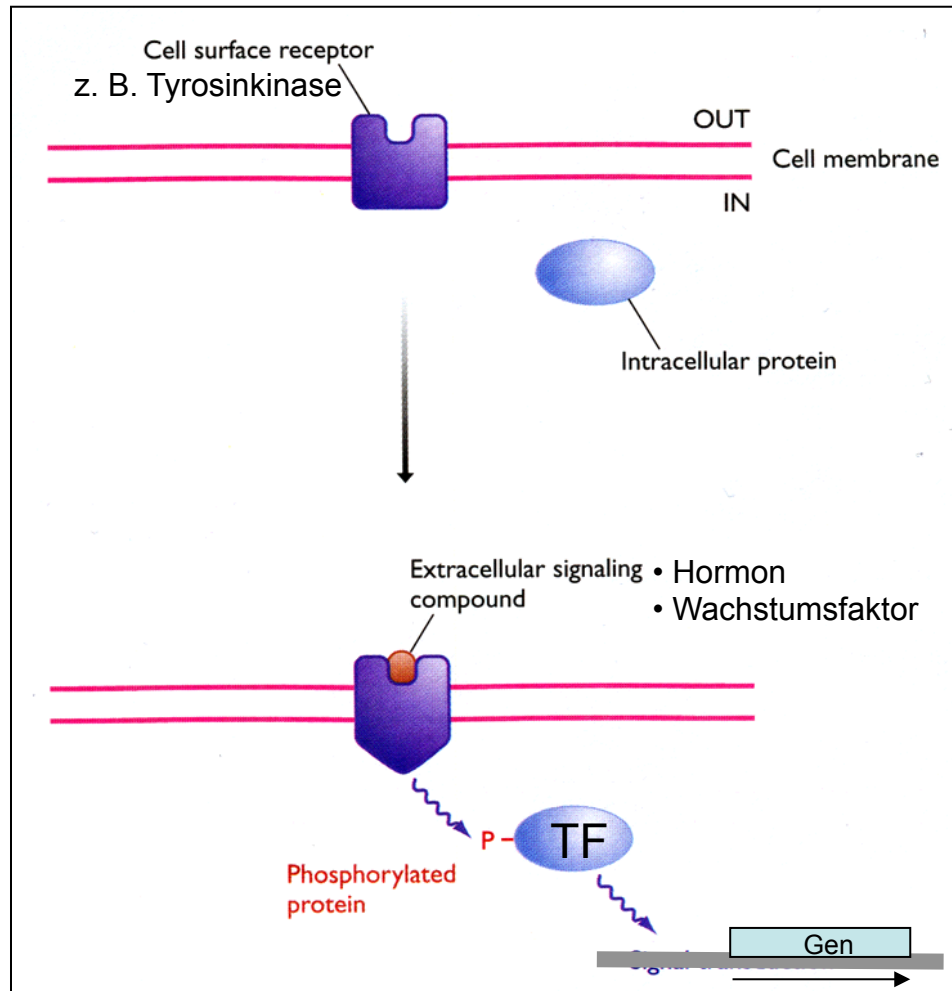


# Koordination der Genregulation in Eukaryoten

...durch externe Stimuli, Hormone oder Wachstumsfaktoren



# Signaltransduktion mittels Rezeptoren auf der Zelloberfläche



**Achtung:**

**Phosphorylierung** von Zielproteinen ist oft der „Schalter“!

Nicht immer ist der Weg vom Rezeptor zum Zielgen so direkt!  
Oft wird Signal über mehrere weitere beteiligte Signalmoleküle weitergegeben...

# Beispiel: der JAK-STAT Signalweg

- nur in vielzelligen Tieren, nicht in Pilzen oder Pflanzen
- reagiert z. B. auf
  - Interferone > Immunabwehr
  - Interleukine > Immunabwehr
  - Erythropoietin (EPO) > Blutbildung
  - Prolaktin > Laktation
  - Wachstumshormone > Entwicklung
  - u.a.

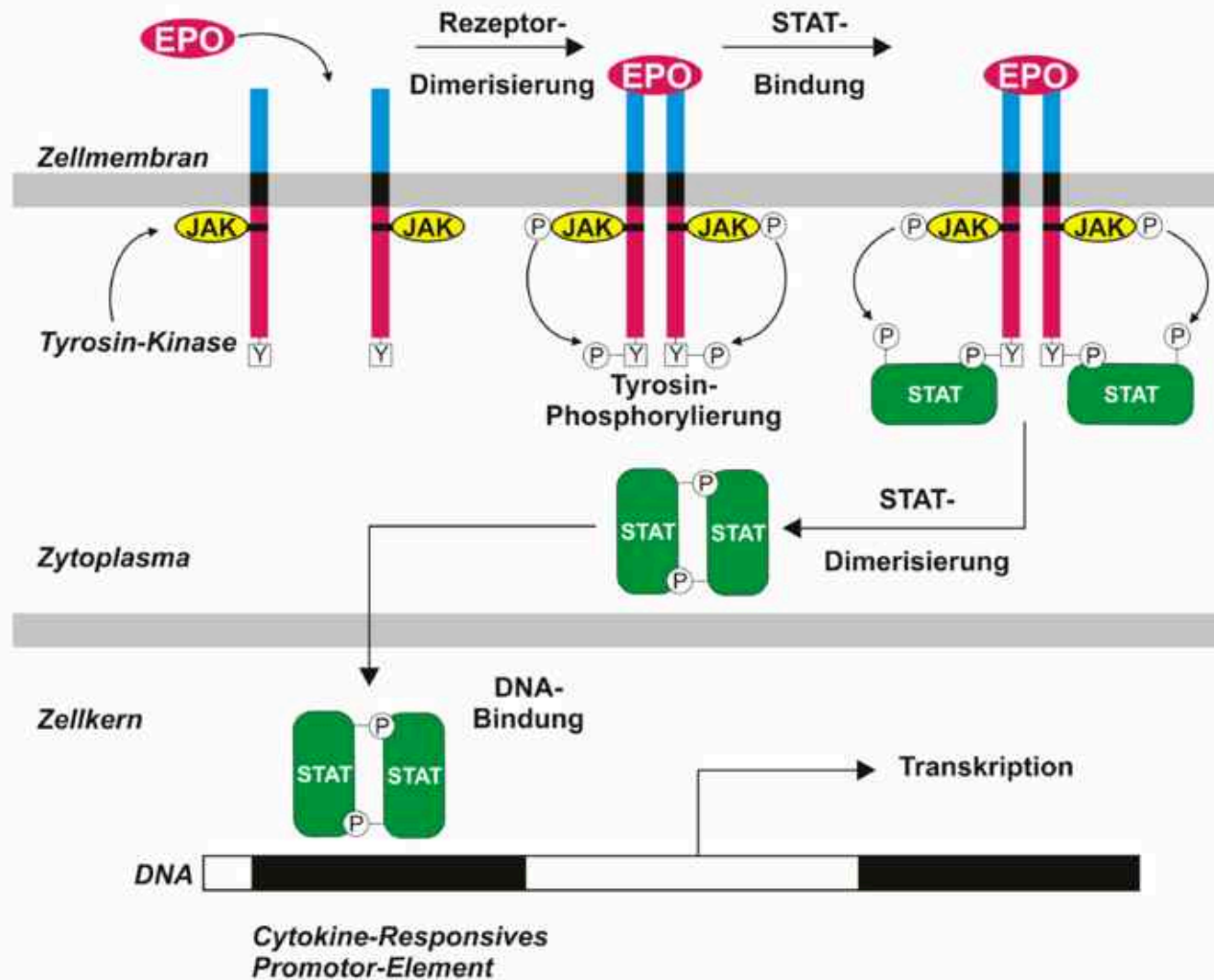
- drei Komponenten:



Membranrezeptor  
Janus-Kinase (JAK)  
STAT-Proteine (Signal transducers and Activators of Transcription)



# JAK-STAT Signalweg

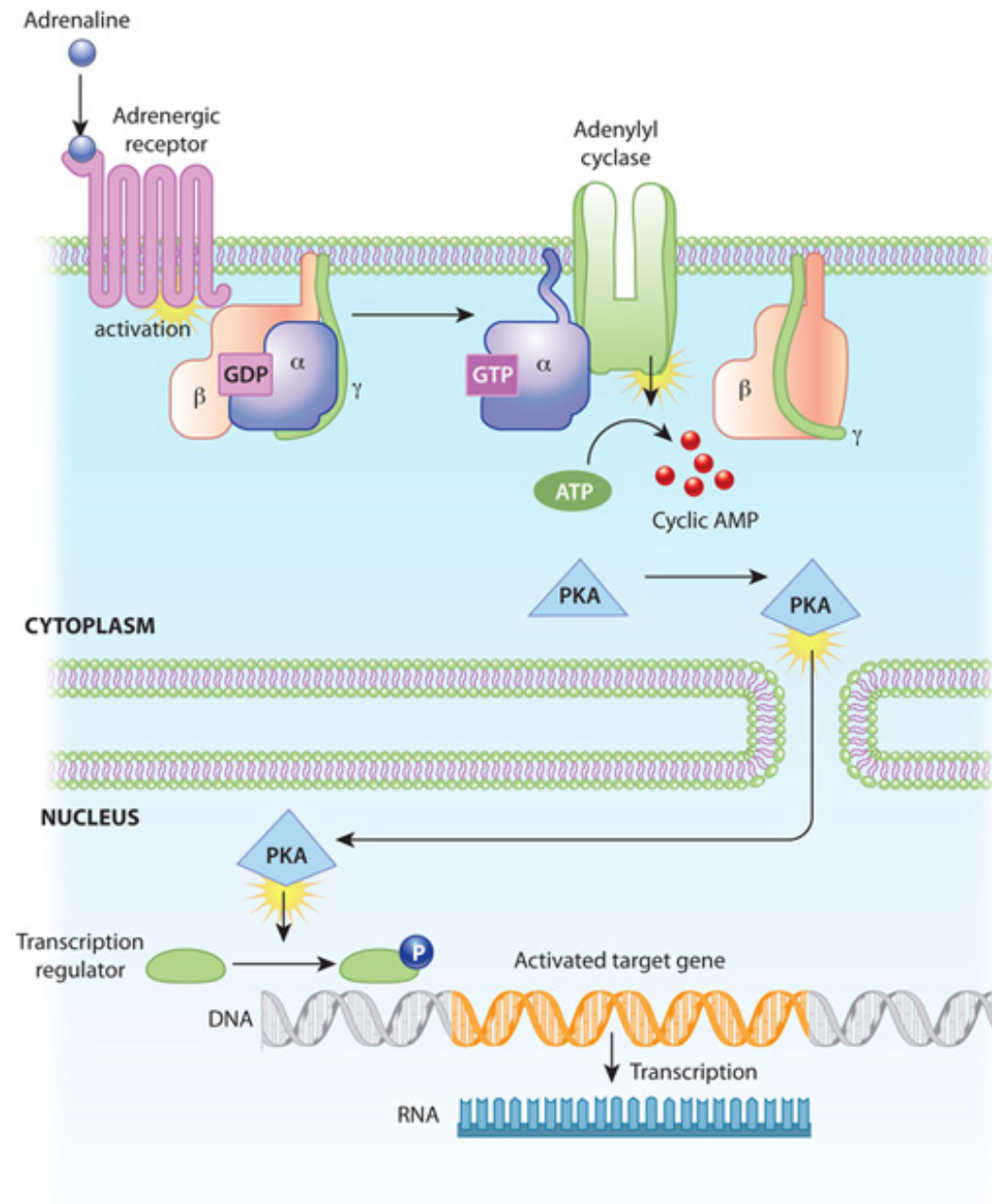


SH2-Domänen erkennen phosphorylierte Tyr (>Spezifität)

...unterschiedlich für verschiedene STATs

...direkter Weg in den Kern ohne sog. „second messenger“!

# Adrenalin?



„**Second messenger**“ (hier: cAMP) sind kleine Nicht-Protein-Moleküle, die Signale weiterleiten

The binding of adrenaline to an adrenergic receptor initiates a **cascade of reactions** inside the cell. The signal transduction cascade begins when adenylyl cyclase, a membrane-bound enzyme, is activated by G-protein molecules associated with the adrenergic receptor. Adenylyl cyclase creates multiple cyclic AMP molecules, which fan out and activate protein kinases (PKA, in this example). Protein kinases can enter the nucleus and affect transcription.  
© 2010 Nature Education All rights reserved.

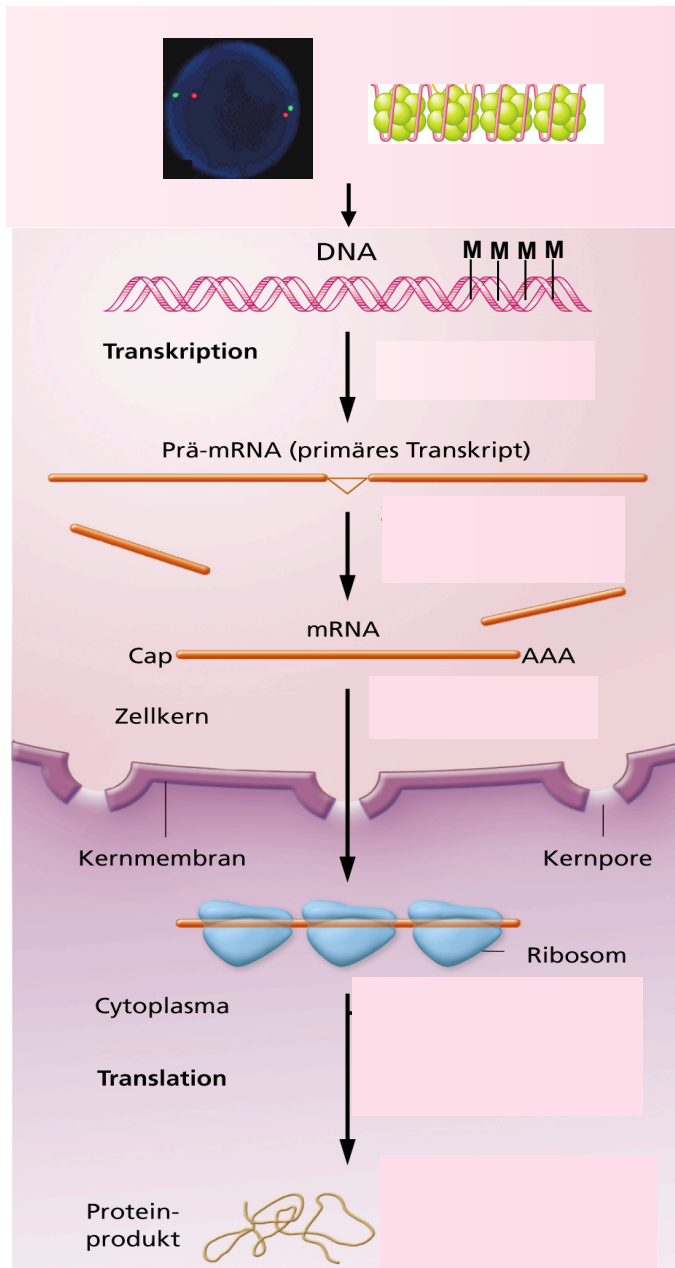
# Signaltransduktion

- Koordination: Zellteilung, Wachstum, Differenzierung, Zelltod
- Sensorische und neuronale Prozesse
- Pathogen-Abwehr
- hohe Spezifität!  
(z. B über räumliche und zeitliche Verteilung u. Transport von Rezeptoren und Transduktor-Molekülen in der Zelle)
- sehr schnelle ( $< 1$  sec) oder langsame ( $>>1$  Std) Prozesse
- Protein-Phosphorylierung als Schalter; second messenger-Moleküle zur Signalweiterleitung

**> Zentrale Bedeutung für vielzellige Organismen!**



# Ebenen der Genregulation in Eukaryoten



Kern-Lokalisation

& Chromatin • Histon-Modifikationen



DNA-Methylierung



Transkription • cis-Kontrollelemente  
• Transkriptionsfaktoren



RNA-Prozessierung • Spleißen  
• Capping, Polyadenylierung  
• RNA Editing



RNA-Transport

RNA-Stabilität & **Abbau**

Post-transkriptionell

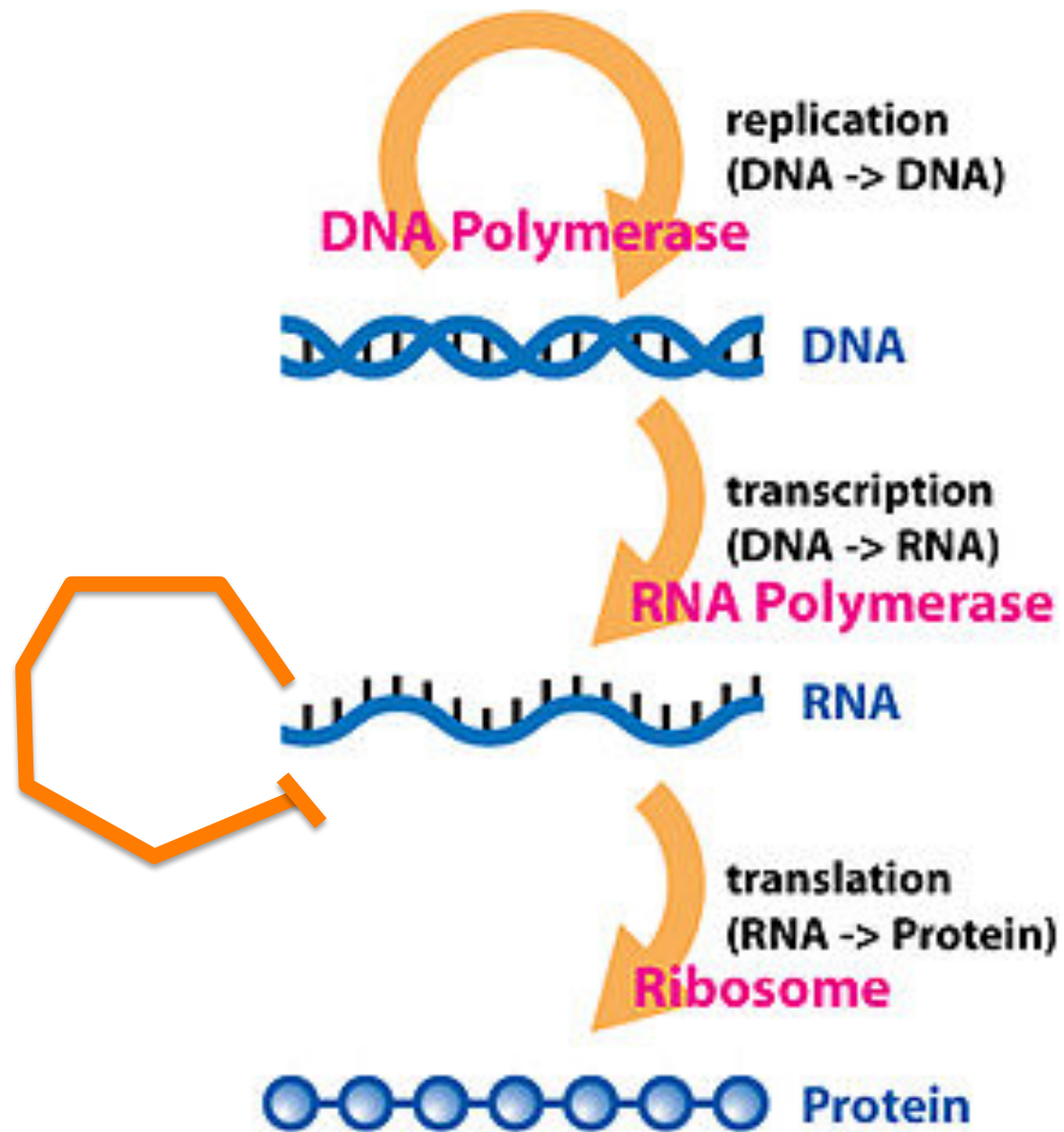


Translation

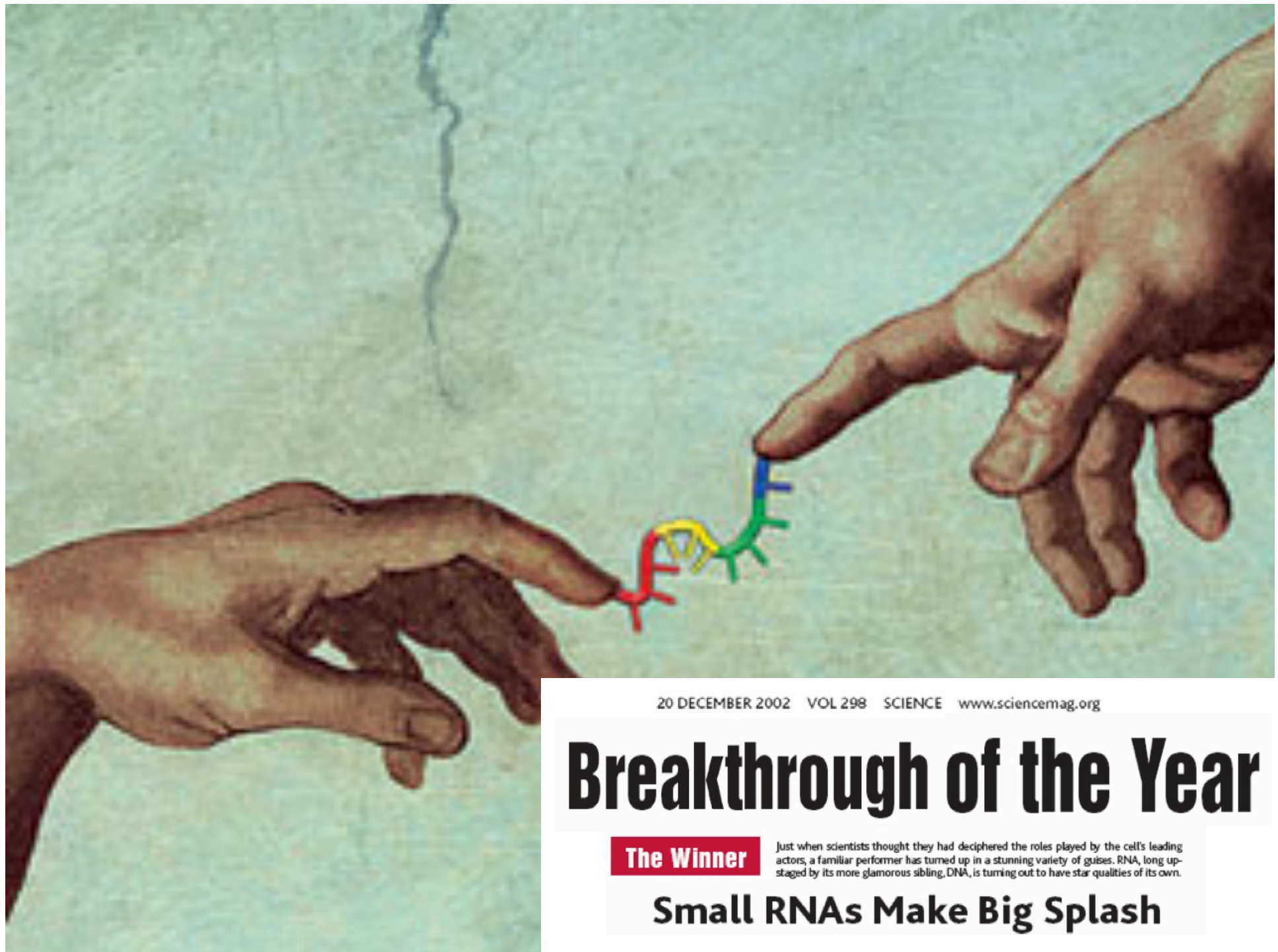


Protein-Reifung & Modifikation

Gen-  
aktivierung







20 DECEMBER 2002 VOL 298 SCIENCE [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)

# Breakthrough of the Year

## The Winner

Just when scientists thought they had deciphered the roles played by the cell's leading actors, a familiar performer has turned up in a stunning variety of guises. RNA, long upstaged by its more glamorous sibling, DNA, is turning out to have star qualities of its own.

## Small RNAs Make Big Splash



# „Wer hat ‘s erfunden...?“



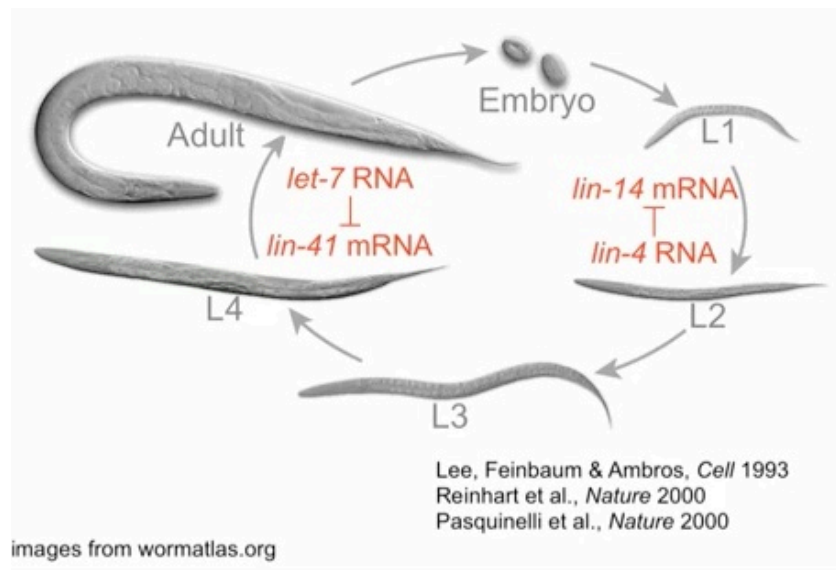
(a) Normal purple petunia flowers



(b) Petunia flower affected by miRNA

**1990:** zusätzlich eingebrachtes Farb-Gen hatte paradoxen Effekt, Blüten wurden unerwartet weiß!

> Farb-Gen-Expression gestört



**1993:** kleine RNA Moleküle regulieren Entwicklung von *C. elegans*





The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006

Andrew Z. Fire, Craig C. Mello

Share this: 35

## The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006



Photo: L. Cicero  
Andrew Z. Fire  
Prize share: 1/2



Photo: J. Mottern  
Craig C. Mello  
Prize share: 1/2

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006 was awarded jointly to Andrew Z. Fire and Craig C. Mello "for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"

## Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*

Andrew Fire\*, SiQun Xu\*, Mary K. Montgomery\*, Steven A. Kostas\*†, Samuel E. Driver‡ & Craig C. Mello‡

\* Carnegie Institution of Washington, Department of Embryology, 115 West University Parkway, Baltimore, Maryland 21210, USA

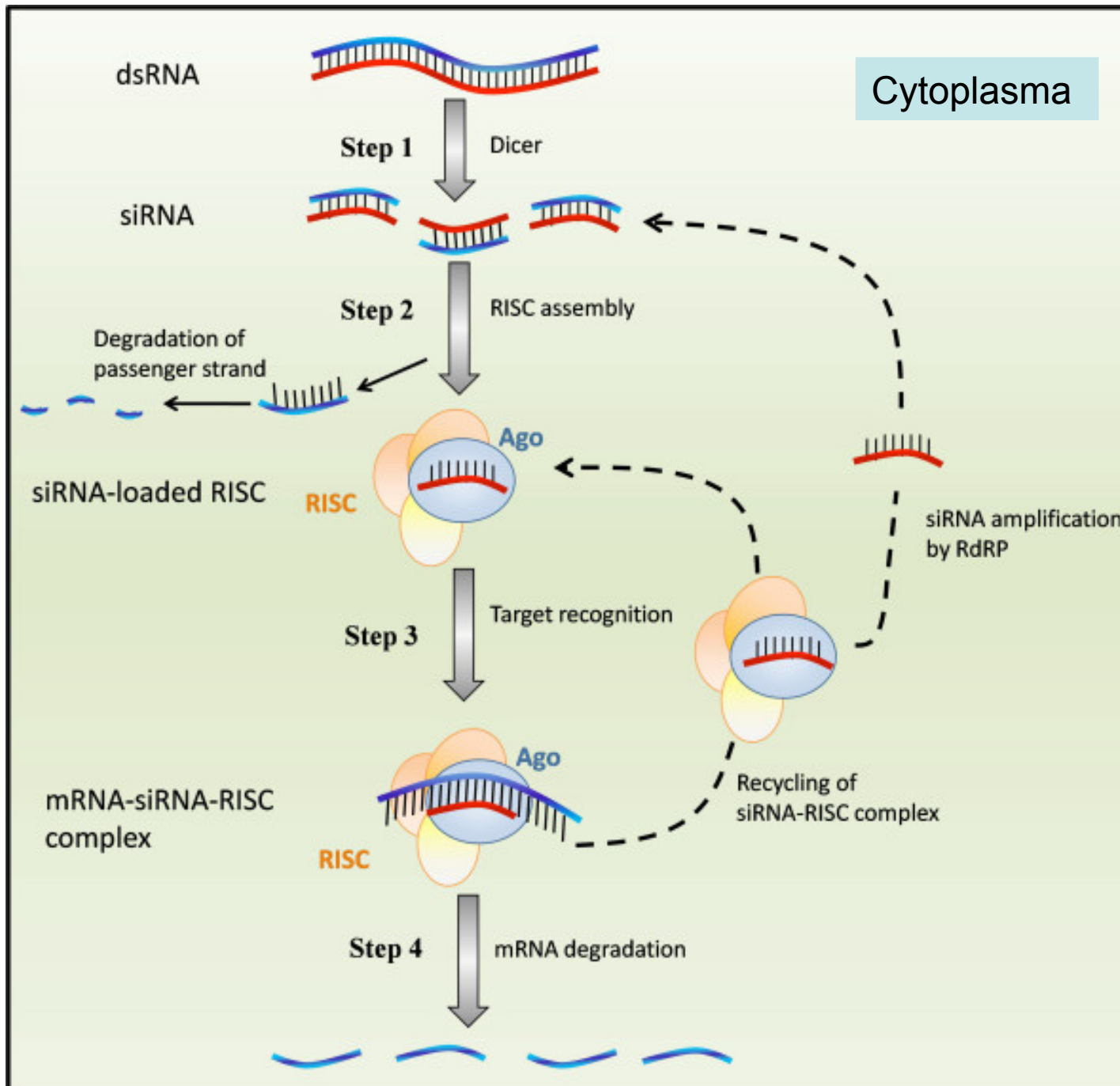
† Biology Graduate Program, Johns Hopkins University, 3400 North Charles Street, Baltimore, Maryland 21218, USA

‡ Program in Molecular Medicine, Department of Cell Biology, University of Massachusetts Cancer Center, Two Biotech Suite 213, 373 Plantation Street, Worcester, Massachusetts 01605, USA

Experimental introduction of RNA into cells can be used in certain biological systems to interfere with the function of an endogenous gene<sup>1,2</sup>. Such effects have been proposed to result from a simple antisense mechanism that depends on hybridization between the injected RNA and endogenous messenger RNA transcripts. RNA interference has been used in the nematode *Caenorhabditis elegans* to manipulate gene expression<sup>3,4</sup>. Here we investigate the requirements for structure and delivery of the interfering RNA. To our surprise, we found that double-stranded RNA was substantially more effective at producing interference than was either strand individually. After injection into adult animals, purified single strands had at most a modest effect, whereas double-stranded mixtures caused potent and specific interference. The effects of this interference were evident in both the injected animals and their progeny. Only a few molecules of injected double-stranded RNA were required per affected cell, arguing against stoichiometric interference with endogenous

mRNA and suggesting that there could be a catalytic or amplification component in the interference process.





Ausgangspunkt:  
lange ds RNA

Dicer = Rnase III

RISC = RNA-  
induced silencing  
complex

Ago 2 = Argo-  
nauten-Protein



# siRNA



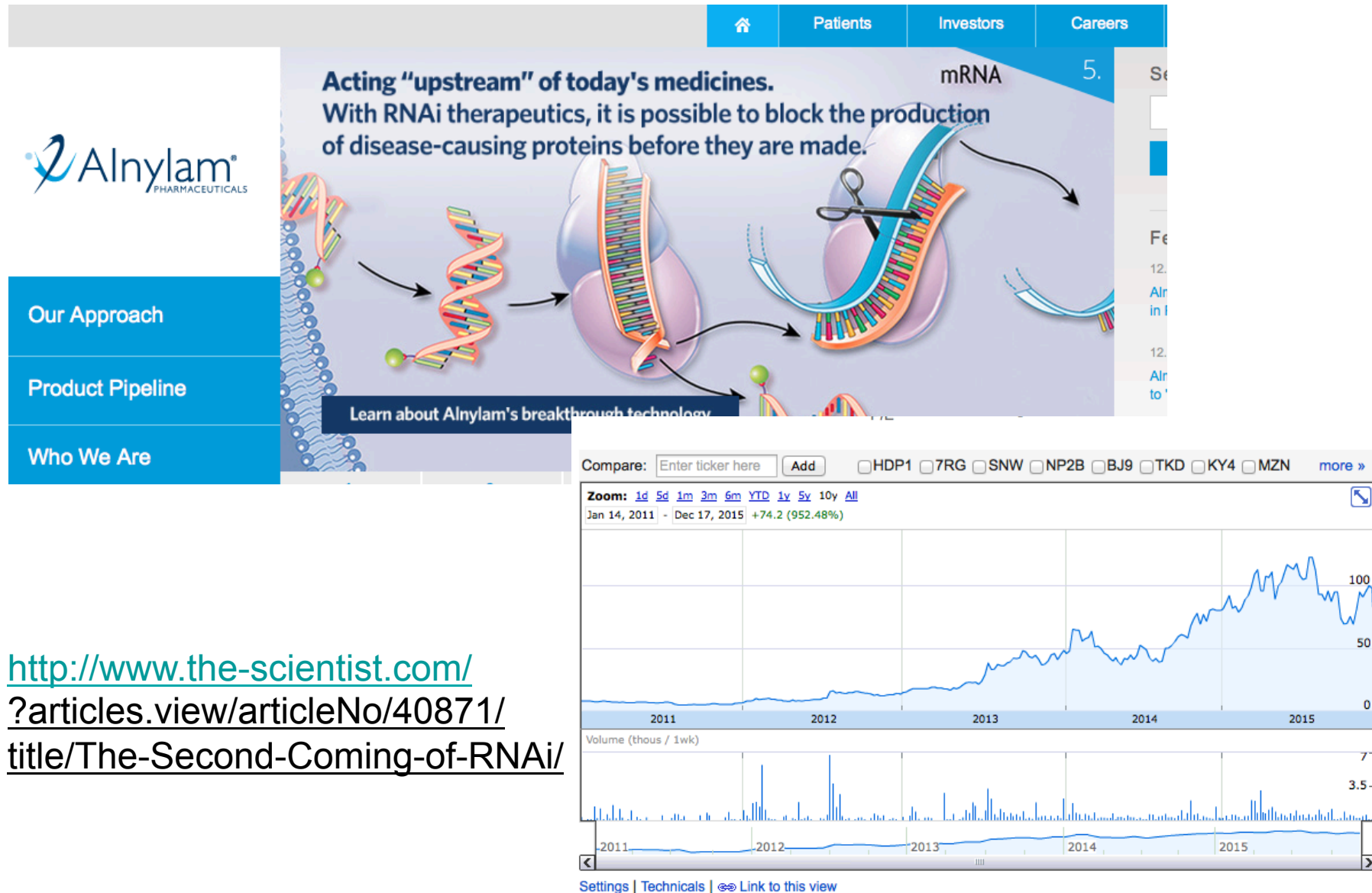
- **dsRNA** entsteht oder kommt in Zelle (zB. durch Transgene (artifizuell), Viren, Transposons u.a.)
- lange dsRNA wird durch RNase III-Protein (**Dicer**) in 19-23 Bp kurze small interfering RNA (**siRNA**)-Moleküle zerlegt
- ds siRNA wird durch Ago2 entwunden
- **guide RNA**-Strang wird in RISC-Komplex eingebaut
- komplementäre **mRNA wird erkannt** und von Ago2 **geschnitten**



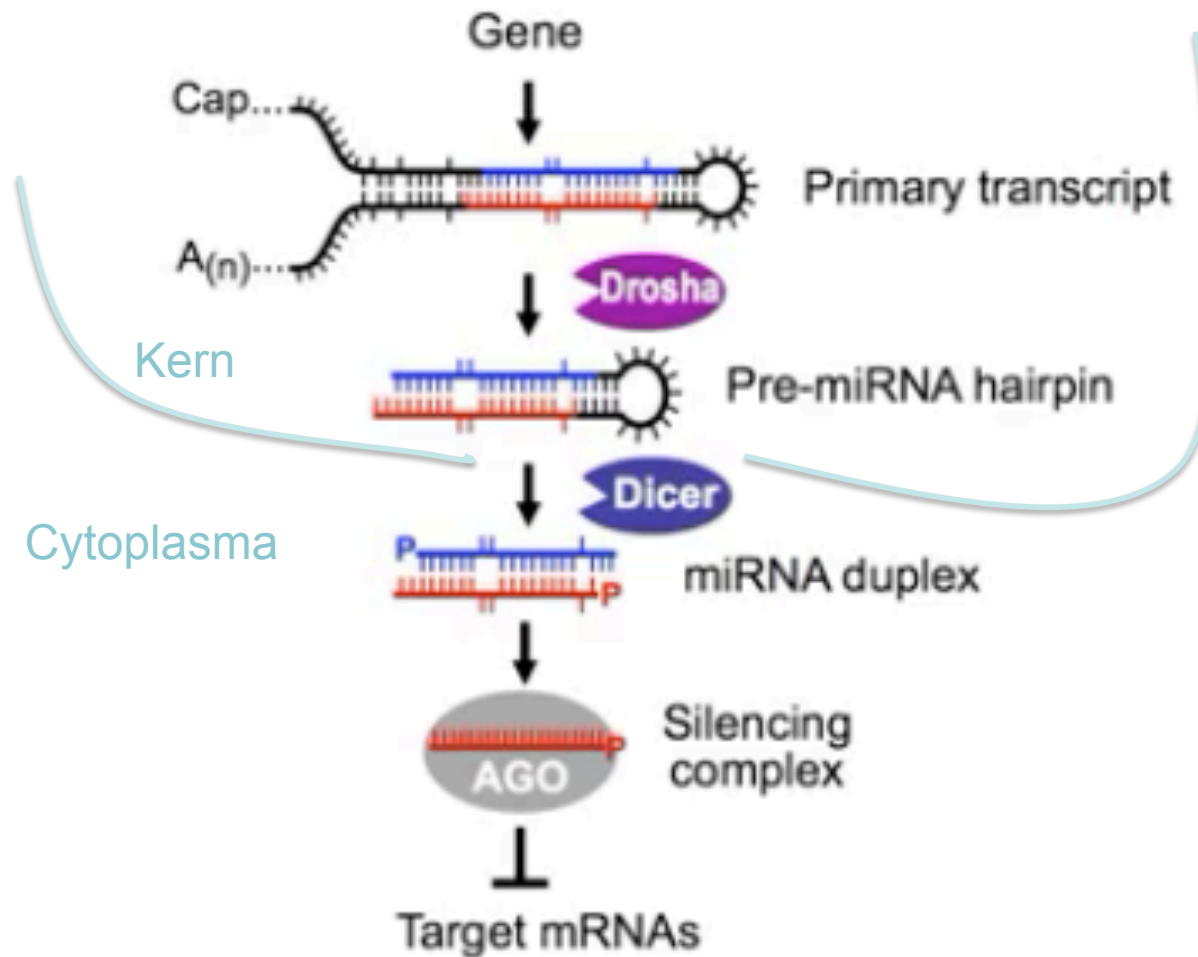
# RNA Interferenz (RNAi)

- „post-transcriptional gene silencing“ (PTGS)
- mRNA wird zerstört oder Translation wird verhindert
- sequenzspezifisch > Gen-spezifisch
- hochkonserviert; vermutlich schon in Ur-Zelle
- natürlich: zur Abwehr von Viren, Transposons etc.  
(siRNA, piRNA)
- natürlich: zur Regulation der Genexpression (miRNA)
- technisch: zur gezielten Inaktivierung von Genen (siRNA)

# siRNA > gezieltes gene silencing



# miRNAs sind „endogen“ und regulieren mRNAs



Kim, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005 (review)

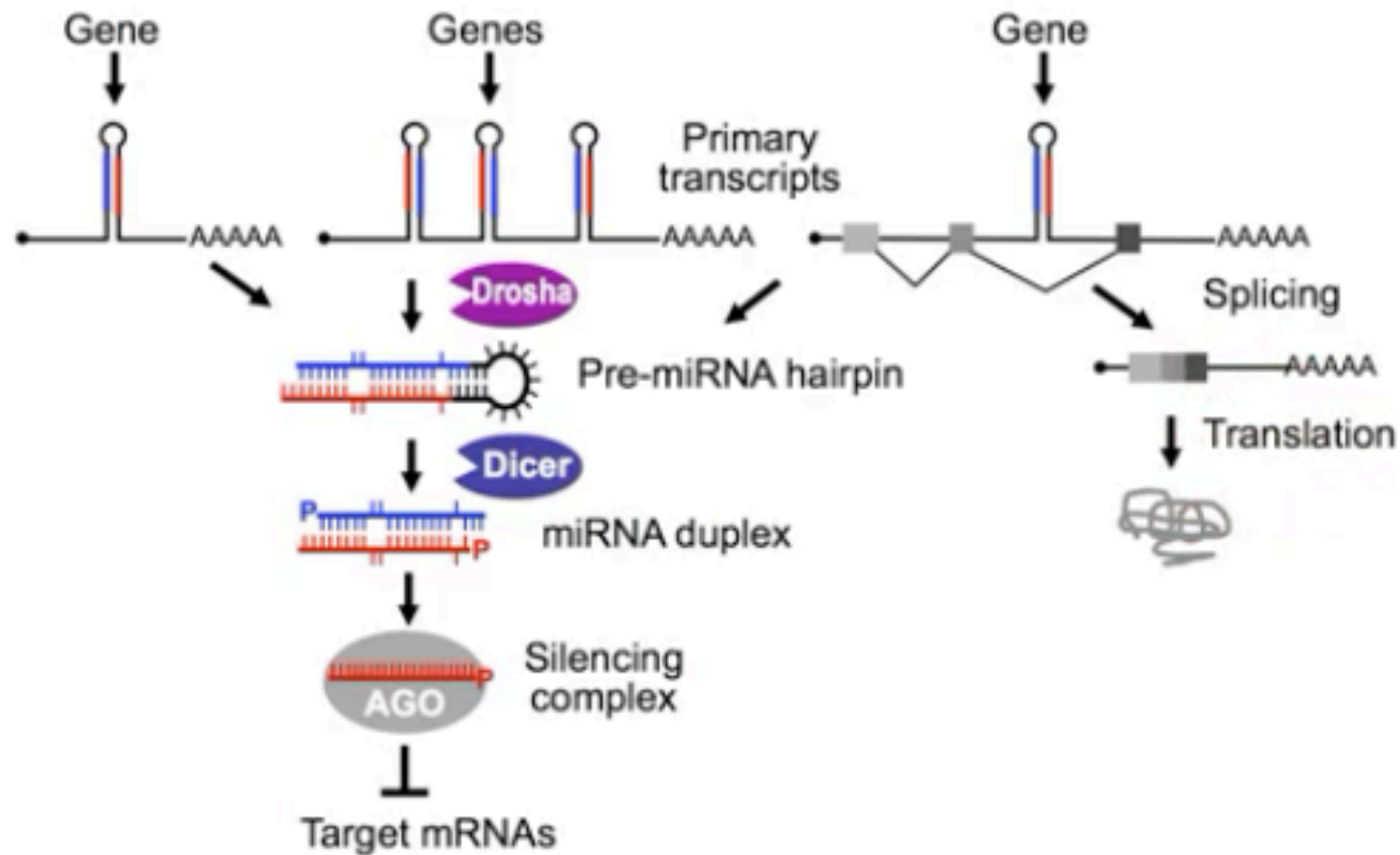


ca. 60 Bp

17-24 Bp

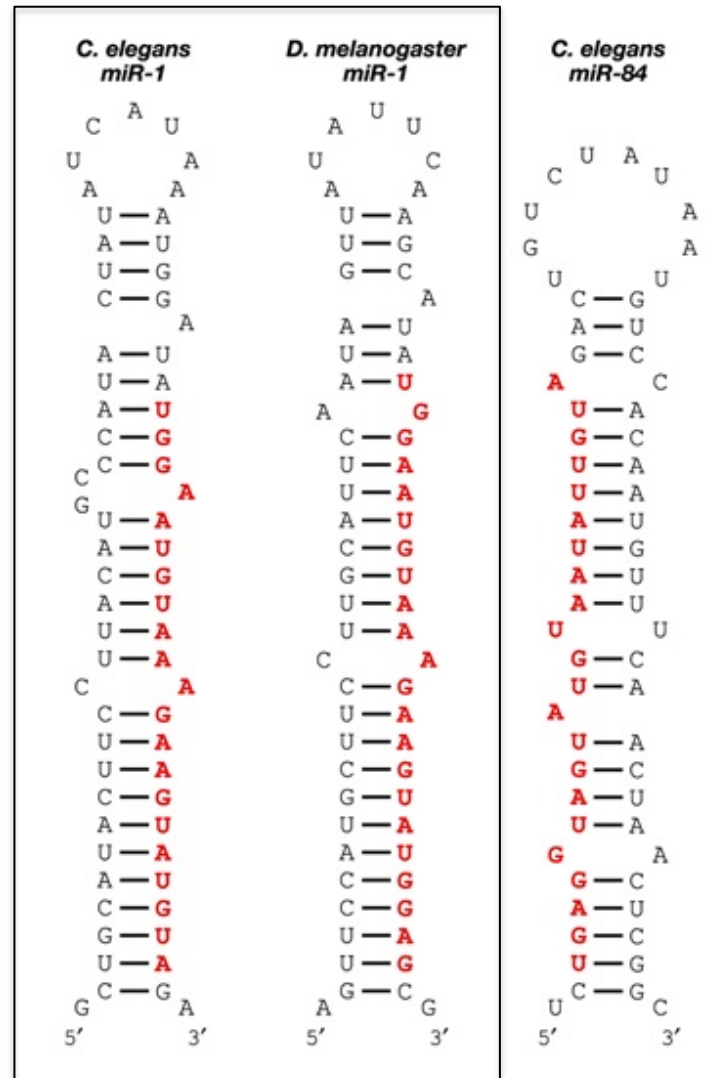
Grundprinzip bei  
Tieren und Pflanzen!

# Entstehung von miRNAs



Kim, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005 (review)

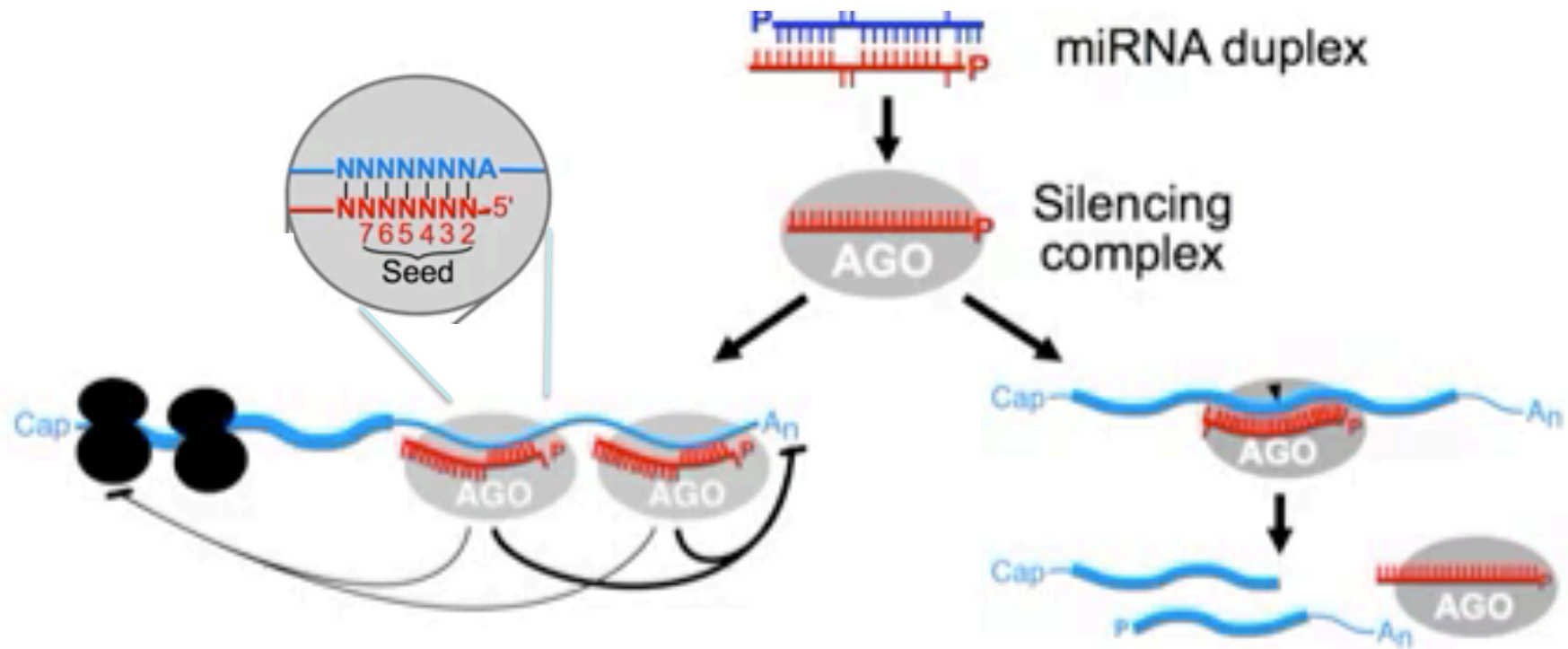
# miRNAs sind oft hoch konserviert



= wichtige Funktion!

guide strand, der mit mRNA paart in **ROT**

# miRNA: zwei Funktionsoptionen!



Teil-komplementär  
> mRNA-Translation inhibiert

vollständig komplementär  
> mRNA geschnitten



# Micro RNA (miRNA)



- im Kern von eigenen Genen transkribiert (Pol II und Pol III)
- ds primäre miRNA durch Drosha in ca. 60 Bp prä-miRNA prozessiert und durch Exportin 5 aus dem Kern ins Cytoplasma transportiert
- prä-miRNA durch Dicer zu 17-24 Bp ds RNA prozessiert
- miRNA entwunden, guide RNA-Strang in RISC-Komplex
- komplementäre mRNA wird erkannt:
  1. bei hoher Komplementarität: mRNA geschnitten
  2. bei geringer K.: Translation der mRNA blockiert

# Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs

Eric Londin<sup>a,1</sup>, Phillipe Loher<sup>a,1</sup>, Aristeidis G. Telonis<sup>a</sup>, Kevin Quann<sup>a</sup>, Peter Clark<sup>a</sup>, Yi Jing<sup>a</sup>, Eleftheria Hatzimichael<sup>a,b</sup>, Yohei Kirino<sup>a</sup>, Shozo Honda<sup>a</sup>, Michelle Lally<sup>c</sup>, Bharat Ramratnam<sup>c</sup>, Clay E. S. Comstock<sup>d</sup>, Karen E. Knudsen<sup>e</sup>, Leonard Gomella<sup>e</sup>, George L. Spaeth<sup>f</sup>, Lisa Hark<sup>f</sup>, L. Jay Katz<sup>f</sup>, Agnieszka Witkiewicz<sup>g</sup>, Abdolmohamad Rostami<sup>h</sup>, Sergio A. Jimenez<sup>i</sup>, Michael A. Hollingsworth<sup>i</sup>, Jen Jen Yeh<sup>k</sup>, Chad A. Shaw<sup>l</sup>, Steven E. McKenzie<sup>m</sup>, Paul Bray<sup>m</sup>, Peter T. Nelson<sup>n</sup>, Simona Zupo<sup>o</sup>, Katrien Van Roosbroeck<sup>p</sup>, Michael J. Keating<sup>q</sup>, George A. Calin<sup>q</sup>, Charles Yeo<sup>r</sup>, Masaya Jimbo<sup>r</sup>, Joseph Cozzitorto<sup>r</sup>, Jonathan R. Brody<sup>r</sup>, Kathleen Delgrosso<sup>s</sup>, John S. Mattick<sup>t,u</sup>, Paolo Fortina<sup>s</sup>, and Isidore Rigoutsos<sup>a,2</sup>

Two decades after the discovery of the first animal microRNA (miRNA), the number of miRNAs in animal genomes remains a vexing question. Here, we report findings from analyzing 1,323 short RNA sequencing samples (RNA-seq) from 13 different human tissue types. Using stringent thresholding criteria, we identified 3,707 statistically significant novel mature miRNAs at a false discovery rate of  $\leq 0.05$  arising from 3,494 novel precursors; 91.5% of these novel miRNAs were identified independently in 10 or more of the processed samples. Analysis of these novel miRNAs revealed tissue-specific dependencies and a commensurate low Jaccard similarity index in intertissue comparisons. Of these novel miRNAs, 1,657 (45%) were identified in 43 datasets that were generated by cross-linking followed by Argonaute immunoprecipitation and sequencing (Ago CLIP-seq) and represented 3 of the 13 tissues, indicating that these miRNAs are active in the RNA interference pathway. Moreover, experimental investigation through stem-loop PCR of a random collection of newly discovered miRNAs in 12 cell lines representing 5 tissues confirmed their presence and tissue dependence. Among the newly identified miRNAs are many novel miRNA clusters, new members of known miRNA clusters, previously unreported products from uncharacterized arms of miRNA precursors, and previously unrecognized paralogues of functionally important miRNA families (e.g., miR-15/107). Examination of the sequence conservation across vertebrate and invertebrate organisms showed 56.7% of the newly discovered miRNAs to be human-specific whereas the majority (94.4%) are primate lineage-specific. Our findings suggest that the repertoire of human miRNAs is far more extensive than currently represented by public repositories and that there is a significant number of lineage- and/or tissue-specific miRNAs that are uncharacterized.

## Significance

MicroRNAs (miRNAs) are small ~22-nt RNAs that are important regulators of posttranscriptional gene expression. Since their initial discovery, they have been shown to be involved in many cellular processes, and their misexpression is associated with disease etiology. Currently, nearly 2,800 human miRNAs are annotated in public repositories. A key question in miRNA research is how many miRNAs are harbored by the human genome. To answer this question, we examined 1,323 short RNA sequence samples and identified 3,707 novel miRNAs, many of which are human-specific and tissue-specific. Our findings suggest that the human genome expresses a greater number of miRNAs than has previously been appreciated and that many more miRNA molecules may play key roles in disease etiology.

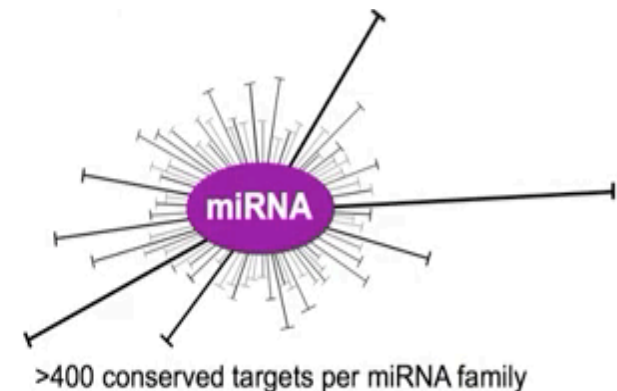


# Micro RNA (miRNA)

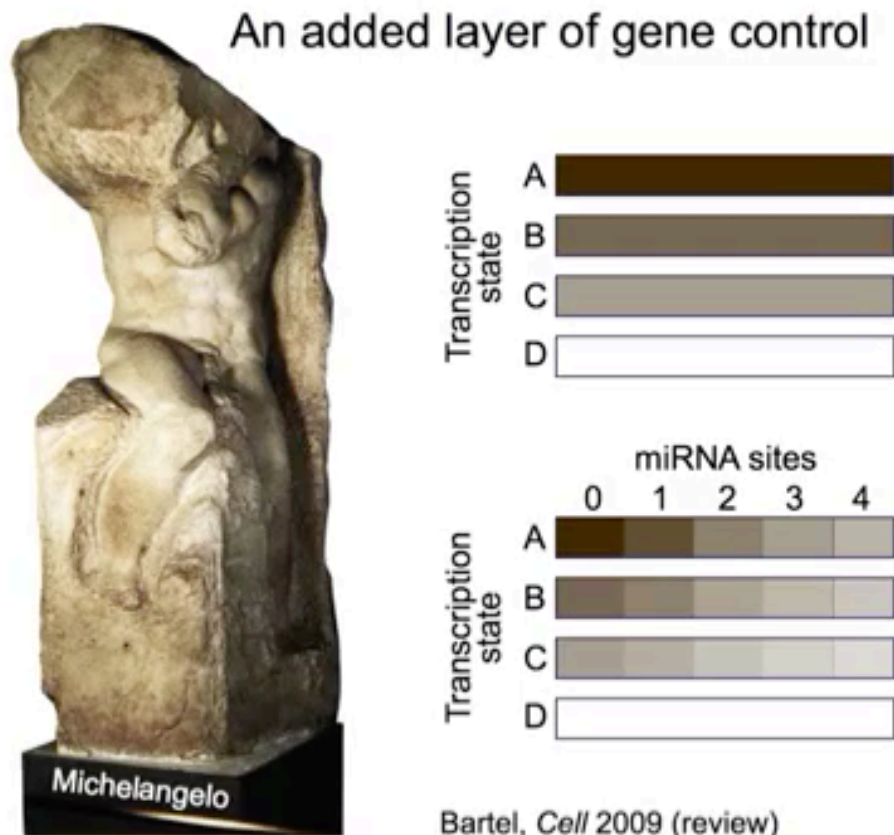
- jede miRNA kann mehrere Gene regulieren
- vermutlich **mehrere Tausend** miRNAs vom Humangenom kodiert
- >50% aller Gene (oder mehr) von miRNA reguliert
- alle Lebensprozesse betroffen
- viele miRNAs sind streng **konserviert**, andere sind als **Neuerungen** während der Evolution hinzugekommen



TargetScan Web Site  
Bartel, *Cell* 2009 (review)



# miRNA: Feintuning der Genregulation



David Bartel (Whitehead Institute/MIT/HHMI) Part 1:  
MicroRNAs: Introduction to MicroRNAs



# The Noncoding RNA Revolution— Trashing Old Rules to Forge New Ones

Thomas R. Cech<sup>1,2,\*</sup> and Joan A. Steitz<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Howard Hughes Medical Institute

<sup>2</sup>Department of Chemistry & Biochemistry, BioFrontiers Institute, University of Colorado Boulder, Boulder, CO 80309, USA

<sup>3</sup>Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Boyer Center for Molecular Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06536, USA

\*Correspondence: [thomas.cech@colorado.edu](mailto:thomas.cech@colorado.edu)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.008>

Noncoding RNAs (ncRNAs) accomplish a remarkable variety of biological functions. They regulate gene expression at the levels of transcription, RNA processing, and translation. They protect genomes from foreign nucleic acids. They can guide DNA synthesis or genome rearrangement. For ribozymes and riboswitches, the RNA structure itself provides the biological function, but most ncRNAs operate as RNA-protein complexes, including ribosomes, snRNPs, snoRNPs, telomerase, microRNAs, and long ncRNAs. Many, though not all, ncRNAs exploit the power of base pairing to selectively bind and act on other nucleic acids. Here, we describe the pathway of ncRNA research, where every established “rule” seems destined to be overturned.

