

# Expressionskontrolle in Eukaryonten

Warum muss Genexpression kontrolliert werden?

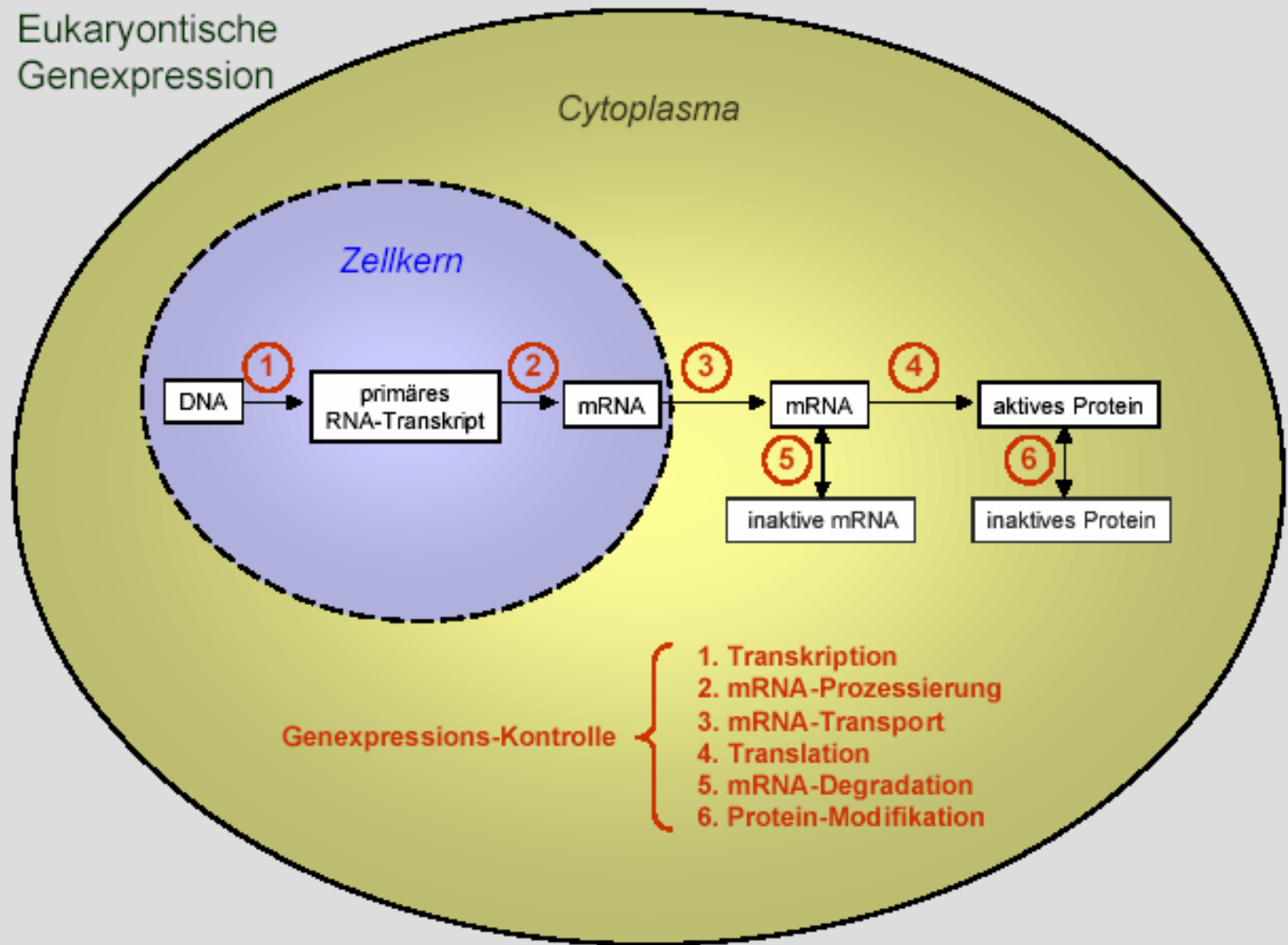
## 1. Gewebsspezifische Kontrolle

- nicht jedes Genprodukt ist in allen Zellen erforderlich
- manche Genprodukte werden ausschliesslich von hochdifferenzierten Zellen produziert oder benötigt

## 2. Zeitliche Kontrolle

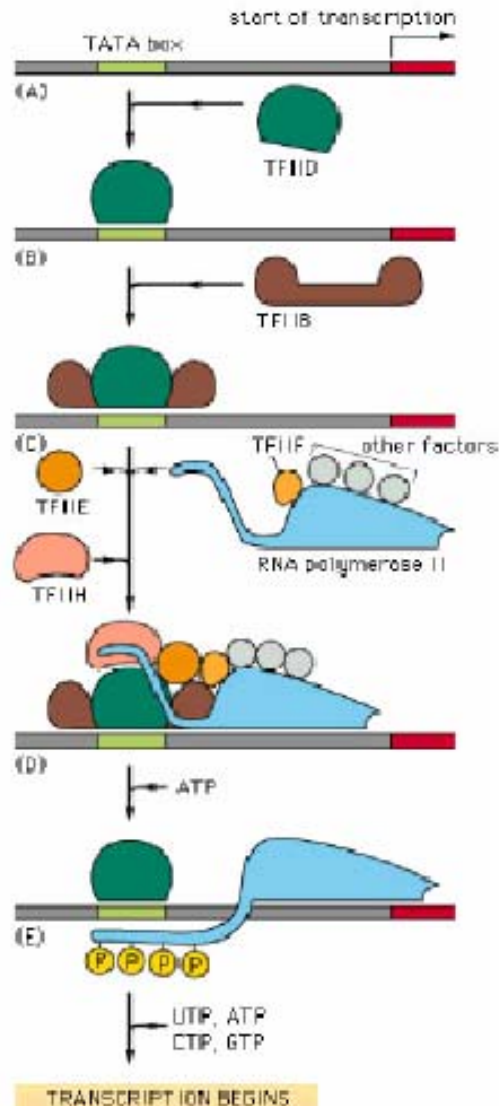
- manche Genprodukte werden nur zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung benötigt (on/off-System)
- unterschiedliche Anforderungen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten

# Eukaryontische Genexpression



Regulation der Genexpression durch  
Unterschiedliche Transkriptionseffizienz

# INITIATION DER TRANSKRIPTION



## TATA-Box

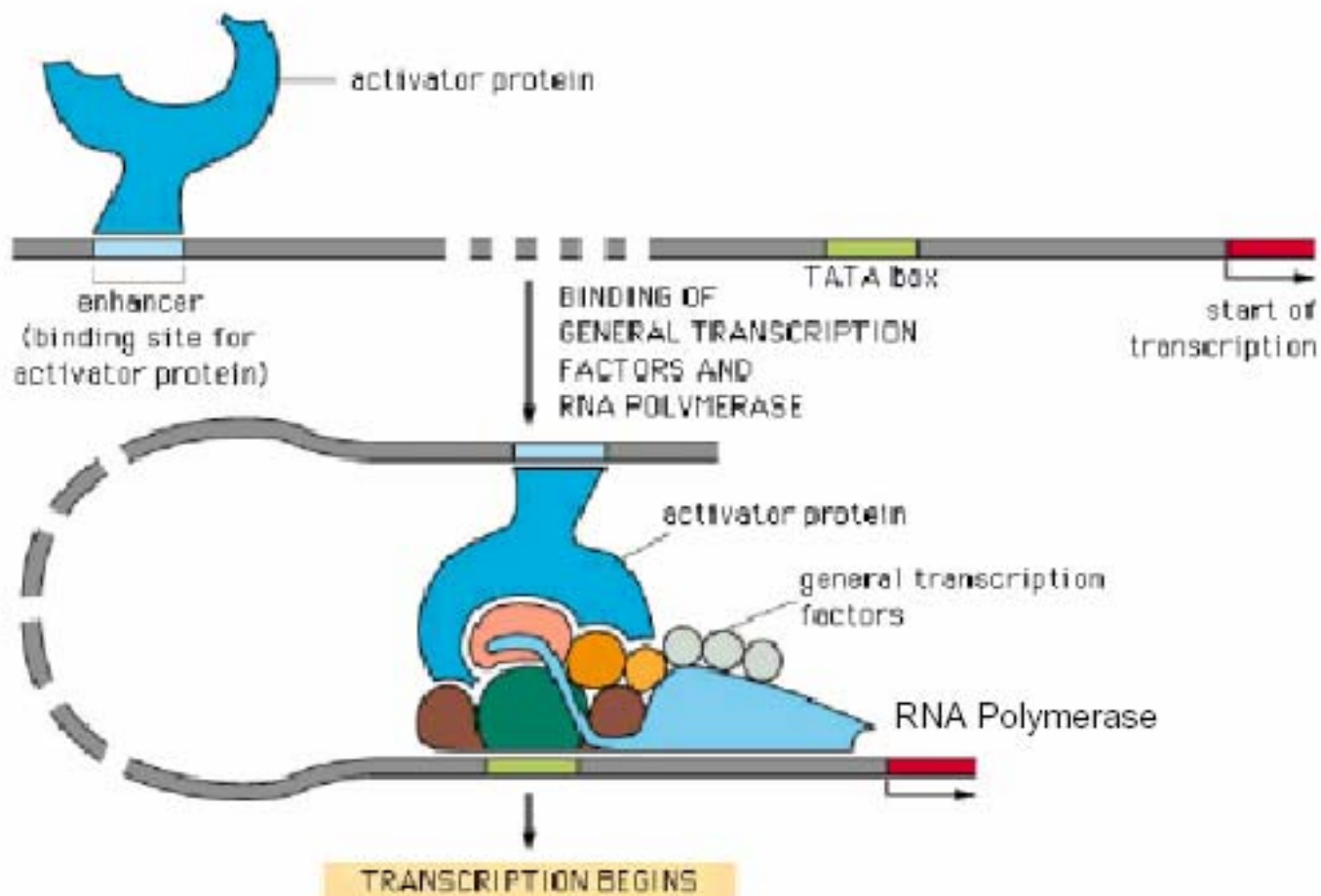
- kann leicht „aufschmelzen“
- wird durch allgemeine Transkriptionsfaktoren erkannt
- ermöglicht Erkennen des Genes durch RNA-Polymerase

## ABER:

es werden zusätzlich spezifische Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung der Transkription benötigt

diese spezifischen Transkriptionsfaktoren können das Zielgen in einem bestimmten Zelltyp, in einem bestimmten Entwicklungszustand oder in einer bestimmten Zellzyklusphase aktivieren

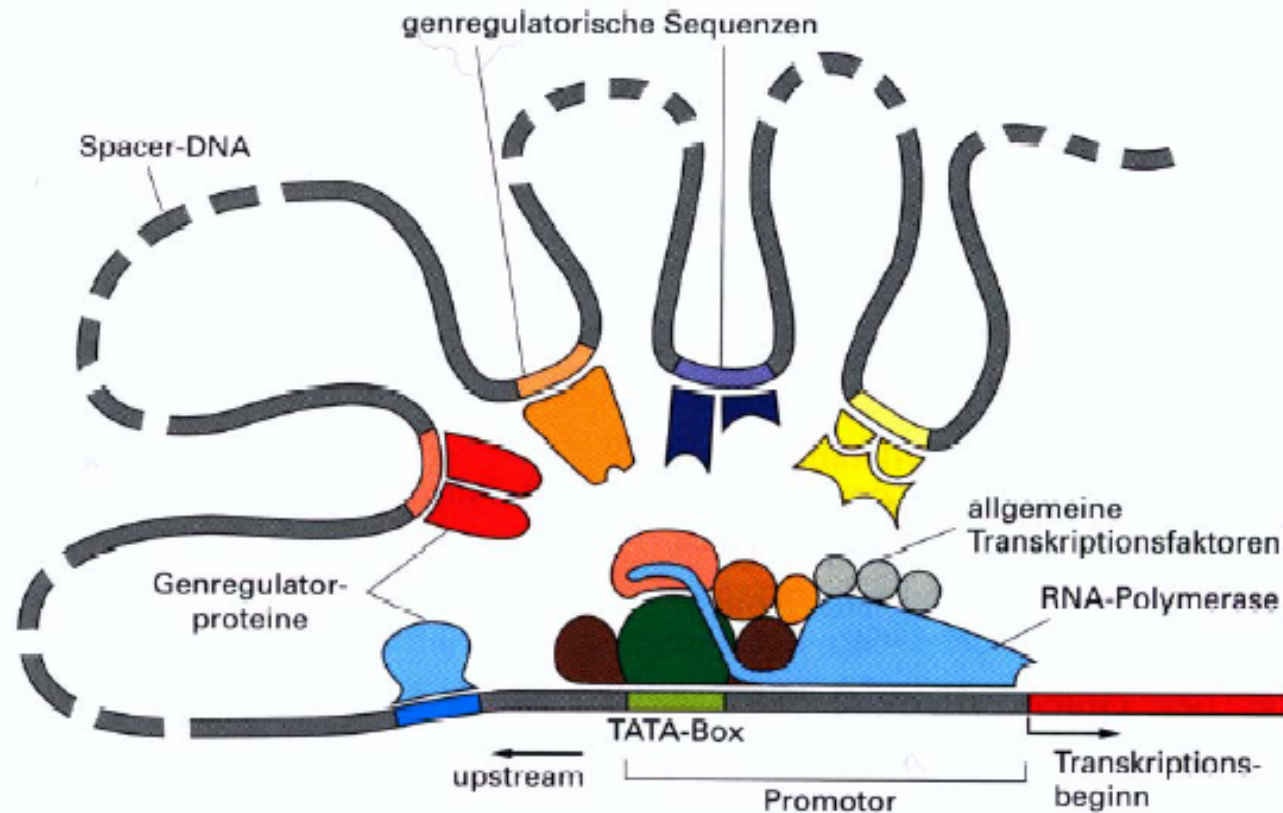
# GENAKTIVIERUNG DURCH SPEZIFISCHE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN



Kombinatorischer Effekt:

## Regulatorische Sequenzen eines eukaryontischen Gens

---



kombinatorische Kontrolle

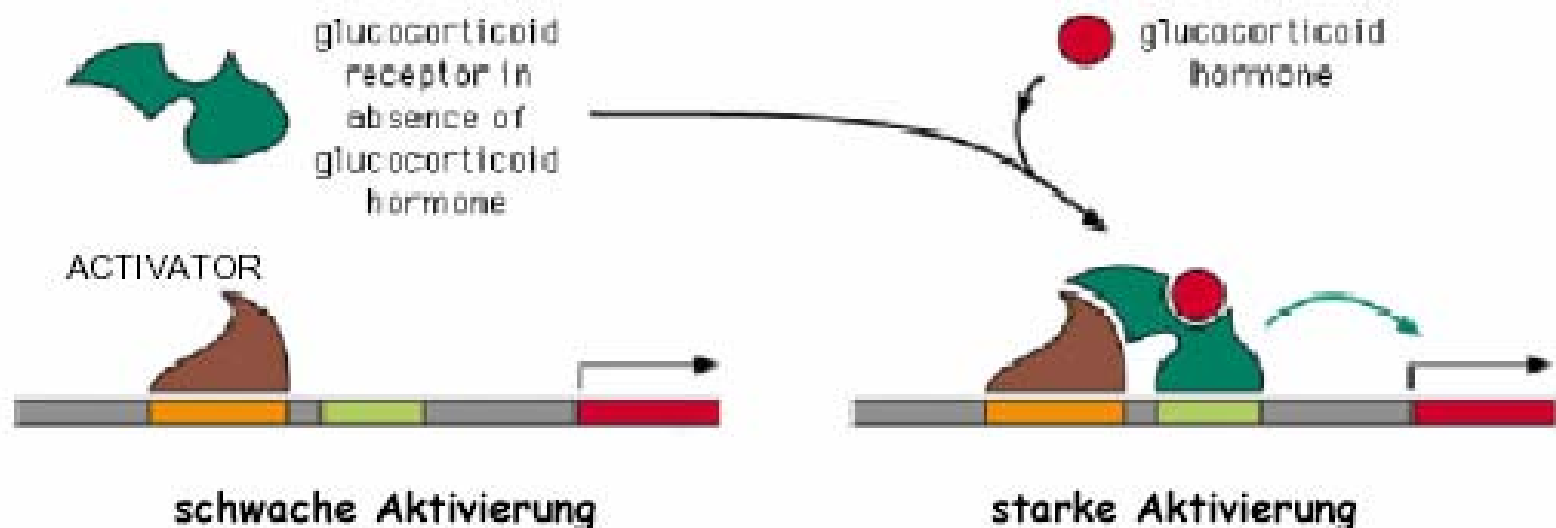
# HORMONINDUZIERTE TRANSKRIPTION

Glucocorticoide:

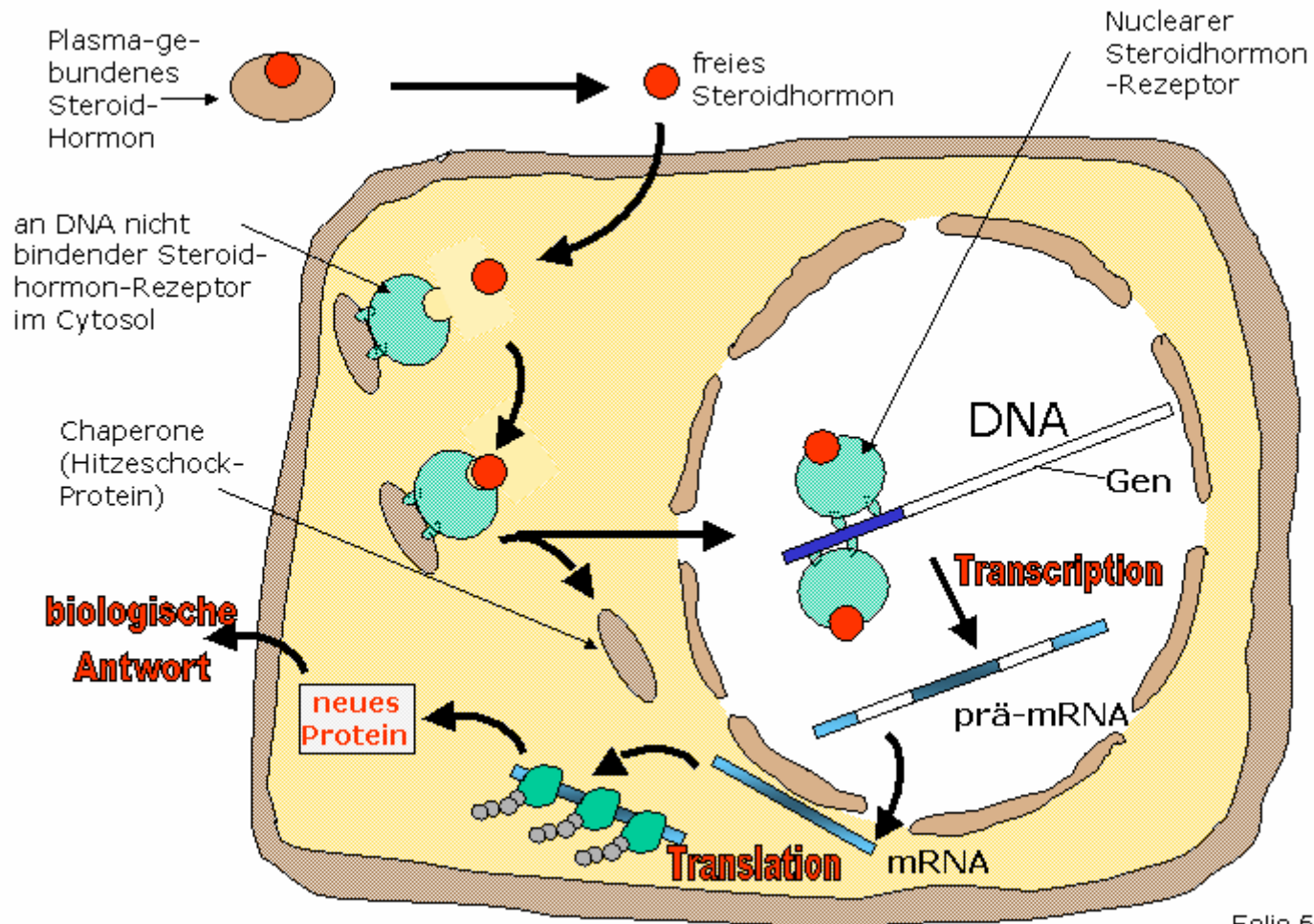
Steroidhormone z.B. Cortisol

Cortisol wird in Hungerperioden oder bei intensiver körperlicher Tätigkeit freigesetzt und aktiviert Gene, die die Umsetzung von Aminosäuren in Glucose bewirken (u.A. in der Leber).

Cortisol bindet an den Glucocorticoidrezeptor, der Hormon-Rezeptorkomplex bindet an die Promotoren von Zielgenen und aktiviert deren Transkription



# Wirkung von Steroidhormonen



## Allgemeine Transkriptionsfaktoren

- für jede Transkription notwendig
- binden entweder direkt an die DNA (zum Beispiel die TATA-Box), oder an Polymerase oder an andere Proteine des Initiationskomplexes.
- sind ubiquitär in allen Zellen
- haben an der spezifischen Genregulation meist keinen Anteil.

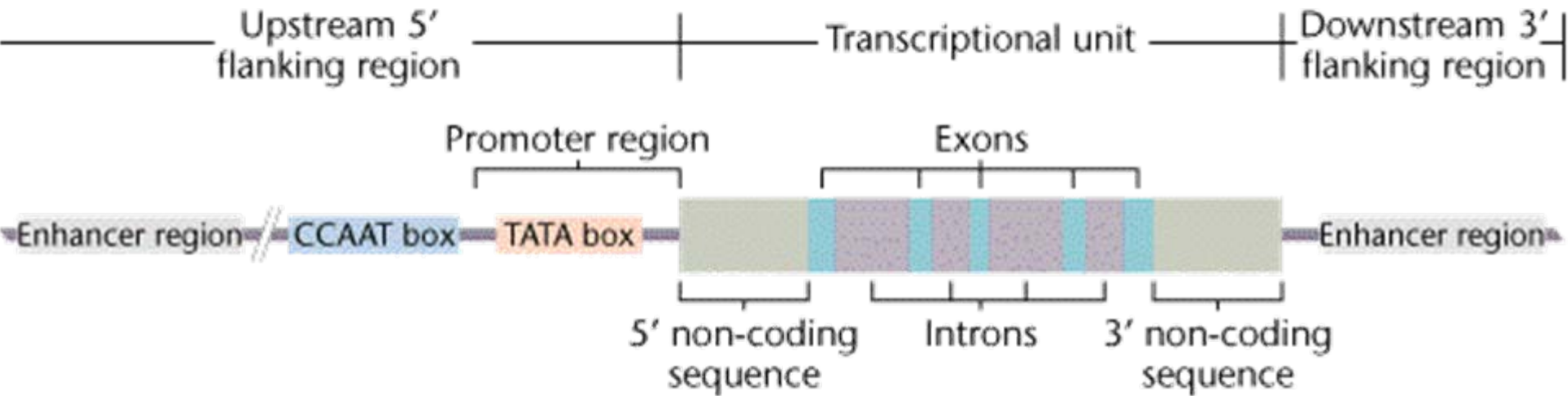
## spezifische Transkriptionsfaktoren

- vermitteln der Polymerase, *welches* Gen aktiviert oder reprimiert werden soll.
- sind zellspezifisch
- binden an spezifische DNA Sequenzen (cis-Element oder Enhancer)
- nur dann kann Polymerase binden und das Gen wird exprimiert.

# Enhancer

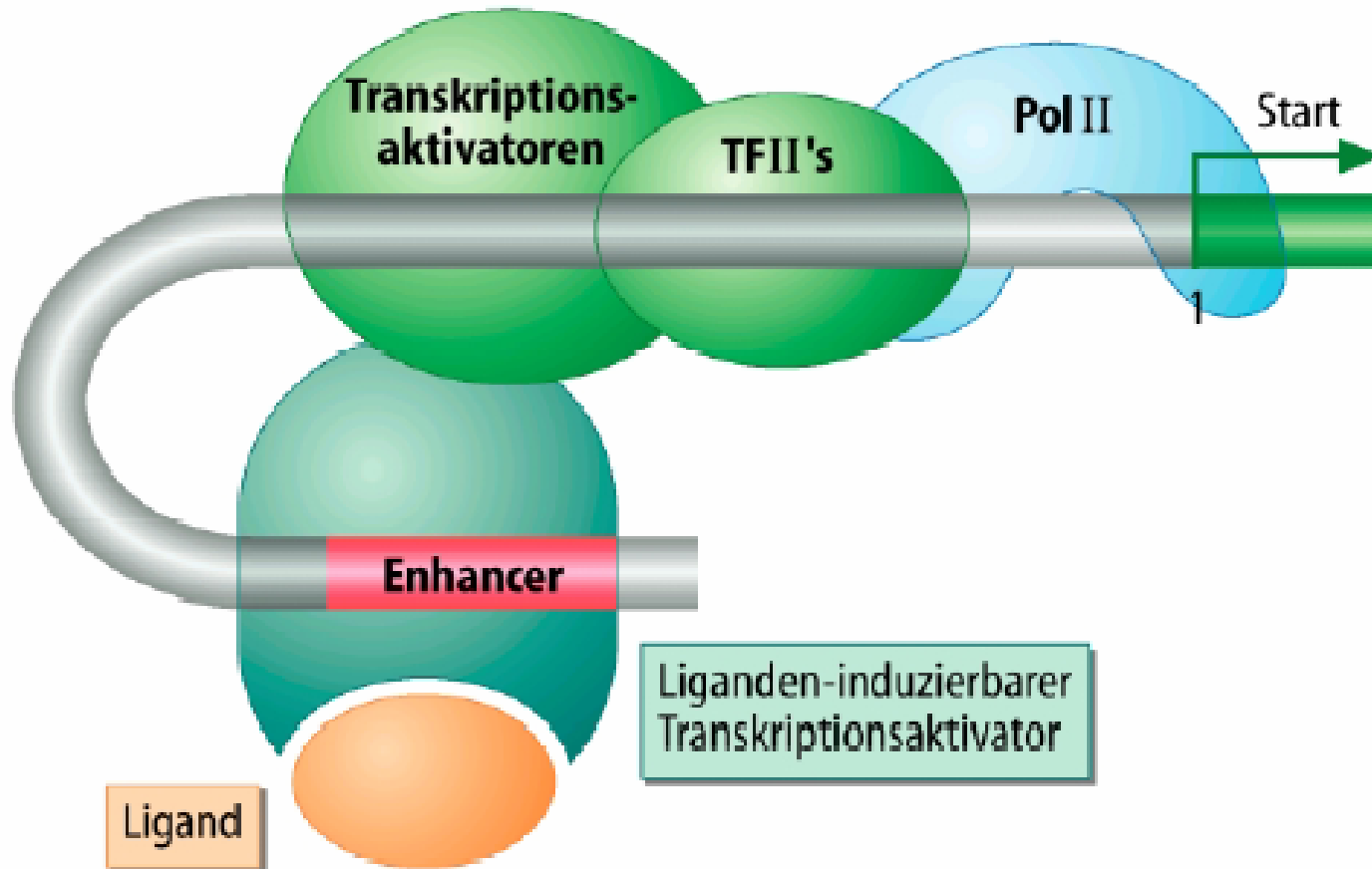
- Regulationselemente außerhalb von Promotoren
- oft Tausende von Basenpaaren vom Promotor entfernt
- vor oder hinter dem offenen Leserahmen
- Enhancer können auch in Intronen vorkommen
- spezifische Transkriptionsfaktoren können an bestimmte Enhancer (und/oder Promotoren) binden
  - gewebe- oder zellspezifische Expression
  - entwicklungsspezifische Expression

# Aufbau eines Gens



(Klug & Cummings 1997)

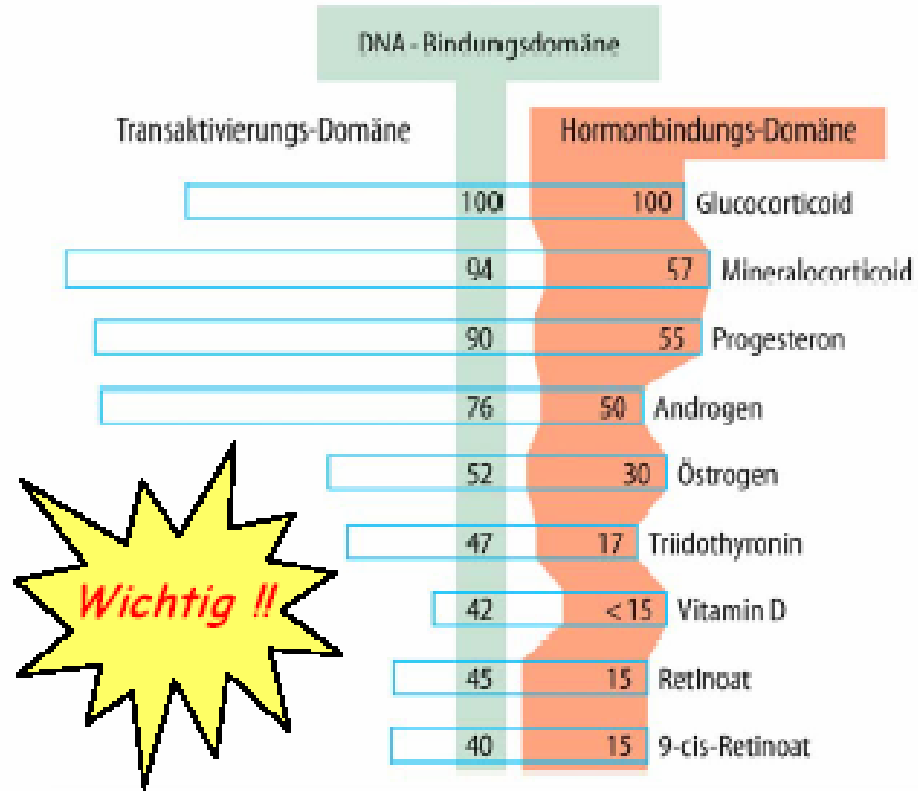
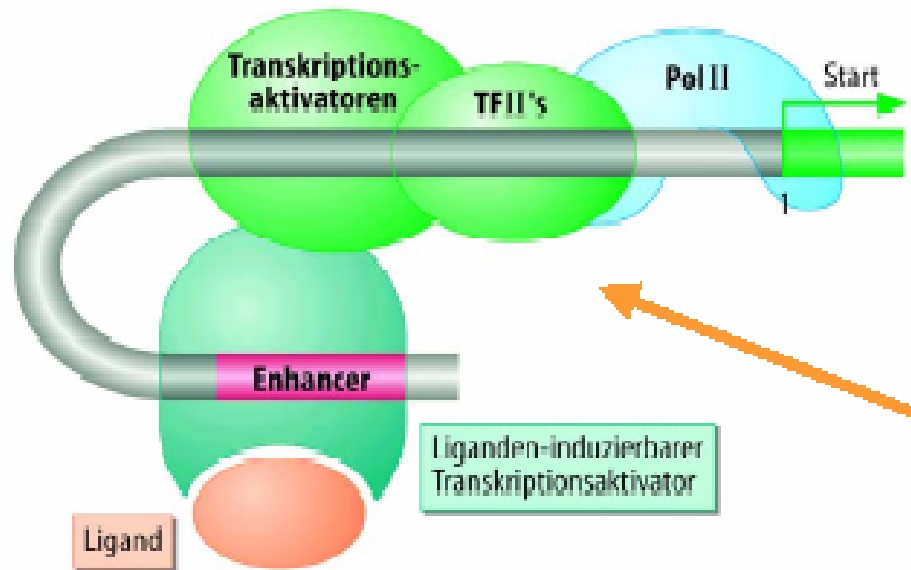
Transkriptionsfaktoren können weit (> 1000 bp) vom  
Transkriptionsstart entfernt  
an Enhancer-Sequenzen auf der DNA binden



# ein typischer T.-Faktor besitzt mindestens drei Domänen

- eine DNA-Bindedomäne
  - Bindung an eine spezifische DNA-Sequenz
- transaktivierende Domäne
  - Kontaktaufnahme mit allgemeinen Transkriptionsfaktoren oder Histon-Acetyl-Transferase
- Signal-Empfangsdomäne = Ligandbindende Domäne
  - eine Stelle im Molekül, die als Empfangsort für Signale dient; z.B. ein Threonin- oder Serin-Rest der phosphoryliert wird oder an die ein Ligand (z.B. Hormon) binden kann

# Die Rezeptoren der lipophilen Mediatoren



**Wichtig !!**

<i>Auslöser</i>	<i>DNA-Bindungsprotein</i>	<i>Enhancer-Bezeichnung</i>	<i>Consensussequenz</i>
Glucocorticoide	Glucocorticoid-Rezeptor	GRE	TGGTACAAATGTTCT
Cyclo-AMP	CREBP	CRE	TGACGTCA
Serum	Serum-Response Factor (SRF)	SRE	CCATATTAGG
Hitzeschock	Hitzeschock-Transkriptionsfaktor	HSRE	CNNGAANNTCCNNG
Oxidativer Streß, TNF $\alpha$	NF- $\kappa$ B	$\kappa$ BRE	GGGRNNYCC

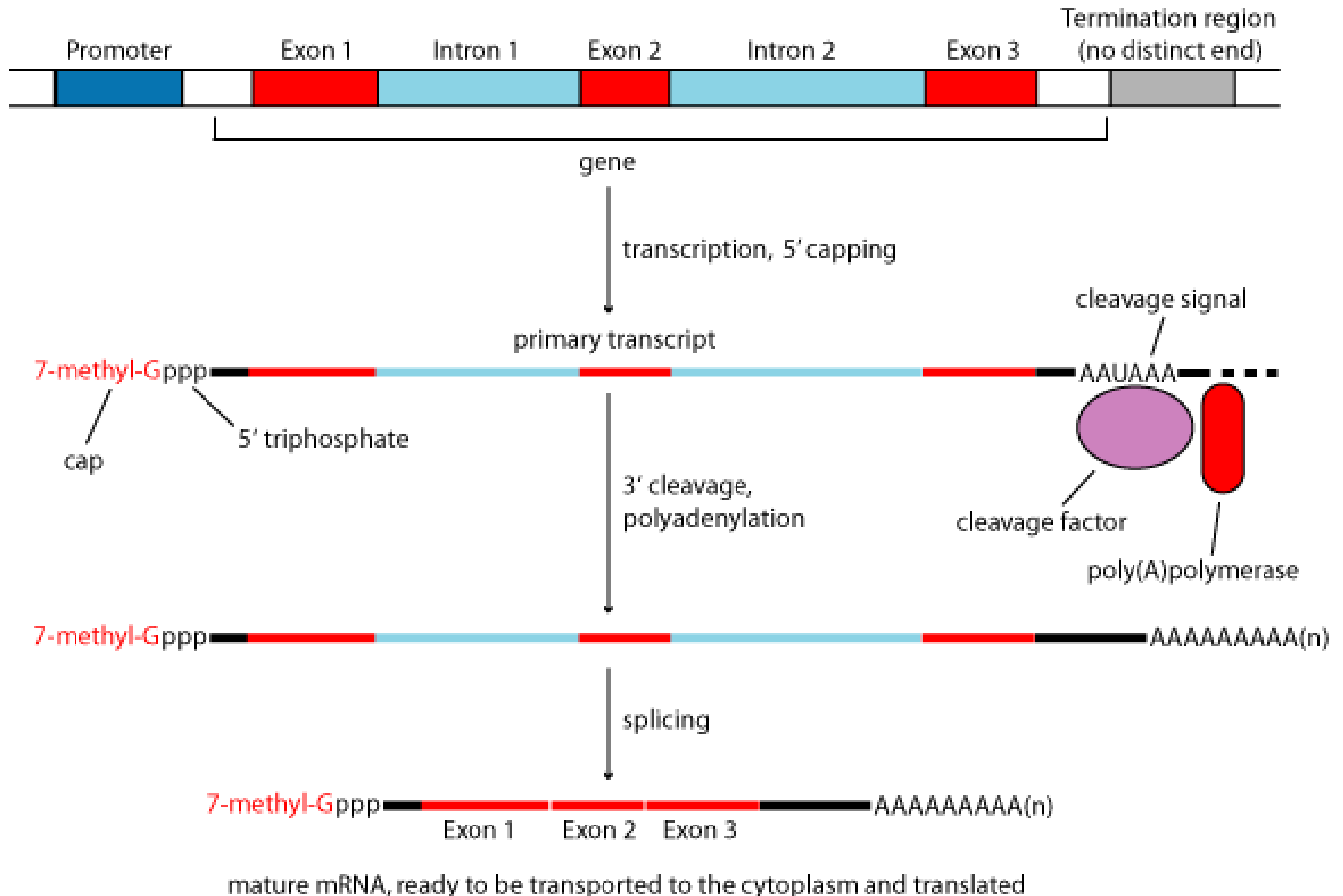
GRE Glucocorticoid responsive Element; CRE cAMP responsive Element; SRE Serum response Element; HSE Heat shock responsive Element;  $\kappa$ BRE  $\kappa$ B responsive Element.

## Posttranskriptionale Modifikation

Die transkribierte RNA-Moleküle sind noch nicht funktionstüchtig

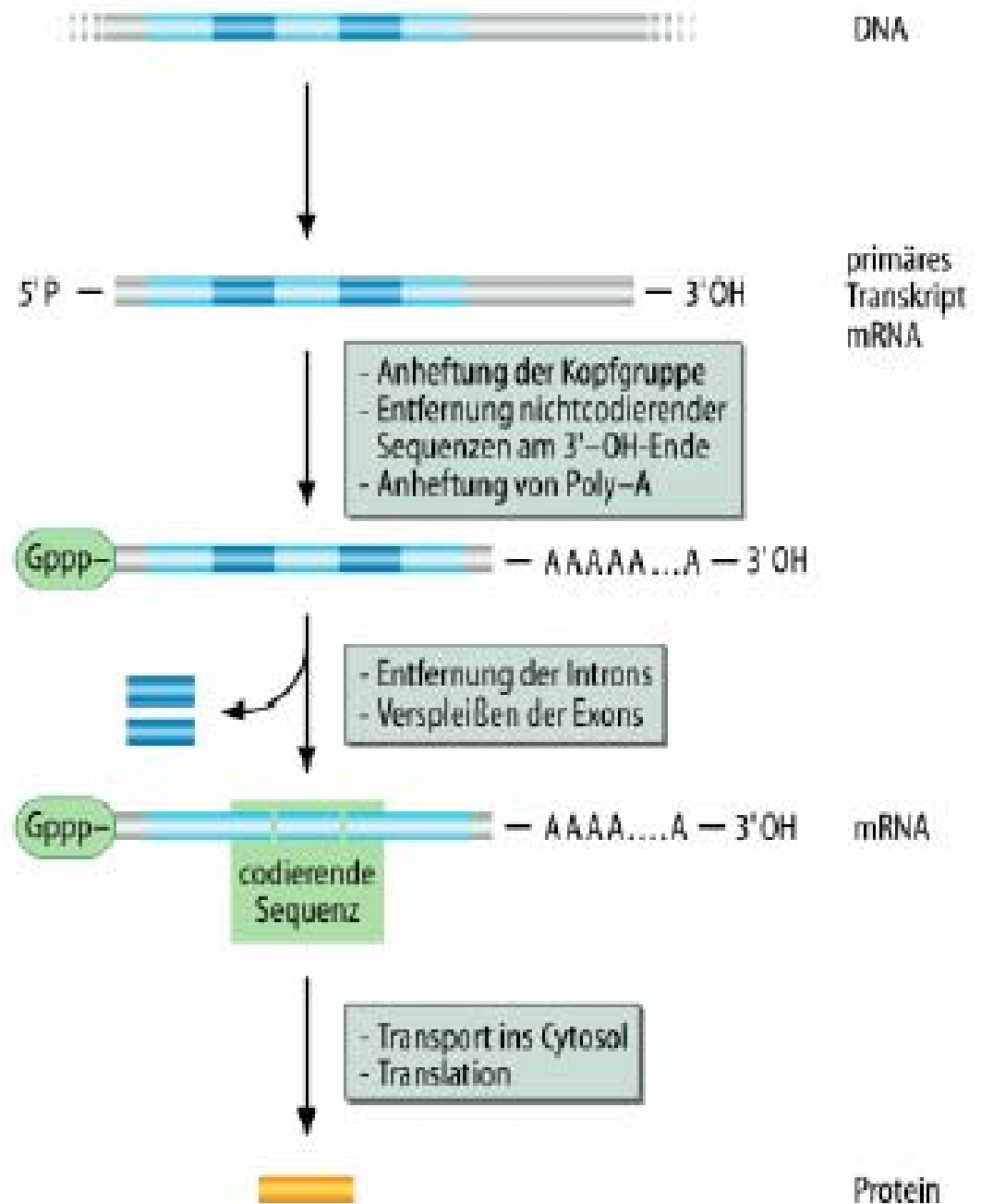
—————> RNA Reifung

# RNA Prozessierung

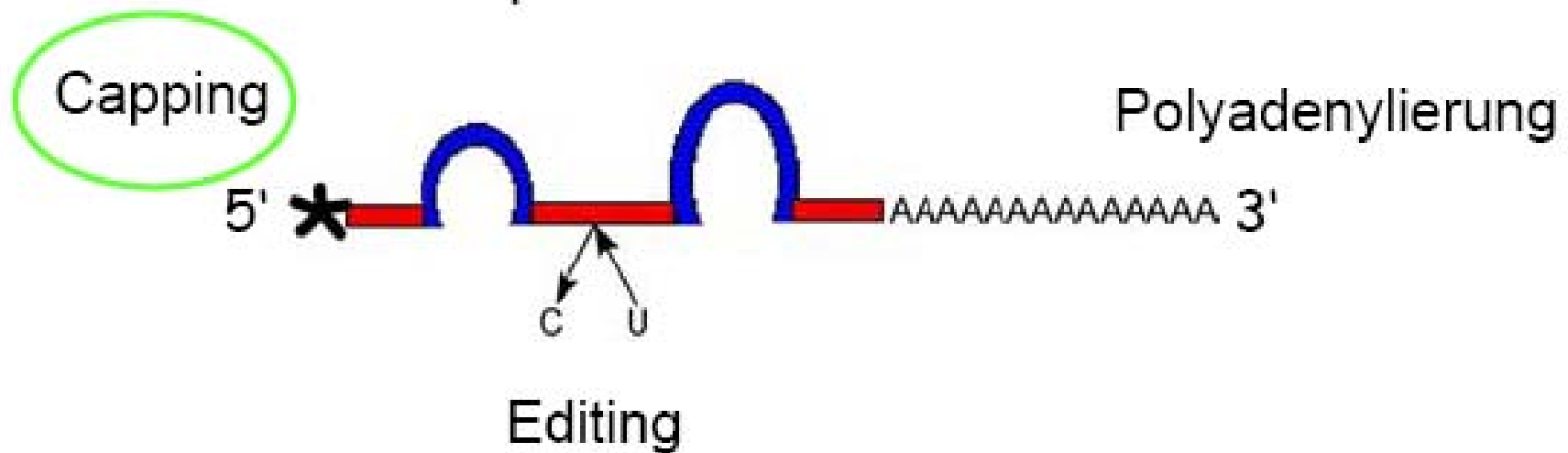


# Posttranskriptionale Modifikation der RNA

- + Cap-Struktur
- + Polyadenylierung
- Spleißen
- Edeting

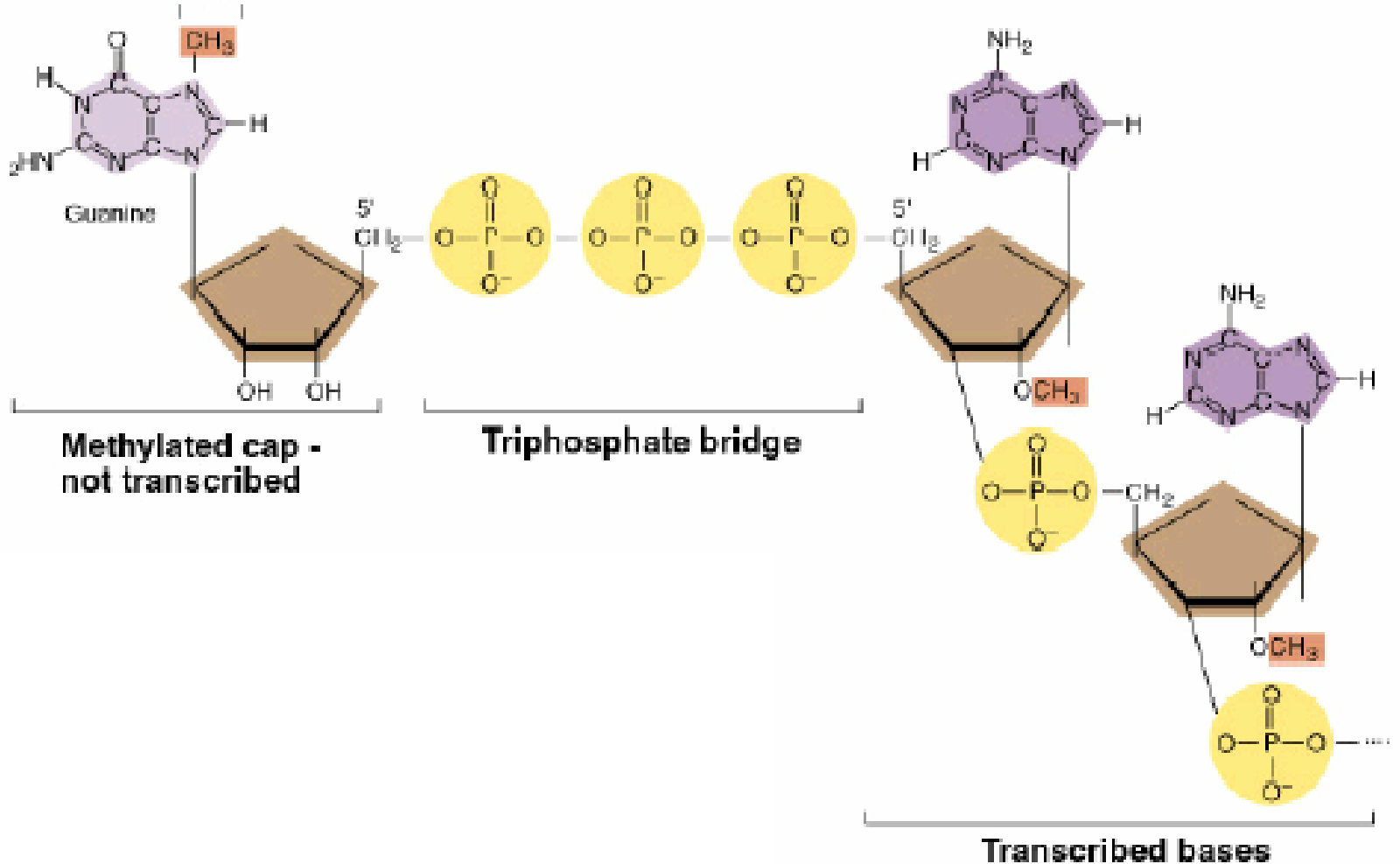


# RNA wird prozessiert



# Das 5'-Ende von eukaryontischen mRNAs

(a) Methyl group

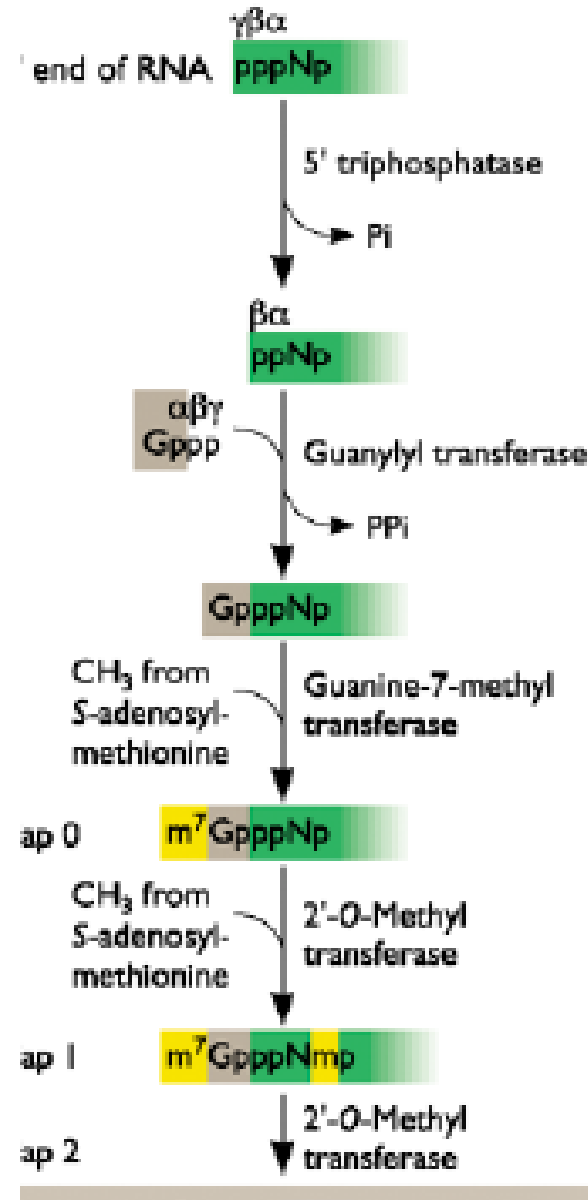


### 3 Schritte der Capping Reaktion:

Eine Phosphohydrolase entfernt das gamma phosphate vom 5'-Ende des wachsenden hnRNA-Transkripts

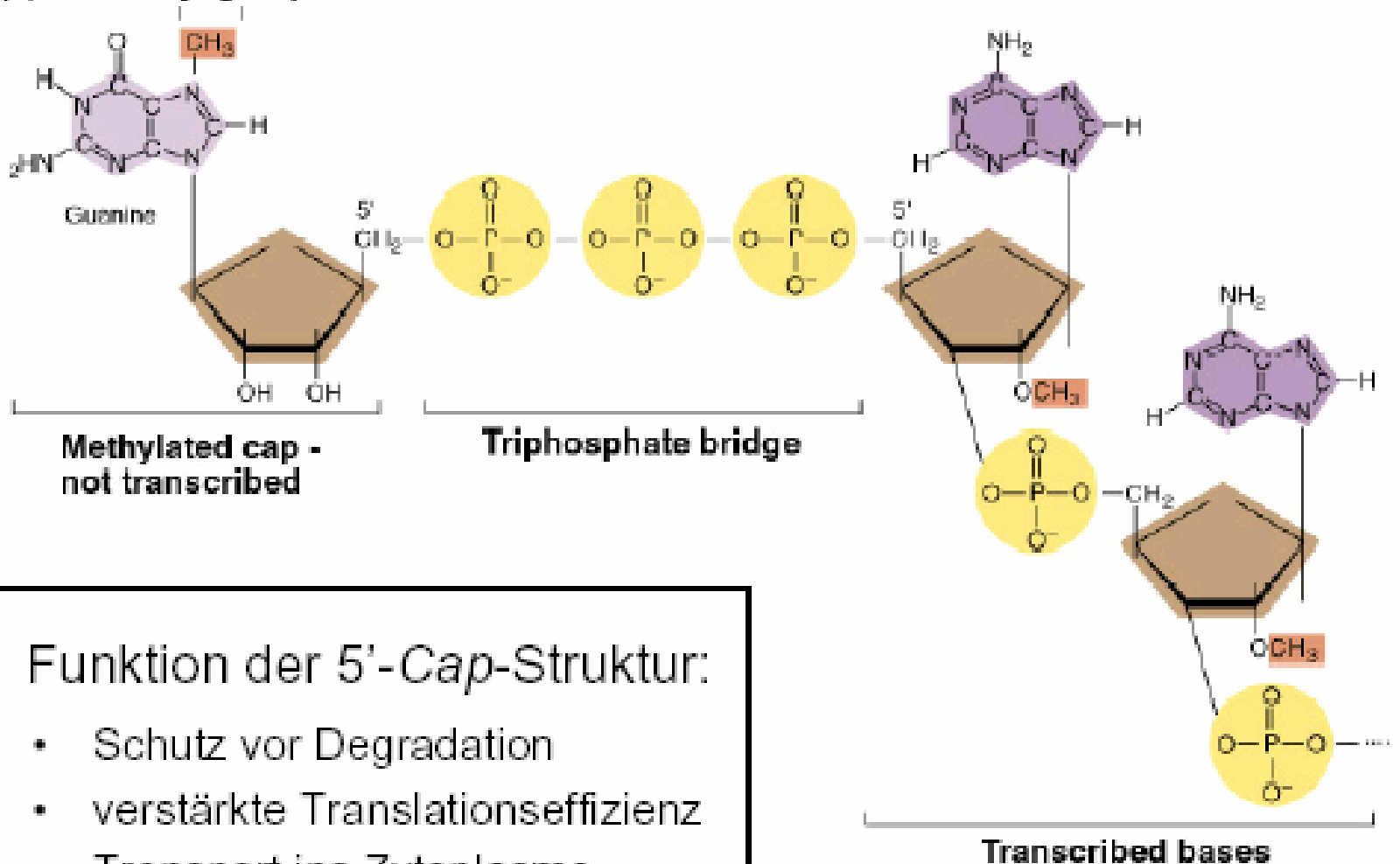
Guanylyl transferase katalysiert die Kondensation von GTP mit dem 5' Ende. Dadurch entsteht eine 5'-5' triphosphate Verbindung. Pyrophosphat wird freigesetzt.

Guanosinnucleotid wird methyliert: guanine-7-methyl transferase. S-adenosyl-methionine ist Donor!.



# Das 5'-Ende von eukaryontischen mRNAs

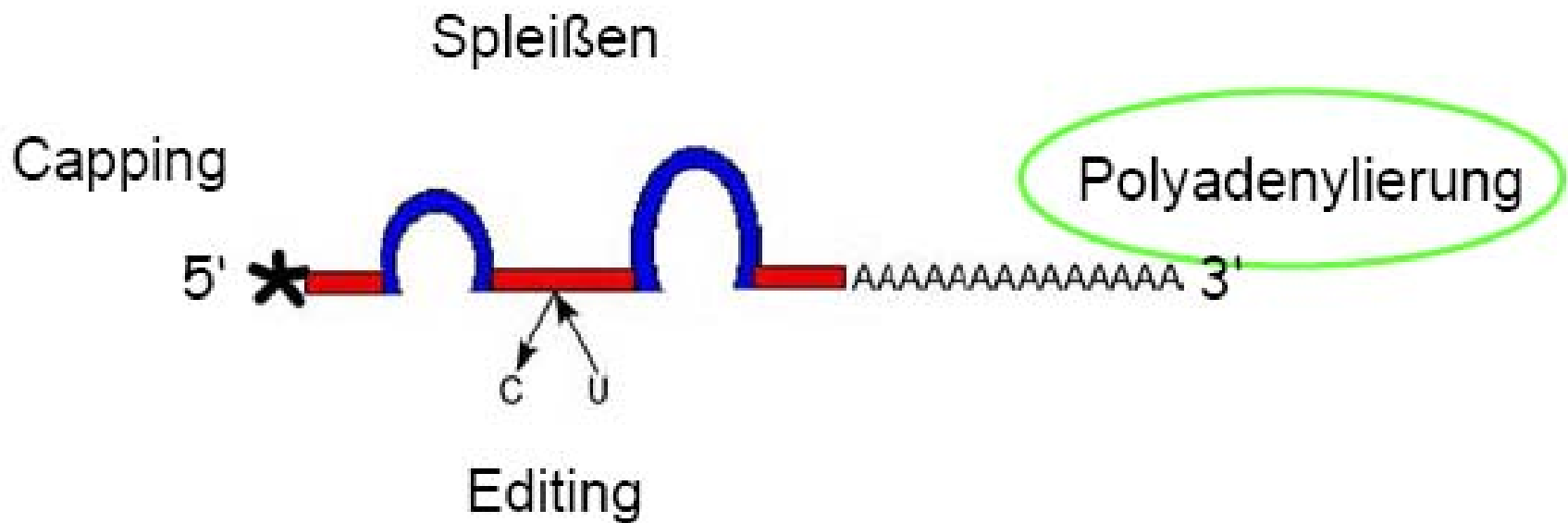
(a) Methyl group



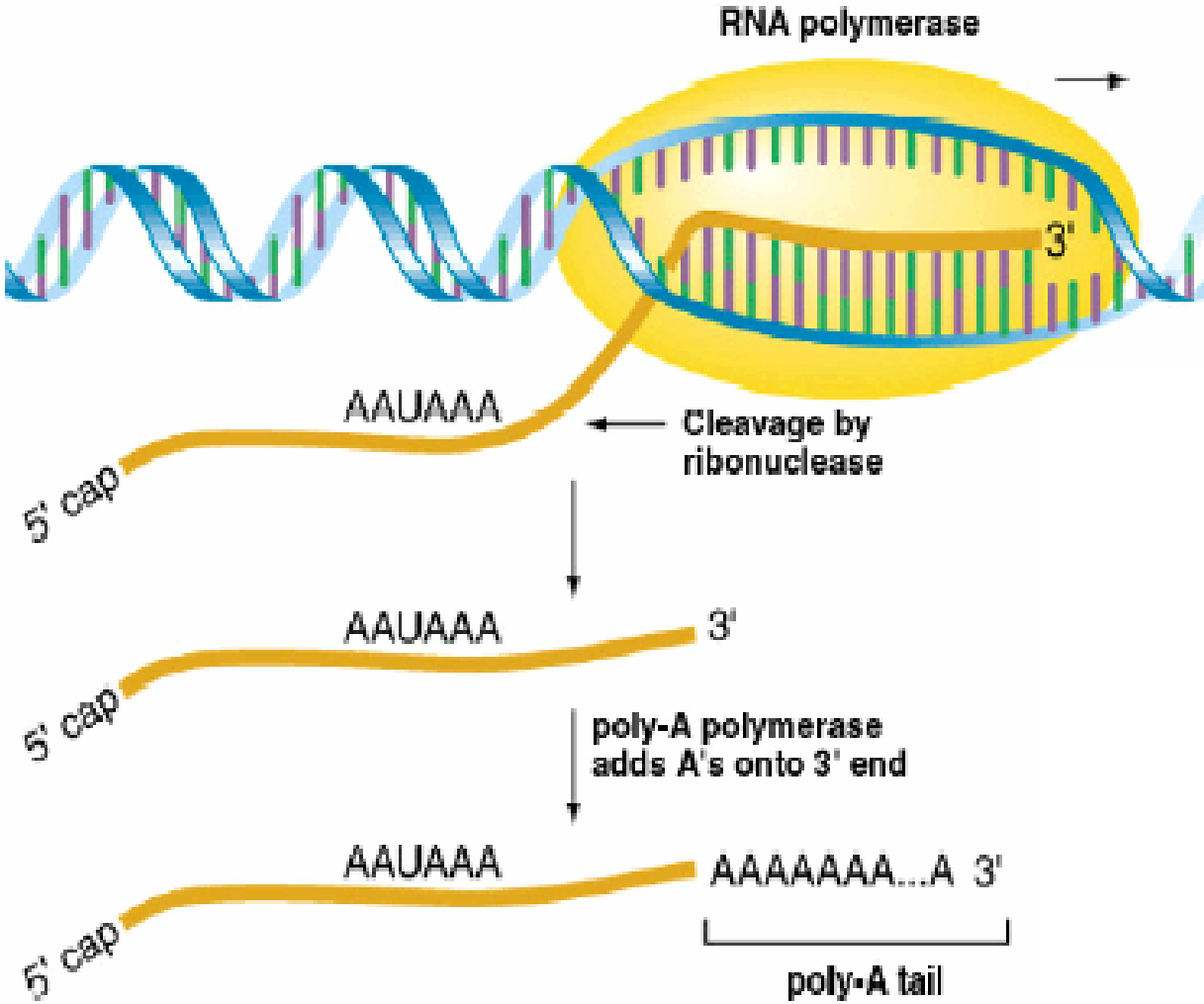
## Funktion der 5'-Cap-Struktur:

- Schutz vor Degradation
- verstärkte Translationseffizienz
- Transport ins Zytoplasma
- Spleißen des 1. Exons

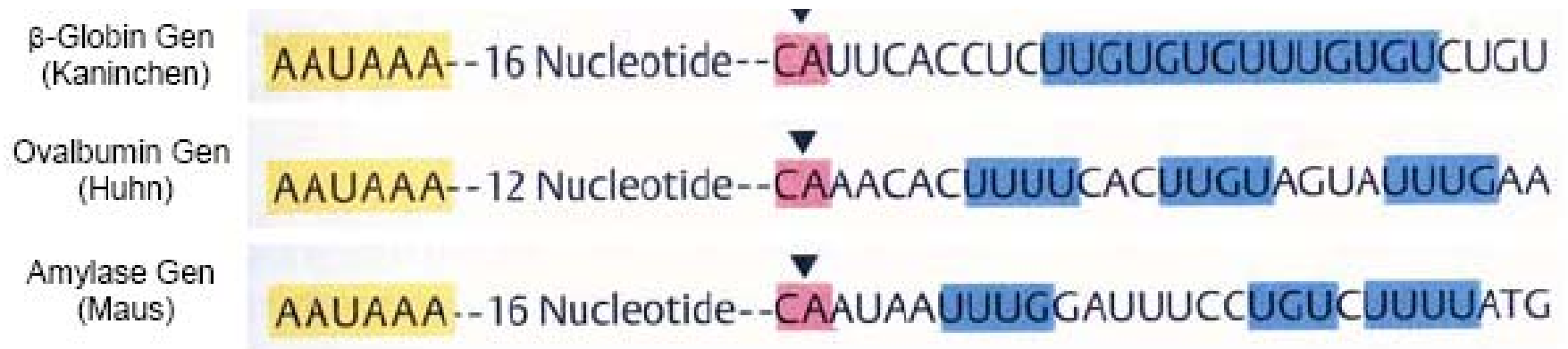
# RNA wird prozessiert



# Das 3'-Ende von eukaryontischen mRNAs



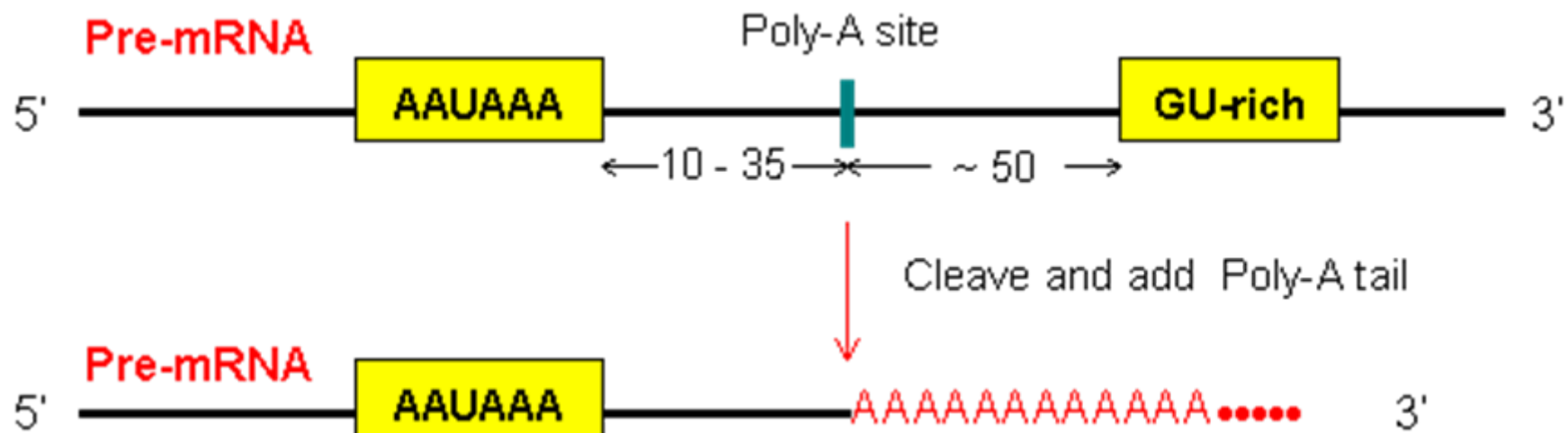
# Die Polyadenylierungsstelle

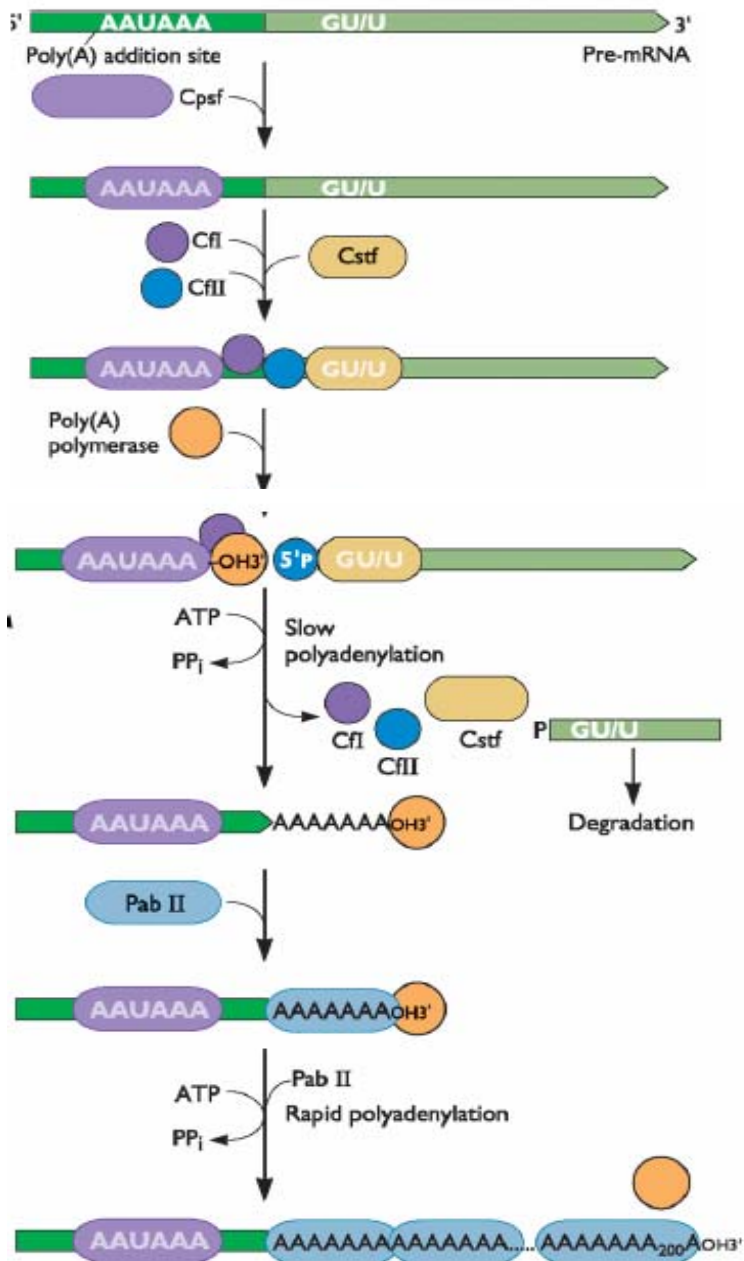


Polyadenylierungssignal

Polyadenylierungsstelle

Stromabwärtssequenzen





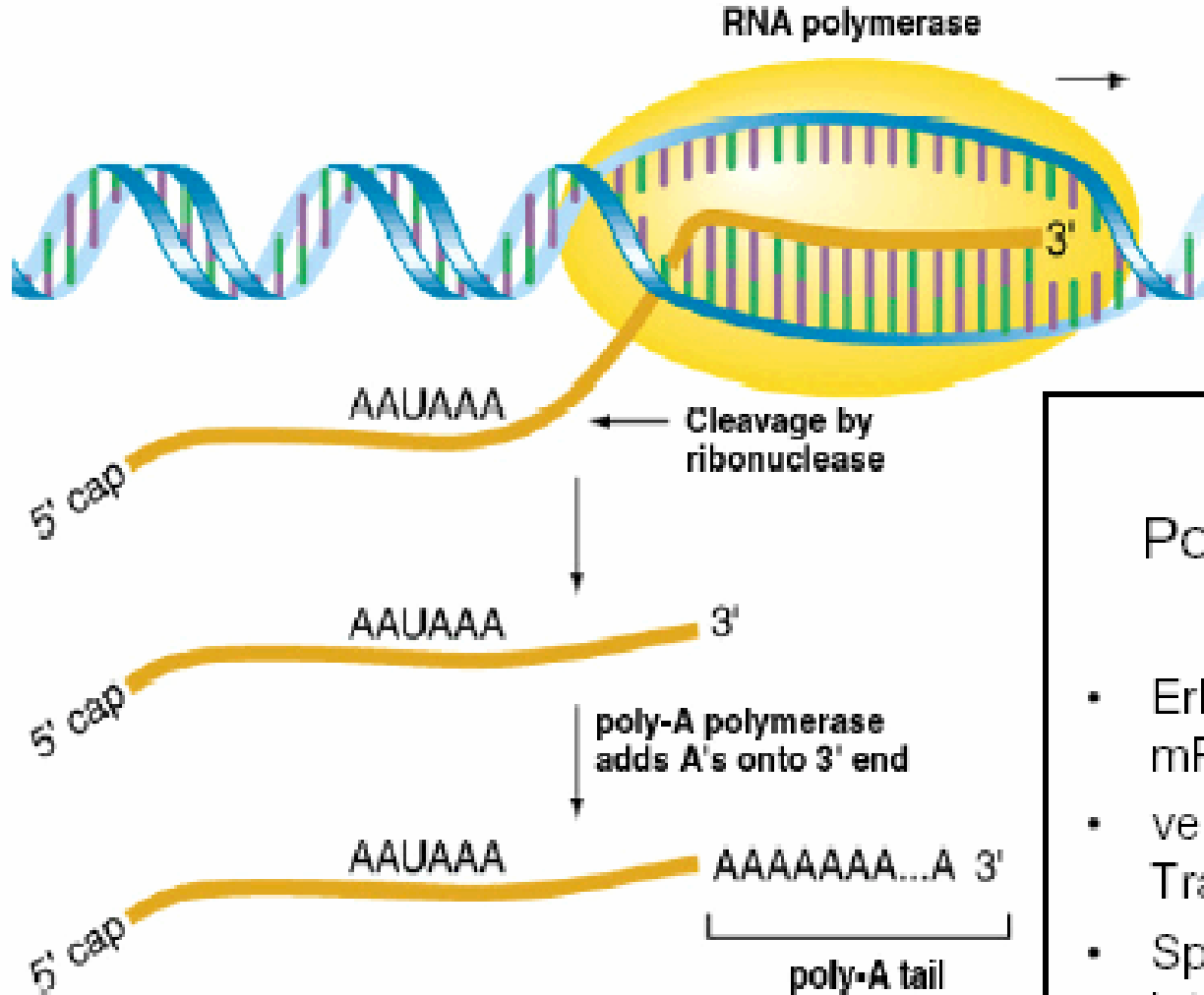
Polyadenylierung erfordert die Beteiligung von mehreren Proteinen

Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor (CPSF) bindet an AAUAAA.

Endonucleasen (CFI und CFII) spalten RNA Transkript mit Hilfe von cleavage stimulatory factor (CstF)

Poly(A)-polymerase (PAP) hängt 200-250 Adenosine dran

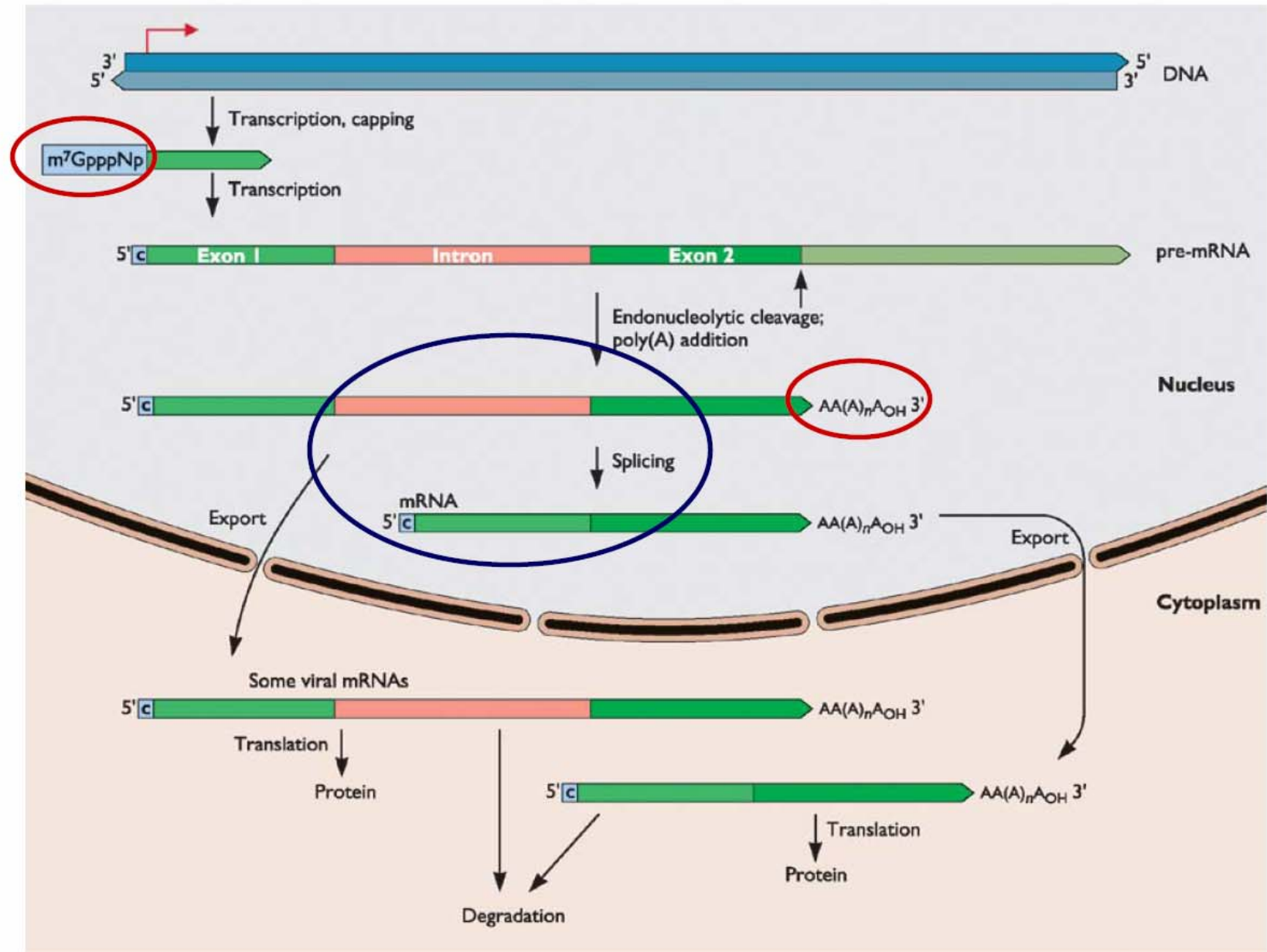
# Das 3'-Ende von eukaryontischen mRNAs



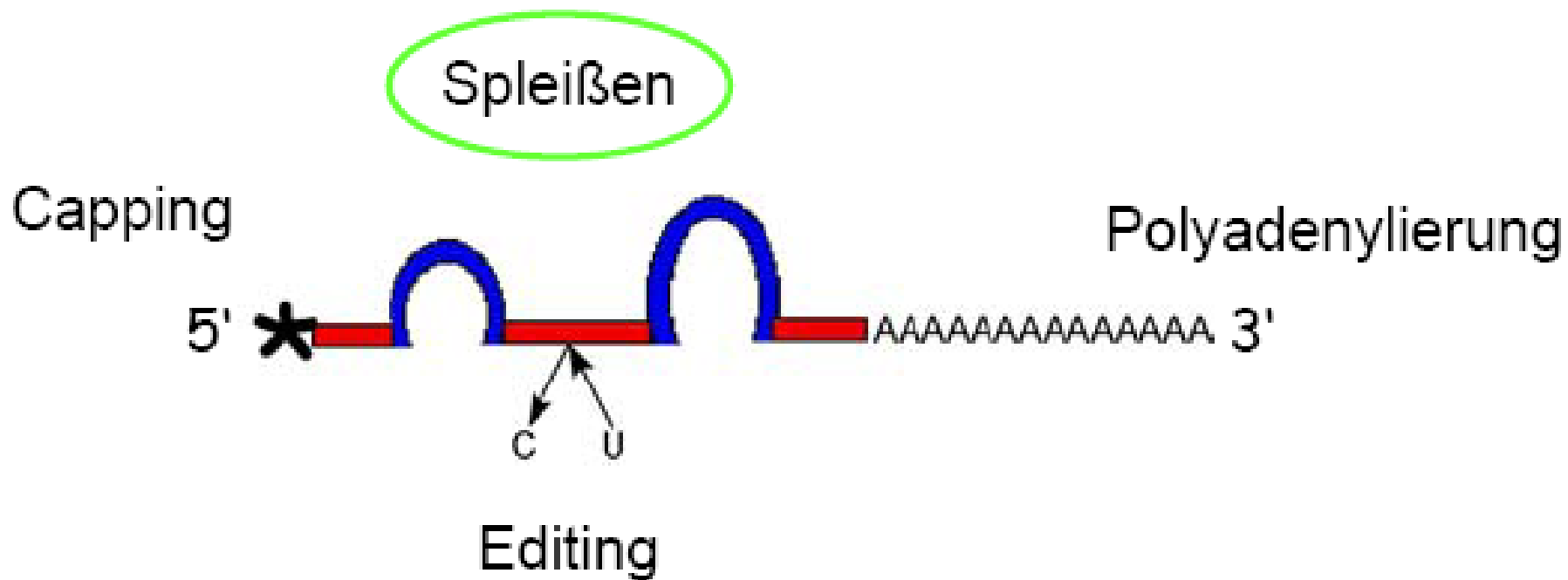
## Funktion der Polyadenylierung:

- Erhöhte mRNA-Stabilität
- verstärkte Translationeffizienz
- Spleißen des letzten Exons

# Prozessierung viraler oder zellulärer mRNA



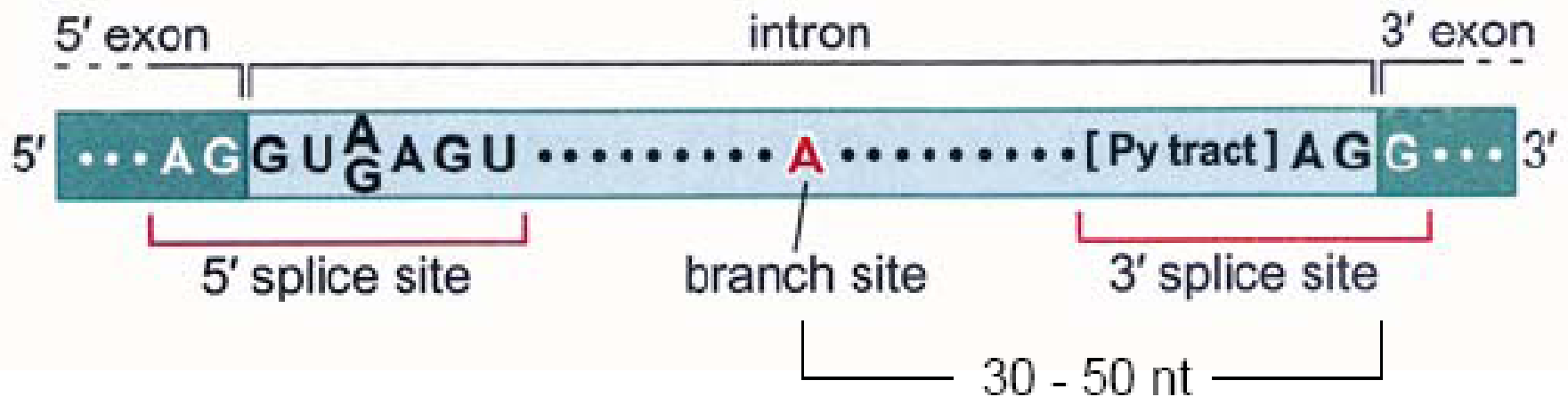
# RNA wird prozessiert



# Spleißen der prä-mRNA

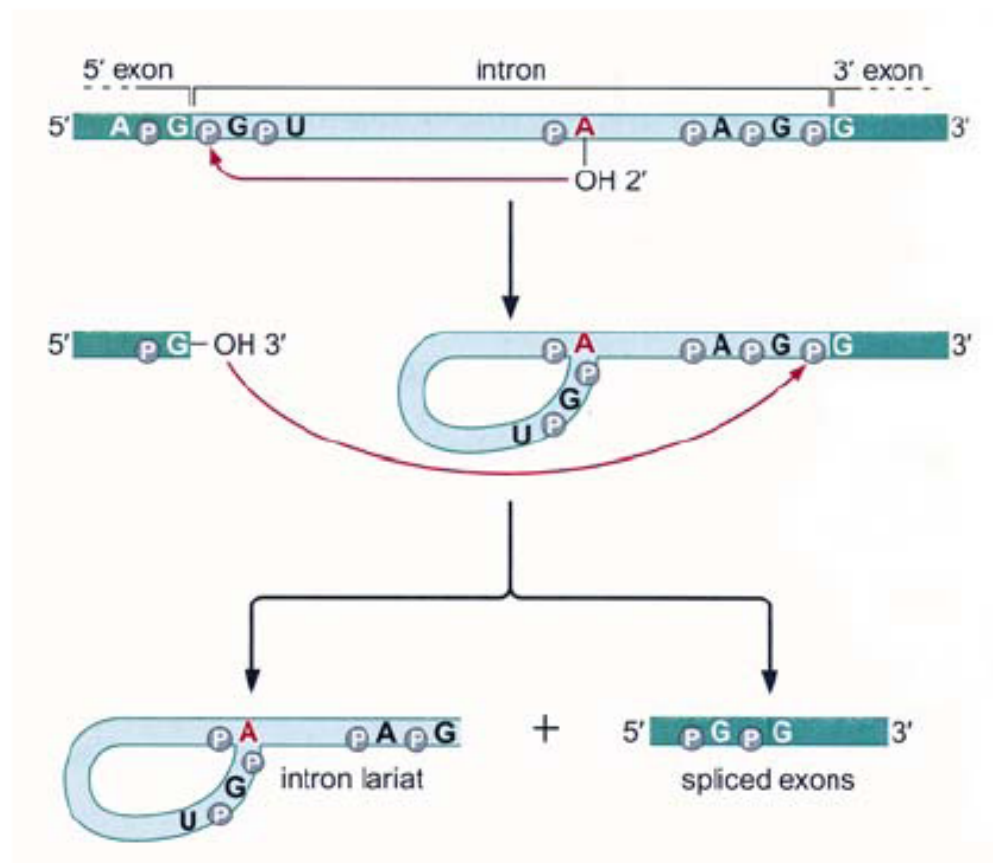
- RNA-Spleißen:  
**Introns** werden entfernt  
**Exons** werden zusammengefügt
- Wird durch das Spleißosom katalysiert (RNA + Protein)
- Der Spleißmechanismus muss sehr genau sein, damit das Leseraster bei der Translation gewahrt bleibt.

# Exon/Intron Übergänge sind oft konserviert

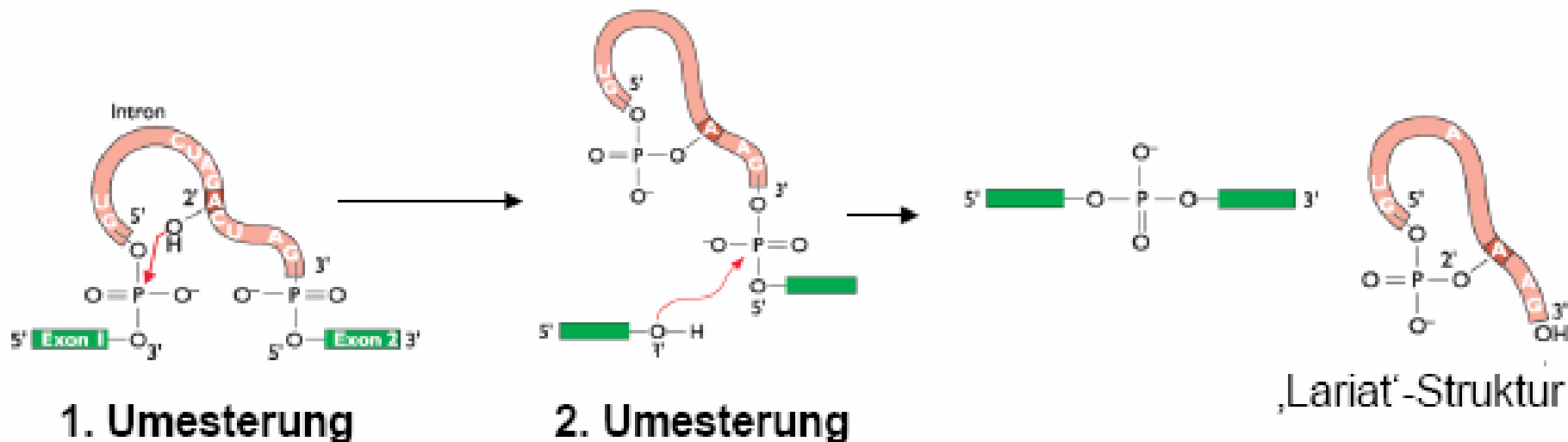
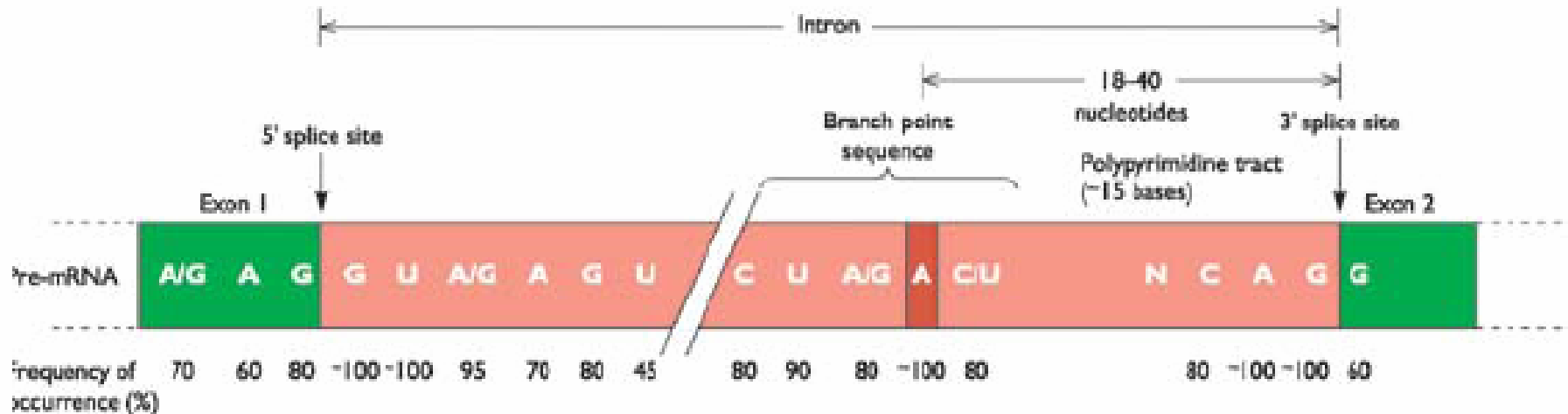


Fast alle Introns fangen mit „GU“ an und hören mit „AG“ auf

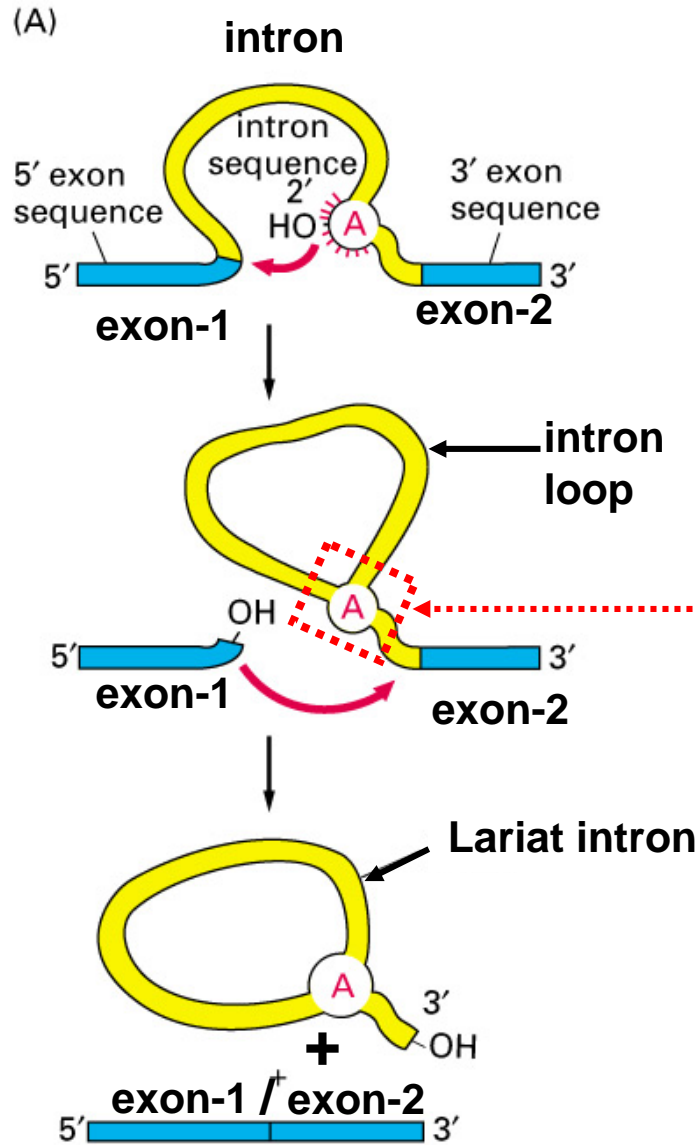
## Die Spleiß-Reaktion besteht aus zwei Schritten



# Splicing-Signale und Mechanismus der Splicing-Reaktion



# The Lariat Intron "Branch Point" (Closeup)



## (B) Covalent linkage to adenine (A)

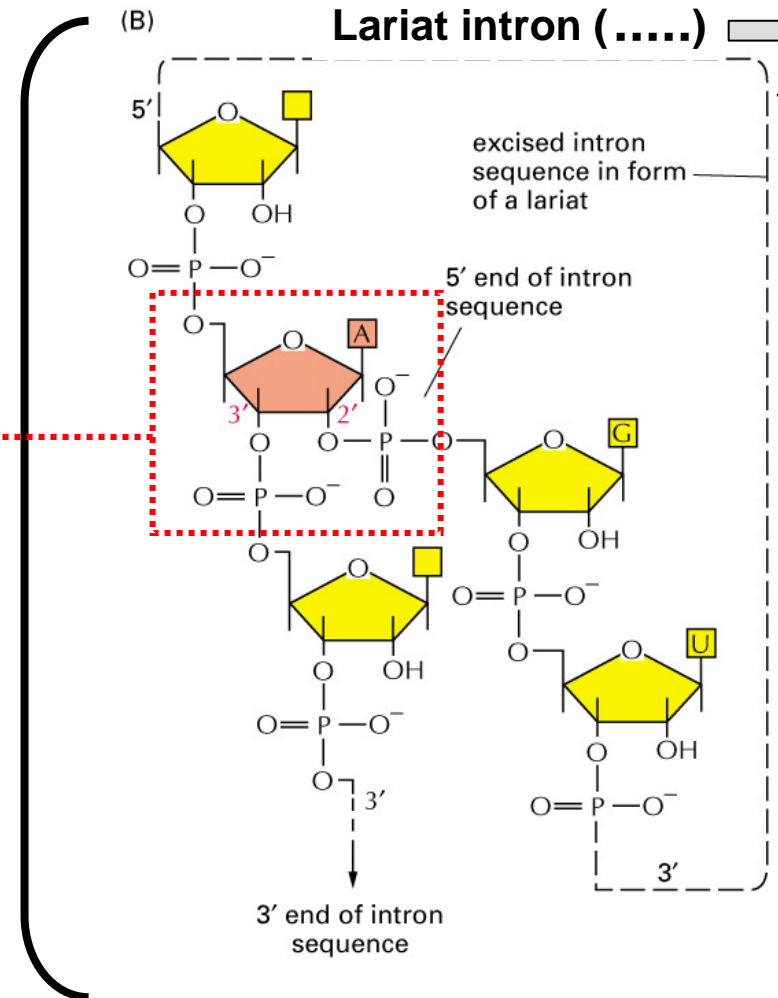
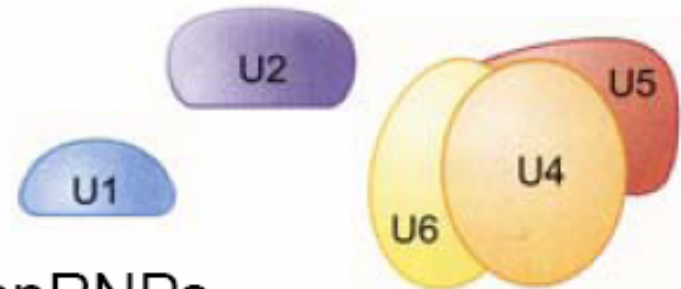


Fig 6-26 (A) Lariat Loop

# Komponenten des Spleißapparates

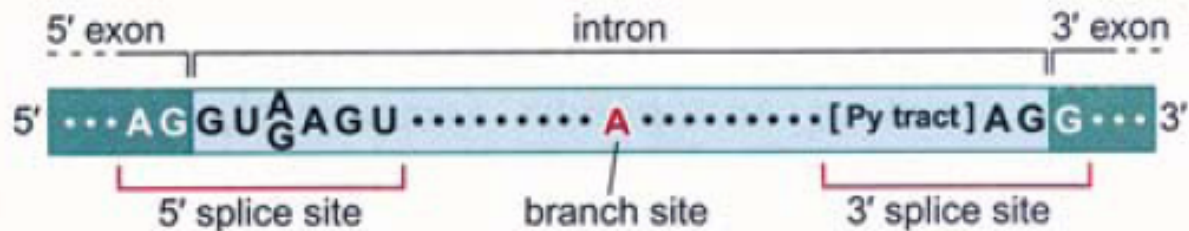
ca. 150 Proteine

5 RNA Moleküle (snRNA)

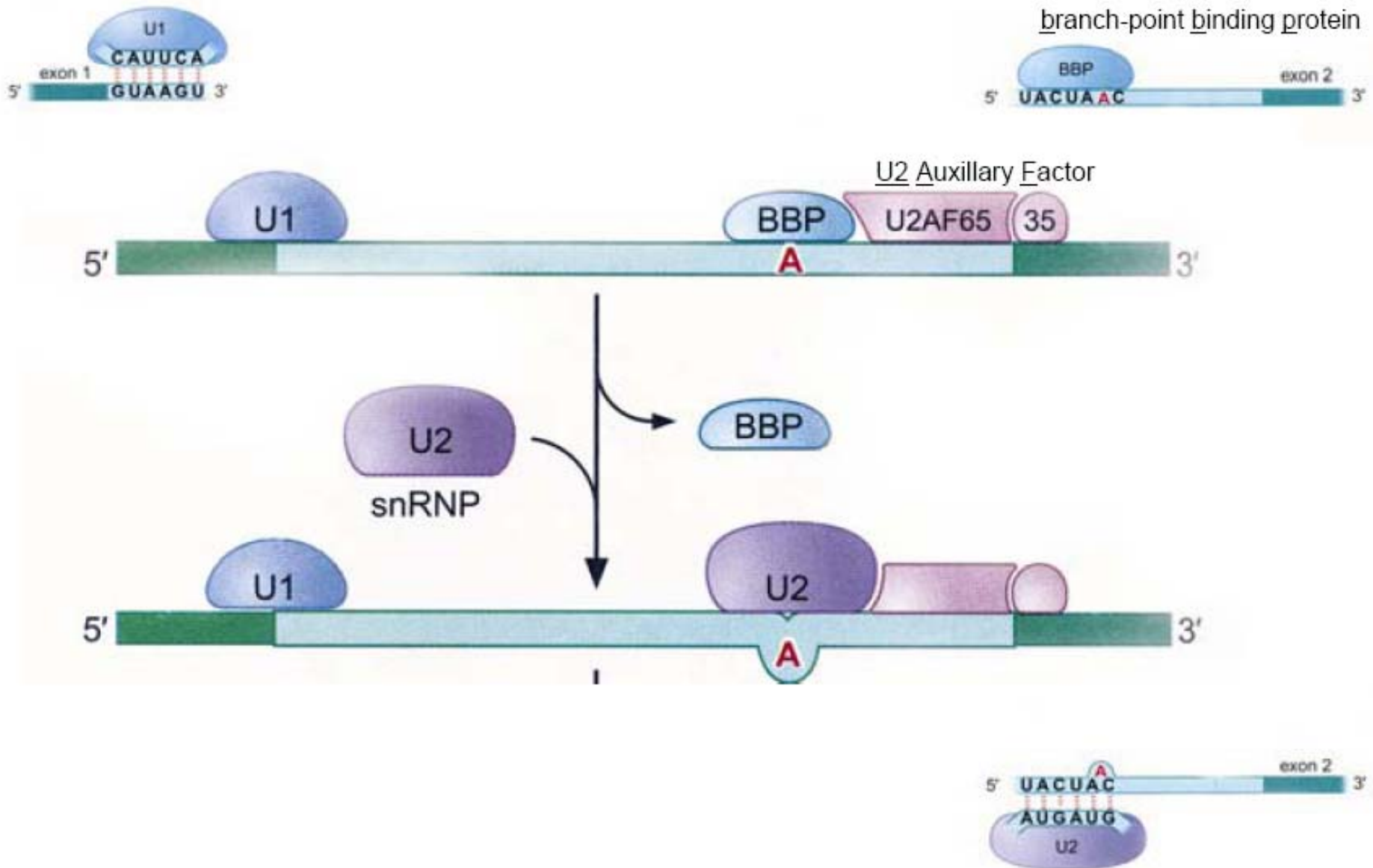


snRNPs

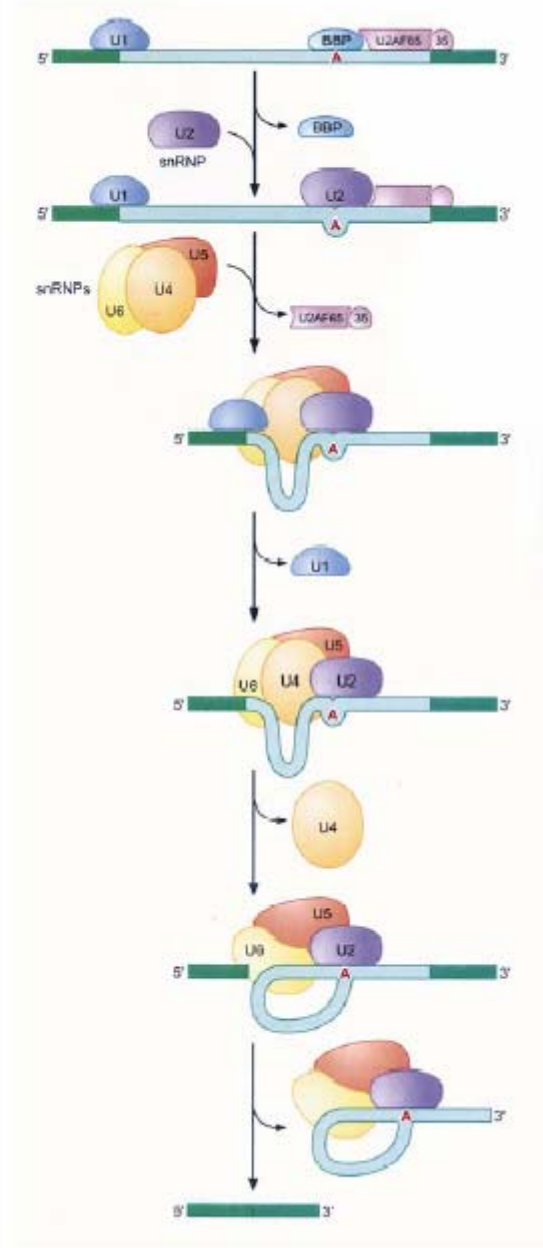
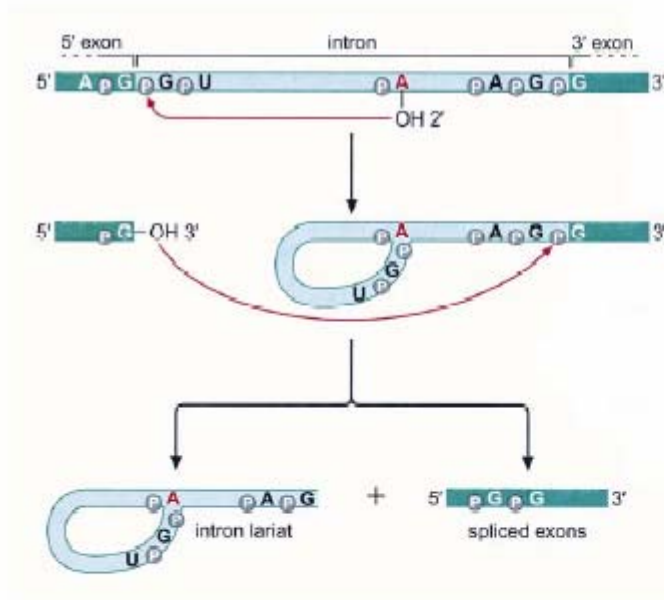
small nuclear RiboNuclear Proteins



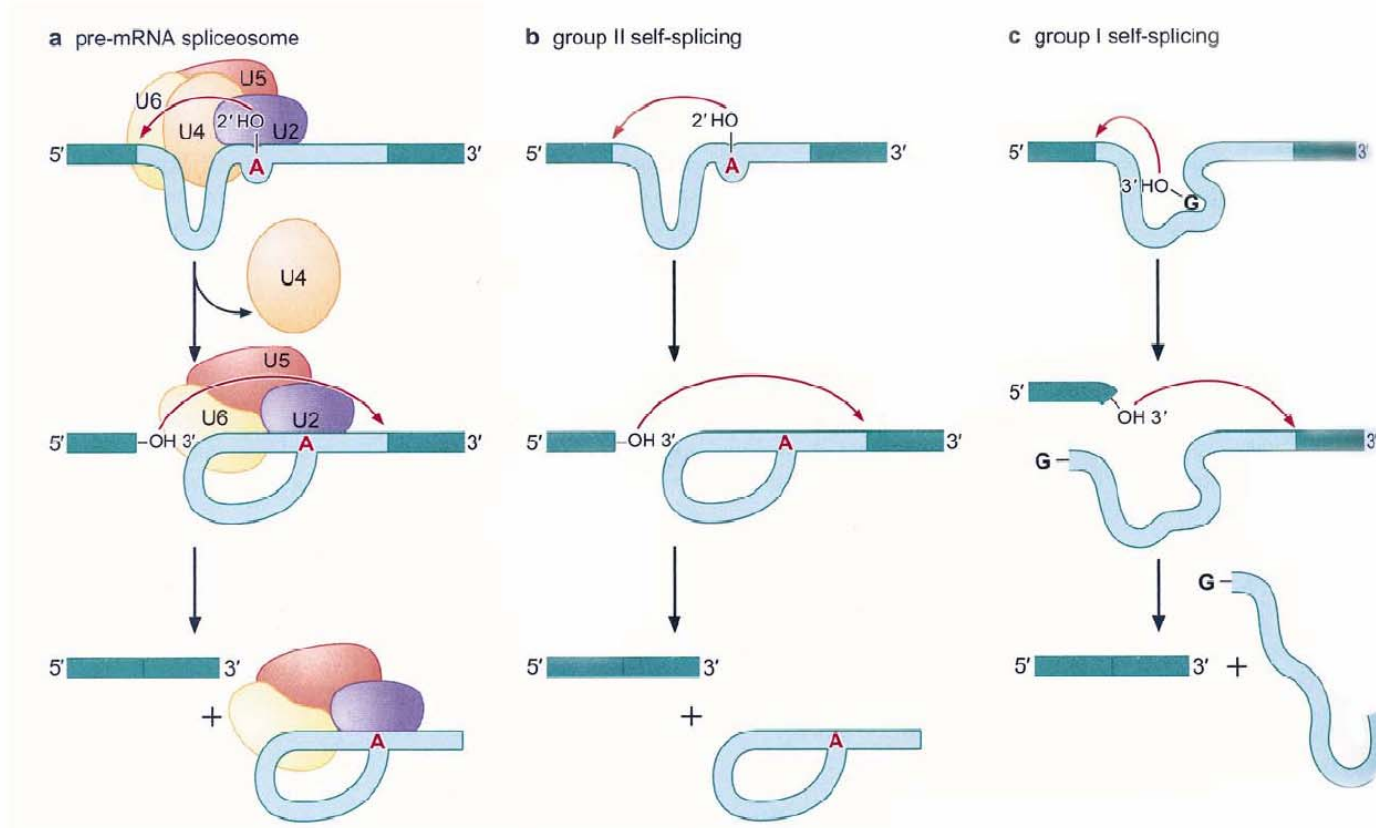
# Das Spleißosom setzt sich am Intron zusammen



# Die Spleißreaktion im Überblick



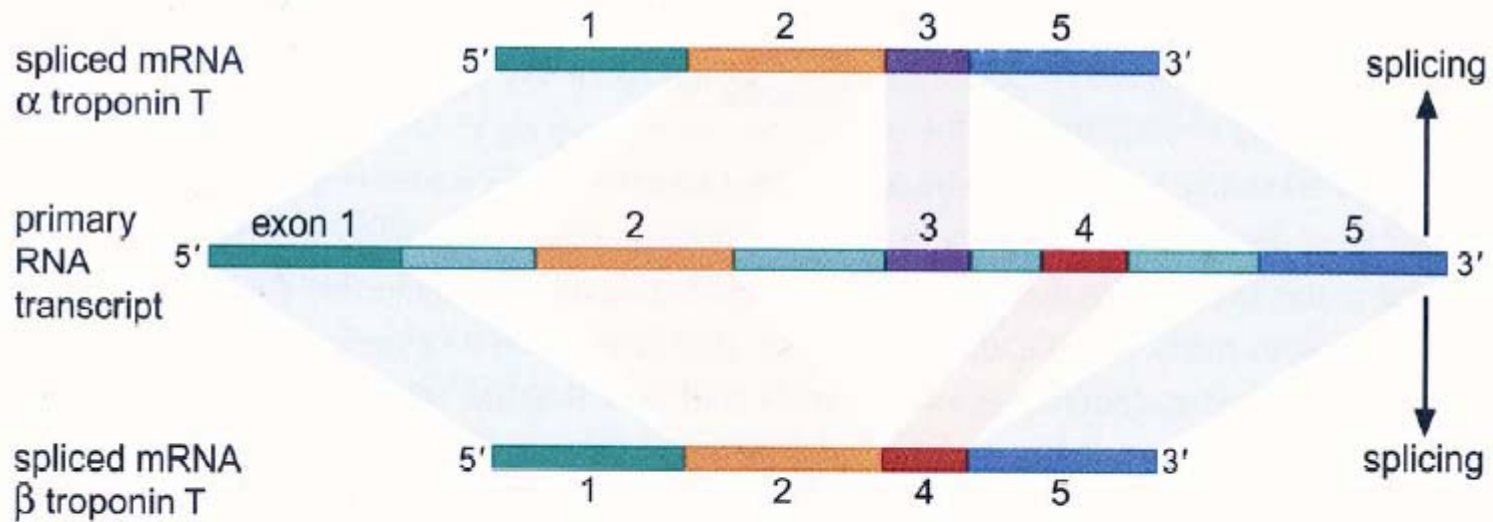
# Selbstspleißende Introns



RNA kann RNA spleißen

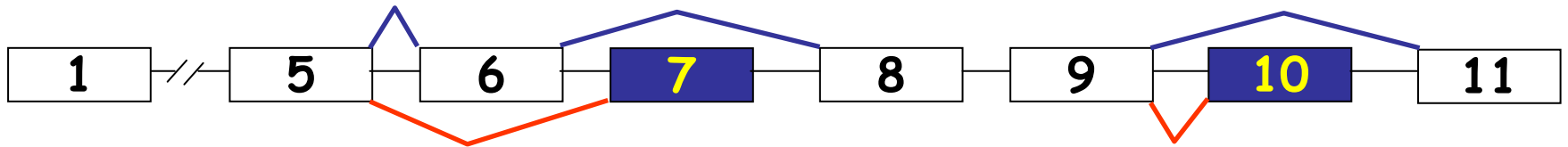
Nicht alle Introns werden von Spliceosomen entfernt: bei niederen Eukaryoten und den mitochondrialen Genen von Pilzen kommt auch Selbst-Spleißen vor, d.h. die RNA selbst hat hier enzymatische Aktivität (Ribozym).

# Alternatives Spleißen



Das Muskelproteingen Troponin T

# $\beta$ -tropomyosin alternate splicing



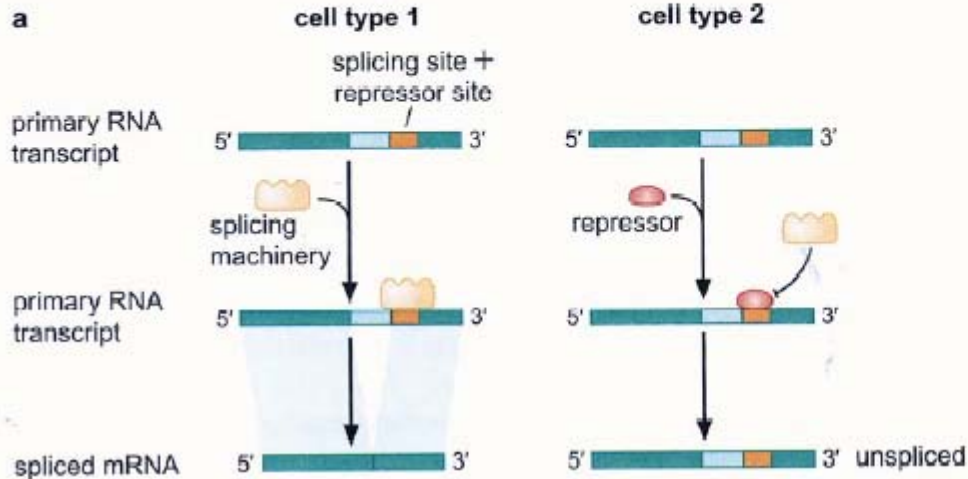
- Non-muscle cells skip exons 7 and 10
- Skeletal muscle cells splice in exons 7 and 10, skipping exon 6

## alternatives Spleißen

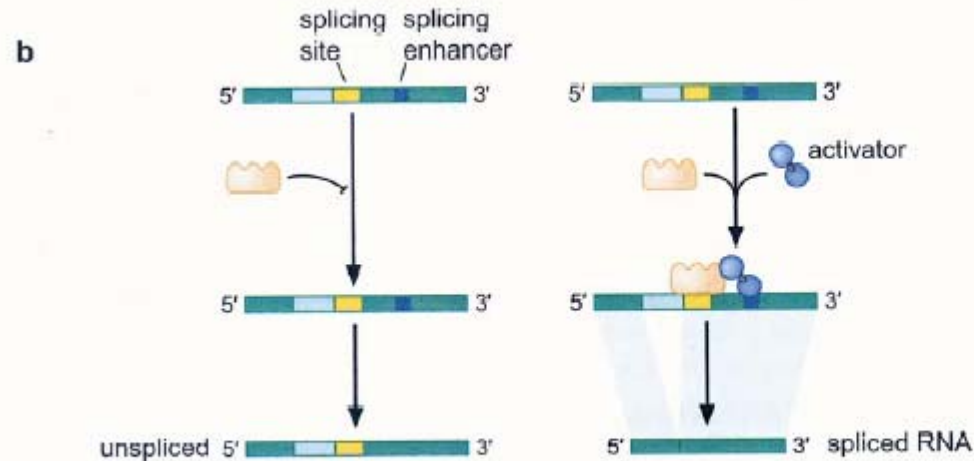
---

- RNA wird auf verschiedene Arten gespleißt
  - alternative Auswahl von 5' - und 3' -Spleißstellen
  - überspringen von Exons oder Introns
- dadurch kann ein Gen für verschiedene Proteine kodieren
- kann zell- oder gewebespezifisch erfolgen
- Schätzungen gehen z.B. für Säuger in Einzelfällen davon aus, dass mehr als tausend Proteine von einem Gen durch alternatives Spleißen gebildet werden

# Regulation des alternativen Spleißens



Exonic splicing silencers  
Intronic splicing silencers



Exonic splicing enhancers  
Intronic splicing enhancers

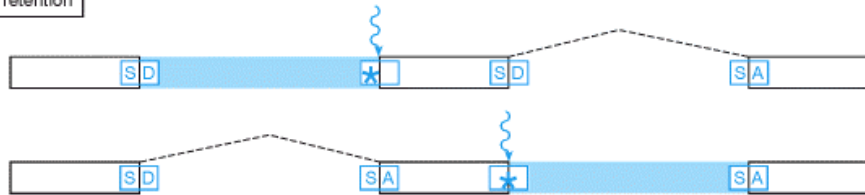
# Beim Splicing können Fehler unterlaufen

(A) Conserved splice donors (SD) and splice acceptor SA

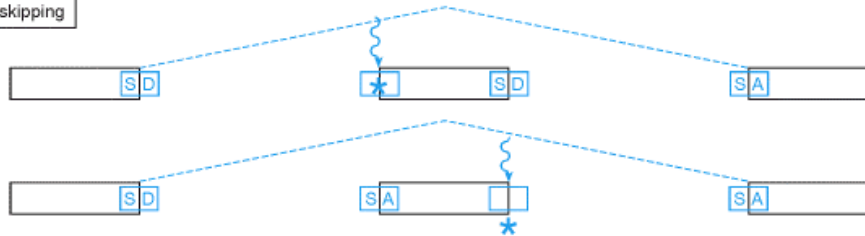
Normal splicing



Intron retention



Exon skipping



(B)

Activation of cryptic splice site

Activation of cryptic splice acceptor in intron 1

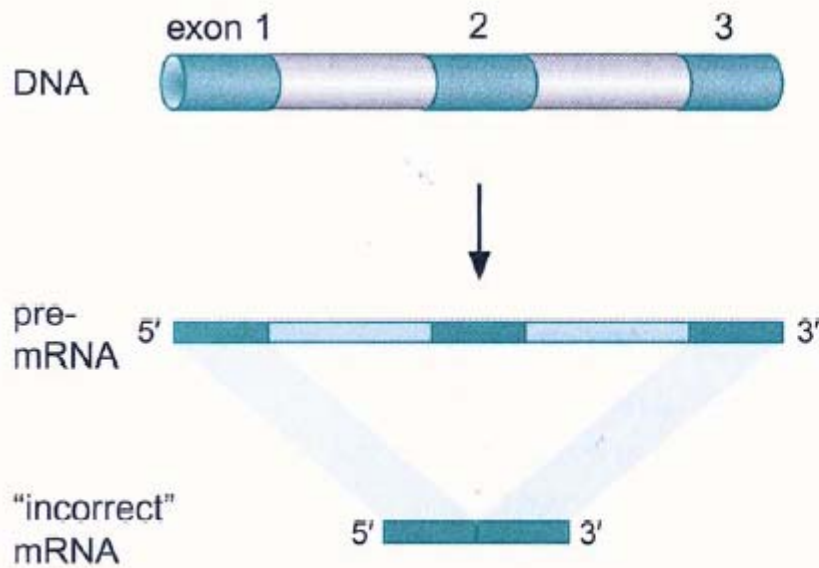


Activation of cryptic splice donor in exon 2

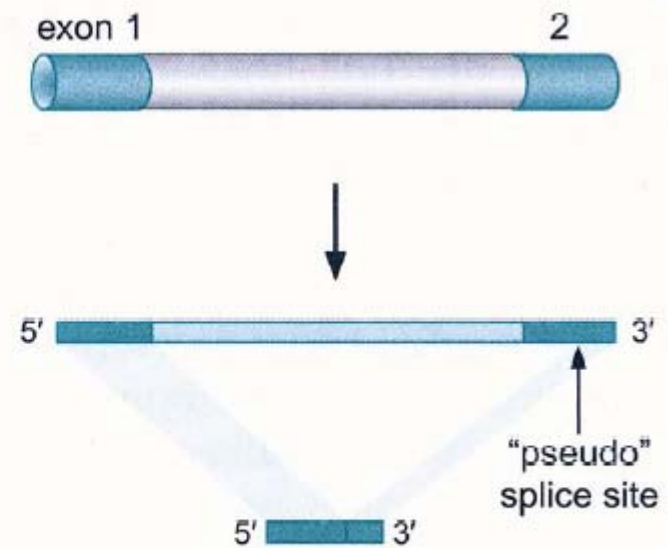


# Fehler bei der Wahl der Spleißstellen

**a** exon skipping

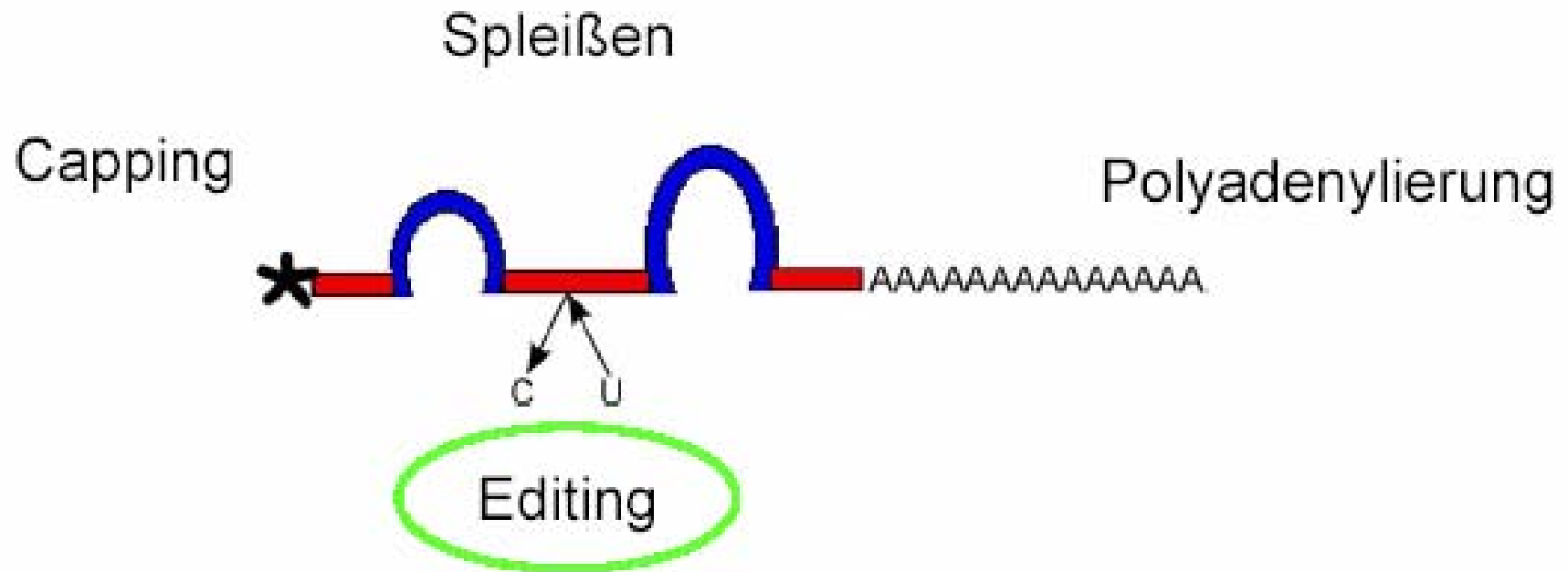


**b** pseudo splice-site selection





# RNA wird prozessiert



# RNA-Edierung

---

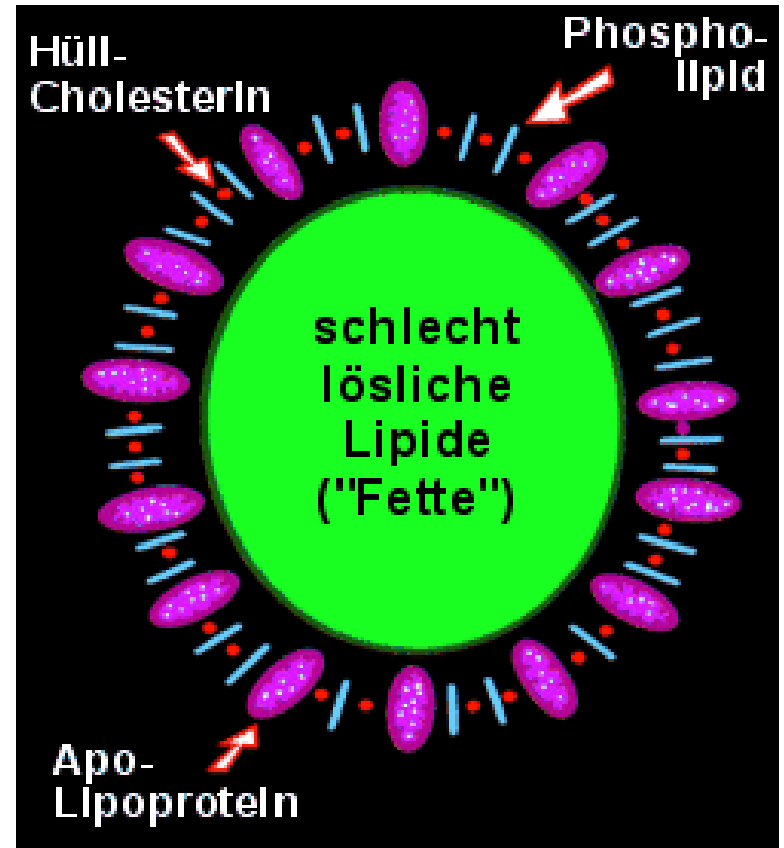
- besonderer Prozessierungsschritt
- hierbei werden einzelne Nukleotide in der RNA verändert
  - entfernt
  - hinzugefügt
  - verändert
- insbesondere mRNAs betroffen
  - seltener rRNA und tRNA
- dadurch ändert sich der Informationsgehalt der RNA gegenüber der DNA
- zahlreiche Beispiele bekannt
  - Transkripte im Zellkern von Säugern
  - Transkripte von Viren
  - Transkripte in Plastiden und Mitochondrien

## Apolipoprotein (Apo) B

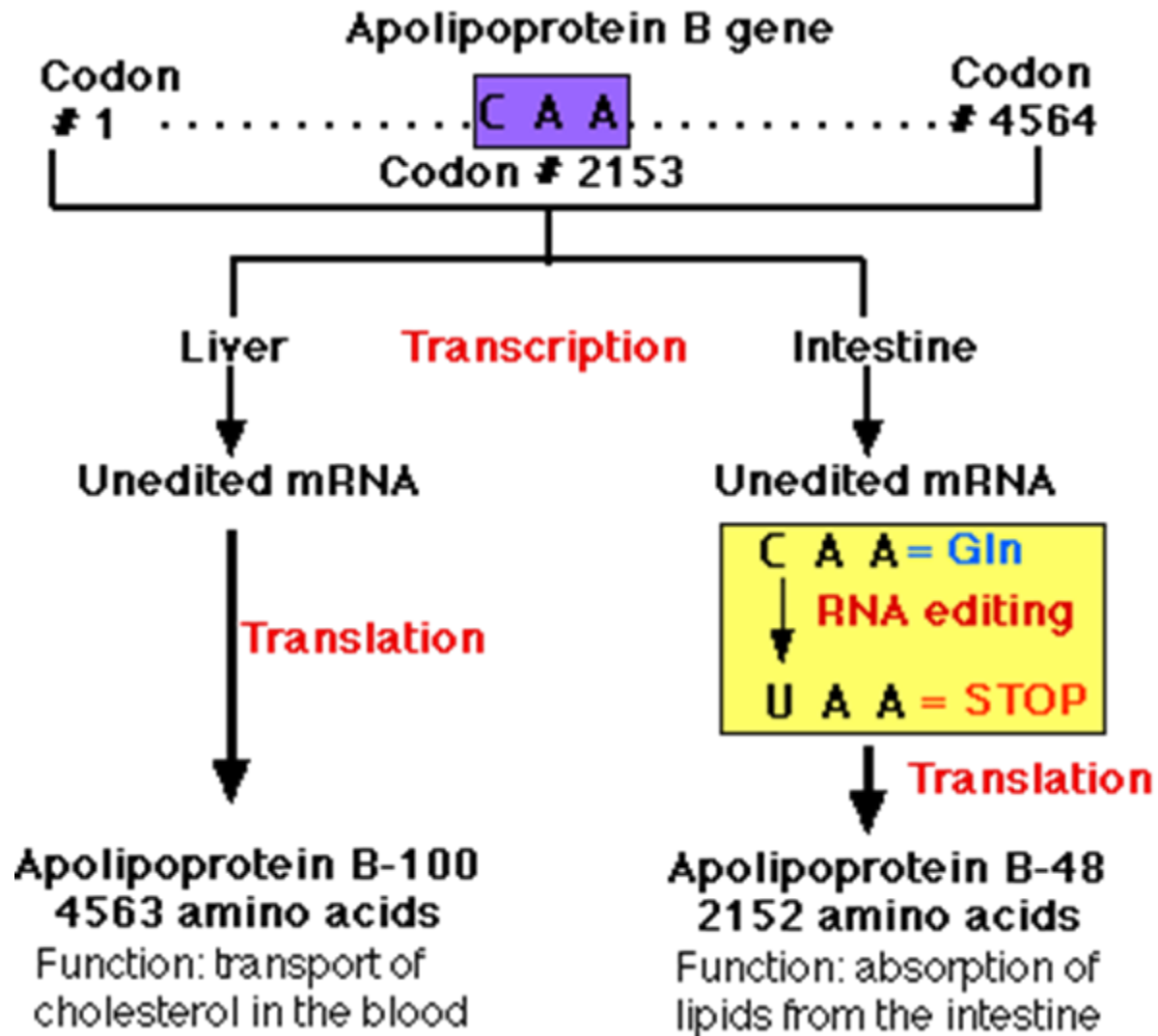
Das Apolipoprotein (Apo) B ist ein wichtiges Lipoprotein, das für den Transport von Fetten im Blut benötigt wird.

Dünndarm baut solche Lipoproteine auf und gibt auf diese Weise aus der Nahrung aufgenommenes Fett (Chylomicronen) ins Blut ab.

Auch die Leber bildet Lipoproteine, um die Fette (VLDL), die sie hergestellt hat, ans Blut abzugeben.



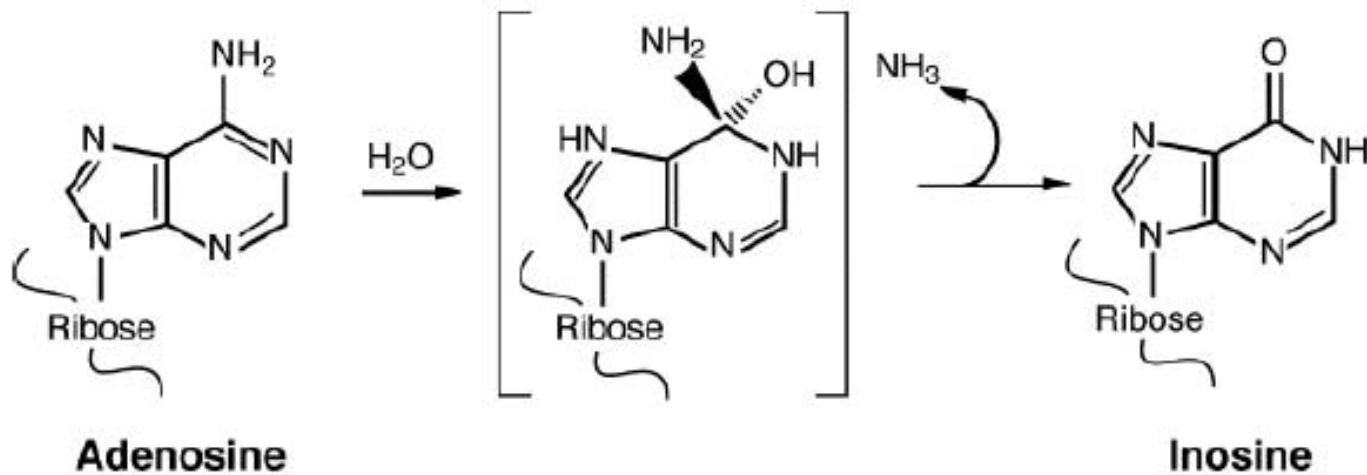
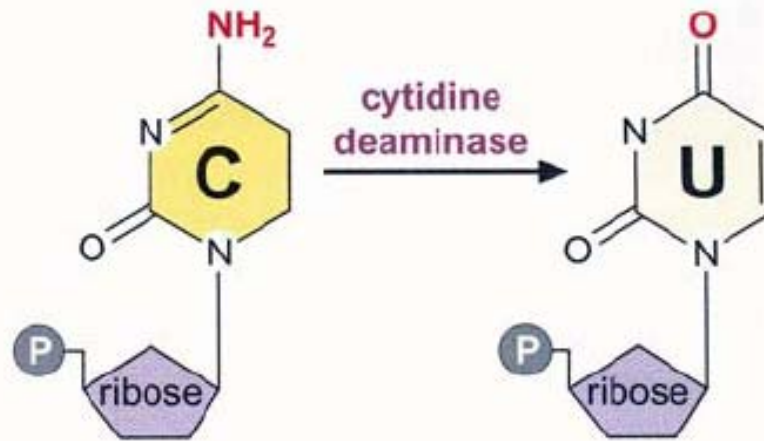
# Substitution Editing



## RNA-Edierung in der mRNA des Gens für das Apolipoprotein

- in der Leber Translation der Apolipoprotein mRNA zu einem B-100 Protein
- im Dünndarm an Position 2156 erfolgt eine RNA-Edierung C→U
- dadurch entsteht ein Stoppcodon
  - CAA (Glutamin) → UAA (Stopp)
- somit wird im Dünndarm nur ein kürzeres B-48 Protein gebildet
- Vorgang biochemisch gut charakterisiert

# RNA Editing durch Desaminierung von Cytidin oder Adenin



## **Folgen der Desaminierung**

- **Änderung eines Codons**
- **Einfügen von Spleiß-stellen**
- **Erweiterte Codonerkennung in tRNAs**

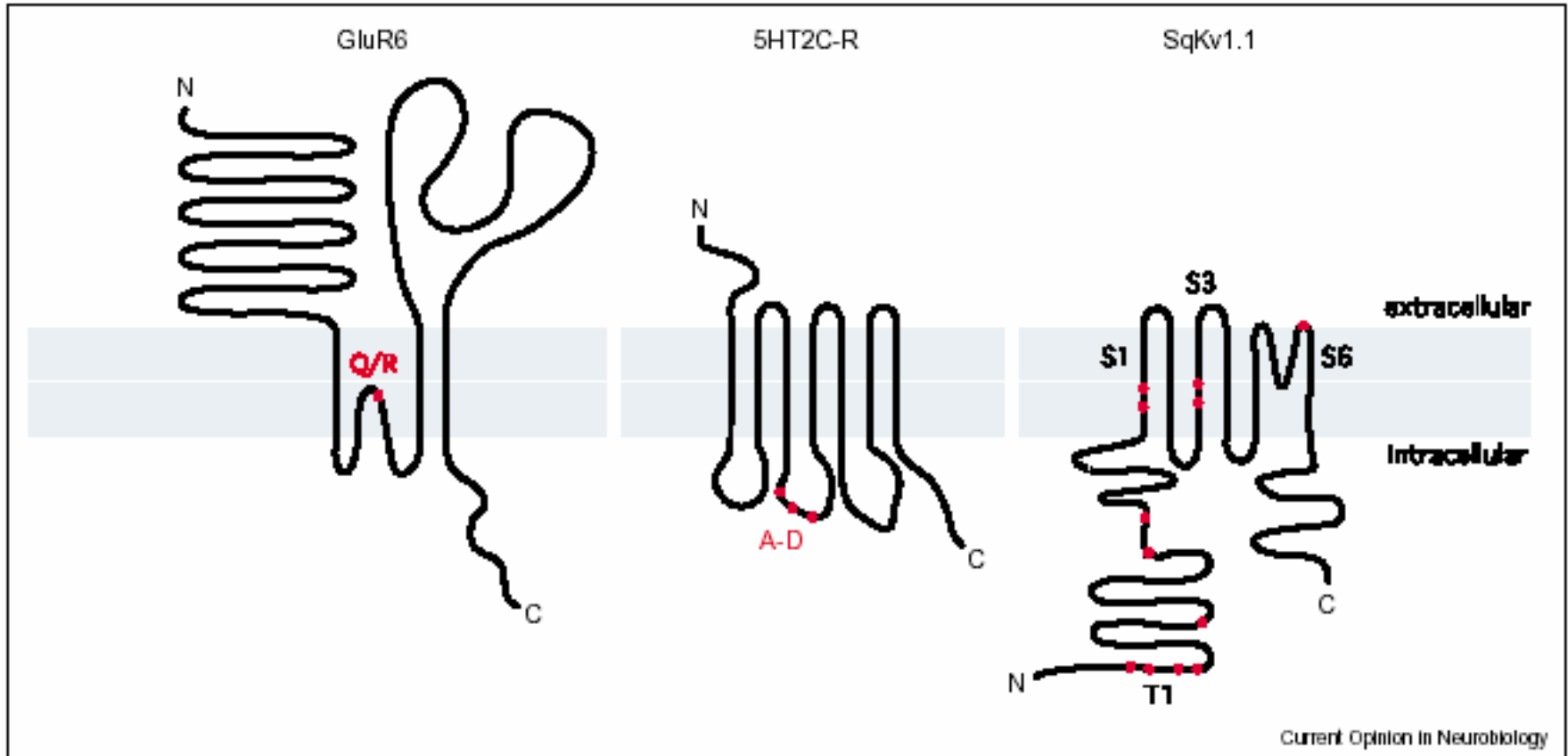
## RNA-Edierung in mRNAs für Kanalproteine im Gehirn

- mRNAs für einige Untereinheiten von *Glutamat-aktivierten Ionenkanälen* werden ediert
- A→I (Inosin) RNA-Edierung
- Inosin wird wie ein *Guaninnukleotid* in Kodonen translatiert
- regulative Funktion
- ganz neue Arbeiten zeigen eine reduzierte A→I RNA-Edierung in bestimmten Hirntumoren

Glutamatrezeptor

Serotoninrez.

Kalium-Kanal

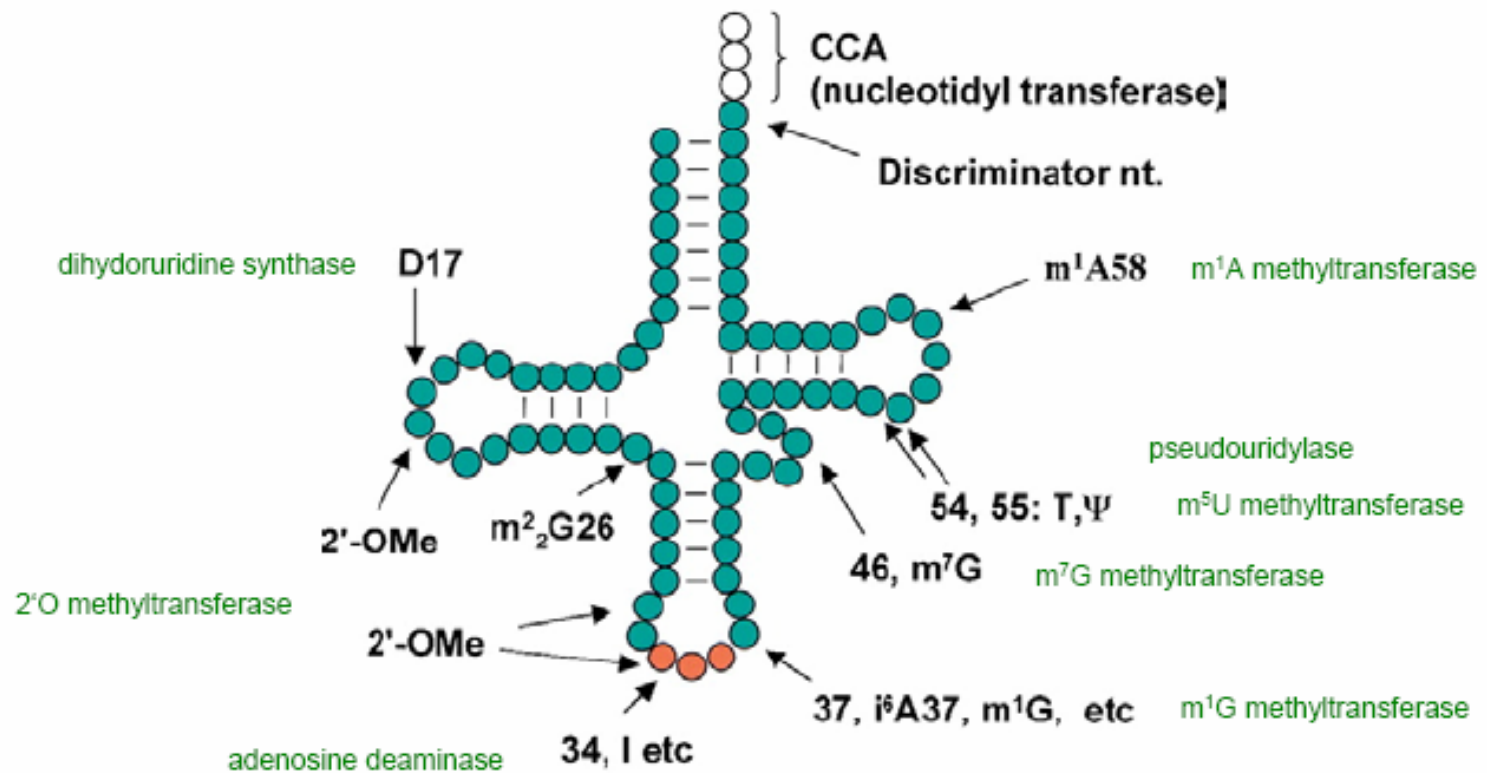


CAG / CIG

Glutamin / Arginin = Q / R

sauer / basisch

# Die tRNA Sequenz wird an vielen Stellen editiert



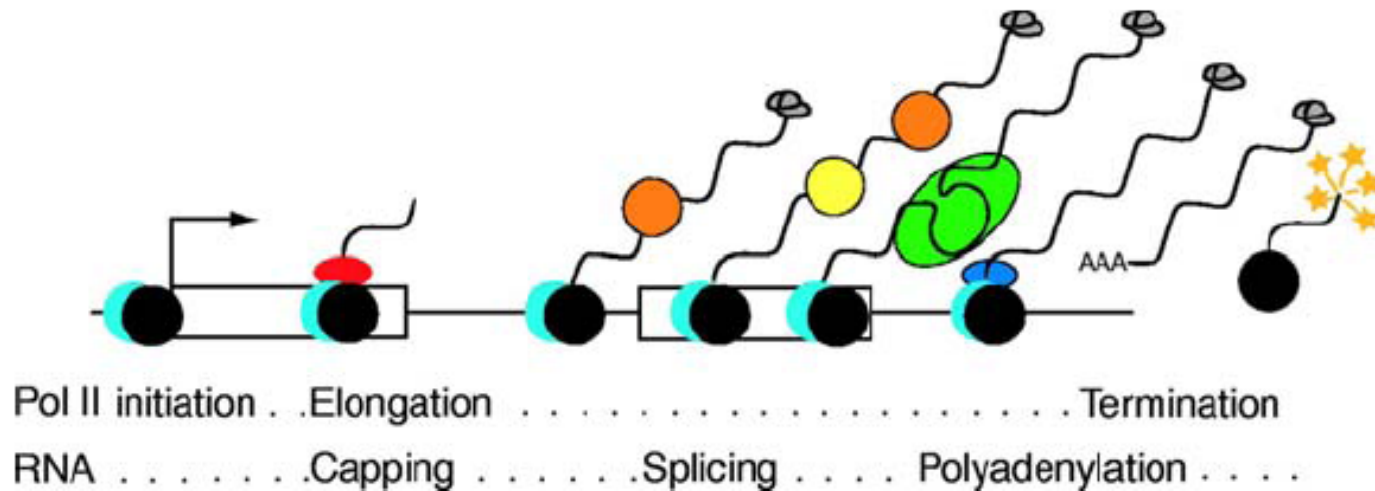
# Beispiele von RNA editing

Organism	Transcript	Effect of editing	Functional consequence	References	
Site-specific Mammals	GluR-B	Q → R	Decreases Ca <sup>2+</sup> ion permeability	[12,41,42]	
		R → G	Modulates gating kinetics	[12,42,43]	
		R → G	Unknown	[12,42,43]	
		R → G	Unknown	[12,42,43]	
		Q → R	Unknown	[12,42,44]	
	GluR-6	Q → R	Increases Ca <sup>2+</sup> ion permeability	[12,42,44]	
		I → V	Modulates Ca <sup>2+</sup> ion permeability	[12,42,44]	
	5-HT <sub>2c</sub> R	Y → C	Unknown	[12,42,44]	
		2xI → V, N → S	Decrease G-protein coupling efficiency	[12,45]	
		I → M, N → D	Unknown	[12,45]	
<i>Drosophila melanogaster</i>	ADAR2	N → G	Unknown	[12,45]	
		New 3' splice site	Generates an isoform expressed at low levels	[17,54]	
	Voltage-activated channel ( <i>para</i> )	Na <sup>+</sup> 3xQ → R, 2xK → R, Y → C, M → V, N → D, N → S, 2 silent changes	Unknown	[39,46]	
	Voltage-gated Ca <sup>2+</sup> channel subunit Dmca1A ( <i>cac</i> )	3xN → S, S → G, I → M, S → G, M → V, N → S, N → D, R → G	Unknown	[39,47,48]	
Hepatitis delta virus (HDV)	Antigenomic RNA	Glutamate-gated Cl <sup>-</sup> channel ( <i>GluCl-α</i> )	I → V, K → R, N → S, 1 silent change	Unknown	[39,49]
		<i>DADAR</i>	S → G	Affects activity or substrate specificity (?)	[19]
Eukaryotes	tRNA <sup>Ala</sup>	STOP → W	Enables switch from replication to packaging	[12,55,56,58]	
		A → I at position 37 (3' adjacent to the anticodon)	Increases translation efficiency and fidelity (?)	[11,15,16,101]	
Eukaryotes	tRNAs (7 or 8)	A → I at position 34 (wobble base of the anticodon)	Increases translation efficiency and fidelity and allows multiple codon decoding by the same tRNA (?)	[11,15,16,101]	
Prokaryotes Hyperediting	tRNA <sup>Asp</sup>				
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>4f-rnp</i>	Multiple aa changes, 1 intronic nt change	Unknown	[62,63]	
<i>Loligo peali</i> (squid)	K <sup>+</sup> channel (sqKv2)	Y → C, I → V	Affect rates of channel closure and slow inactivation	[64]	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	UTRs	Multiple other aa changes Multiple nt changes	Unknown Affect translation, RNA stability or -export (?)	[77]	
<i>Homo sapiens</i>	Haematopoietic cell phosphatase (PTPN6)	Multiple aa changes, 1 intronic nt change	Might lead to synthesis of a non-functional protein	[65]	
Measles virus	Negative-strand genomic RNA	Multiple nt and aa changes	Prevent normal viral protein synthesis, leading to a switch from lytic to persistent infection	[12,72]	
Polyoma virus	Early-strand transcripts	Multiple aa changes	Prevent early-strand transcript export, leading to a switch from early to late phase of viral infection	[12,73]	

# Transkription und RNA Prozessierung sind gekoppelt

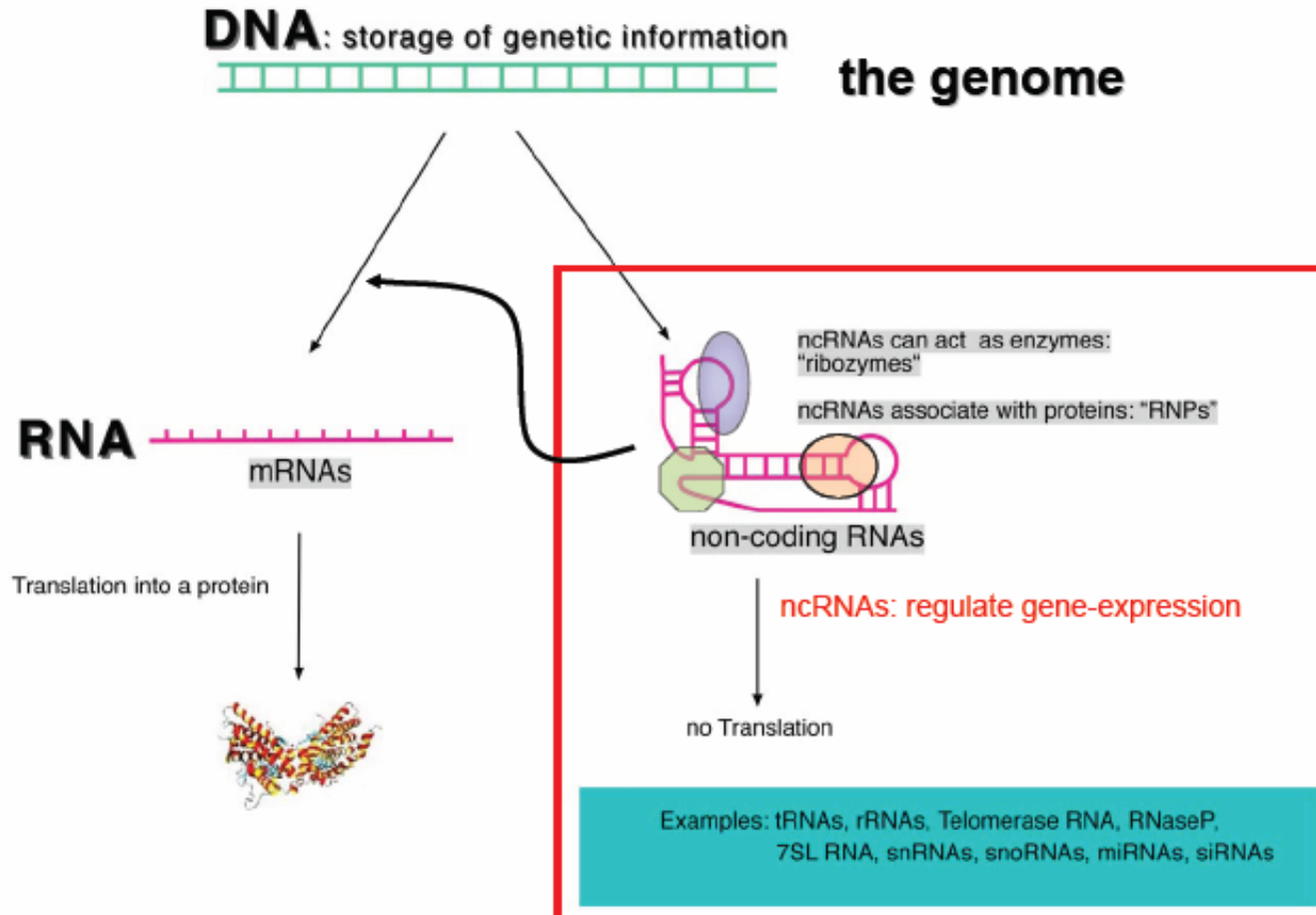
Einige Eckdaten:

- Capping erfolgt, wenn die RNA erst 20 – 40 nt lang ist
- RNA Pol synthetisiert 1000 - 1500 nt/min
- snRNP wird an die 3' Spleißstelle rekrutiert 48 sec nach deren Synthese
- Intron-Verlust 3 min nach Rekrutierung der snRNPs



# Nicht-kodierende RNA Moleküle als Regulatoren der Genexpression

## Protein-coding and non-protein-coding RNAs



# Non-coding RNAs

---

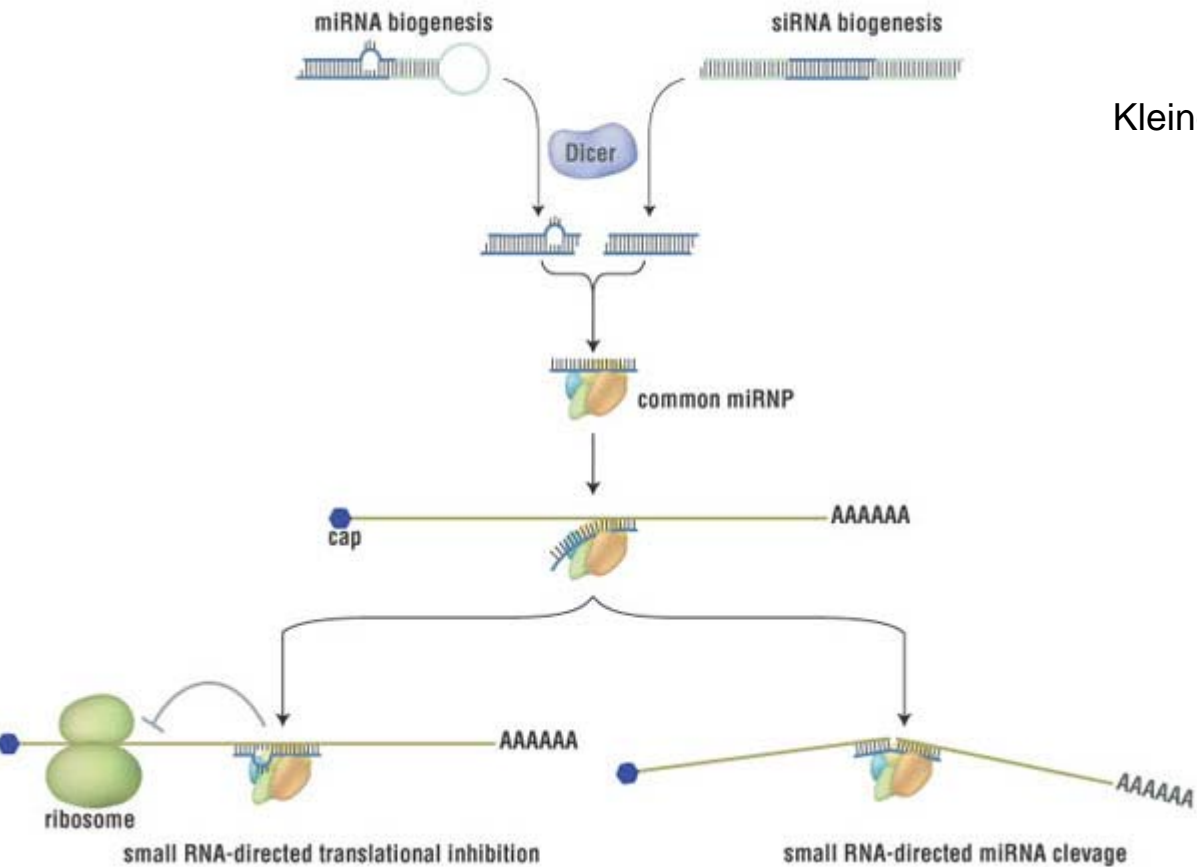
ncRNA	Non-coding RNA	all RNAs other than mRNA
frNA	Functional RNA	essentially synonymous with non-coding RNA
snmRNA	Small non-mRNA	essentially synonymous with small ncRNAs
miRNA	MicroRNA	putative translational regulatory gene family
stRNA	Small temporal RNA	for example, <i>lin-4</i> and <i>let-7</i> in <i>Caenorhabditis elegans</i>
( siRNA	Small interfering RNA	tRNA Transfer RNA active molecules in RNA interference)
rRNA	Ribosomal RNA	
snRNA	Small nuclear RNA	includes spliceosomal RNAs
snoRNA	Small nucleolar RNA	most known snoRNAs are involved in rRNA modification



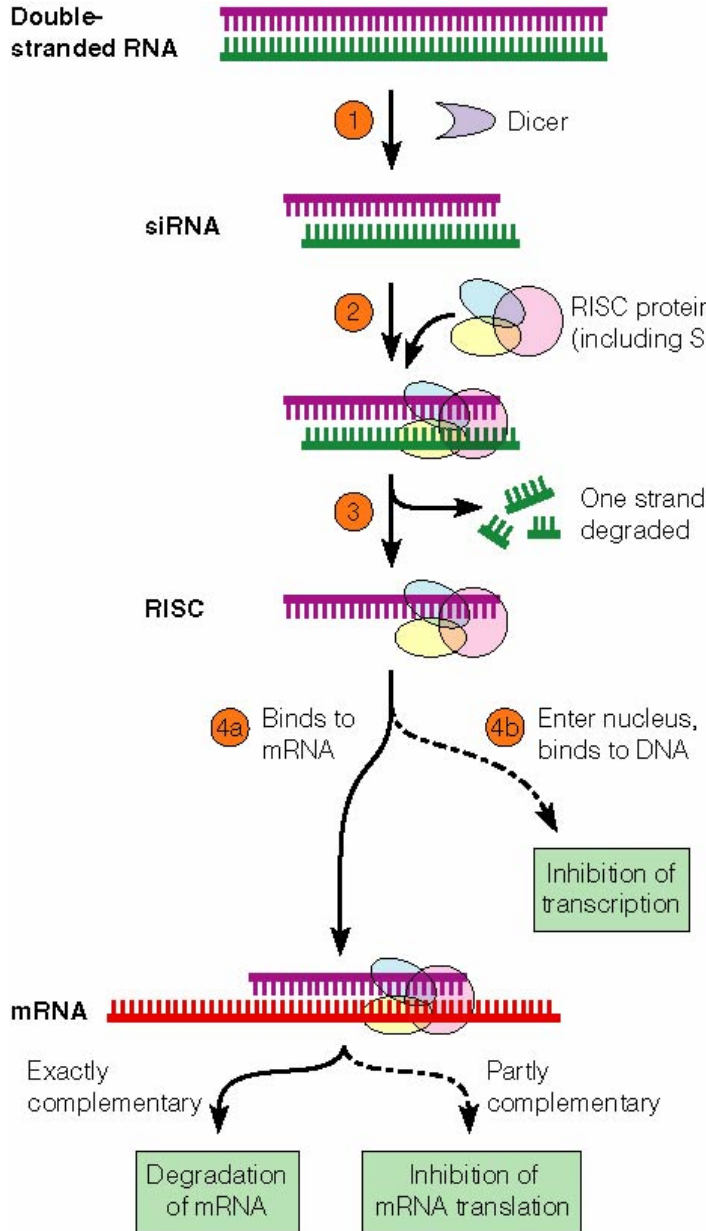
# RNAi: RNA interference

- siRNA: short interfering RNAs
- miRNA: micro RNA

Kleine dsRNA Moleküle von 20-25nt Länge



# siRNA: short interfering RNAs



Kleine dsRNA Moleküle von 20-25nt Länge, die durch die Ribonuclease Dicer aus hnRNA geschnitten werden.

Binden an Proteine: RISC = RNA-induced silencing complex

Abbau eines Strangs

Anderer Strang kann

- an komplementäre Sequenzen der mRNA binden → Translation inhibiert, oder mRNA degradiert
- an genomische DNA Sequenzen binden → Inaktivierung von Genen

## Zusammenfassung RNA Prozessierungsschritte:

- **Hinzufügen von Sequenzen**
  - 5' cap
  - 3' PolyA
  - Einige nt durch Editing
- **Entfernen von Sequenzen**
  - Splicing von Introns
  - Degradation
- **Sequenzänderung**
  - Editing
- **Relokation**
  - Kernexport
  - Transport innerhalb des Zytoplasmas