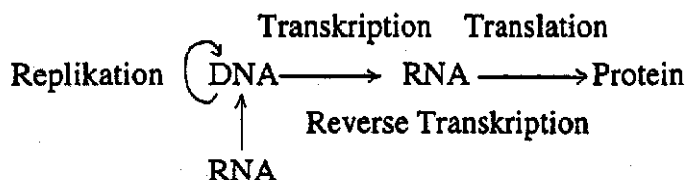


# Vorlesung Molekularbiologie II (SS 2001)

## Transkription (Otmar Huber)

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie



Eigenschaften der drei RNA Arten in E.coli:

RNA Spezies	Sed. Koef.	MW in kDa	Nucleotide pro Molekül	Zahl der Moleküle pro Zelle	% Gesamt-RNA	% DNA	Funktion
rRNA	23 S	$1,2 \times 10^3$	3700	10000-50000	> 80 %	ca. 0,1	Aufbau der Ribosomen
	16 S	$0,55 \times 10^3$	1700	10000-50000		ca. 0,1	
	5 S	$3,6 \times 10^1$	120	10000-50000		ca. 0,1	
tRNA	4-5 S	$2,5 \times 10^1$	75	10000	10 %	ca. 0,02	Adapter
mRNA	8-30 S	heterogen	heterogen	heterogen	2-5 %	> 99	Matrize

Die rRNAs von Eukaryonten unterscheiden sich in ihrer Größe zu den Prokaryonten rRNAs: 28S, 18S, 5S; die 5,8S rRNA findet sich nur in Eukaryontenzellen.

Codierende Sequenz/ Codogener Strang:

Die codierende Sequenz entspricht der Sequenz der RNA bzw. der Sequenz des bei der Transkription nicht als Matrize dienenden DNA-Stranges (Antisinn-Strang, Crick-Strang). Als codogenen Strang bezeichnet man den während der Transkription abgelesenen DNA-Strang (Sinn-Strang, Watson-Strang).

Aufbau der E. coli RNA-Polymerase:  $\alpha 2\beta\beta'\sigma$

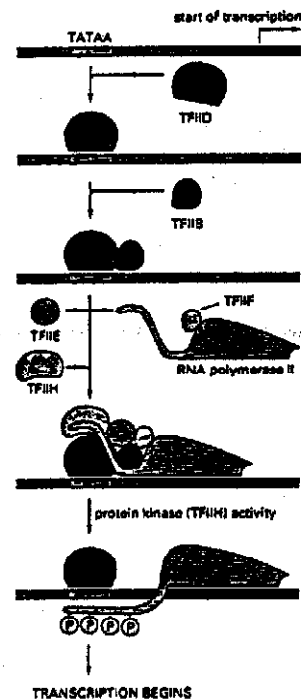
Der  $\sigma$ -Faktor erhöht die Affinität für Promotor-DNA um den Faktor  $10^4$ . Etwa 10 Nucleotide nach dem Start dissoziiert der  $\sigma$ -Faktor ab. Die RNA-Polymerase verlängert den RNA-Strang mit einer Rate von 50 Nucleotide/s (17nm/s).

RNA-Polymerasen benötigen keine Primer für den Transkriptionsstart. RNA-Synthese erfolgt in 5'-3' Richtung.

Eukaryontische RNA-Polymerasen:

Enzym	$\alpha$ -Amanitin	Lokalisation	Funktion
RNA-Pol I (A)	nicht sensitiv	Nucleolus	Synthese von rRNA (außer 5S rRNA)
RNA-Pol II (B)	sehr sensitiv	Nucleoplasma	Transkription der mRNA Vorläufer
RNA-Pol III (C)	wenig sensitiv	Nucleoplasma	Synthese von tRNA, 5S rRNA, sRNP-RNA

Die eukaryontische Transkriptionsmaschinerie ist im Vergleich zu den Komponenten der prokaryontischen Transkription wesentlich komplizierter. Am basalen Promotor baut sich die generelle Transkriptionsmaschinerie aus den generellen Transkriptionsfaktoren (TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH, TFIID) und der RNA-Polymerase II auf. Nach den derzeitigen Vorstellungen ist die Anlagerung an den Promoter in sequentieller Reihenfolge am wahrscheinlichsten (Multistep-Modell). Jedoch wurden auch vorgeformte Komplex gefunden (Holoenzym-Assembly-Modell).

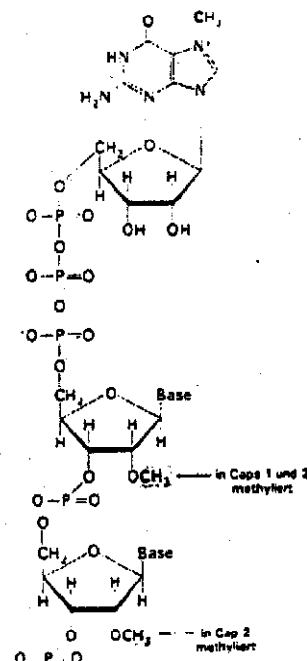


Neben den basalen Promotorelementen gibt es eine Vielzahl weiter entfernt liegender regulatorischer Elemente, die als Enhancer oder Silencer bezeichnet werden. Enhancer sind Transkriptionselemente, die unabhängig von ihrer Orientierung und von ihrem Abstand zum Transkriptionsstart die Transkription verstärken. Silencer-Elemente schwächen die Transkription ab.

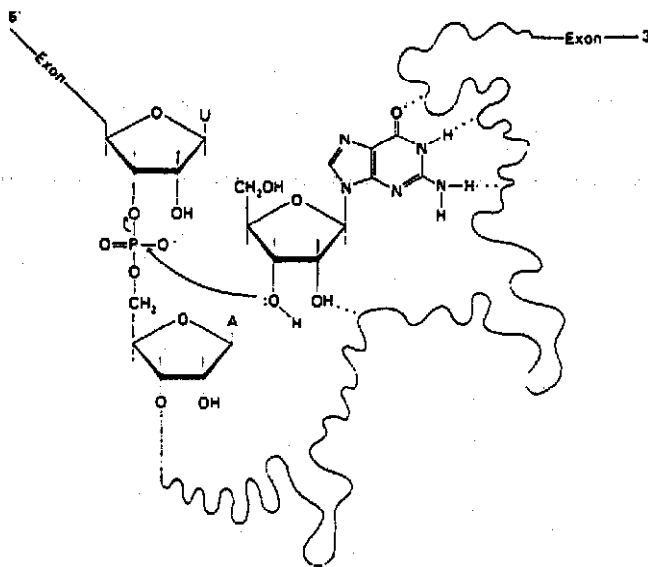
### Posttranskriptionale Modifikationen:

#### 1. Capping (7Methyl- GpppN<sup>Methyl</sup>N<sup>Methyl</sup>):

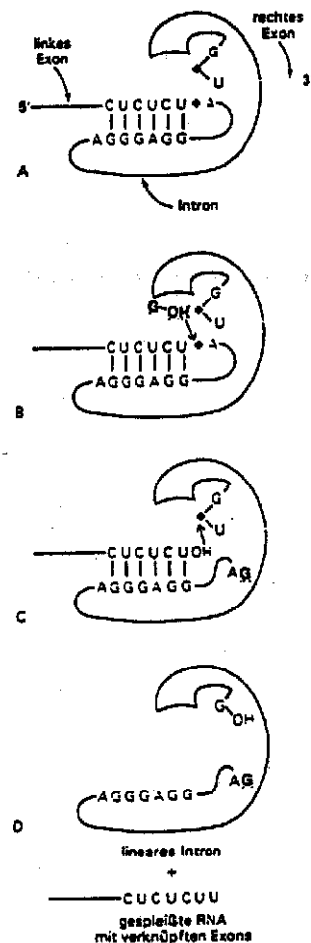
- Sequenzielle Reaktion: Addition von GMP, Methylierung des Guanin-Rests an C7, Methylierung der Ribose des ersten Nukleotids an C2 (Cap1), Methylierung der Ribose des zweiten Nukleotids an C2 (Cap 2).
- beeinflusst RNA-Stabilität, Splicing, Translationseffizienz
- tRNAs und rRNAs weisen keine Caps auf



2. Polyadenylierung: alle mRNAs außer Histon mRNAs besitzen einen PolyA-Schwanz
- durch einen Multiproteinkomplex vermittelte gekoppelte Spaltungs- und Polyadenylierungsreaktion (PolyA-Polymerase)
  - 2 Signalsequenzen: AAUAAA 10-30 Basen vor der Spaltstelle und GU reiche Sequenz 20-40 Basen nach der Spaltstelle; Abstand dieser Sites bestimmt die Stärke des Polyadenylierungssignals
  - beeinflusst Transport der mRNA aus dem Kern in das Cytoplasma, mRNA-Stabilität, Translationseffizienz
  - Wechselwirkung zwischen Polyadenylierungs- und Splicemaschinerie
3. Splicing: Das präzise Ausschneiden der Intronsequenzen aus der hnRNA im Rahmen der Prozessierung zur mRNA.
- erfolgt in hochmolekularen Ribonucleoproteinpartikeln, den Splicisomen
  - Splicisomen enthalten snRNP-RNAs, die für den Aufbau der Splicisomen und die Erkennung der Splicestellen wichtig sind. Ausbildung einer Lassostruktur
  - Grundlage für die Aufklärung des Mechanismus lieferten die Untersuchungen zum autokatalytischen Selbstsplicen von Tetrahymena rRNA.
  - Alternatives Splicing erzeugt, ausgehend von einem RNA-Primärtranskript, verschiedene Proteinprodukte

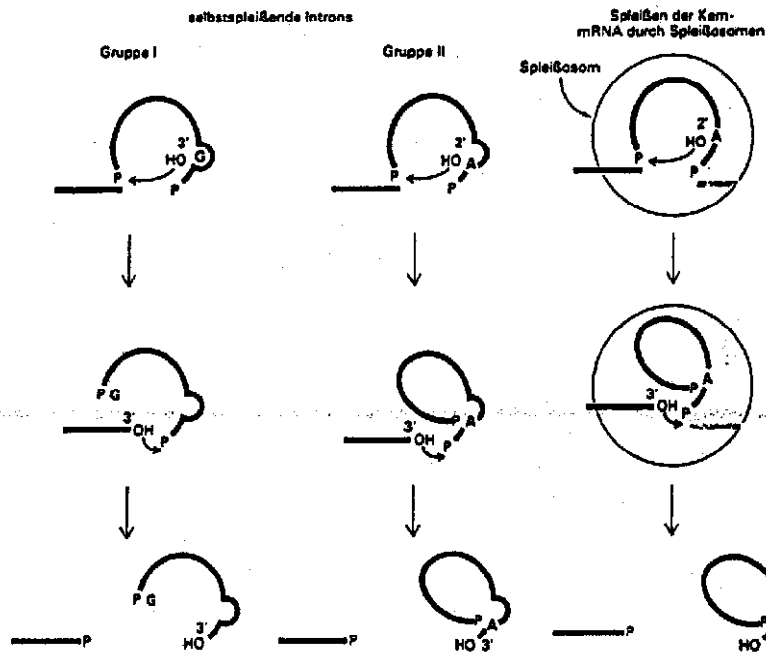


29.35 Ein Vorschlag zur Bindung des Guanosins im aktiven Zentrum eines RNA-Enzyms. (Nach Bass, B. L.; Cech, T. R. *Nature* 308 (1984) S. 820.)



29.36 Eine Hypothese zum katalytischen Mechanismus des Selbstsplicens eines Introns von *Tetrahymena*. (Nach Cech, T. R. *RNA as an Enzyme*, In: *Sci. Amer.* 11 (1986), S. 76-84. Copyright © 1986 bei Scientific American. Alle Rechte vorbehalten.)

Aus L. Stryer, Biochemie, Spektrum Verlag



28.37 Ein Vergleich des Selbstspaltens und des Spleißens durch Spleißosomen. Die miteinander zu verknüpfenden Exons sind blau und gelb dargestellt, die angreifende Einheit grün. Das katalytische Zentrum wird in den Gruppen I und II vom Intron (rot) selbst gebildet. Im Gegensatz dazu wird das Spleißen von mRNA-Vorkürtern im Zellkern durch snRNPs in einem Spleißosom katalysiert. (Nach Sharp, P. A. Science 235 (1987) S. 789)

#### 4. RNA-Editing:

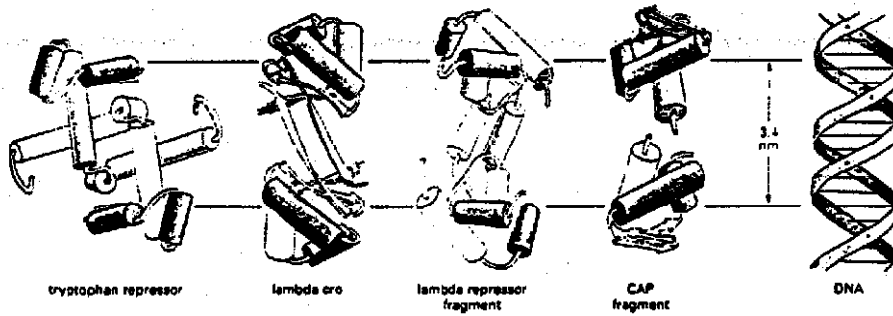
- Insertions/Deletions-Editing: Polarität 3' - 5'; guide RNAs definieren die Insertionsstellen; Mechanismus: Spaltung/Ligation  
 Insertions-Editing: Editing Endonuclease, Terminale Uridyltransferase, RNA-Ligase  
 Deletions-Editing: Editing Endonuclease, U-spezifische Exonuklease, RNA-Ligase
- Conversions-Editing:
 

A – I Deaminierung	ds RNA	z.B. Glutamatrezeptoren
C – U Deaminierung	Sequenzmotiv?	z.B. Apolipoprotein B, Neurofibronin Tumorsuppressor
U – C Aminierung	Sequenzmotiv?	z.B. Wilms Tumor Protein-1 Bombesin-Neuropeptide
- tRNA-Moleküle weisen eine Vielzahl von Modifikationen auf, z.B. Methylierung, Isopentenylierung

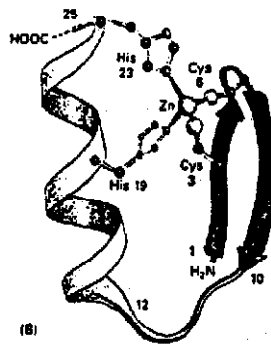
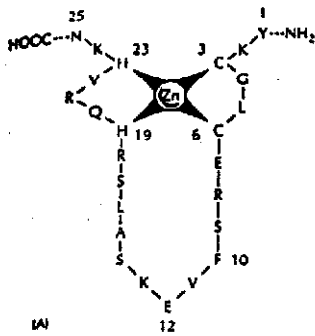
Die DNA-Doppelhelix bildet an der Moleküloberfläche eine große und eine kleine Grube aus. Genregulatorische Proteine erkennen über H-Brückenbindungen sowie hydrophobe und ionische Wechselwirkungen ein spezifisches, durch die Basensequenz vorgegebenes Muster. Aufgrund der größeren Vielfalt der Wechselwirkungsmöglichkeiten erfolgt die Bindung von Transkriptionsfaktoren hauptsächlich über die großen Grube.

Die meisten DNA-Erkennungsdomänen lassen sich in eine der folgenden Familien einordnen:

- Helix-Turn-Helix (A)
- Zink-Finger (B)
- $\beta$ -Sheet (C)
- Leuzin-Zipper (D)
- Helix-Loop-Helix (E)
- Helix-Loop-Helix Zipper
- HMG-box

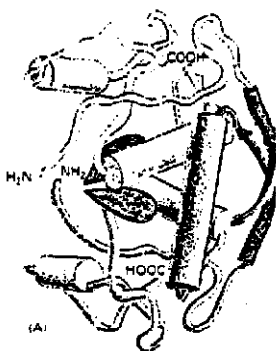


### Helix-Turn-Helix



### Zink-Finger

### Leuzin-Zipper



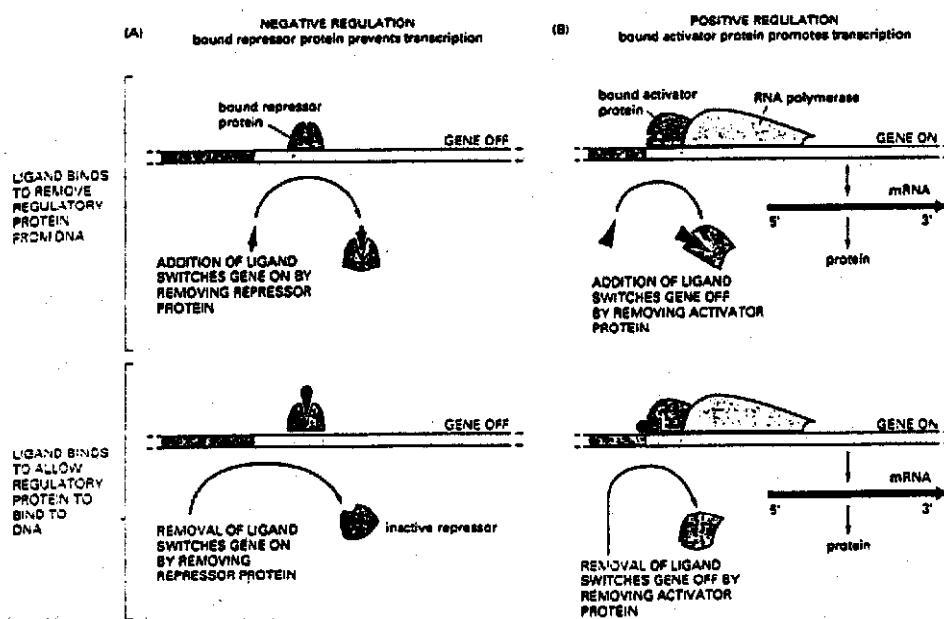
### $\beta$ -Sheet

### Helix-Loop-Helix

aus Alberts, Molecular Biology of the Cell

$\alpha$ -helikale Strukturen sind besonders gut geeignet mit der großen Grube der DNA in Wechselwirkung zu treten und werden mit Ausnahme des  $\beta$ -Sheet in all diesen DNA-Bindungsdomänen als Interaktionsdomänen genutzt. Die Wechselwirkung wird verstärkt, dadurch daß Transkriptionsfaktoren als Dimere an die DNA binden. Genregulatorische Protein bilden häufig niedermolekulare Proteinkomplex auf der DNA aus, wobei die DNA häufig als Nukleationspunkt für die Ausbildung dieser Proteinkomplexe dient.

Als negative Regulation wird der Einfluß von Proteinen bezeichnet, die in ihrer aktiven Form die Transkription reprimieren. Faktoren, die in ihrer aktiven Form die Transkription steigern, werden als positive Regulatoren eingeordnet.



**Literatur:**

- Lubert Stryer, Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag
- Bruce Alberts, Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing
- Rolf Knippers, Molekulare Genetik, Georg Thieme Verlag

# Codogener Strang/Codierende Sequenz

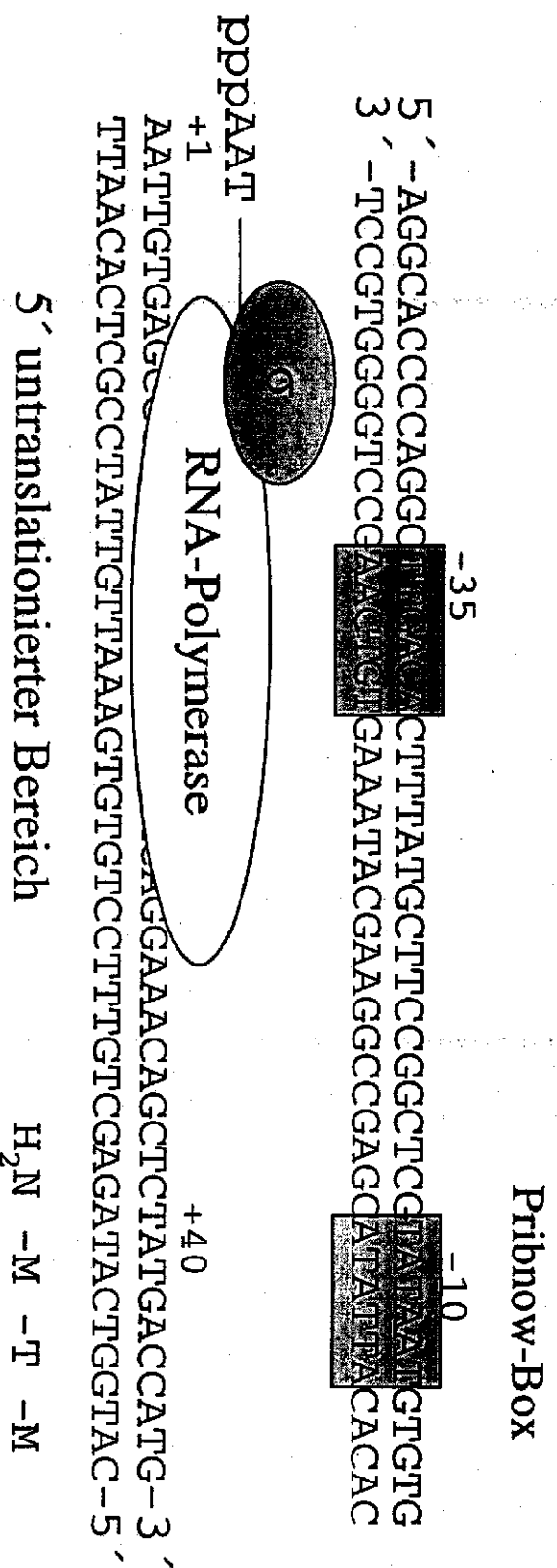
DNA 5' CGTACGAAGCCATGTCACCAGGTCCTGTGTCCTCGT3' Anti-Sinnstrang

3' GCATGCTTCGGTACAGT<sup>G</sup>GTCCAGACACAGGACA5' Sinnstrang

mRNA 5' CGUACGAAGCCAU<sup>G</sup><sub>U<sup>C</sup></sub>

Protein H<sub>2</sub>N-M S P G L C P P R

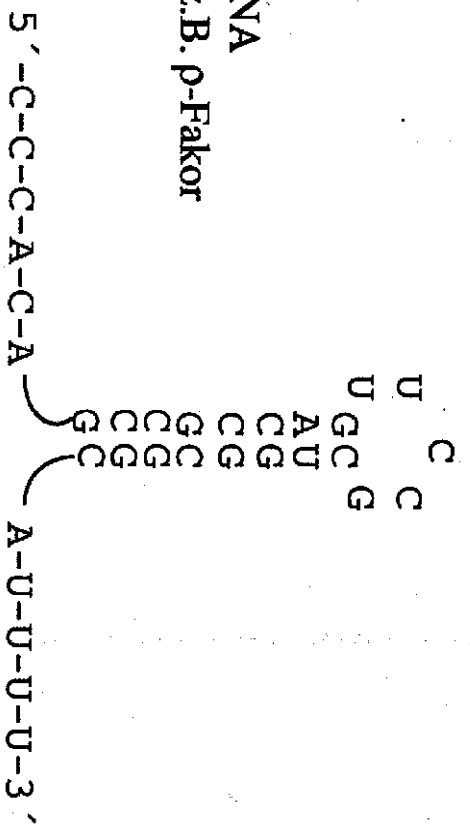
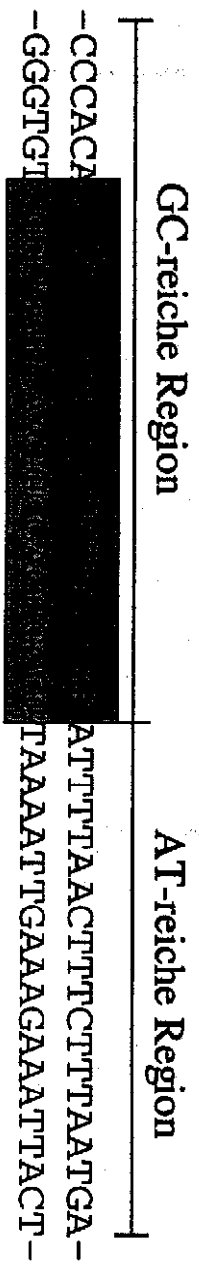
# Promotoren definieren Transkriptionsstartpunkte



σ-UE. verringern die Affinität der RNA-Polymerase für Nicht-Promoter  
 Regionen der DNA um den Faktor 10<sup>4</sup> und ermöglicht die Erkennung der  
 Promoterstellen

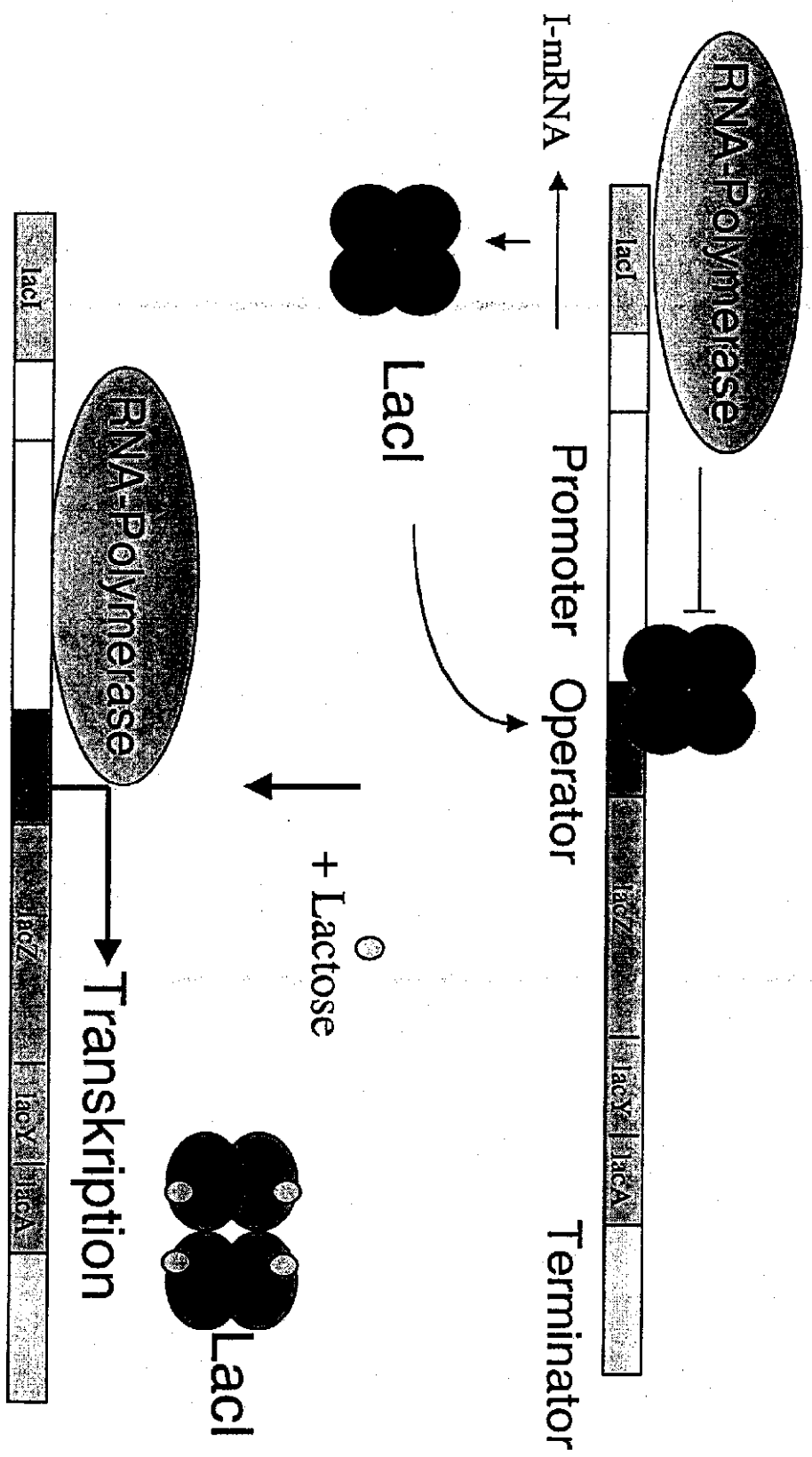


# Termination der Transkription

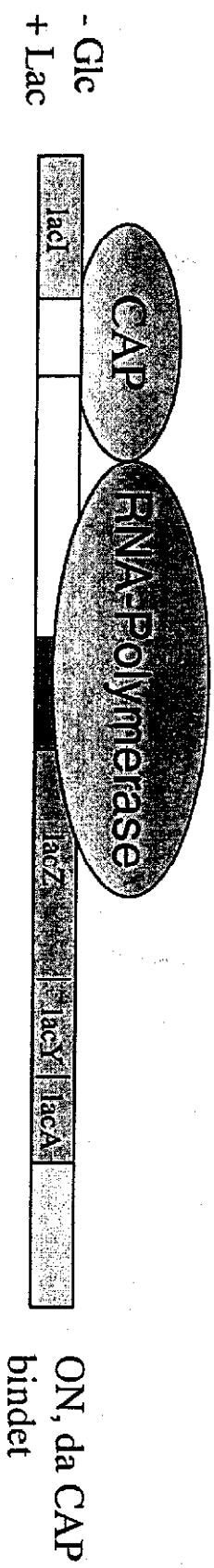
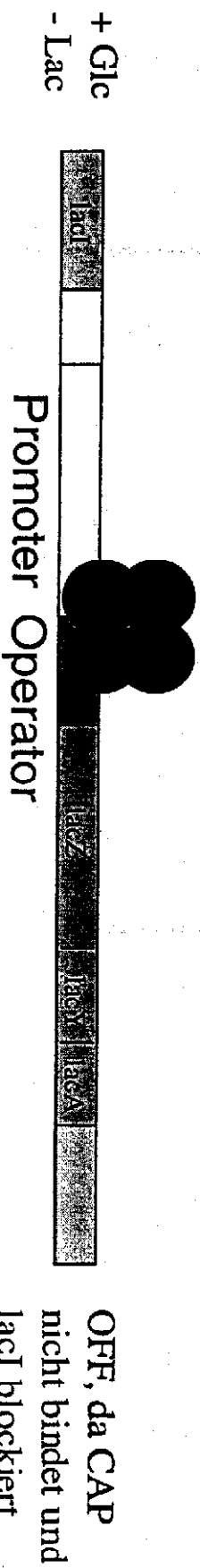


Sekundärstruktur der RNA  
 Terminationsfaktoren: z.B. ρ-Faktor

# Das Lac-Operon



# Negative und positiver Regulation des Lac-Operons



# Auswirkungen des mRNA Editing

