

Bachelorstudiengang Biowissenschaften

Modul B07 – Molekulare Biologie der Zelle

1. Vorlesung - **Einführung** in die Molekularbiologie
1.4. – 20.5.2014
2. Vorlesung – **Grundlagen** der Signaltransduktion

6 Leistungspunkte – 60 min Klausur über Inhalte beider VL



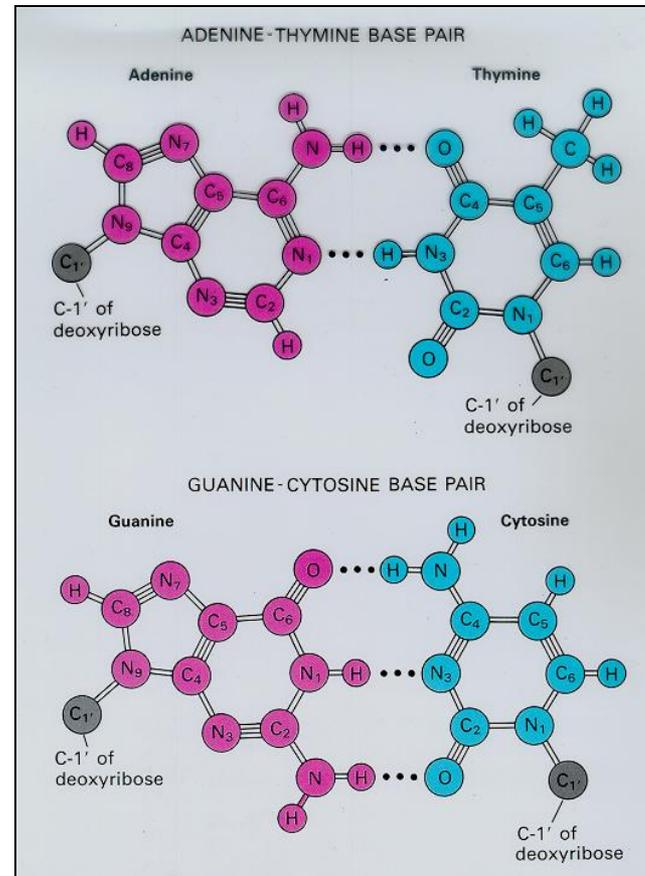
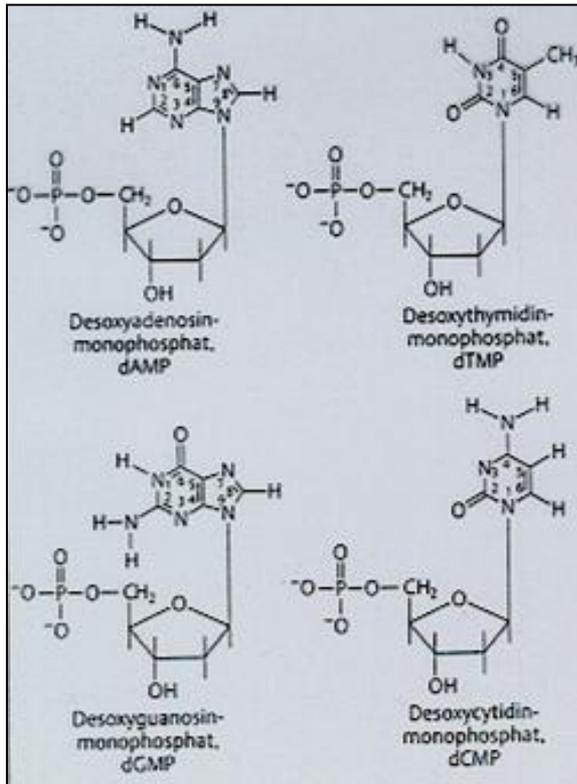
Einführung in die Molekularbiologie
Prof. Dr. Martin Hagemann

Vorlesung 1

Struktur der beteiligten Makromoleküle
RNA-Polymerasen

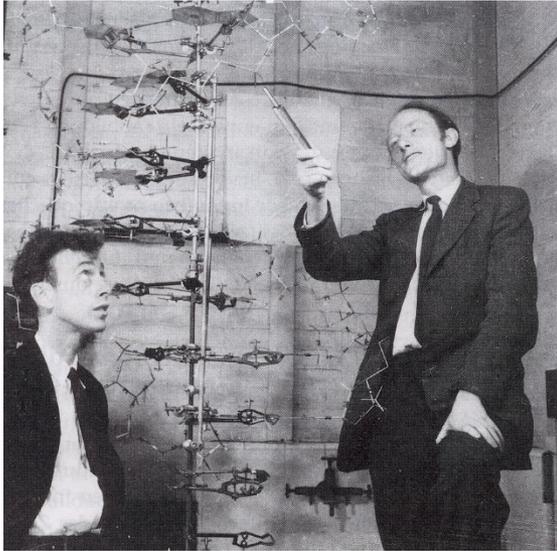
DNA-Struktur

Die DNA ist aus 4 Desoxy-Nucleotiden aufgebaut, die definiert paaren können

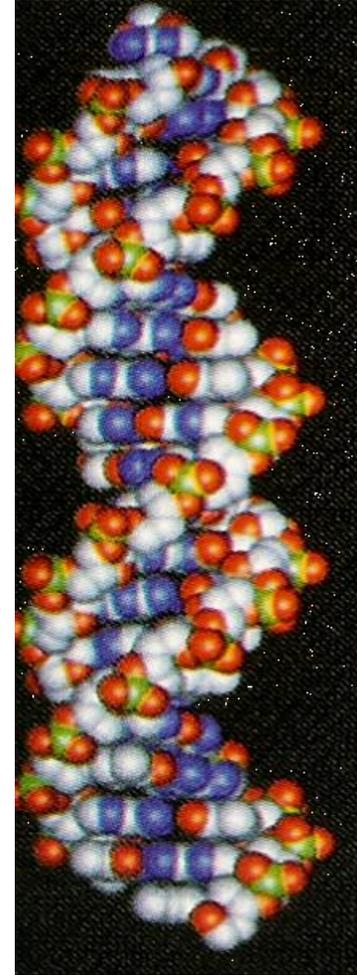


DNA-Struktur

Aus der Primärstruktur der Basenfolge entsteht eine definierte Sekundärstruktur – die α -Helix



Watson und Crick 1952/53
Auflösung der DNA-Struktur
Doppelhelix-Modell



Watson and Crick (From Wikipedia, the free encyclopedia)

[James D. Watson](#) and [Francis Crick](#) were the two co-discoverers of the structure of DNA in 1953. They used x-ray diffraction data collected by [Rosalind Franklin](#) and proposed the [double helix](#) or spiral staircase structure of the [DNA](#) molecule. Their article, [Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid](#), is celebrated for its treatment of the B form of DNA ([B-DNA](#)), and as the source of [Watson-Crick base pairing](#) of nucleotides. They were, with [Maurice Wilkins](#), awarded the [Nobel Prize in Physiology or Medicine](#) in 1962.

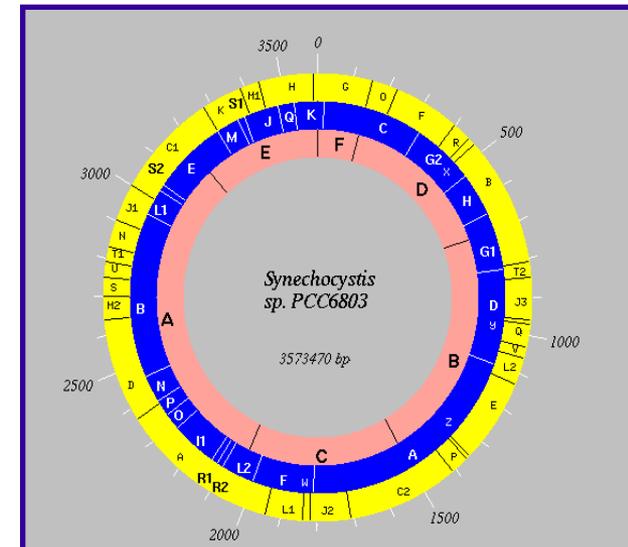
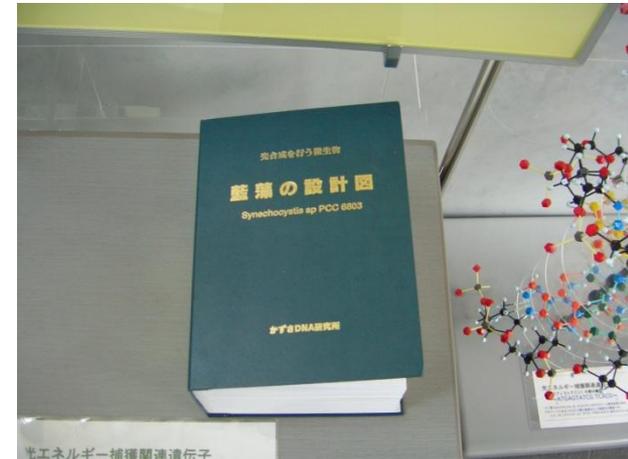
Apparently, as they walked into the [Eagle](#) pub in [Cambridge](#), Crick announced, "We have found the secret of life."



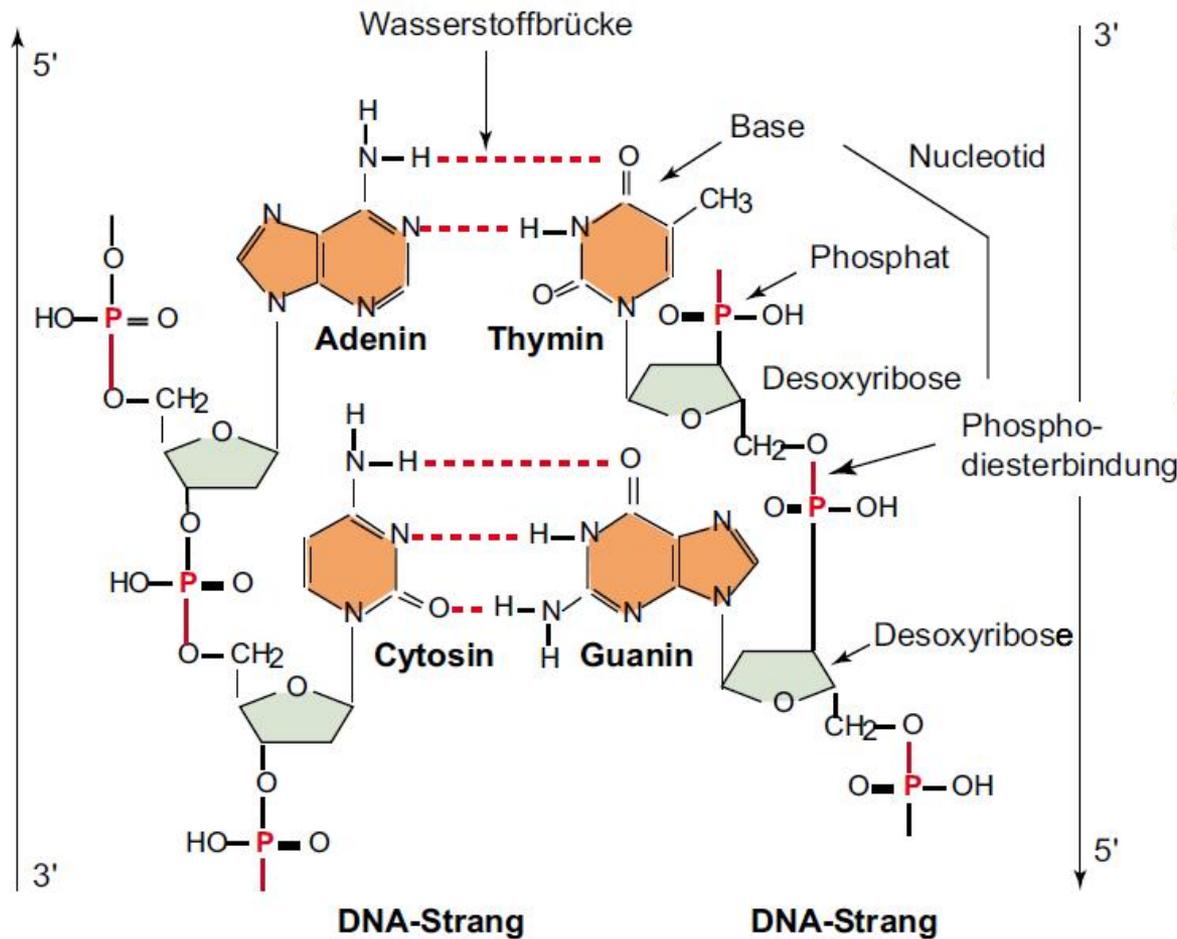
Genomsequenzierung ist heute eine Industrie

Bis heute (04/2014) wurden Genome von 18850 (**3004 finished**) Organismen (329 Archaea, 17615 Bacteria, 906 Eukaryoten) sequenziert, 22500 Projekte laufen!

<http://www.genomesonline.org/>

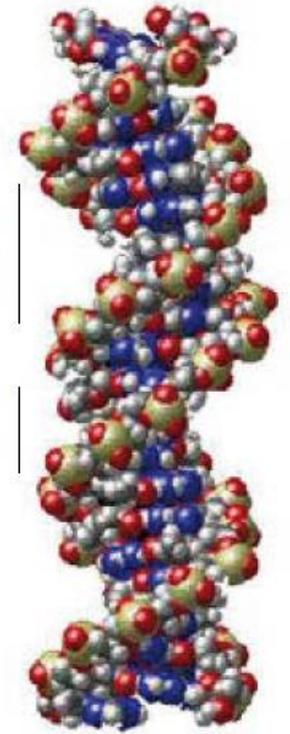


<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>



große Furche
2,2 nm breit

kleine Furche
1,2 nm breit



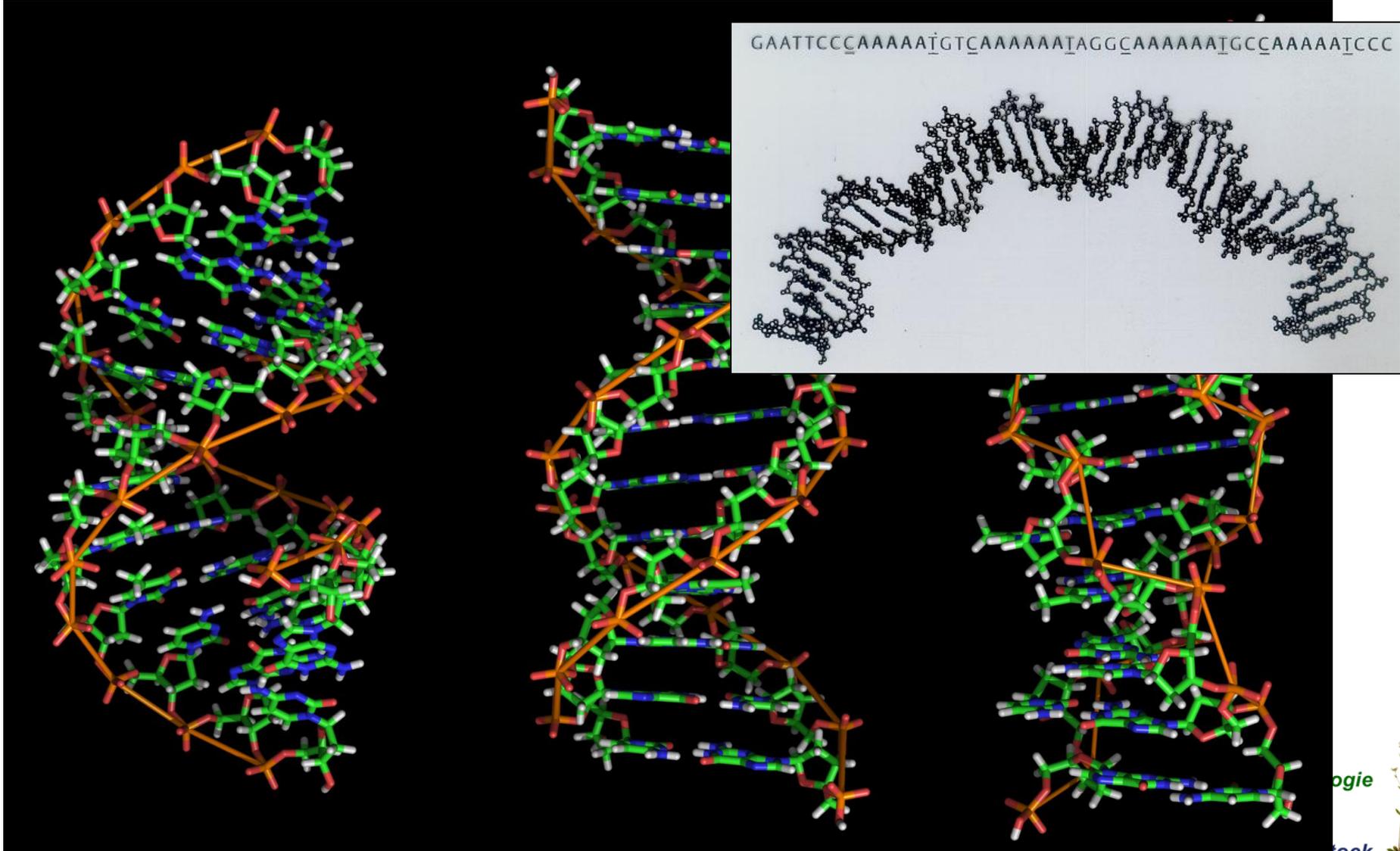
2 nm

Basenpaare pro Windung: 10,4
Windung pro Basenpaar: 34,6°
Raum zwischen Basenpaaren:
0,34 nm



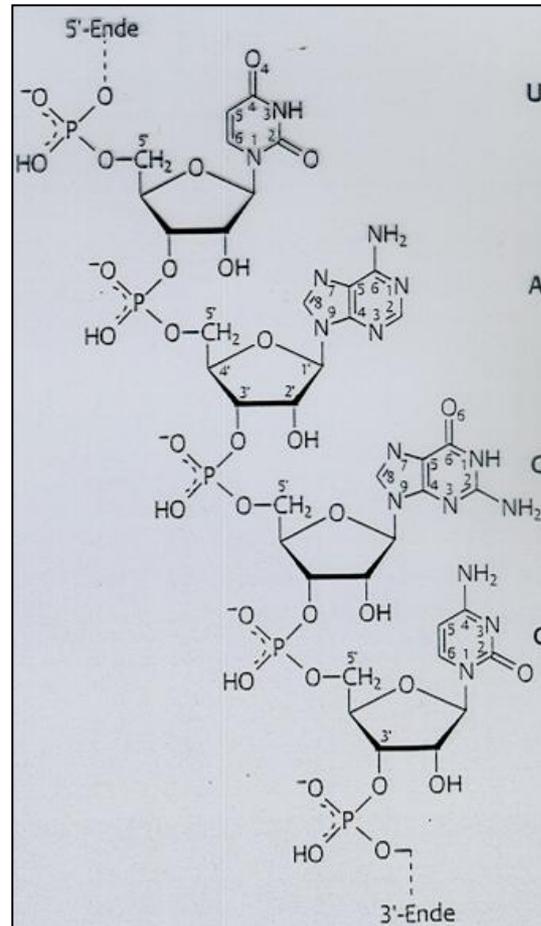
DNA-Struktur

Neben der α -Helix kann die DNA auch andere Strukturen ausbilden – auch *in vivo* vorliegend?



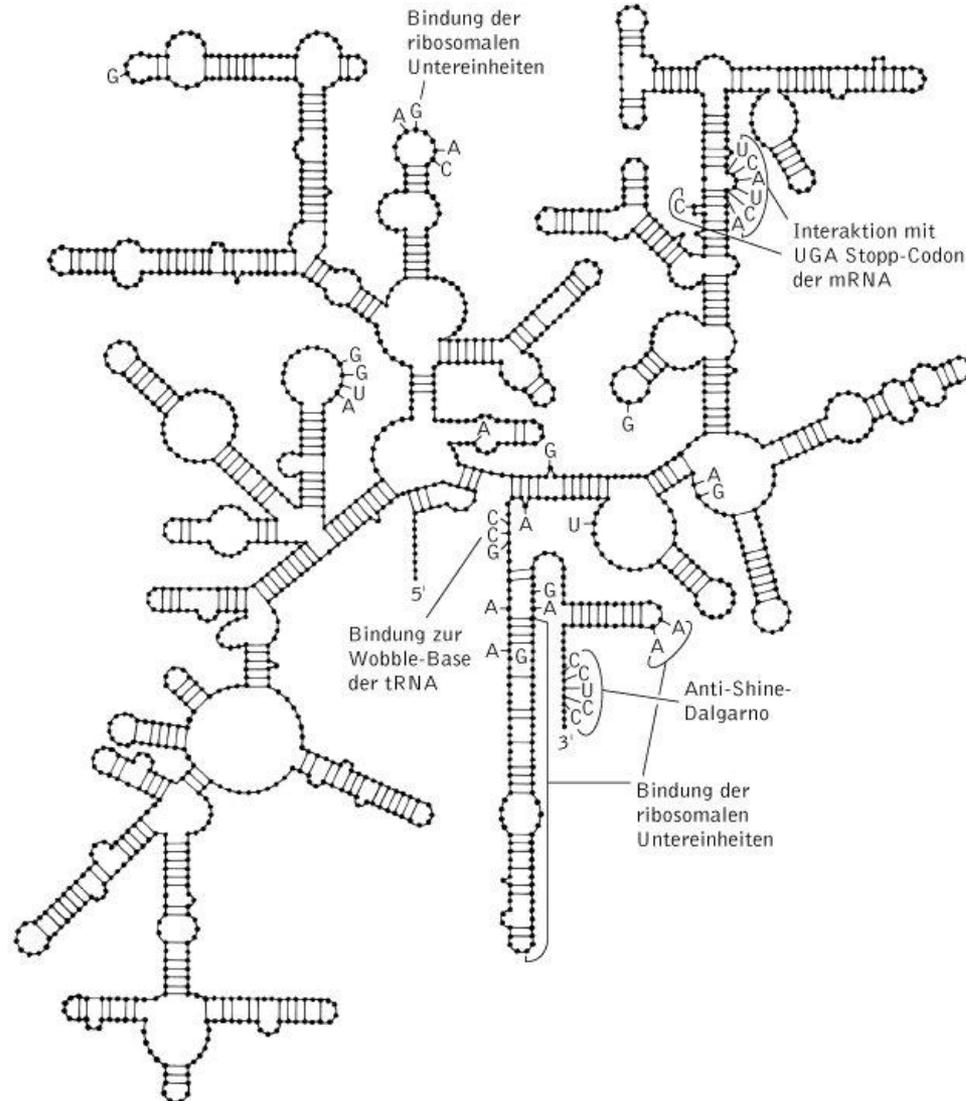
RNA-Struktur

In der RNA sind Ribonucleotide in einem Einzelstrang verknüpft – Primärstruktur ist Basenfolge



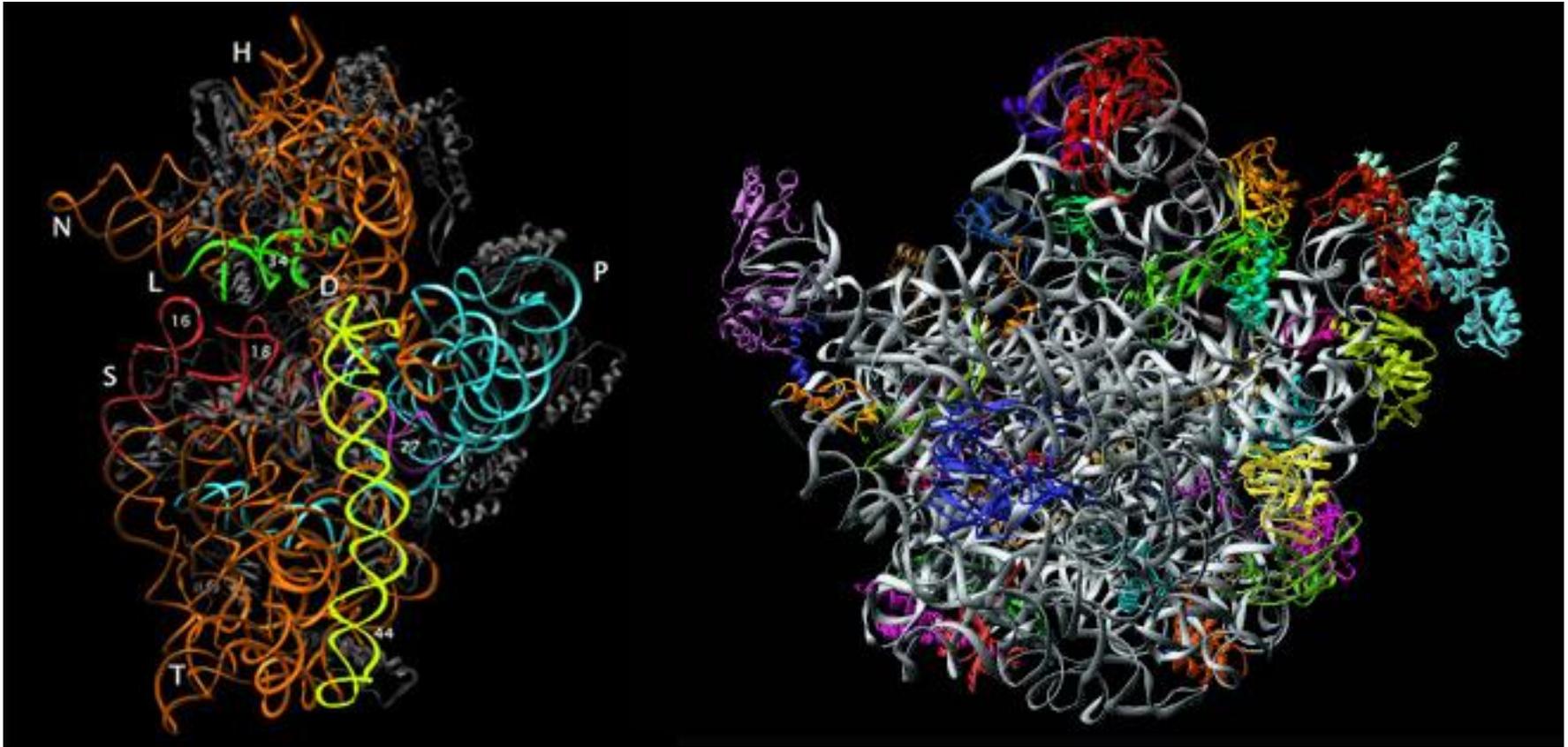
RNA-Struktur

Über Strang-interne Basenpaarungen entsteht eine definierte Sekundärstruktur, z.B. 16s rRNA *E. coli*



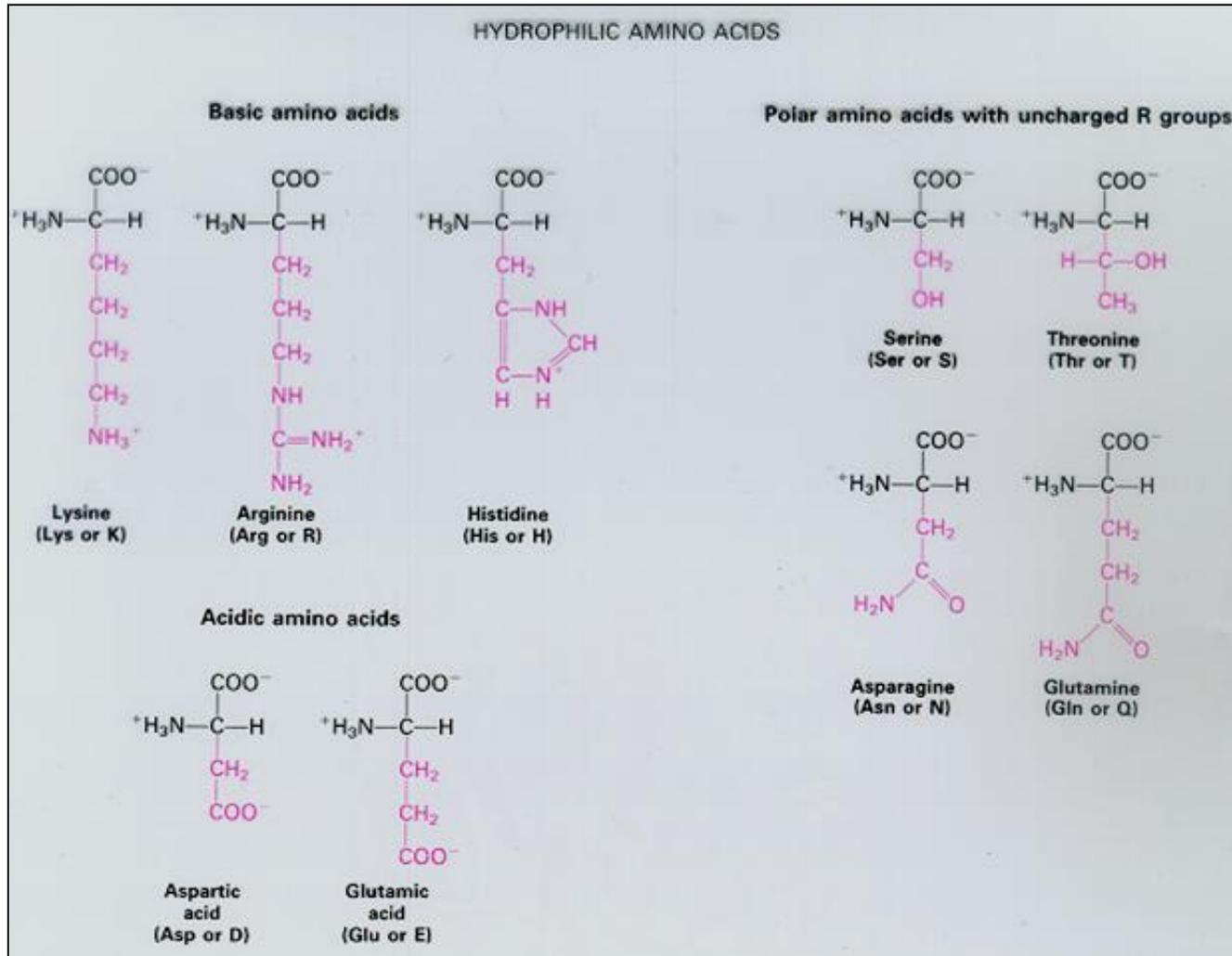
RNA-Struktur

Durch Anlagerung von Proteinen
entsteht eine definierte Tertiärstruktur



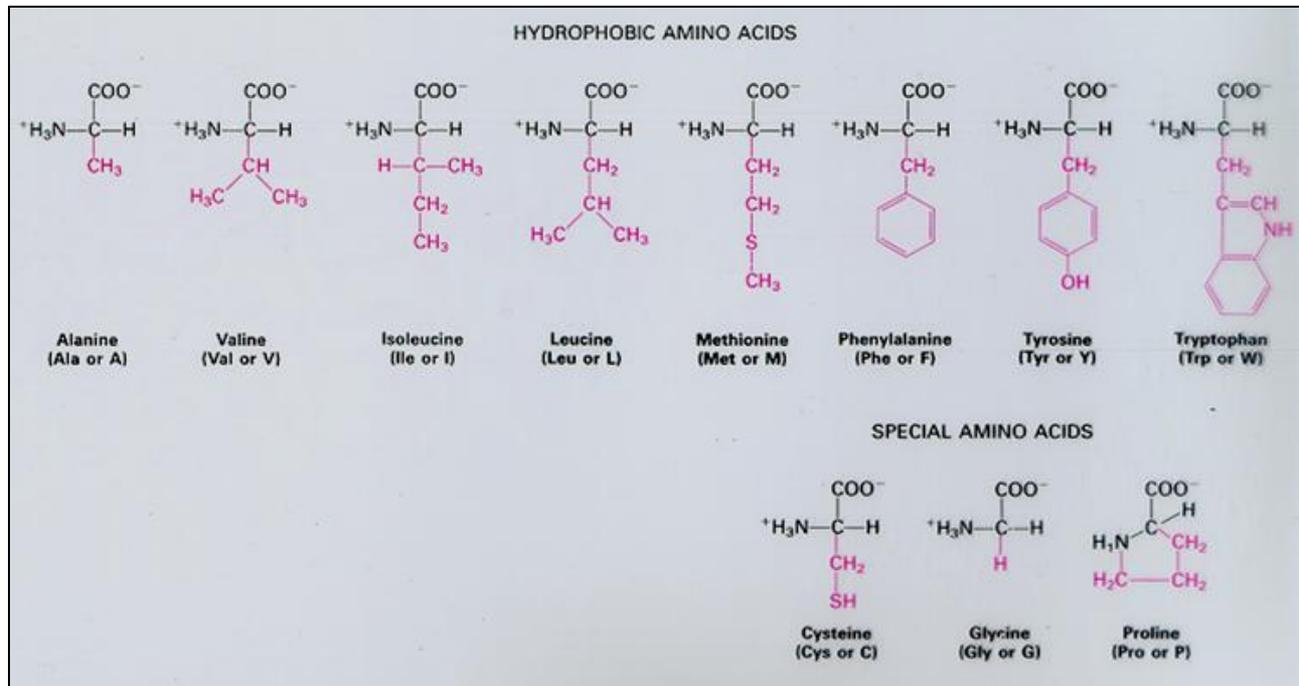
Protein-Struktur

Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaut
Aminosäuren gehören funktionellen Gruppen an



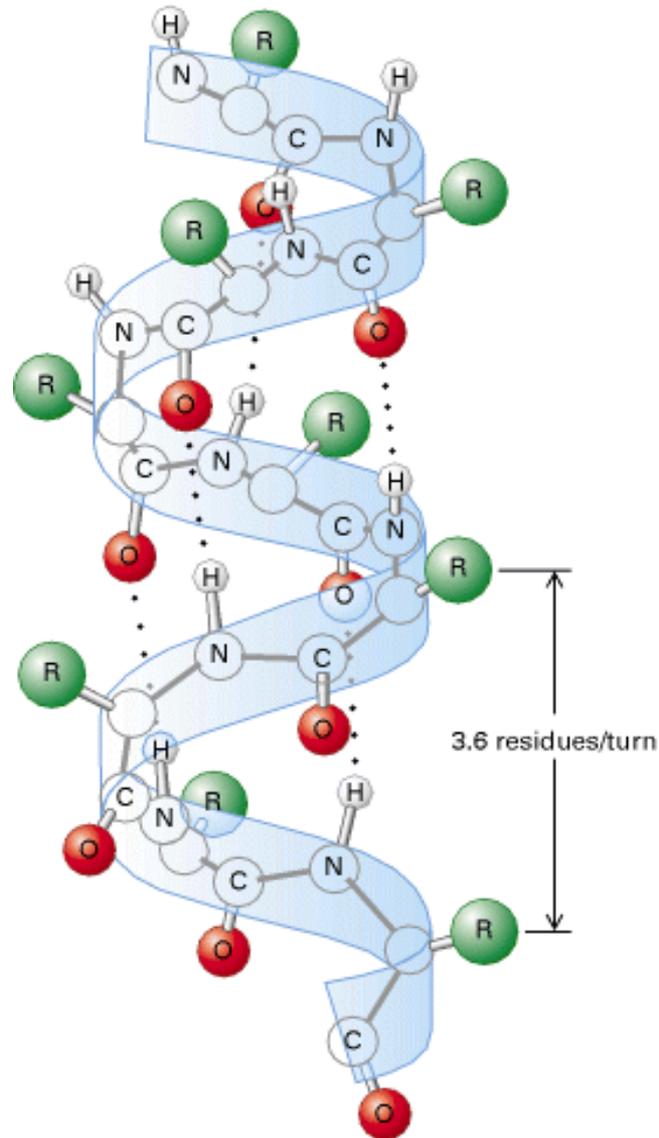
Protein-Struktur

Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaut
Aminosäuren gehören funktionellen Gruppen an



Protein-Struktur

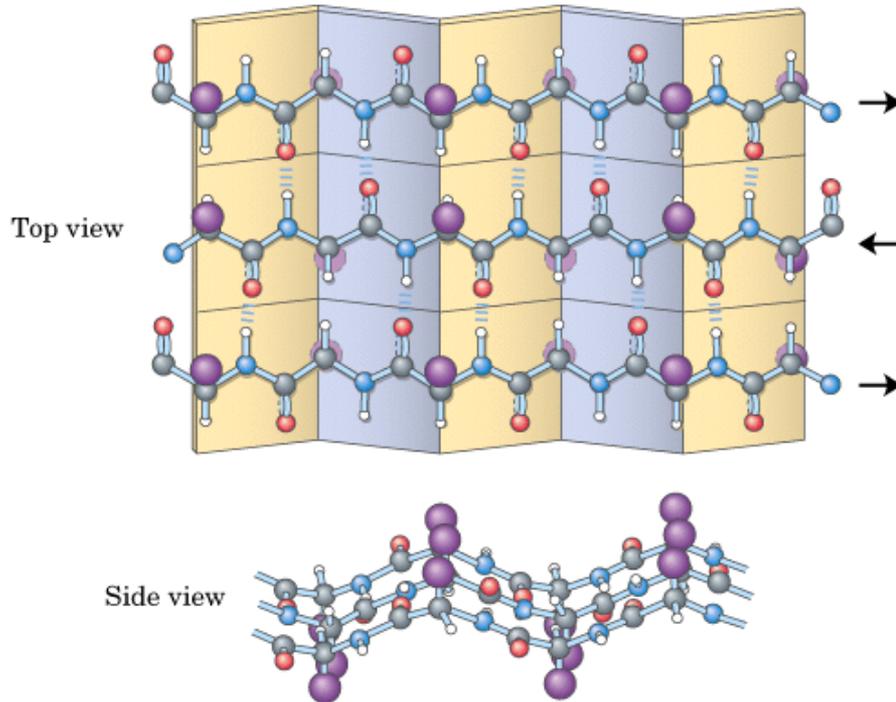
Die Primärstruktur faltet sich spontan zur Sekundärstruktur – z.B. α -Helix



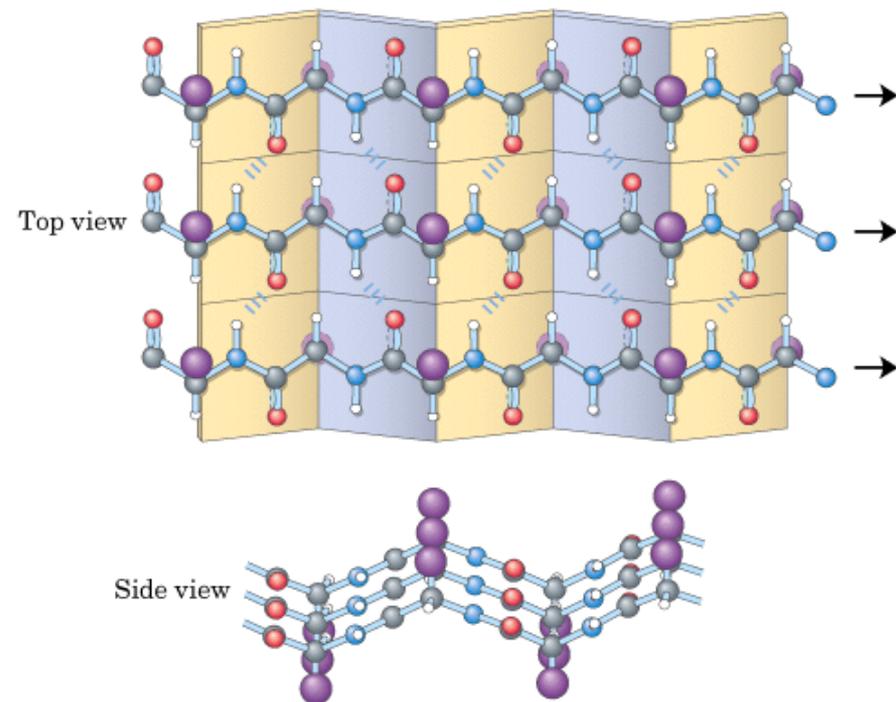
Protein-Struktur

Die Primärstruktur faltet sich spontan zur Sekundärstruktur – z.B. β -Faltblatt

(a) Antiparallel

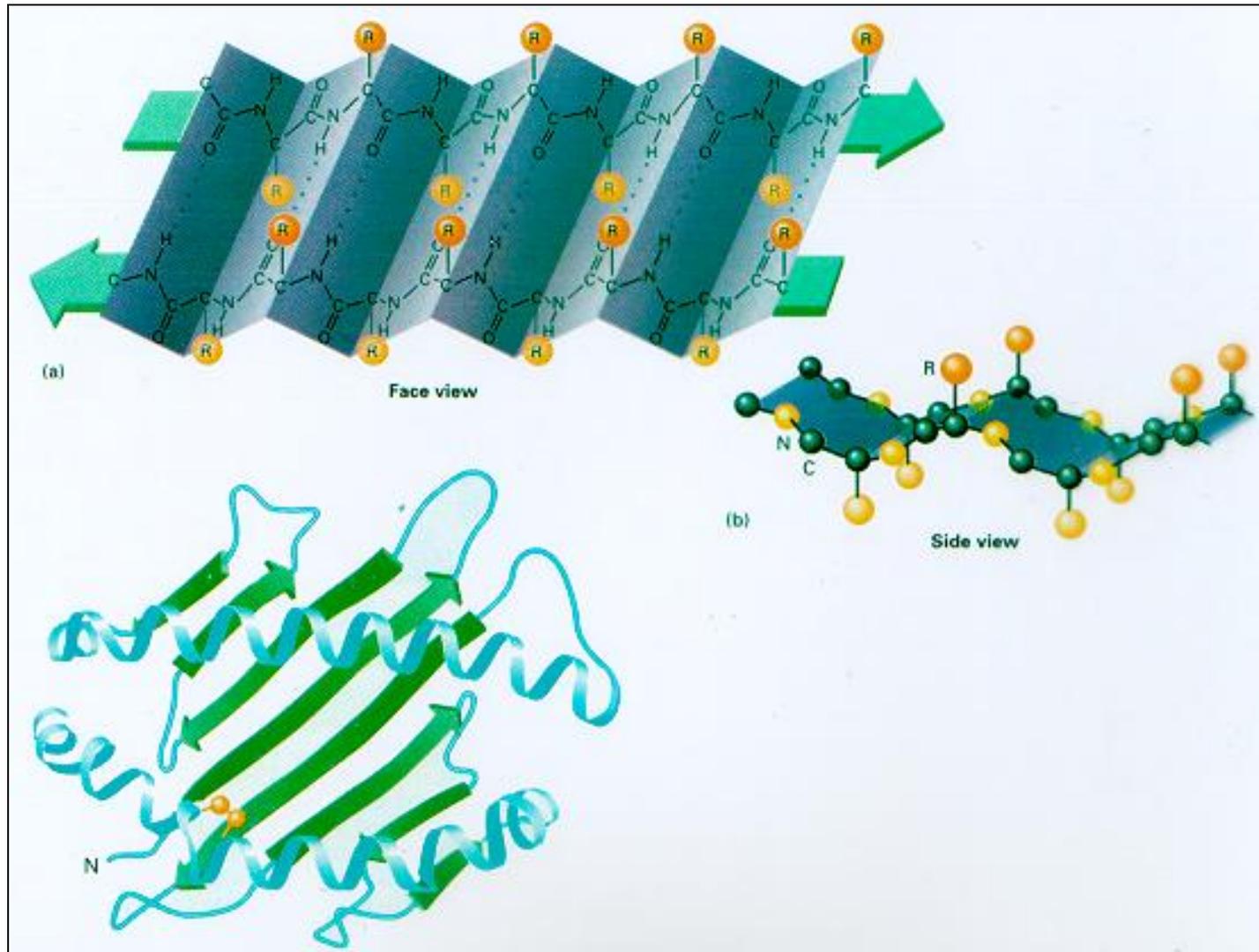


(b) Parallel



Protein-Struktur

Eine definierte räumliche Anordnung der Sekundärstrukturen führt zur Tertiärstruktur – häufig Protein-vermittelt

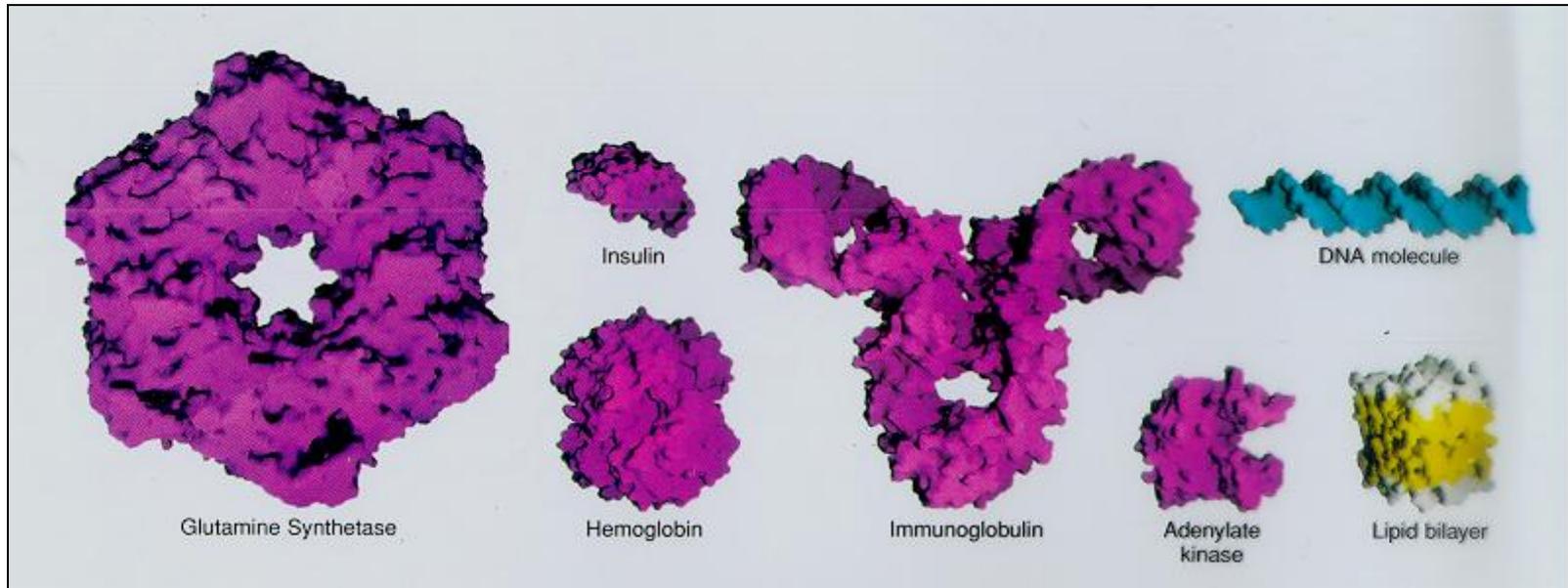


Protein-Struktur

Eine definierte räumliche Anordnung der Sekundärstrukturen

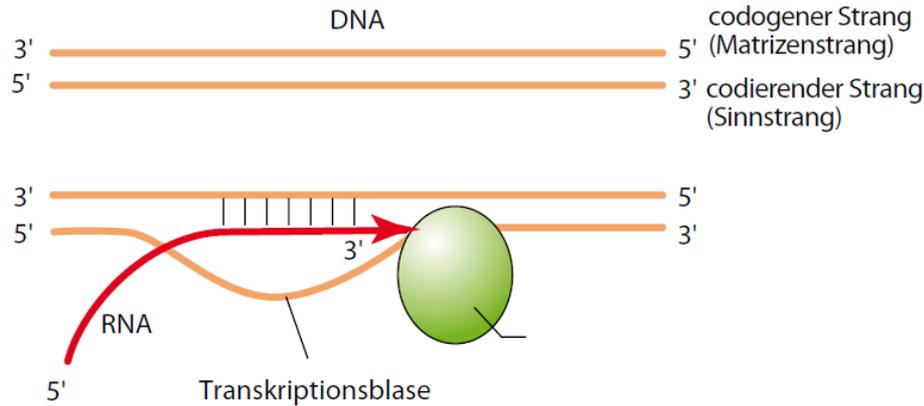
führt zur Tertiärstruktur – häufig Protein-vermittelt

Zusammenlagerung mehrerer Moleküle führt zur Quartärstruktur



Ablauf der Transkription – Biosynthese von RNA

Genexpression – Realisierung der Information in der DNA



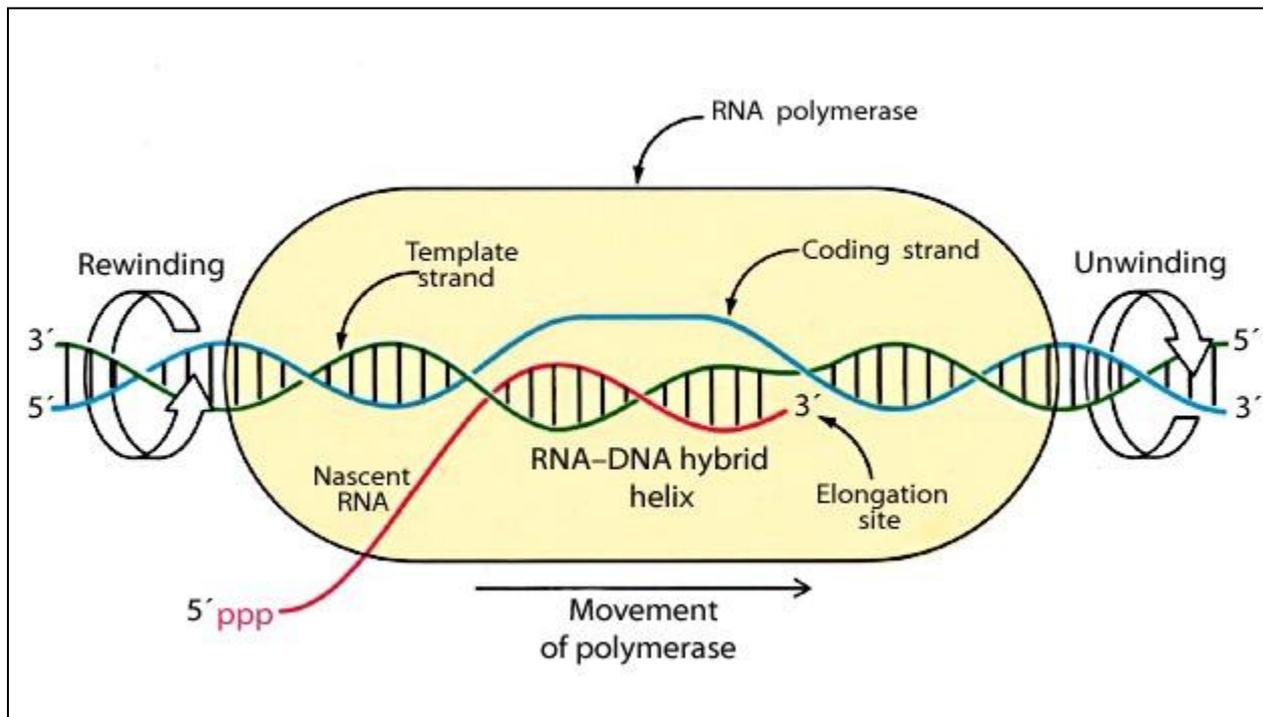
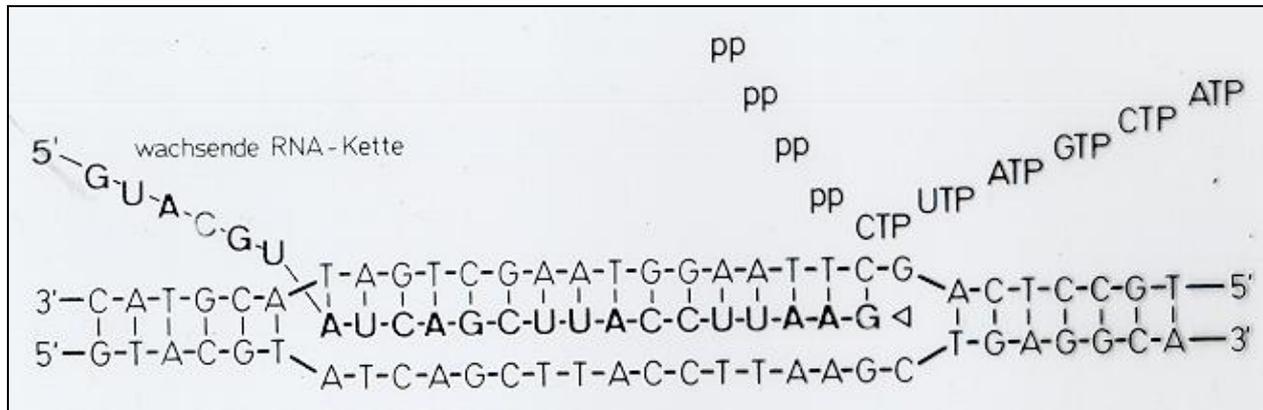
Sowohl bei den Eukaryoten als auch bei den Prokaryoten drückt sich die genetische Information in Form von Proteinen oder funktioneller RNA wie der Transfer-RNA, der ribosomalen RNA oder der interferierenden RNA aus. In allen Fällen wird die DNA während der Transkription in RNA umgeschrieben. Die RNA-Information wird anschließend durch den Translationsvorgang in Proteine umgesetzt.

RNA-Typ	Zelluläre Funktion
messenger-RNA (mRNA)	Informationsmolekül zur Proteinsynthese
Transfer-RNA (tRNA)	Transport von Aminosäuren zur Synthese der mRNA
ribosomale RNA (rRNA)	<ul style="list-style-type: none"> - strukturelle Funktion in den Ribosomen, - an der Bildung von Peptidbindungen während der Translation beteiligt - beteiligt an der korrekten Bindung der Ribosomen an die Startcodons während der Translation
kleine Kern-RNA (sn-RNA)	alternatives Spleißen bei den Eukaryoten
interferierende RNA (iRNA und miRNA)	Kontrolle der Genexpression bei den Eukaryoten

Wichtigste RNA-Vertreter und ihre Funktionen

Biochemie der Synthese von RNA an DNA

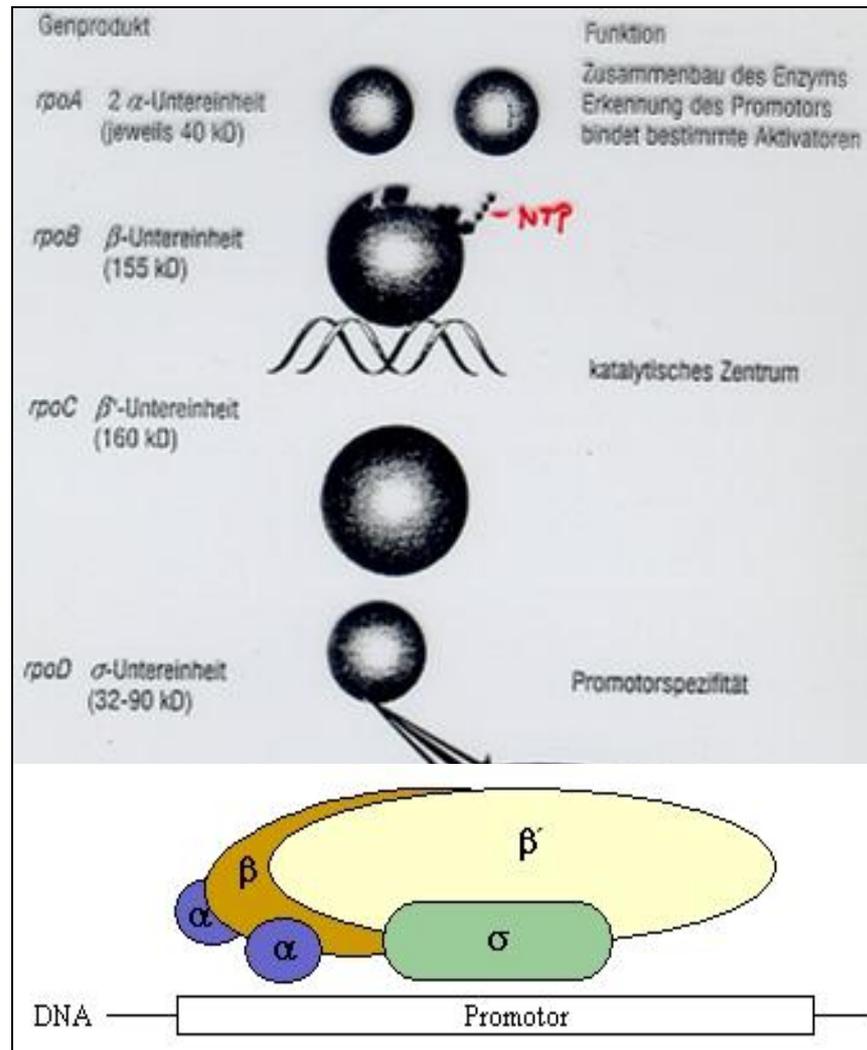
Katalysiert durch DNA-abhängige RNA-Polymerase



RNA-Polymerase in Prokaryoten (Bacteria)

Das Enzym aus *Escherichia coli* gilt als Standard.

Die 4 Untereinheiten sind für spezifische Funktionen verantwortlich.



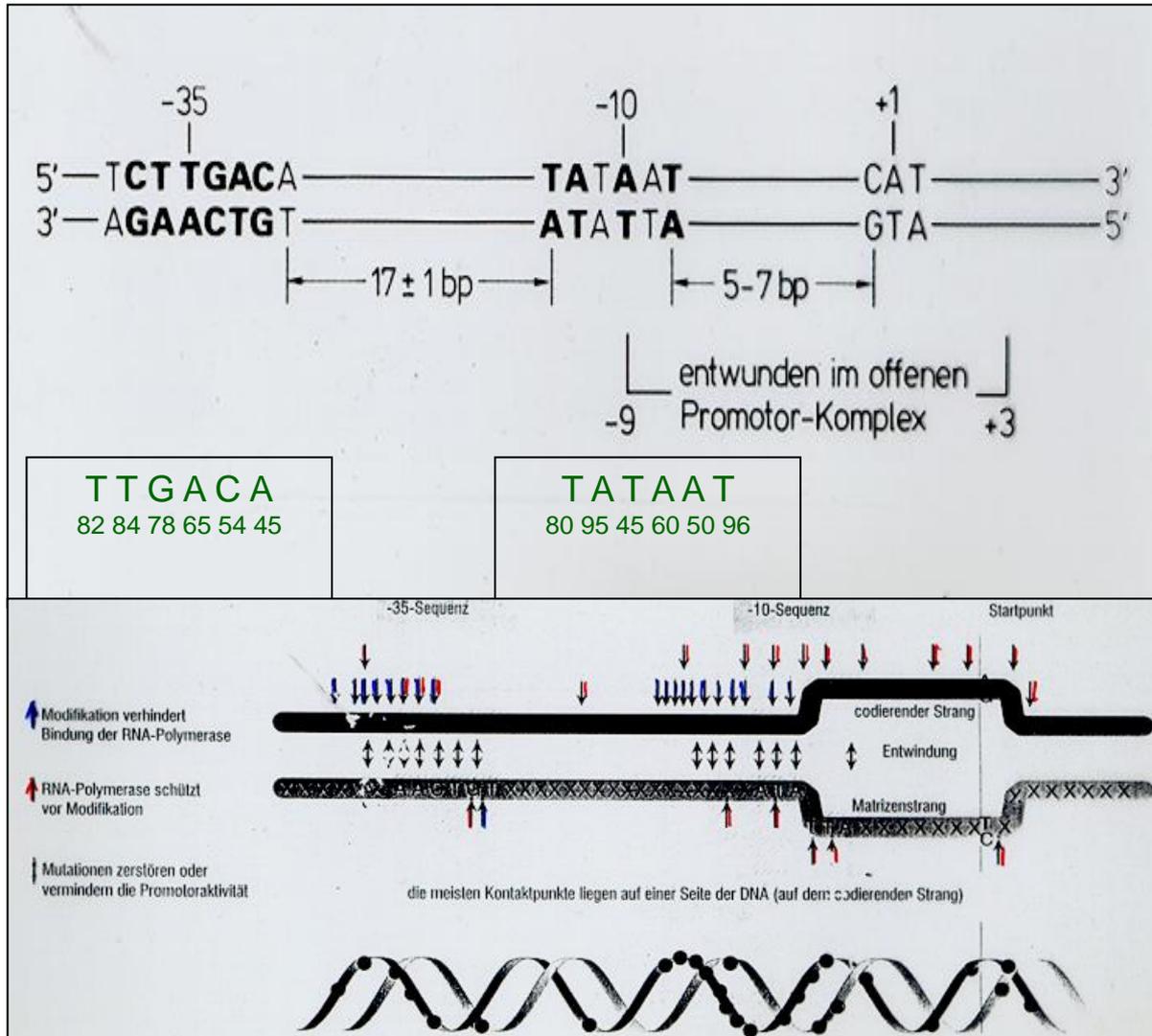
Core Enzym

+ σ UE- Holo Enzym



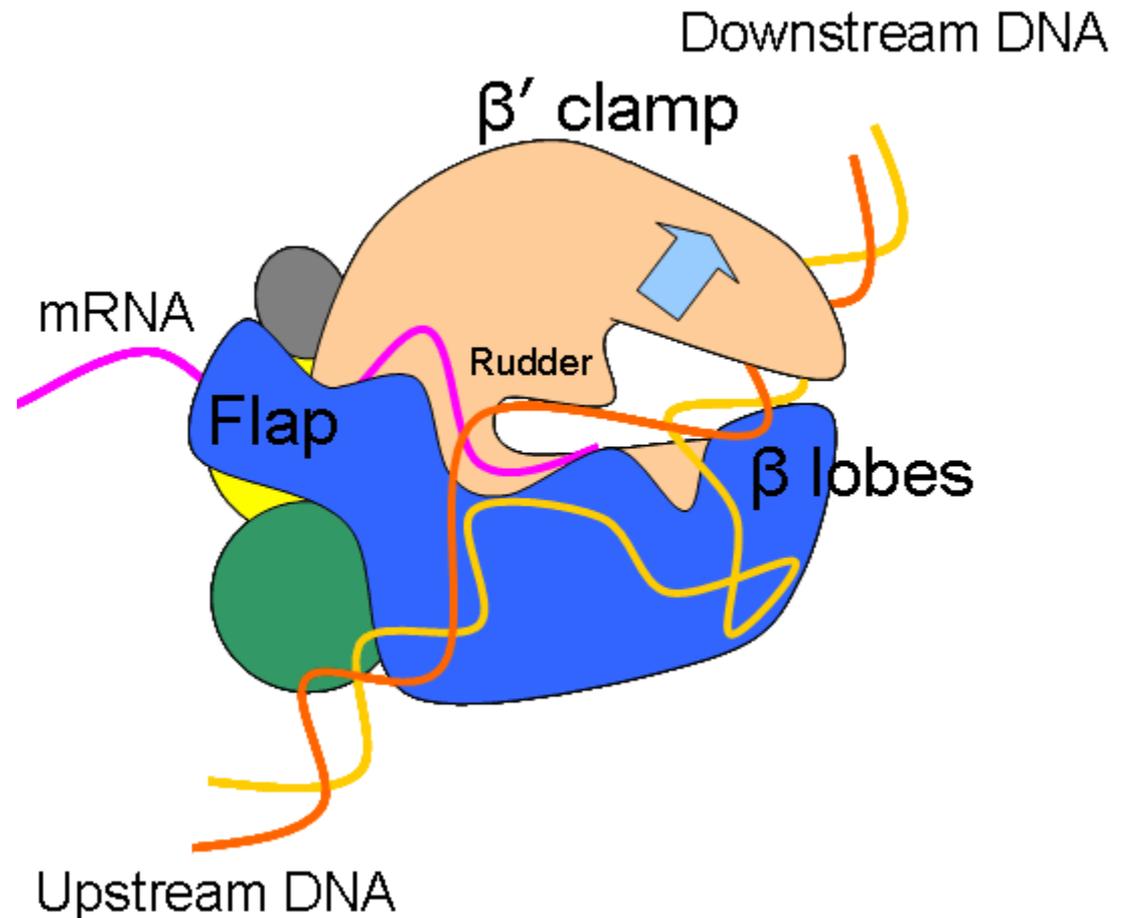
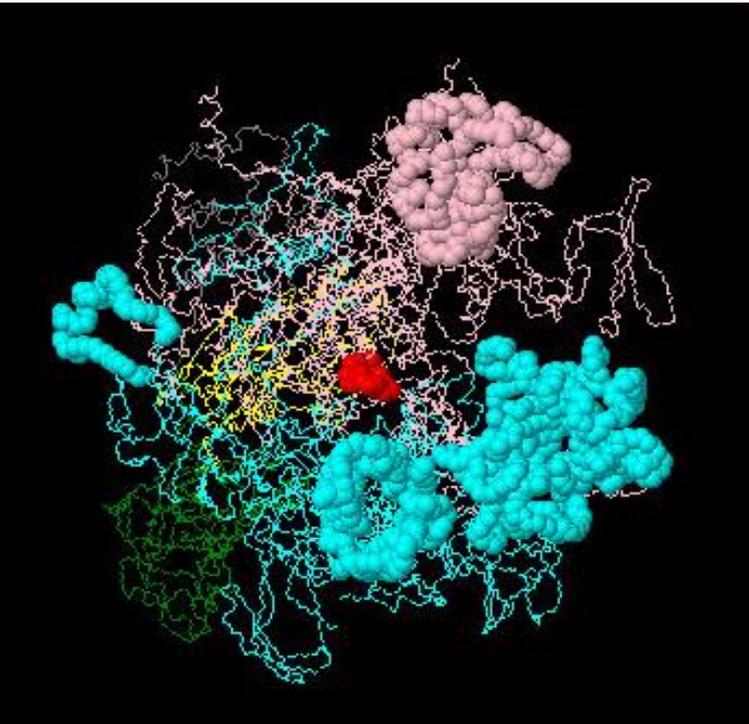
RNA-Polymerase in Prokaryoten

Die RNA-Polymerase erkennt einen „consensus“ Promotor in *E. coli*.



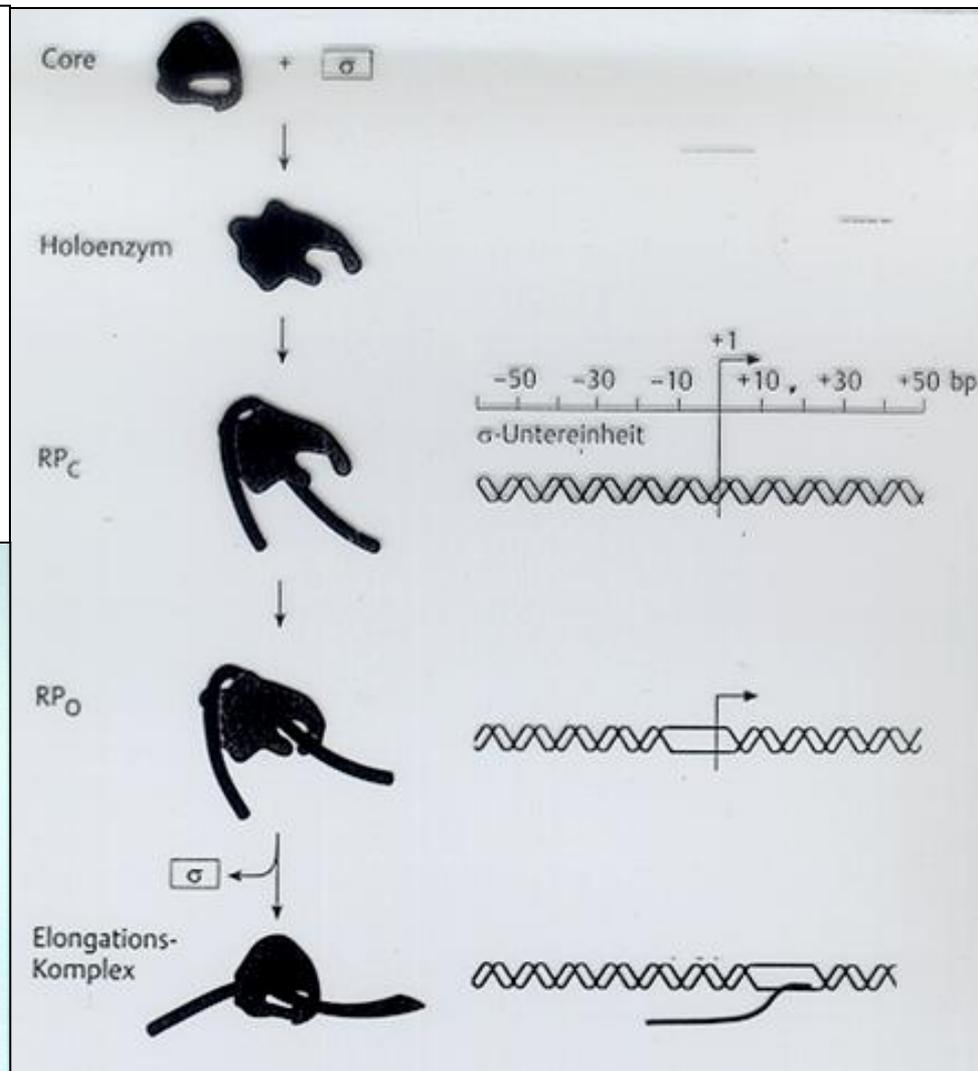
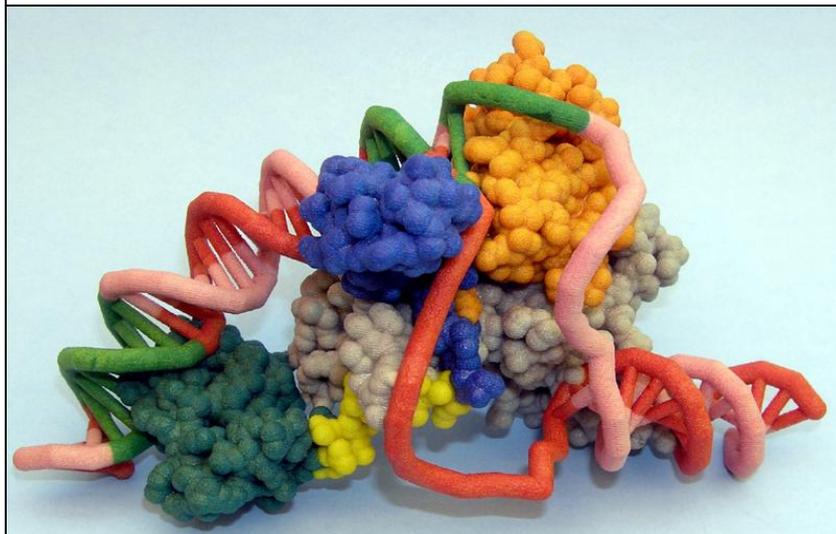
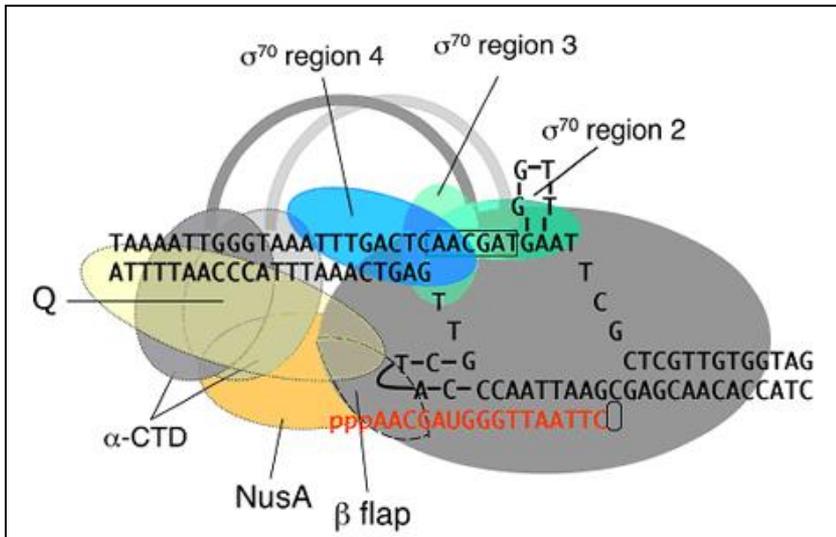
RNA-Polymerase in Prokaryoten

Von der Kristallstruktur abgeleitetes Strukturmodell



RNA-Polymerase in Prokaryoten

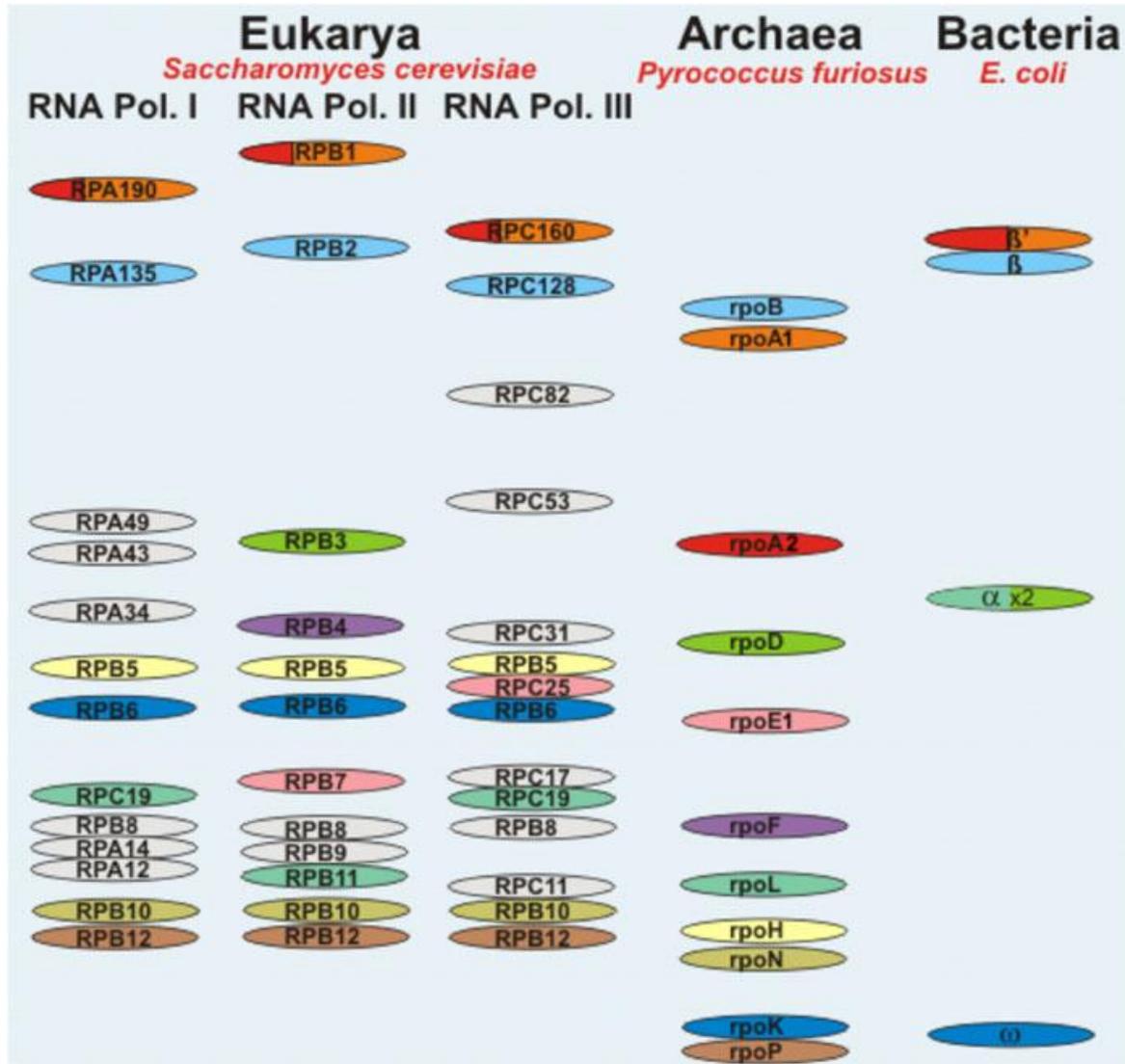
Die Bindung der RNA-Polymerase induziert eine Biegung der DNA, die die Formierung eines „offenen“ Komplexes unterstützt.



RNA-Polymerasen in Eukaryoten

Im Zellkern liegen 3 RNA-Polymerasen vor.

Die großen Untereinheiten sind sich sehr ähnlich (konserviert) – **homolog!**



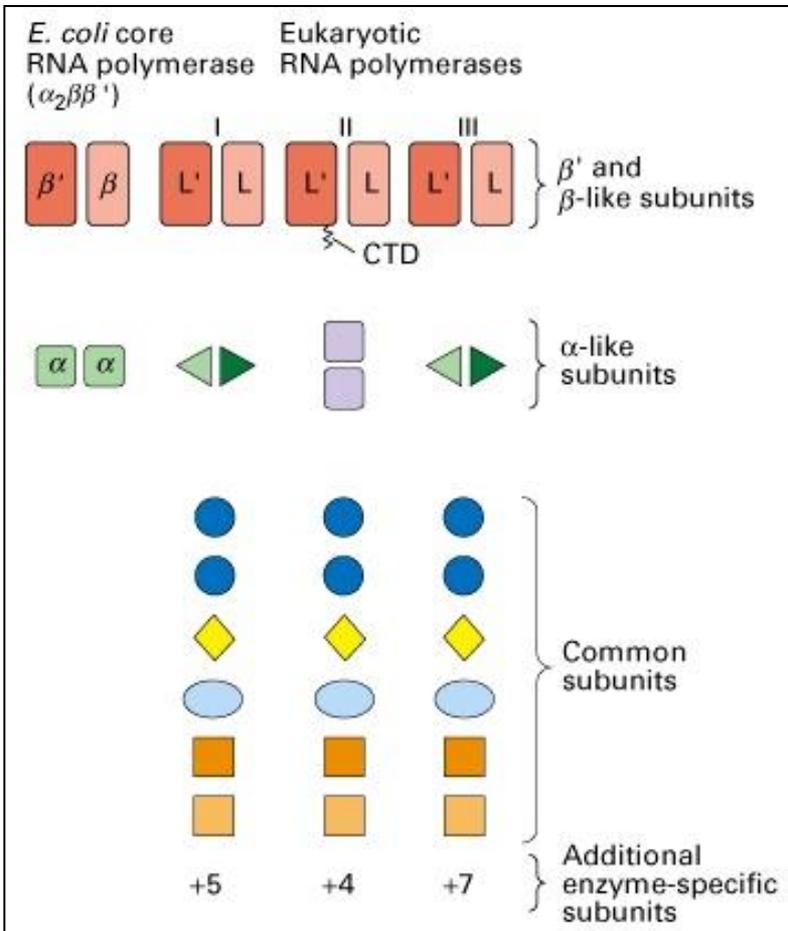
Phagen/Viren

RNA-Pol. aus 2 UE!



Initiation der Transkription in Eukaryoten

Im Zellkern liegen 3 RNA-Polymerasen vor.



Funktion

RNA-Polymerase I: rRNA-codierende Gene

RNA-Polymerase II: Protein-codierende Gene

RNA-Polymerase III: tRNA, 5s rRNA, sn-uRNA, sncRNA-codierende Gene

Alle euk. RNA-Polymerasen benötigen Hilfsfaktoren (Transkriptionsfaktoren) zur Initiation am Promotor!



RNA-Polymerasen in Eukaryoten

Die große Untereinheit der RNA-Polymerase II hat einen C-terminalen Fortsatz, der viele AS-Sequenzwiederholungen aufweist.

Human RNAPII-CTD

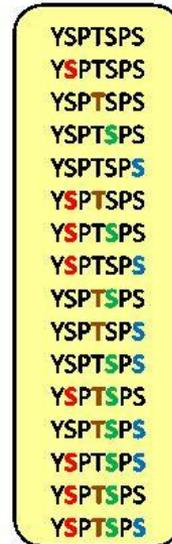
1	YSPTSPA	28	YSPTSPS
2	YEPRSPGG	29	YSPTSPS
3	YTPQSPS	30	YSPTSPS
4	YSPTSPS	31	YSPSSPR
5	YSPTSPS	32	YTPQ\$PT
6	YSPTSPN	33	YTPS\$PS
7	YSPTSPS	34	YSPSSPS
8	YSPTSPS	35	YSPTSPK
9	YSPTSPS	36	YTPTSPS
10	YSPTSPS	37	YSPSSPE
11	YSPTSPS	38	YTPTSPK
12	YSPTSPS	39	YSPTSPK
13	YSPTSPS	40	YSPTSPK
14	YSPTSPS	41	YSPTSPV
15	YSPTSPS	42	YSPTTPK
16	YSPTSPS	43	YSPTSPV
17	YSPTSPS	44	YSPTSPV
18	YSPTSPS	45	YTPTSPK
19	YSPTSPS	46	YSPTSPV
20	YSPTSPS	47	YSPTSPK
21	YSPTSPS	48	YSPTSPV
22	YSPTSPN	49	YSPTSPK\$ST
23	YSPTSPN	50	YSPTSPG
24	YTPTSPS	51	YSPTSPV
25	YSPTSPS	52	YSLT\$PAISPDD\$DEEN
26	YSPTSPN		
27	YTPTSPN		

Saccharomyces cerevisiae RNAPII-CTD

1	YSPTSPA
2	YSPTSPS
3	YSPTSPS
4	YSPTSPS
5	YSPTSPS
6	YSPTSPS
7	YSPTSPS
8	YSPTSPS
9	YSPTSPS
10	YSPTSPS
11	YSPTSPS
12	YSPTSPS
13	YSPTSPS
14	YSPTSPS
15	YSPTSPS
16	YSPTSPA
17	YSPTSPS
18	YSPTSPS
19	YSPTSPS
20	YSPTSPS
21	YSPTSPN
22	YSPTSPS
23	YSPTSPG
24	YSPG\$PA
25	YSPKQDEQKHENENSR

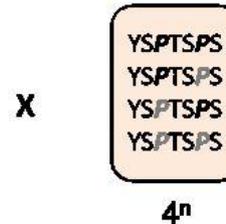
Consensus sequence: Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇
 Main phosphorylation sites: Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇
 Other phosphorylation sites: Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇

Possible patterns of CTD-phosphorylation

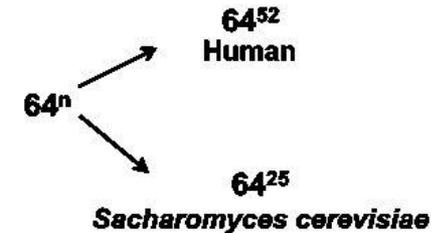


16ⁿ

Possible patterns of CTD cis-trans isomerization

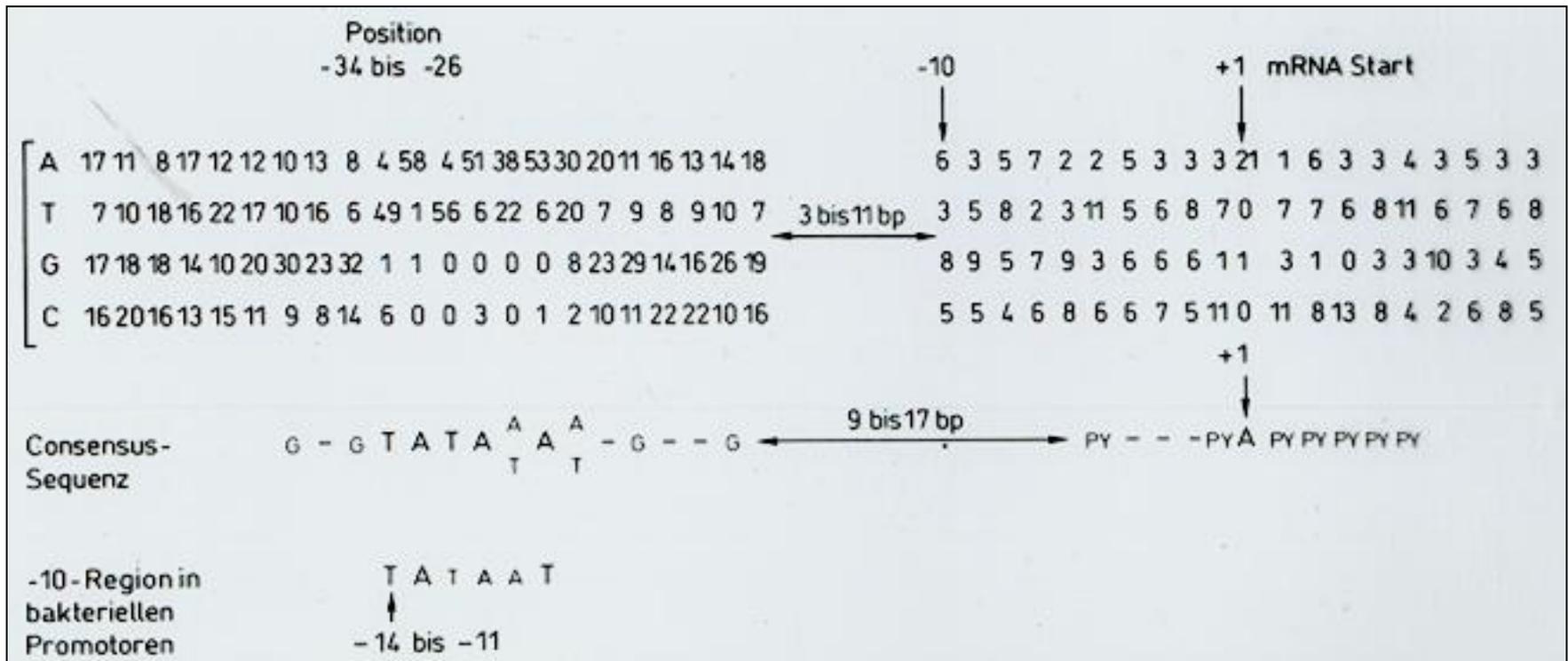


Possible CTD states



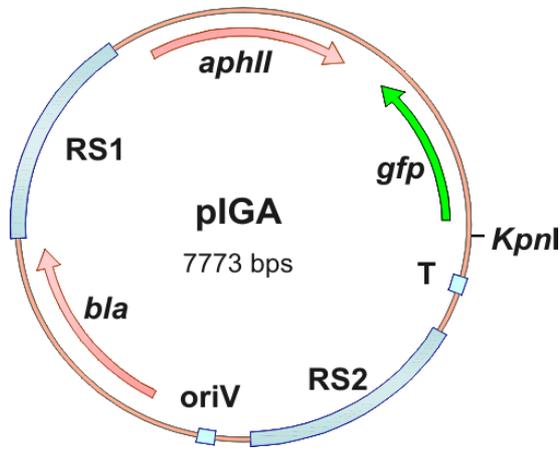
Initiation der Transkription in Eukaryoten - RNAPII

Nur die TATA-Box und das Inr Element sind meist konserviert.
Der eukaryotische Grundpromotor trägt Modulcharakter!

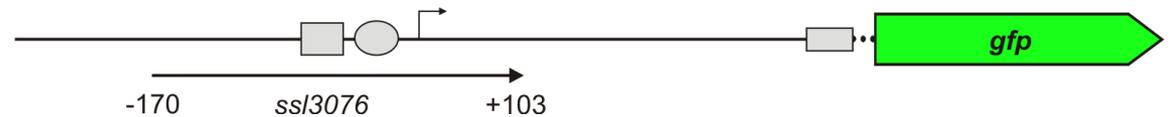


Initiation der Transkription in Eukaryoten - RNAPII

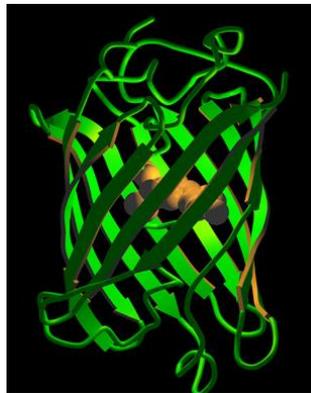
Identifizierung weiterer Promotorelemente durch Promotor-mapping
Ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt +1



Schrittweise Deletion/Mutation des Promotors



Green-fluorescence-protein

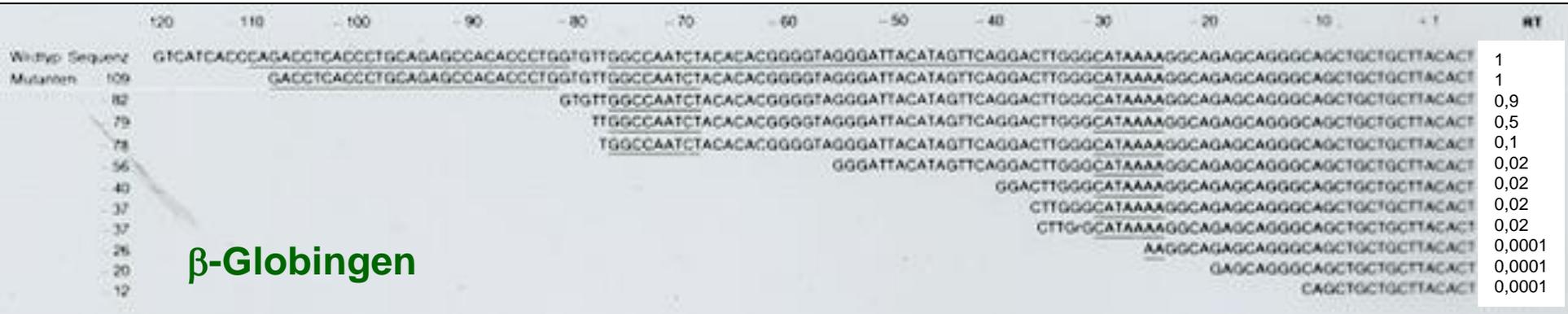


Quantitative Messung
der Promotoraktivität mittels
Reportergenexpression
z.B. Gfp-Fluoreszenz an intakten Zellen



Initiation der Transkription in Eukaryoten - RNAPII

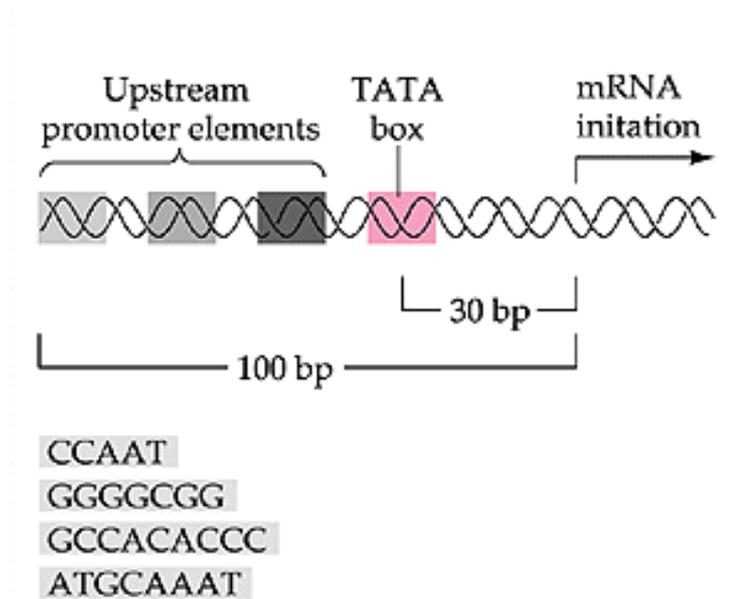
Weitere Elemente sind genspezifisch – experimenteller Nachweis notwendig.
GC- und CCAAT-Boxen gehören häufig zum Grundpromotor.



Initiation der Transkription in Eukaryoten - RNAPII

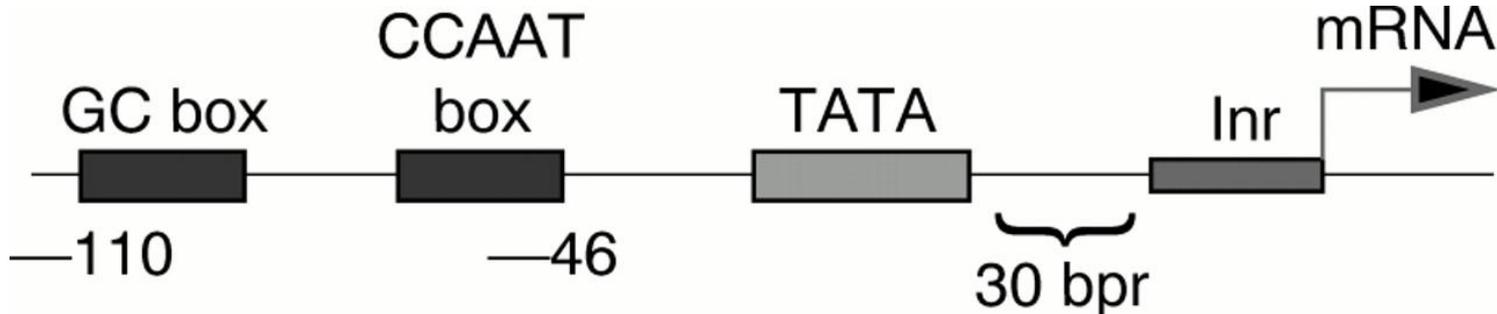
Eukaryotische Promotoren sind **modular** aufgebaut.

Zusätzlich zum Grundpromotor existieren „upstream“ Elemente und „Enhancer“.



Grundpromotorelemente

Meist TATA und Inr-Element
Häufig zusätzlich GC- und CCAAT-Boxen in wechselnder Zahl und Orientierung.

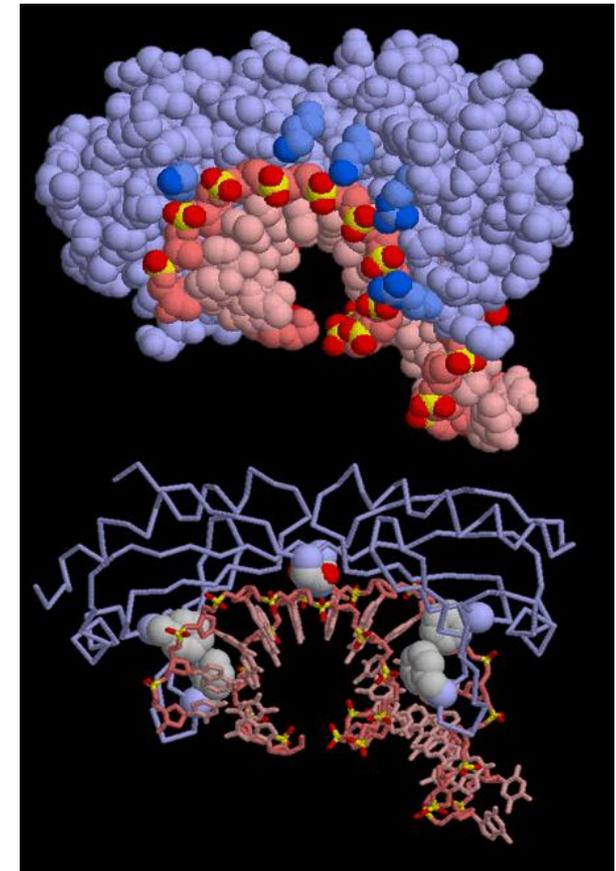
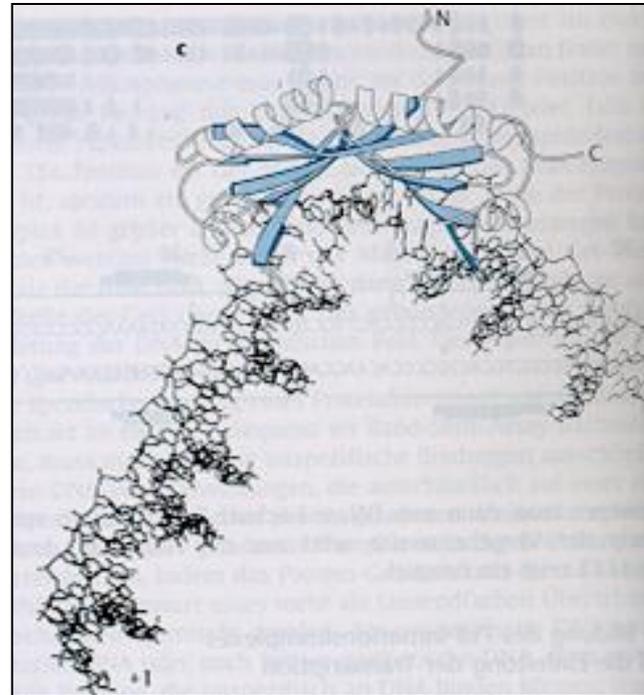
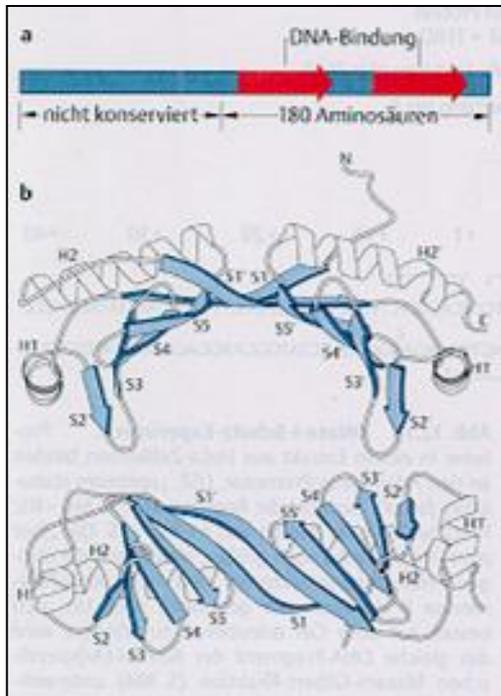


Initiation der Transkription in Eukaryoten - RNAPII

Die TATA-Box wird von TBP im TFIID erkannt und gebunden.

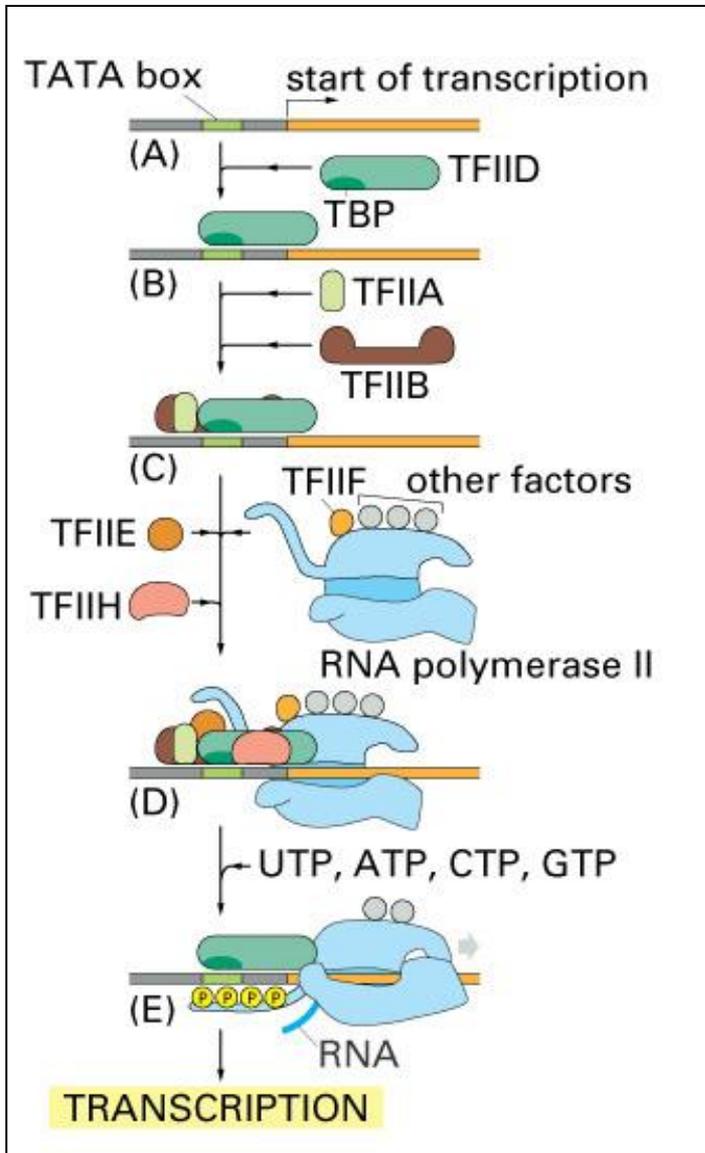
TBP = TATA-Binde-Protein

TBP induziert eine DNA-Verbiegung.



Initiation der Transkription in Eukaryoten - RNAPII

Die RNA-Polymerase ist nicht allein aktiv!
Eine Reihe von universellen TF helfen der RNAPII gemeinsam mit TFIID an den Grundpromotor zu binden.

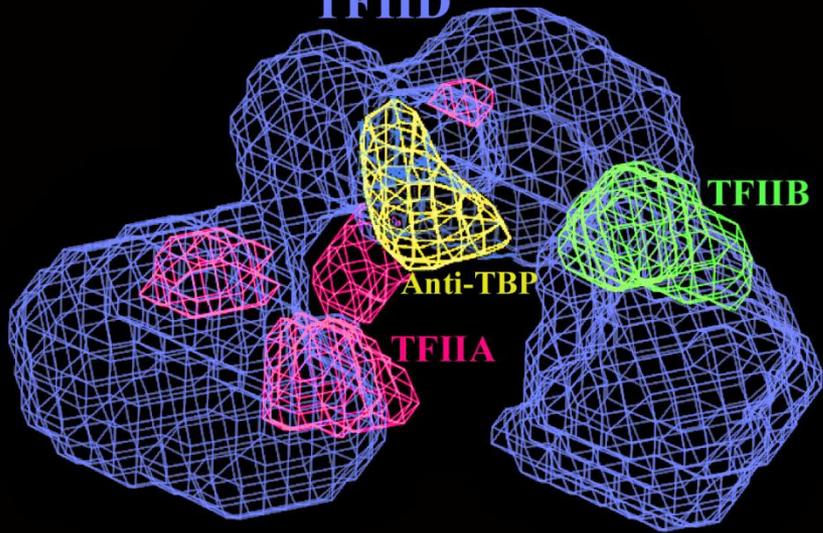


Tab. 12.3 Allgemeine Transkriptionsfaktoren

Bezeichnung	Untereinheiten	Mol.-Gew. (kDa)	Funktion	
TFIID	TBP	1	38	Erkennen der TATA-Box Bindung von TAFs
	TAFs	bis zu 12	15-250	Erkennen von TATA-freien Promotoren verschiedene regulatorische Funktionen
TFIIA		3	12, 19, 35	Stabilisierung der TFIID-Bindung Entfernen/Neutralisieren von negativen Faktoren
TFIIB		1	35	Bindung der RNA-Polymerase II
TFIIF		2	30, 74	Heranführen der RNA-Polymerase II an den Promotor
TFIIE		2	34, 57	Heranführen von TFIIH, Regulation der enzymatischen Aktivitäten von TFIIH
TFIIH		9	35-89	DNA-Helikase: Entwindung der Promotor-Sequenz Protein-Kinase: Phosphorylierung der carboxyterminalen Domäne von RNA-Polymerase II
	hierzu gehören:		89	3'-5'-DNA-Helikase (XPB)
			80	5'-3'-DNA-Helikase (XPD)
			40	cyclinabhängige Protein-Kinase (CDK7)
			38	Cyclin H

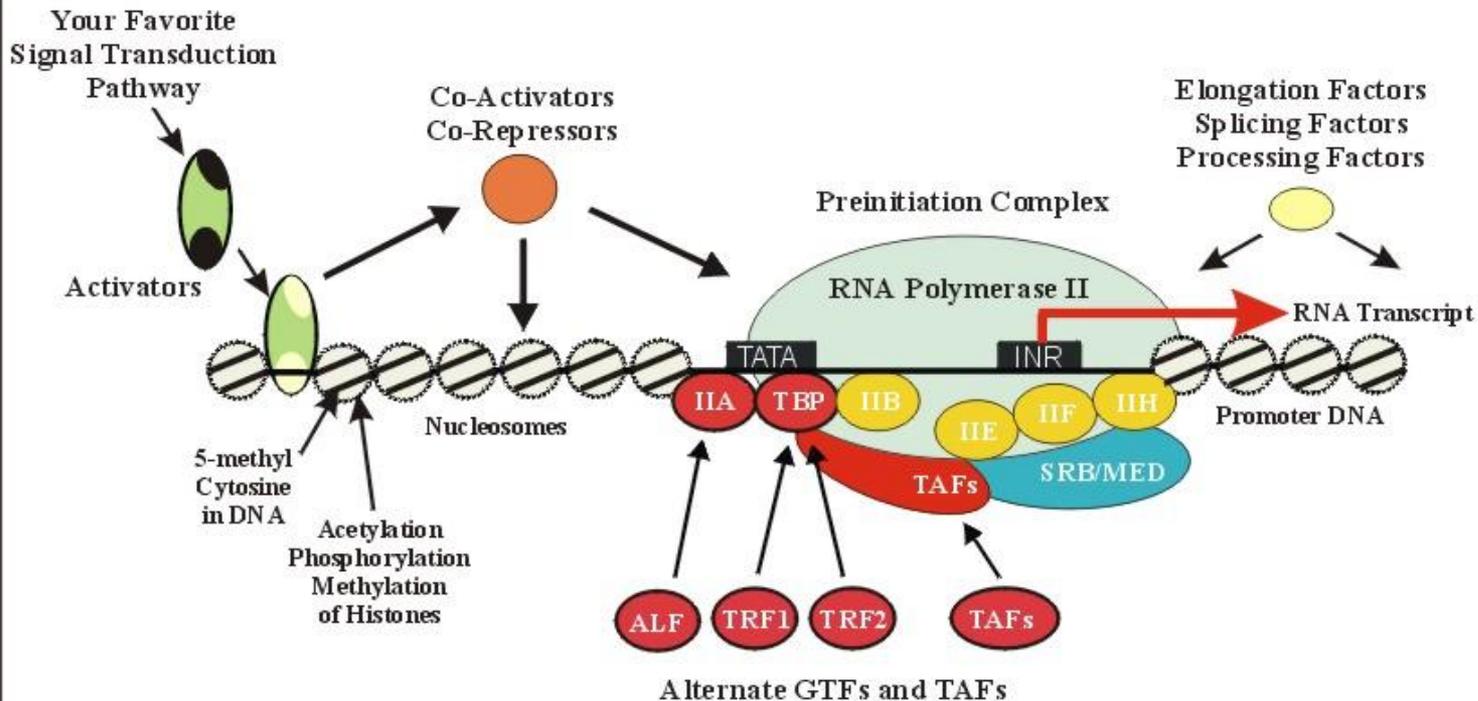


TFIID



Initiation der Transkription in Eukaryoten - RNAPII

TBP – TATA-Binde-Protein – ist mit weiteren Proteinen assoziiert die als TAFs = TBP-Assoziierte-Faktoren bezeichnet werden (Komplex ist TFIID).



Cartoon figure depicting the assembly of certain transcription factors on the promoter of a eukaryotic gene.



Initiation der Transkription in Eukaryoten - RNAPII

TATA-Box-freie Promotoren werden an GC-Boxen durch den TF SP1 sequenzspezifisch erkannt und initiiert

