

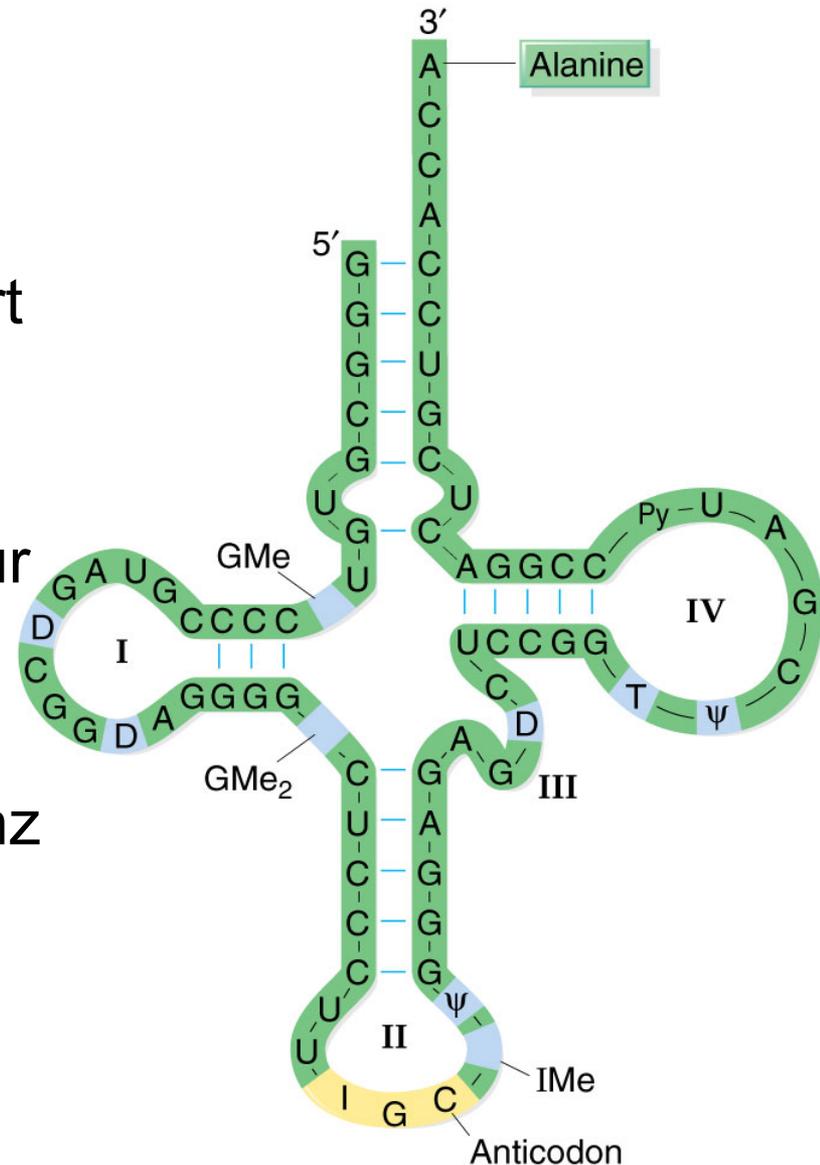
Translation erfolgt vom 5' zum 3' Ende der mRNA. tRNAs (transfer RNAs) bringen Aminosäuren zum Ribosom
a) Cloverleaf model of tRNA

Jede tRNA wird mit einer spezifischen Aminosäure beladen.

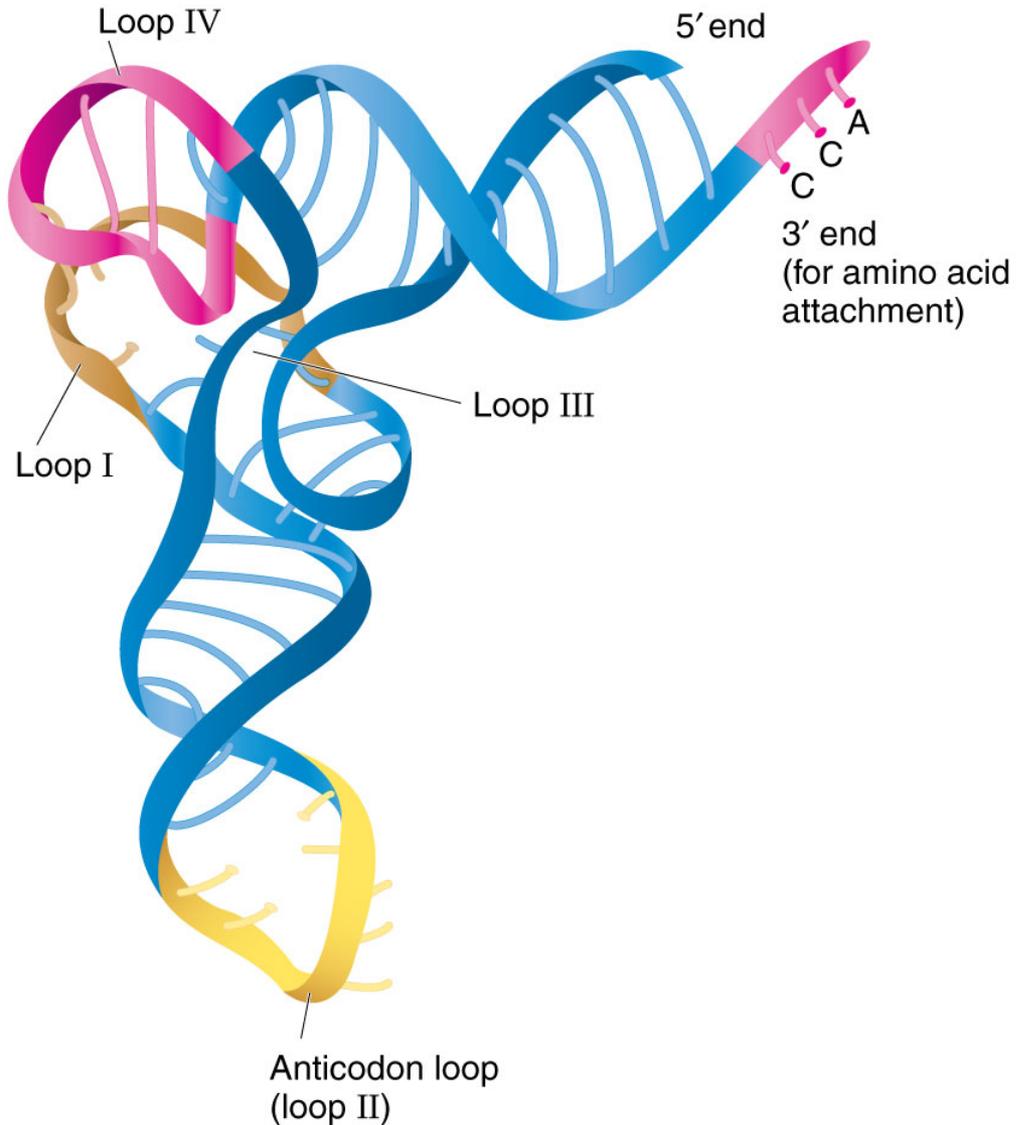
Das Anticodon der tRNA basenpaart mit dem Codon der mRNA.

tRNAs nehmen eine Kleeblattstruktur (durch Basenpaarungen) ein.

Alle tRNAs haben eine CCA Sequenz an deren 3' Ende. Diese Sequenz wird post-transkriptionell angefügt.

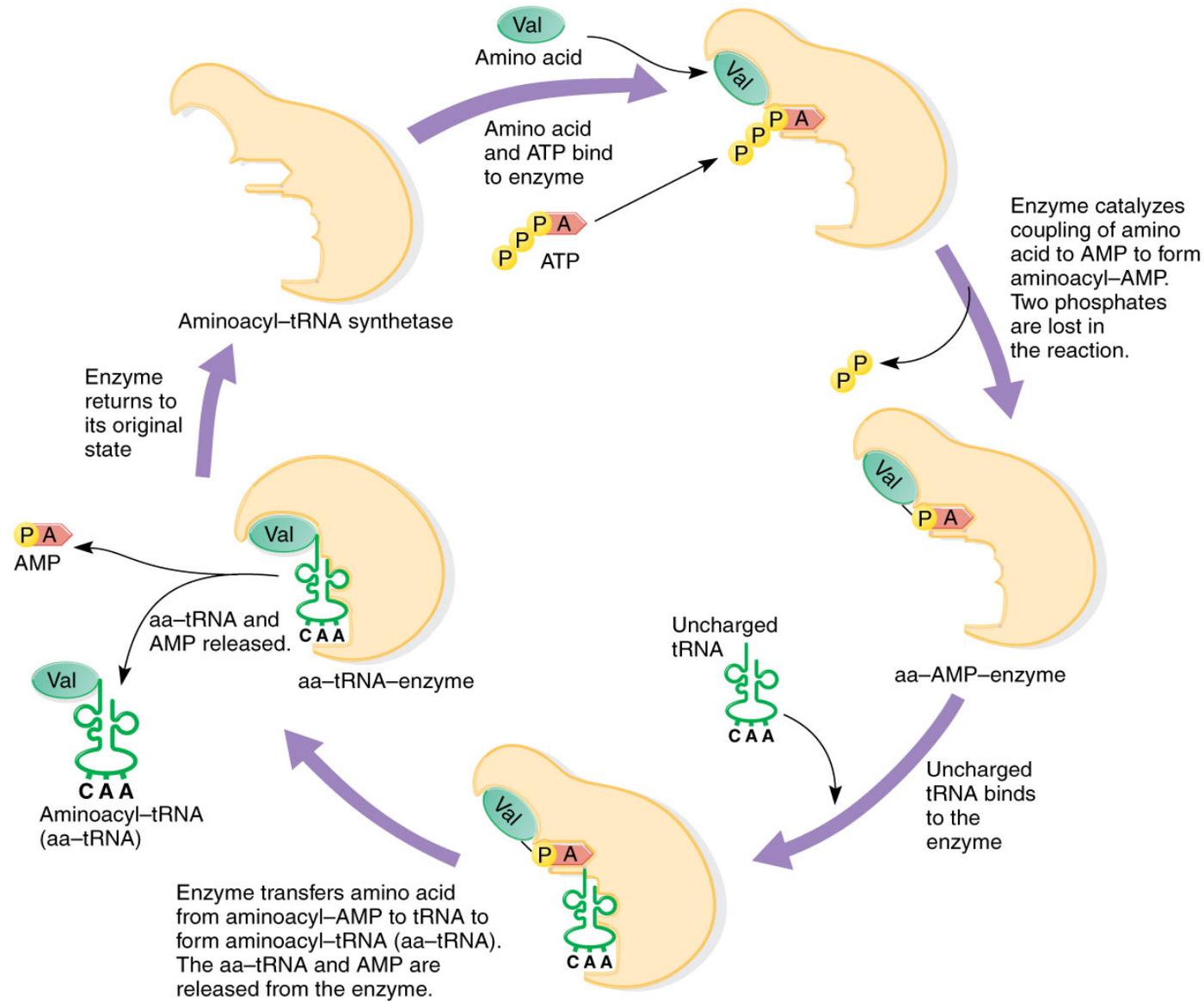


b) Schematic of the three-dimensional L-shaped structure of a tRNA, here yeast phenylalanine tRNA

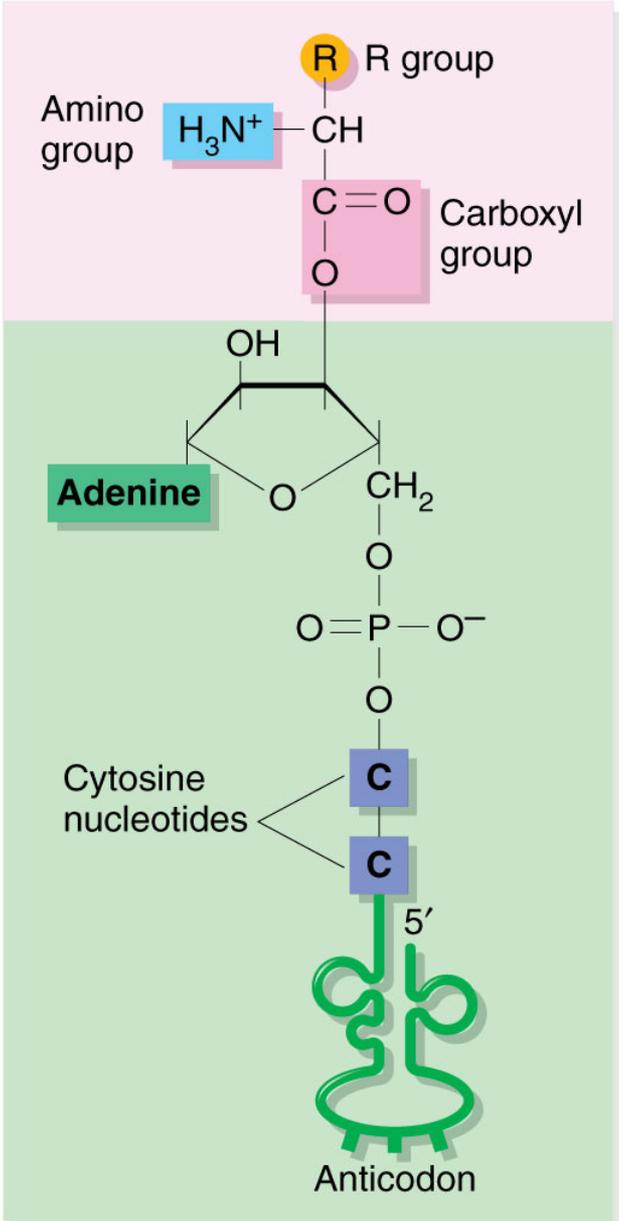


In gefaltetem Zustand nimmt die tRNA eine L-Form ein

Aminoacyl-tRNA Synthetase belädt tRNAs unter ATP Verbrauch



Die Carboxyl Gruppe der Aminosäure bindet an das 3' oder 2' OH der tRNA



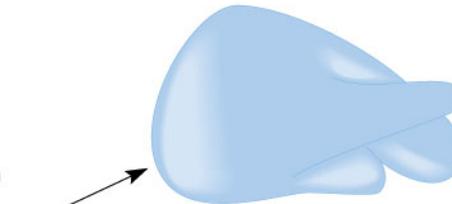
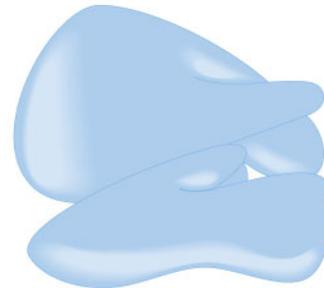
Amino acid attached by carboxyl group to ribose of last ribonucleotide of tRNA chain

Last 3 nucleotides of all tRNAs are -CCA-3'

Bakterielle und eukaryotische Ribosomen sind einander sehr ähnlich. Die RNAs im Ribosom haben strukturelle aber auch katalytische Funktion

a)

Bacterial ribosome (70S)
(2.5×10^6 daltons)



50S subunit



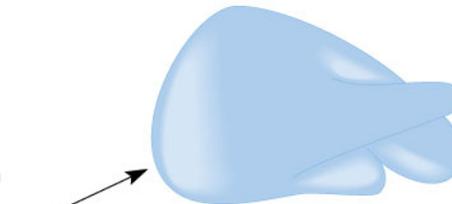
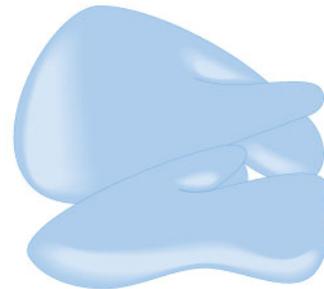
30S subunit

23S rRNA (2,904 nt)
+
5S rRNA (120 nt)
+
31 proteins

16S rRNA (1,542 nt)
+
21 proteins

b)

Mammalian ribosome (80S)
(4.2×10^6 daltons)



60S subunit



40S subunit

28S rRNA (4,718 nt)
+
5.8S rRNA (160 nt)
+
5S rRNA (120 nt)
+
49 proteins

18S rRNA (1,874 nt)
+
33 proteins

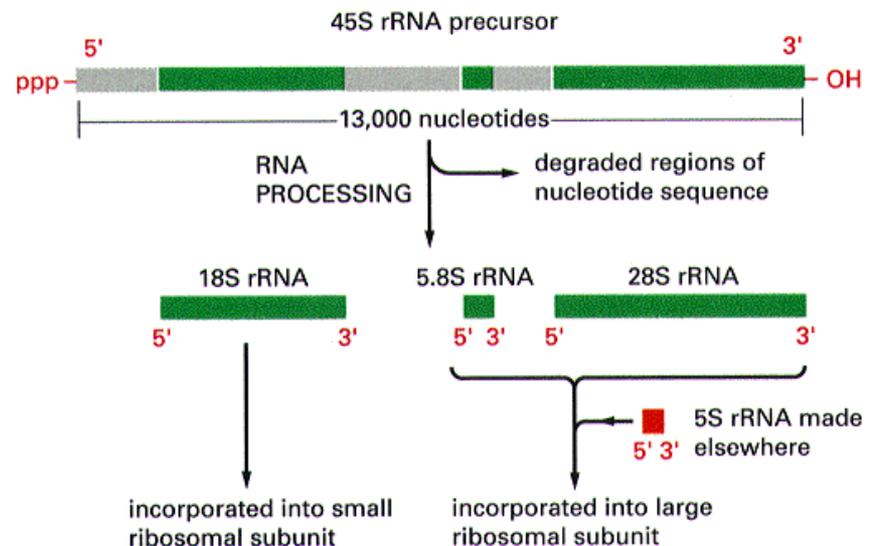
nt = nucleotides

Ribosomale RNA wird als ein precursor-Molekül transkribiert:

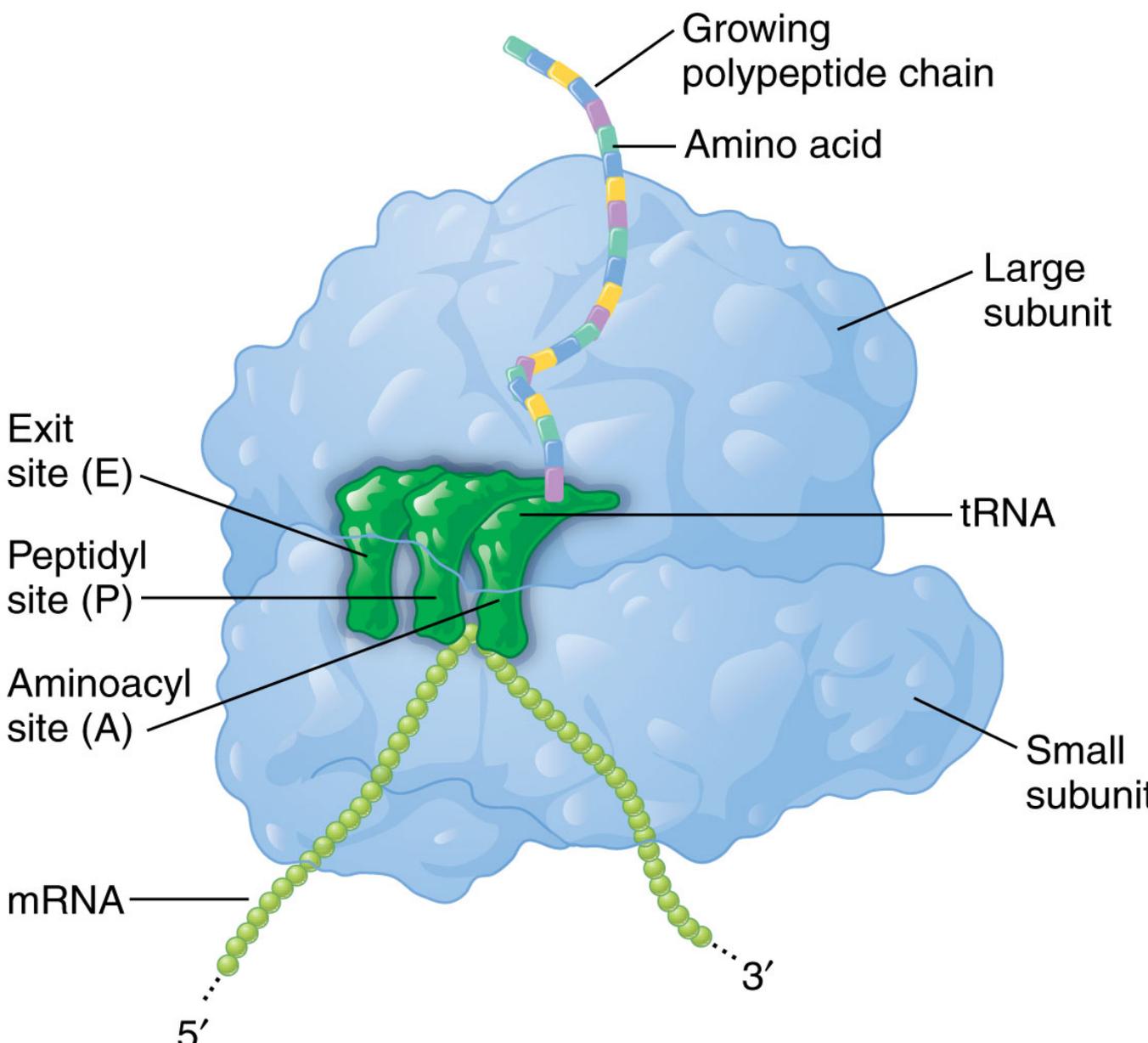
In Bakterien ist dies als 16S 23S 5S Transkript organisiert

In Eukaryoten als 18S-5.8S-28S (bzw. 25S bzw. 23 S (Pflanzen, Tiere, Pilze))

Das primäre Transkript wird in seine Untereinheiten zerschnitten (prozessiert).



tRNA interagiert mit dem Ribosom an der A, P, und E site

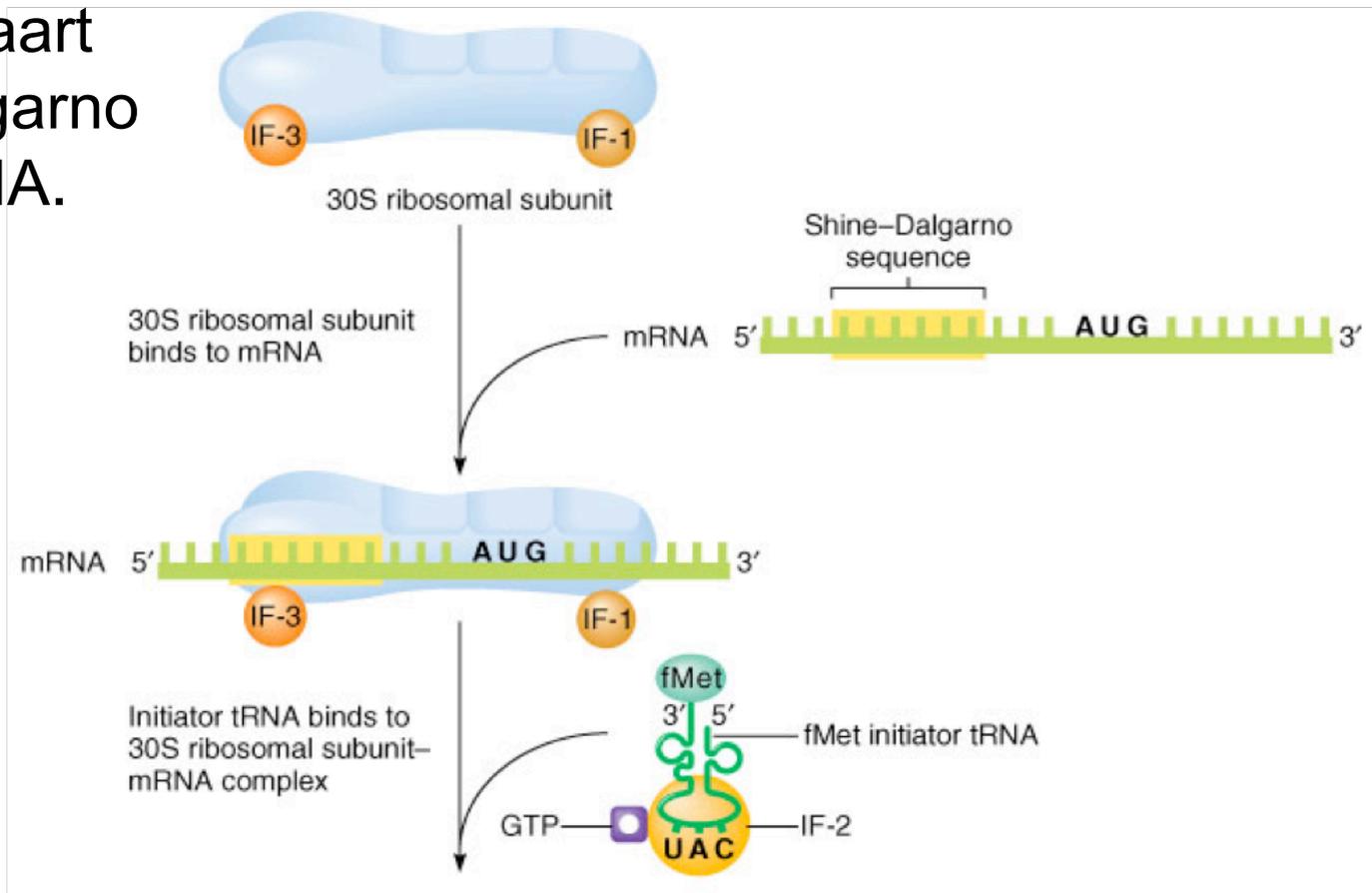


Translation wird in 3 Phasen reguliert: *Initiation*, *Elongation*, *Termination*

In Prokaryoten:

Initiation wird von Initiationsfaktoren reguliert. Initiation Factor 1 und 3 binden die kleine ribosomale Untereinheit. Diese bindet das 5' -Ende der RNA

Die rRNA Basenpaart mit der Shine-Dalgarno Sequenz der mRNA.

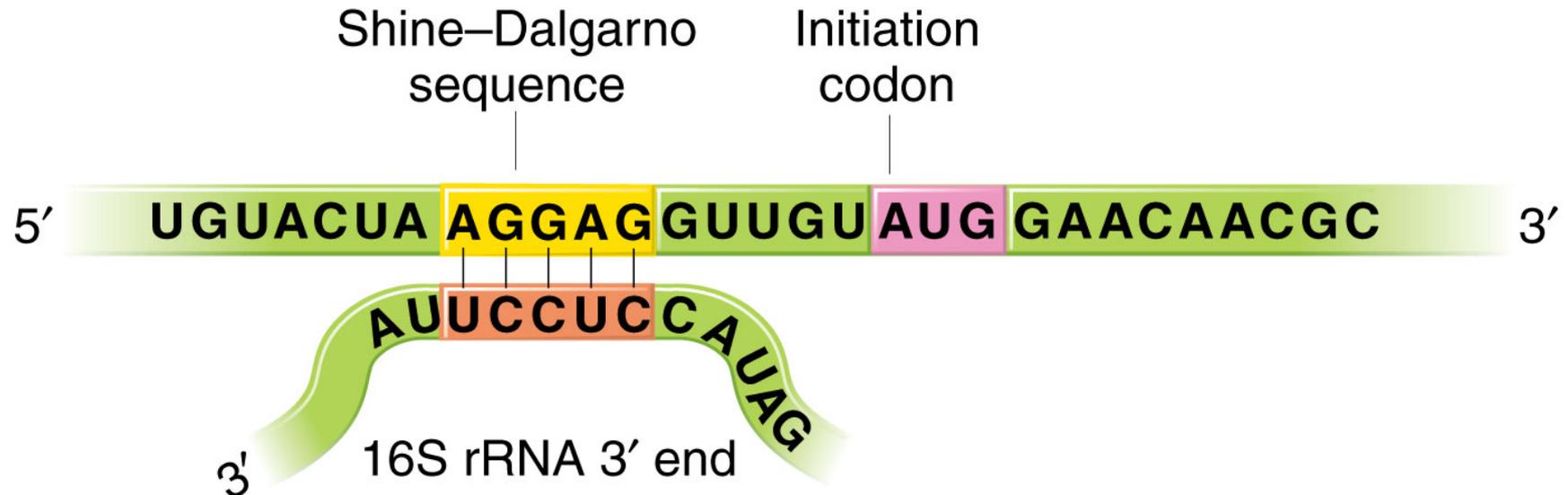


Die Shine-Dalgarno Basenpaarung wurde mittels Mutationsanalyse verifiziert.

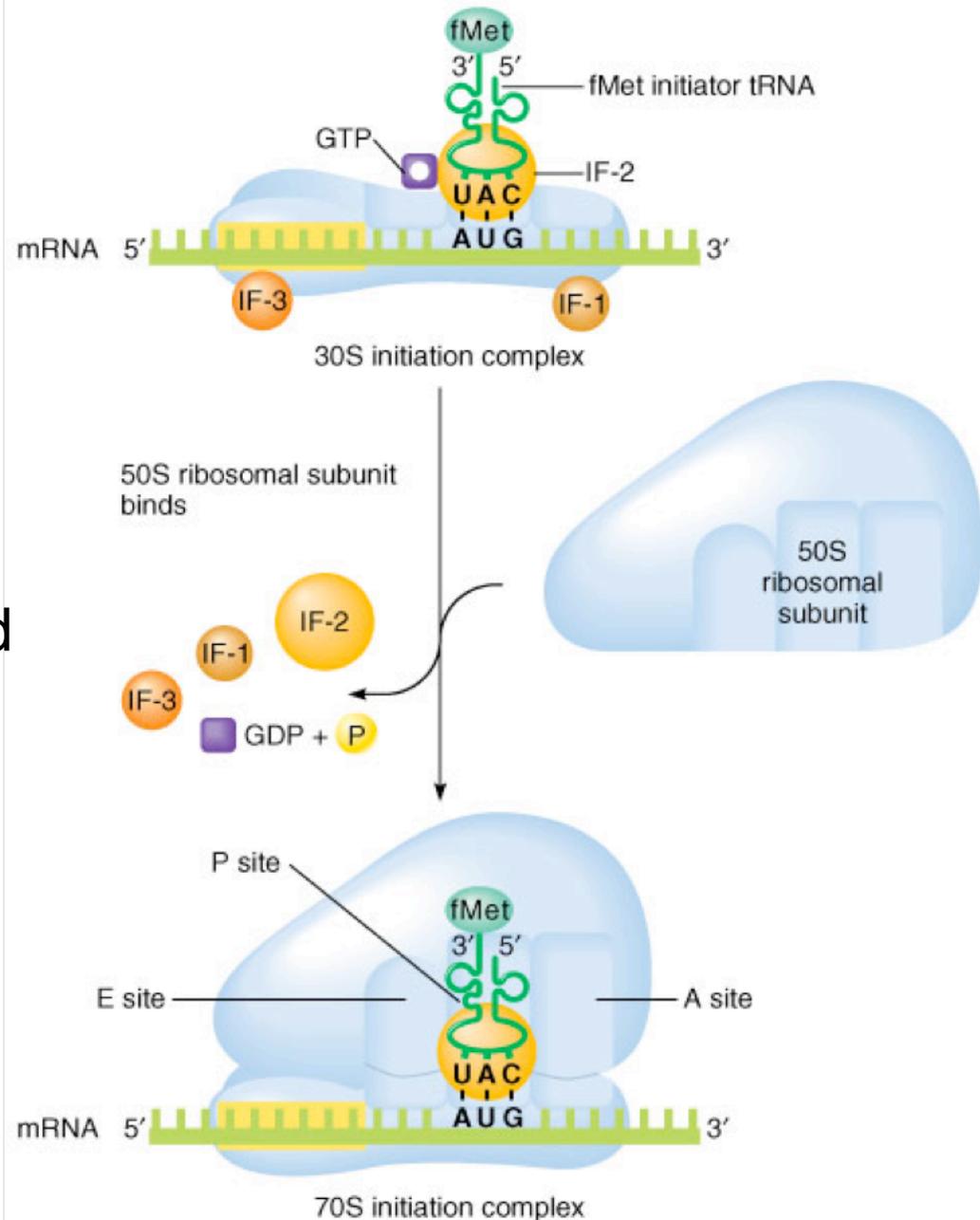
a) Sequence at 3' end of 16S rRNA

3' **AUCCUCCA**UAG 5'

b) Example of sequence upstream of the AUG codon in an mRNA pairing with the 3' end of 16S rRNA



In Pro- und Eukaryoten beginnt die Translation mit einem Methionin (AUG) In Bakterien ist die erste Aminosäure modifiziert **fMET** (= **Formylmethionin**). fMET tRNA wird durch IF2 und GTP von normaler MET tRNA unterschieden. IF1 blockiert die A site. fMET wird über die P-site geladen. Binden der grossen Untereinheit entlässt die drei Initiationsfaktoren.



Translation in Eukaryoten

Erfordert eIFs. (Eukaryotic initiation factors)

Benötigt KEINE Shine-Dalgarno Sequenz.

Die mRNA muss ein **Cap** tragen (eIF4E bindet daran)

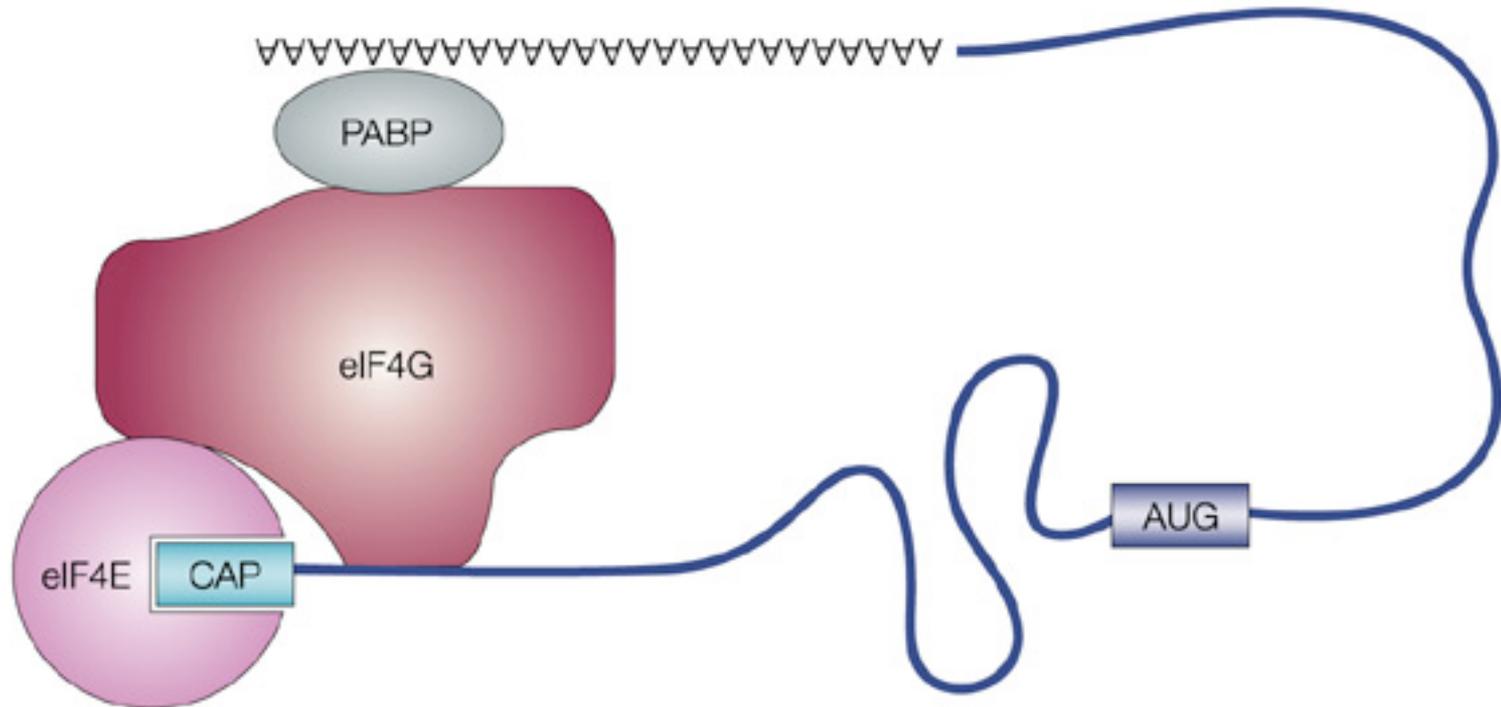
eIFs und eine mit met-tRNA beladene 40 S subunit scannen das 5' Ende der RNA bis zum 1. AUG .

Nach Erkennen des AUGs bindet die 60S Untereinheit und nahezu alle eIFs werden entlassen (ausser eIF4F.)

Das 3' Ende des A+ tails der RNA interagiert mit dem Cap.

Dies führt zu einem geschützten, cirkulären Molekül, welches effizient translatiert werden kann.

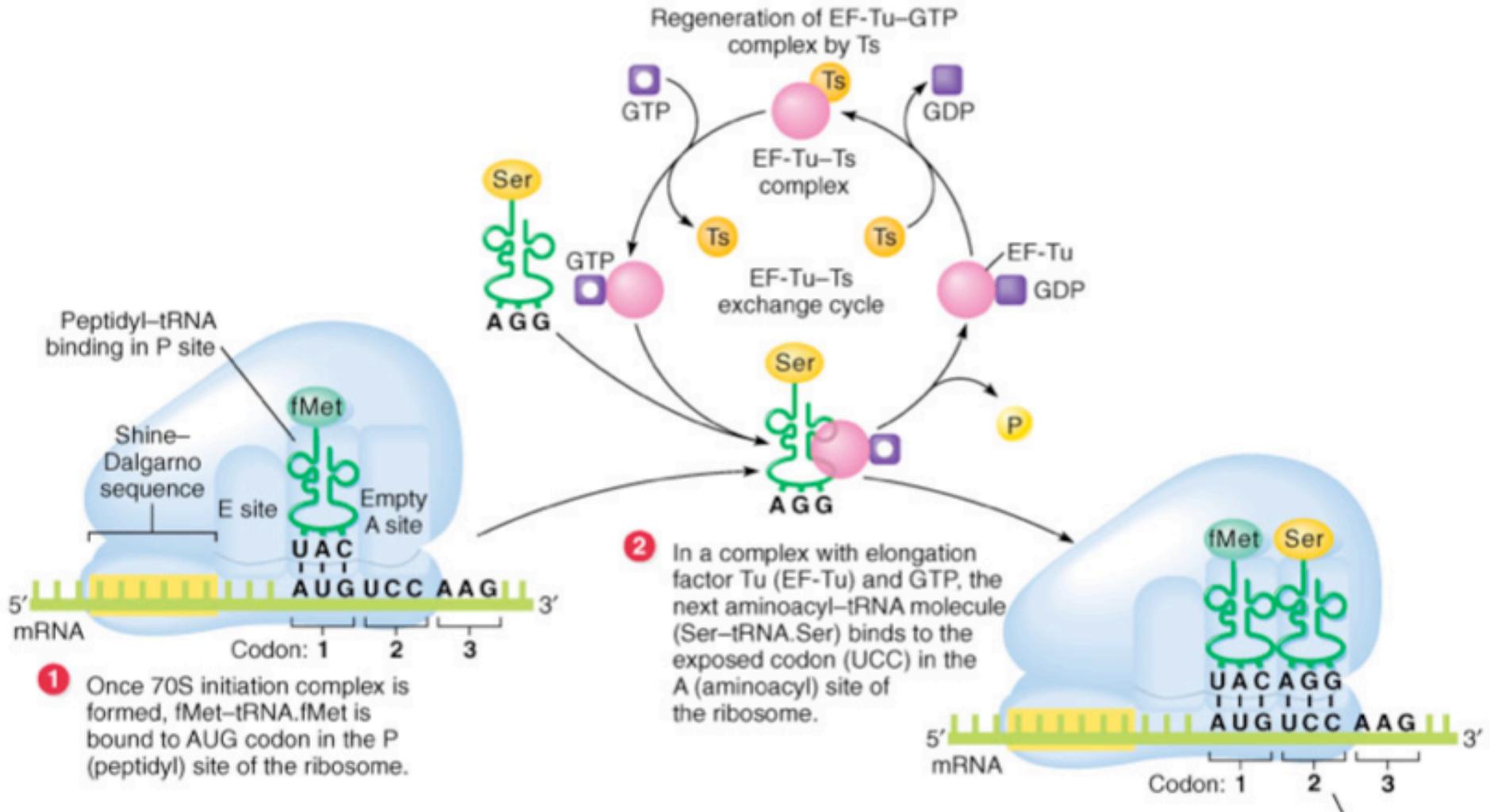
Zirkularisierung der mRNA sorgt für effiziente Translation



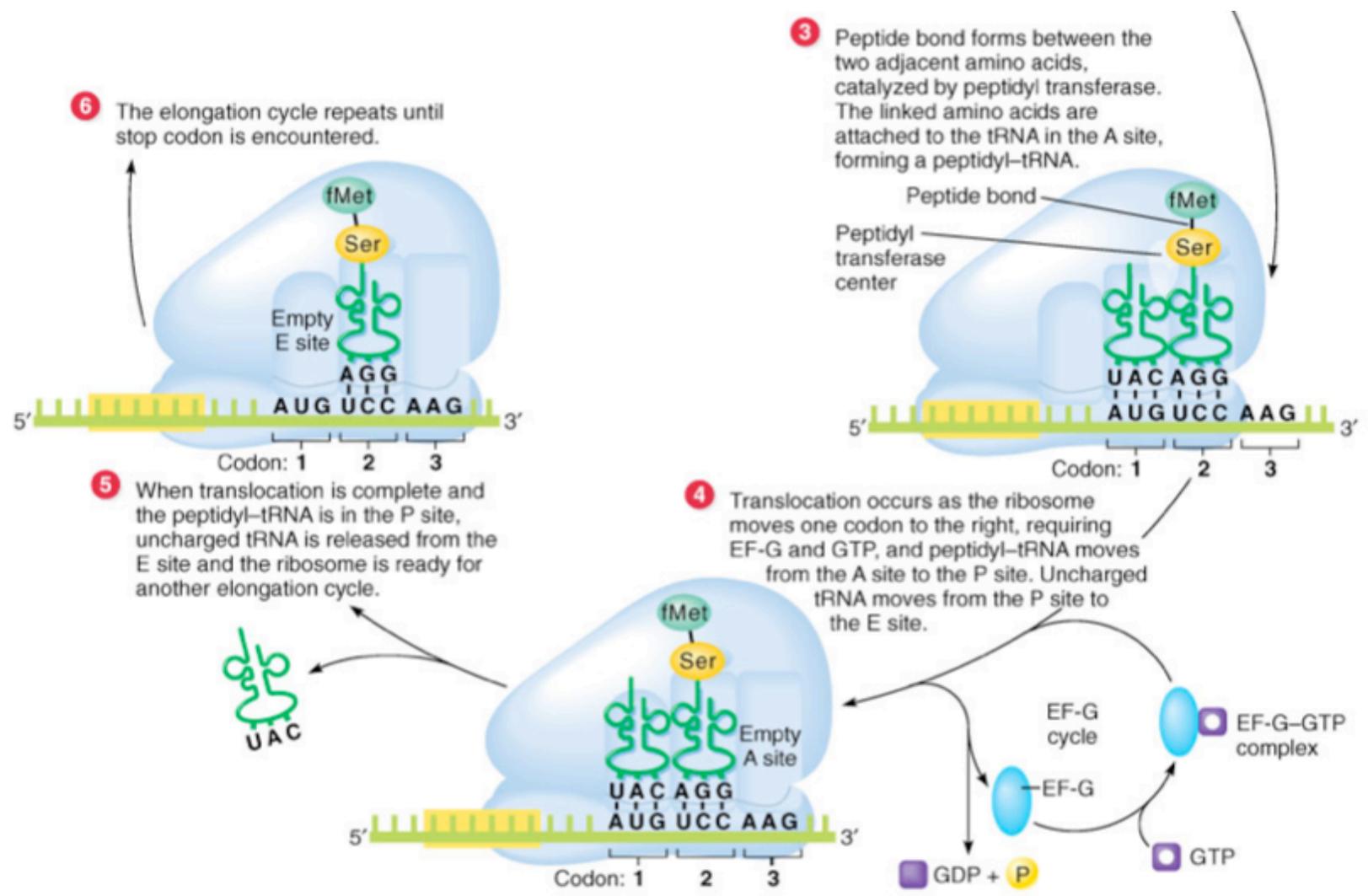
ELONGATION

Elongationsfaktoren werden in Eu- und Prokaryoten benötigt.
Elongation factor Tu (Ef-TU) wird mit der tRNA komplexiert und bindet an die A-site

Ef-TU wird durch Ef-Ts neu mit GTP beladen



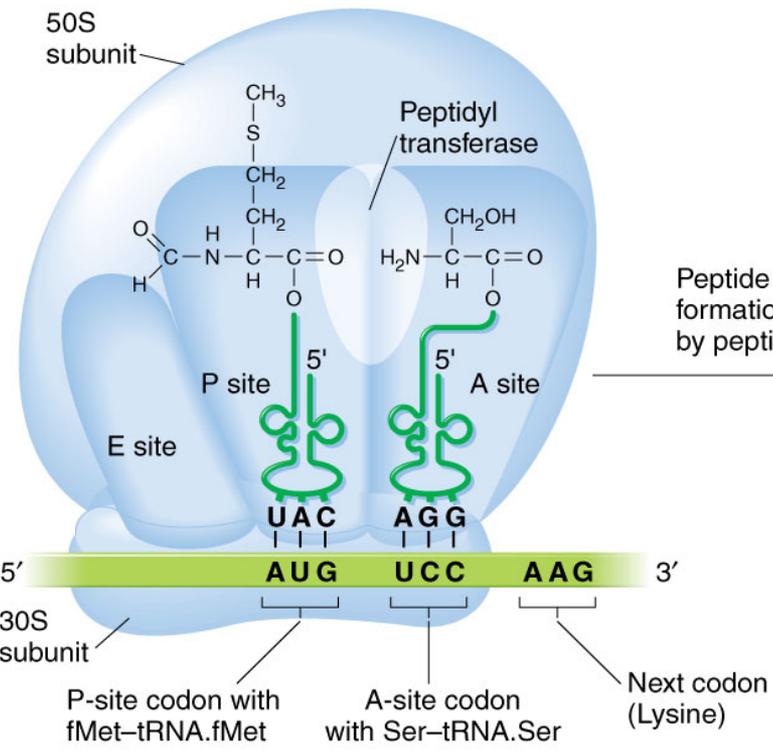
Nach Peptidbindung (3), führt EF-G zur Translokation von A zur P site (in Bakterien). Erst wenn eine freie tRNA die E-site verlässt, ist die A site für die Aufnahme einer neuen tRNA bereit (mit Ef-TU)



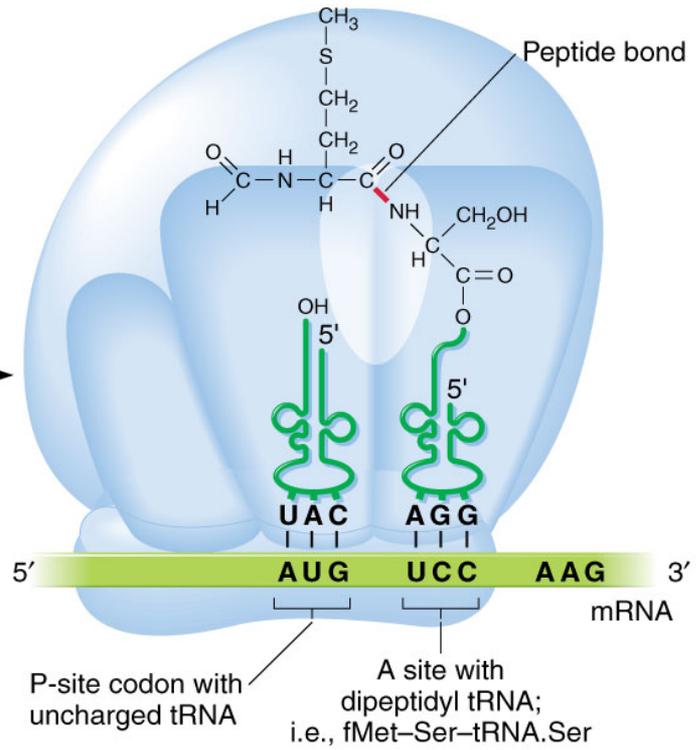
eEF2 in Eukaryoten

Peptidyl-transferase Aktivität verknüpft zwei Aminosäuren. Diese Aktivität wird durch die ribosomale **RNA** bewerkstelligt. Chloramphenicol inhibiert die Peptidyltransferase Aktivität. D.h. die 23S rRNA ist ein *Ribozym* (RNA mit enzymatischer Aktivität)

a) Adjacent aminoacyl-tRNAs bound to the mRNA at the ribosome

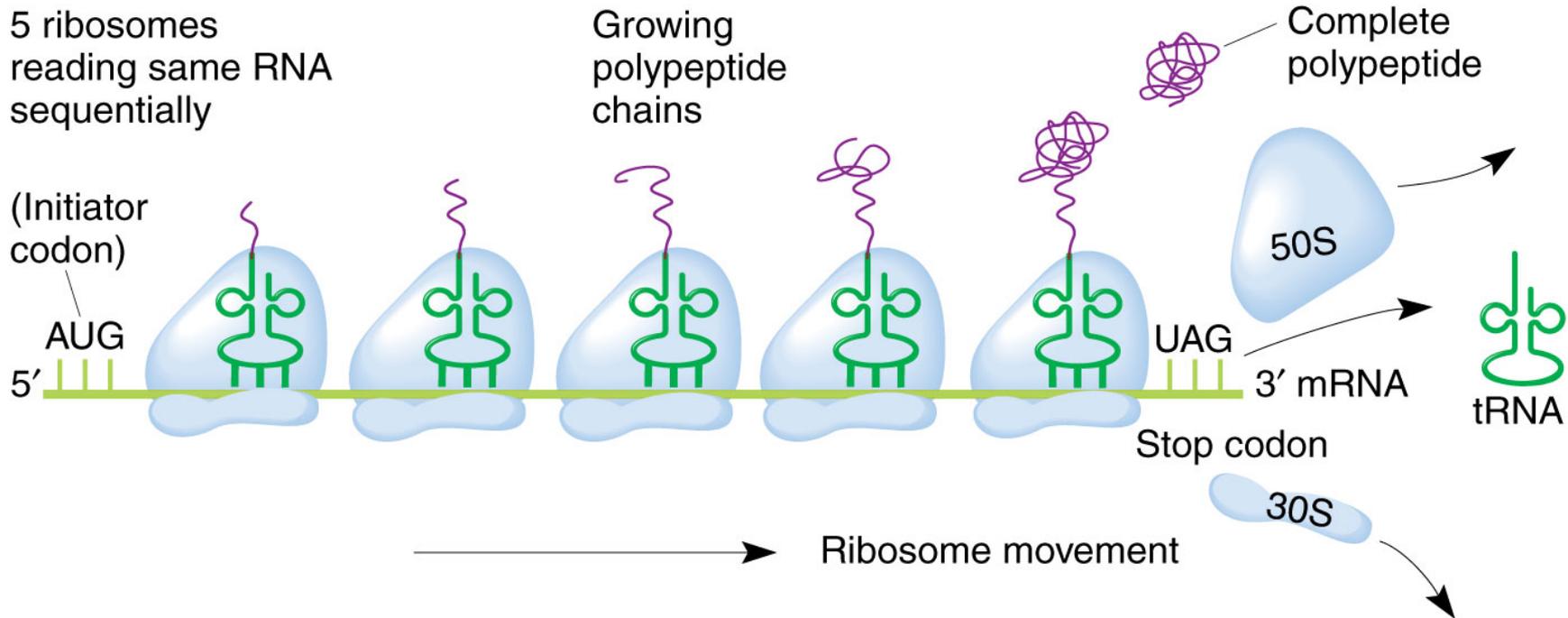


b) Following peptide bond formation, an uncharged tRNA is in the P site, and a tRNA with two amino acids attached is in the A site



Sobald das Risosom einige codons vom Start-Codon entfernt ist, kommt es zu einer neuen Translationsinitiation.

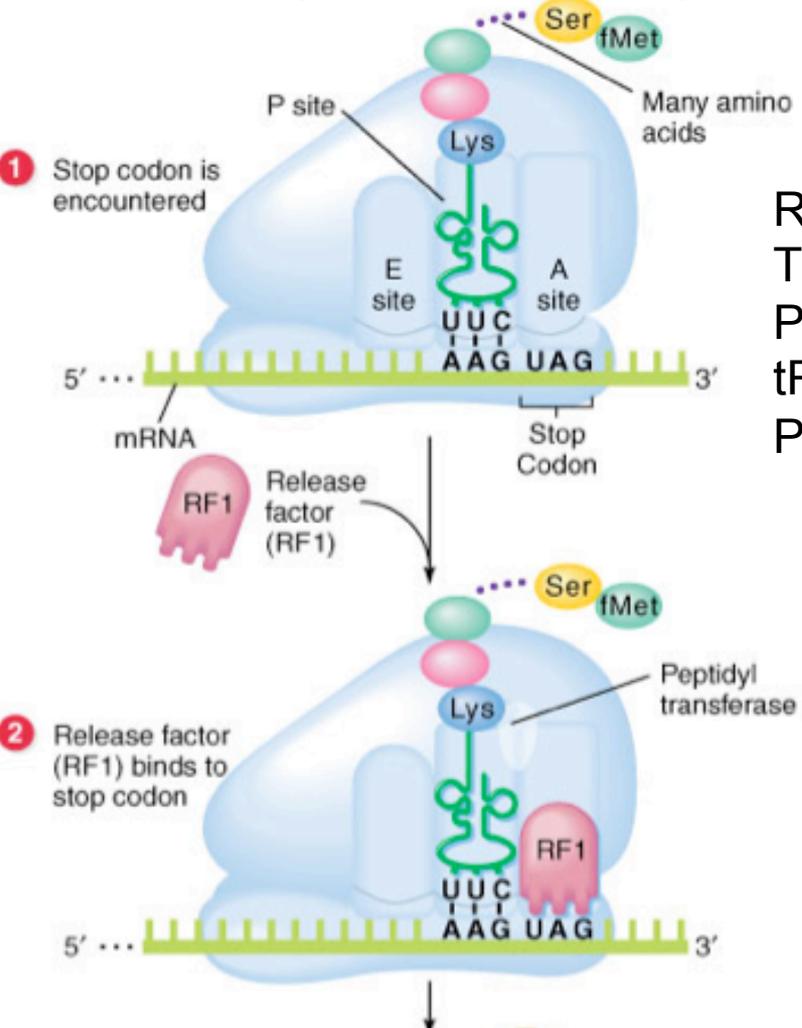
Dieser Prozess wiederholt sich immer wieder, sodass ein *Polysome* (mRNA mit vielen Ribosomen) entsteht.



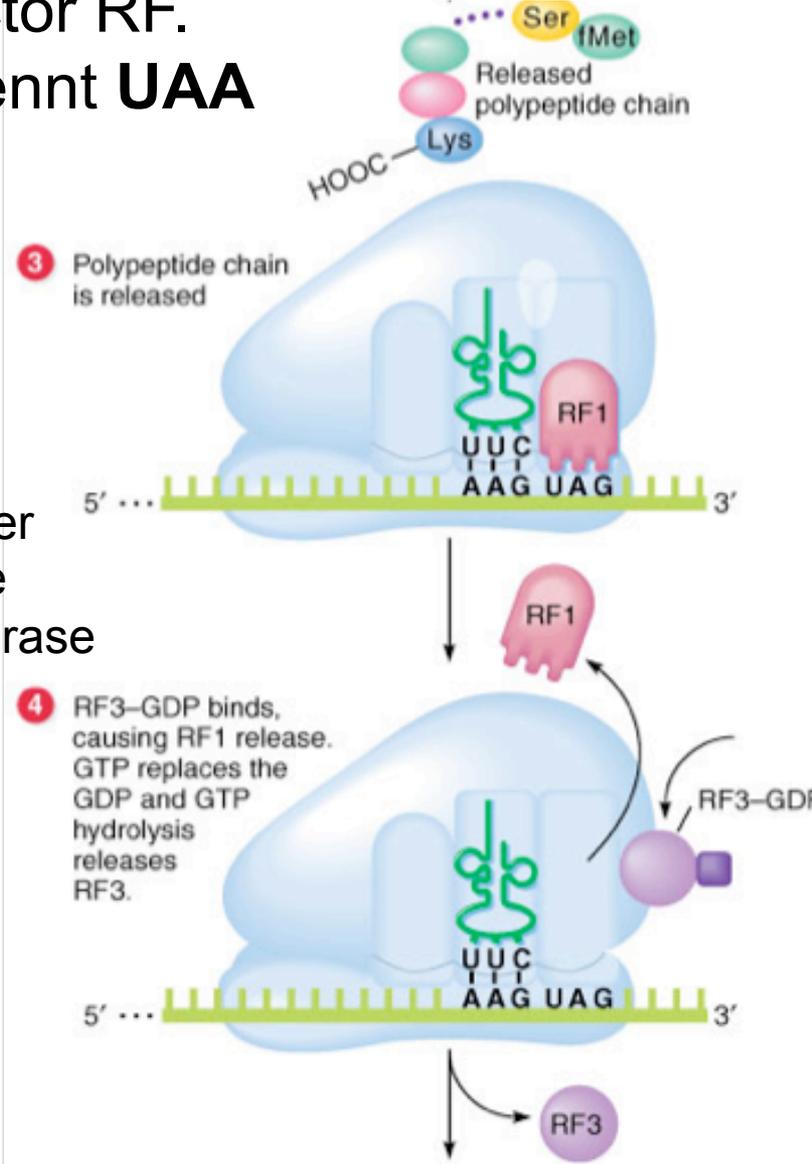
Terminationskodons werden nicht durch tRNA erkannt.
 Statt einer tRNA bindet ein release factor RF.

RF1 erkennt **UAA** und **UAG**, **RF2** erkennt **UAA** und **UGA** (in Bakterien).

TERMINATION

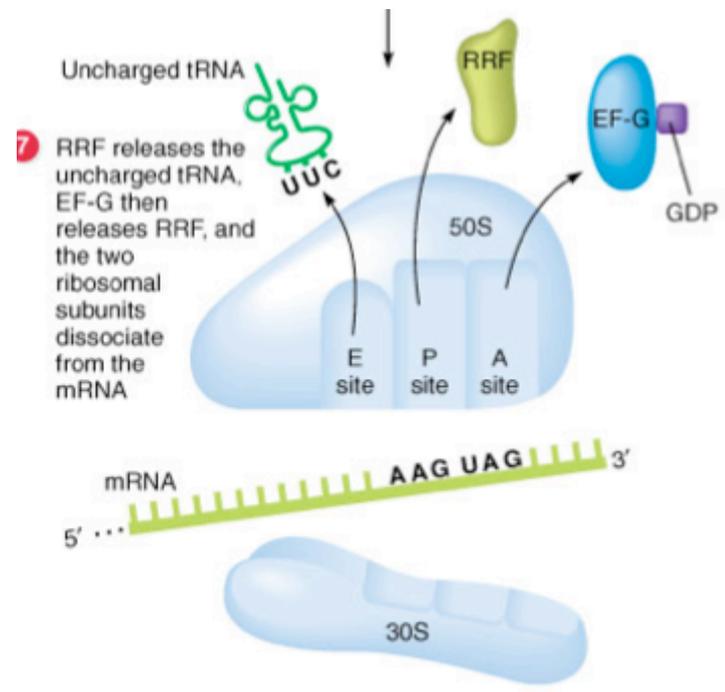
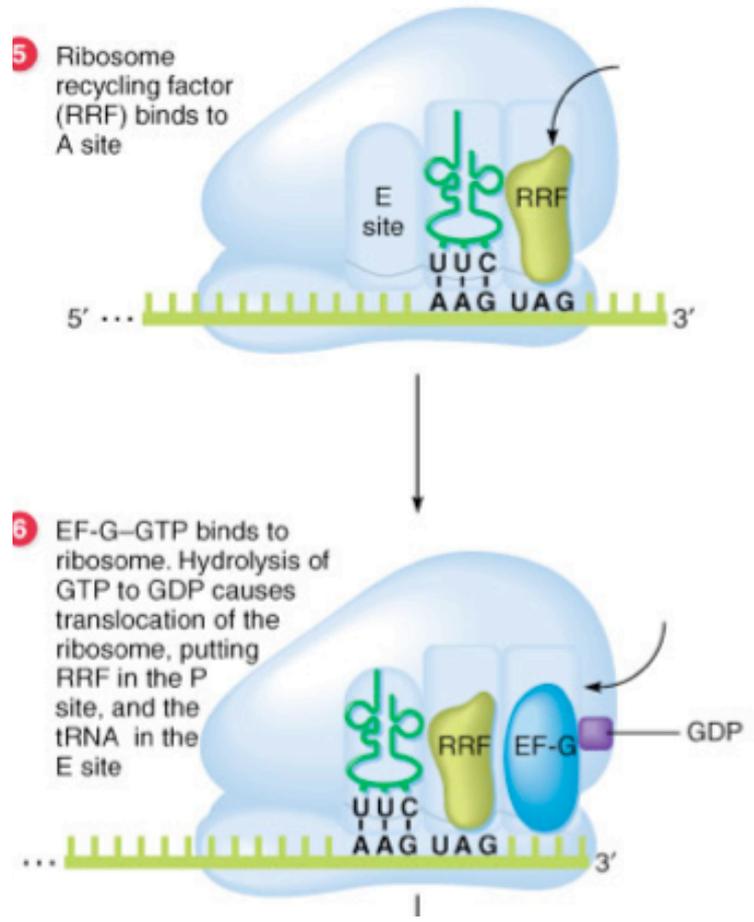


RF-1 führt zur Trennung des Proteins von der tRNA durch die Peptidyltransferase



Bindung von **ribosome recycling factor** (RRF) erlaubt Bindung von EF-G und somit Translokation.

Die zwei ribosomalen Untereinheiten dissoziieren.

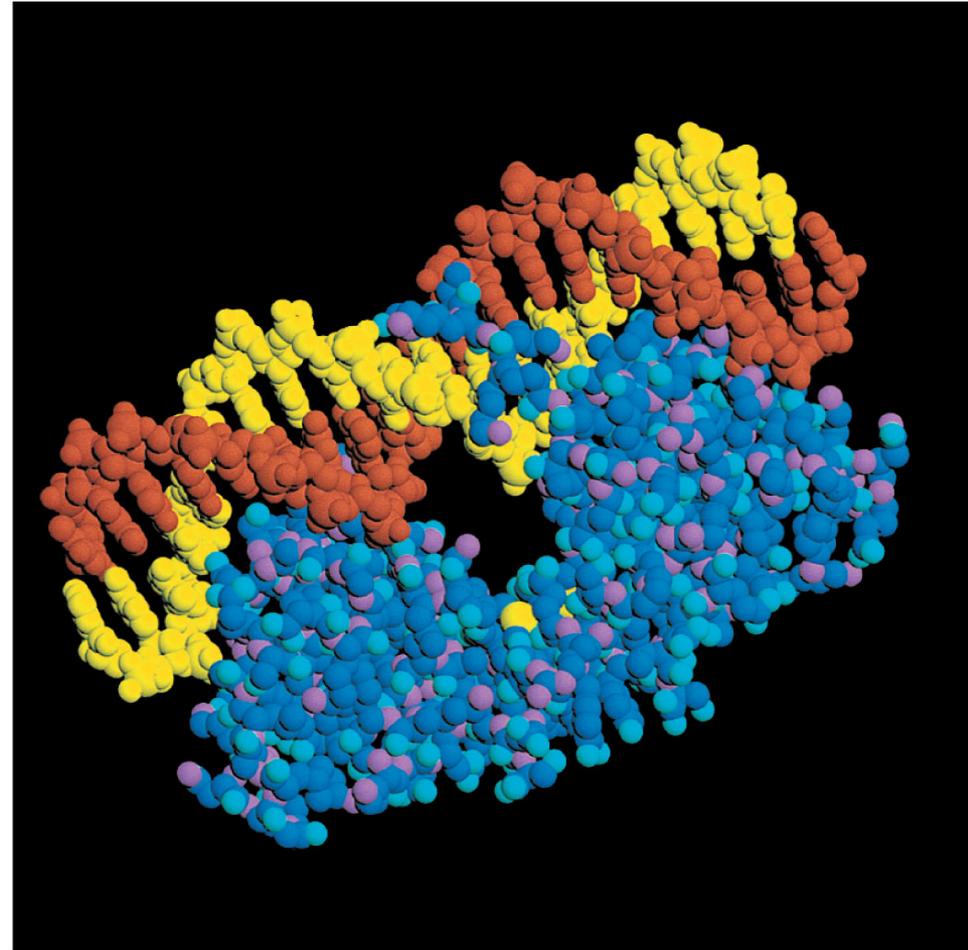


Termination in Eukaryoten:

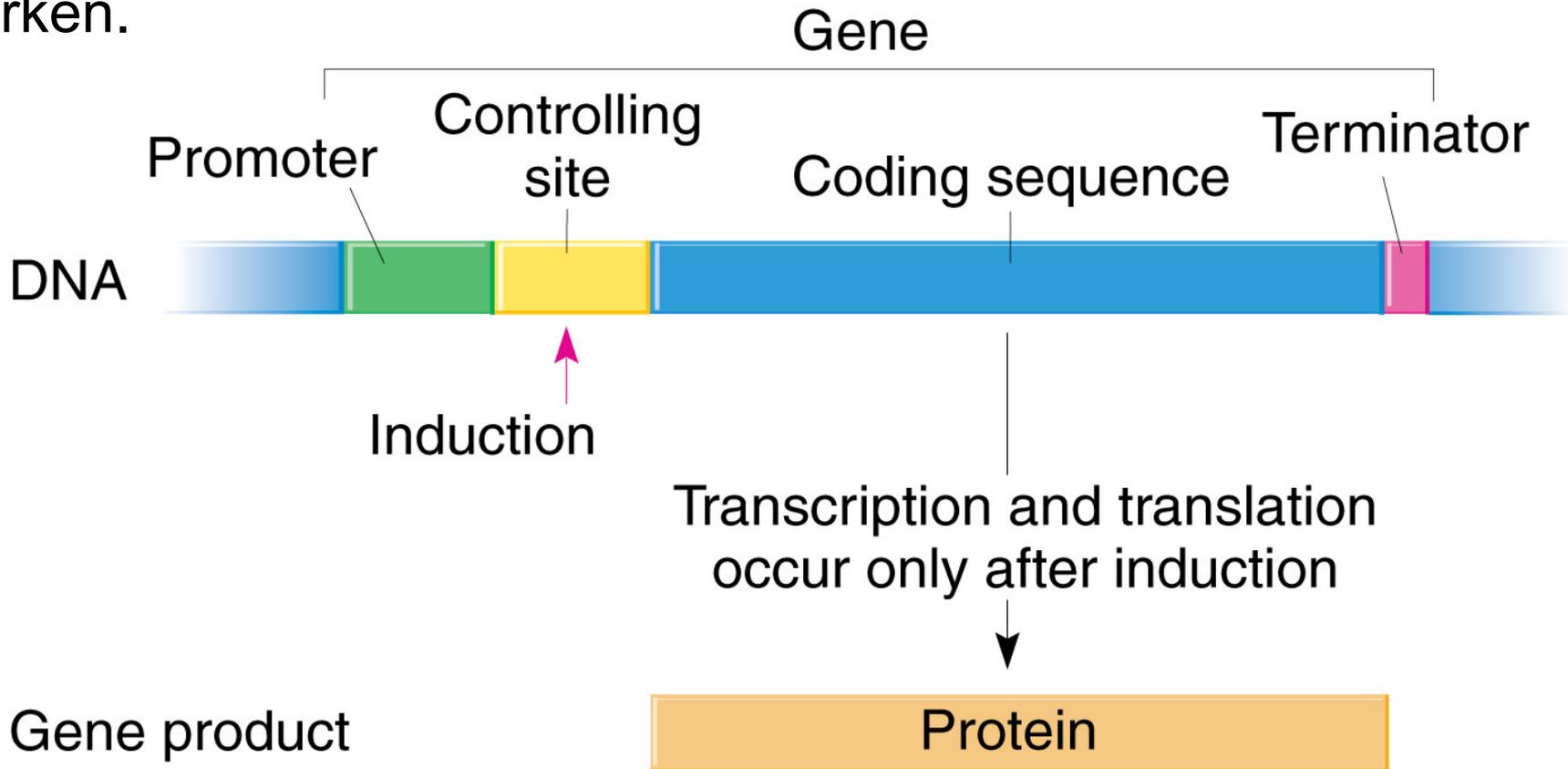
eRF1 erkennt alle 3 Stop Codons
eRF3 stimuliert Termination

Regulation der Genexpression in Bakterien und Phagen

Lac-Repressor an DNA gebunden

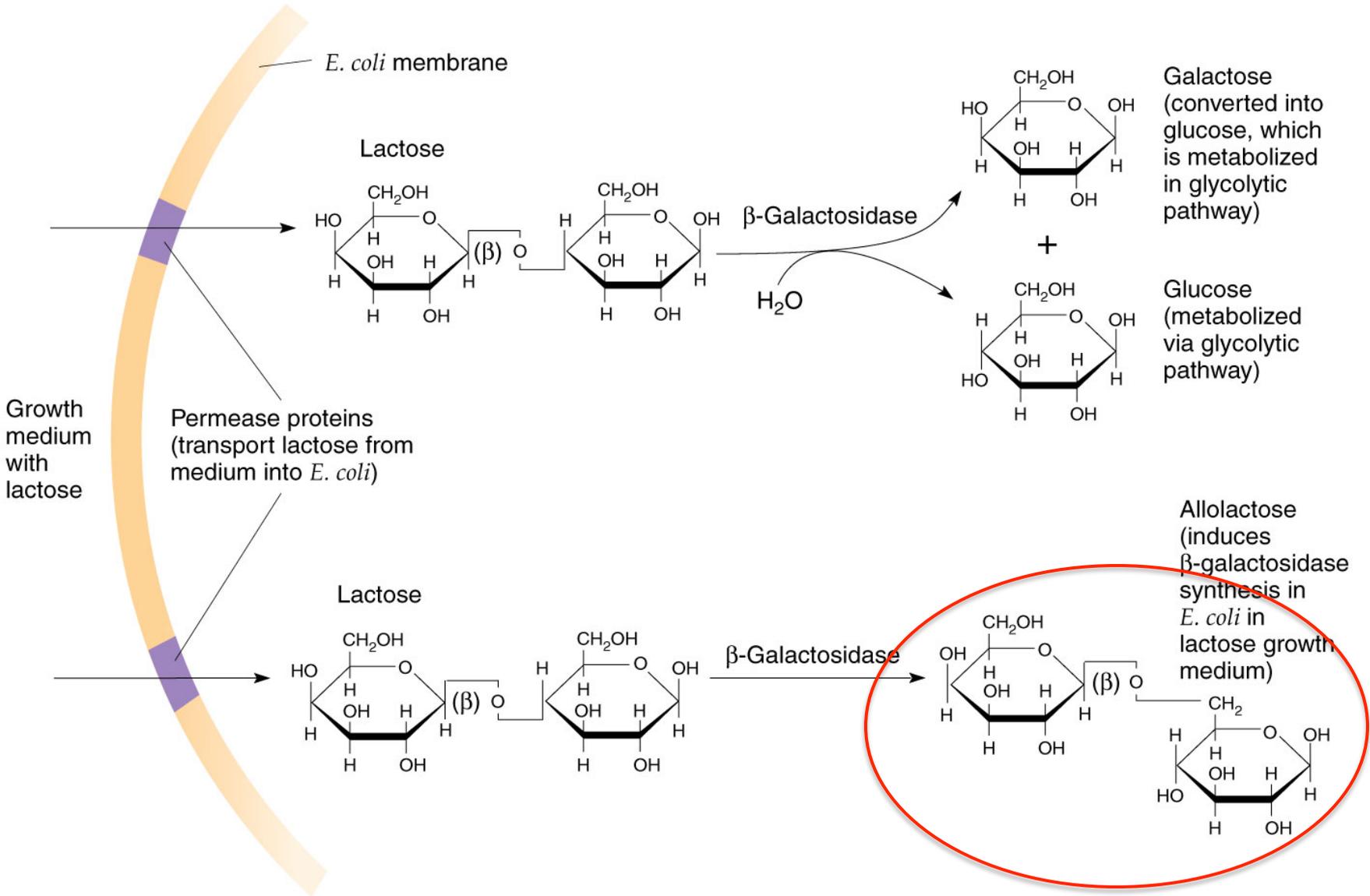


Inducers und **Repressors** kontrollieren die Genexpression. Inducers sind of kleine Moleküle (z.B. Metabolite). Diese kleinen Moleküle werden oft von DNA-bindenden Proteinen erkannt, welche als Aktivatoren oder Repressoren der Transkription wirken.



Inducible genes are expressed only in the absence of a repressor and/or presence of an effector/inducer molecule.

Lactose (bzw. Allolaktose) induziert die Produktion von β -Galaktosidase



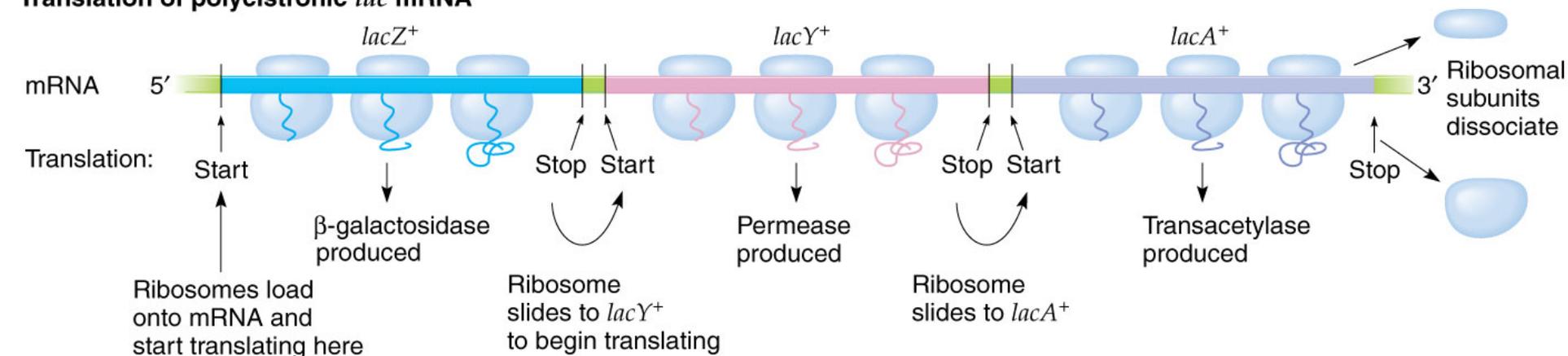
In Bakterien sind die *Gene für bestimmte Stoffwechselwege* oftmals *gekoppelt*. D.h. eine regulatorische Region kodiert für die Transkription **einer** Polycistronischen **RNA**. Diese RNA kodiert für multiple Peptide.

Dies ist ein **Operon**.

Jacob und Monod (Nobelpreis 1965) haben das lac-Operon untersucht. Dieses kodiert für β -Galactosidase (*lacZ*), Lactose permease (*lacY*), β -Galactoside transacetylase (*lacA*).

Die Anwesenheit von Galactose und die Abwesenheit von Glukose induziert die Expression dieser Gene 1000x. Die RNA ist instabil. Abwesenheit von Lactose schaltet diese Gene sofort ab.

Translation of polycistronic *lac* mRNA

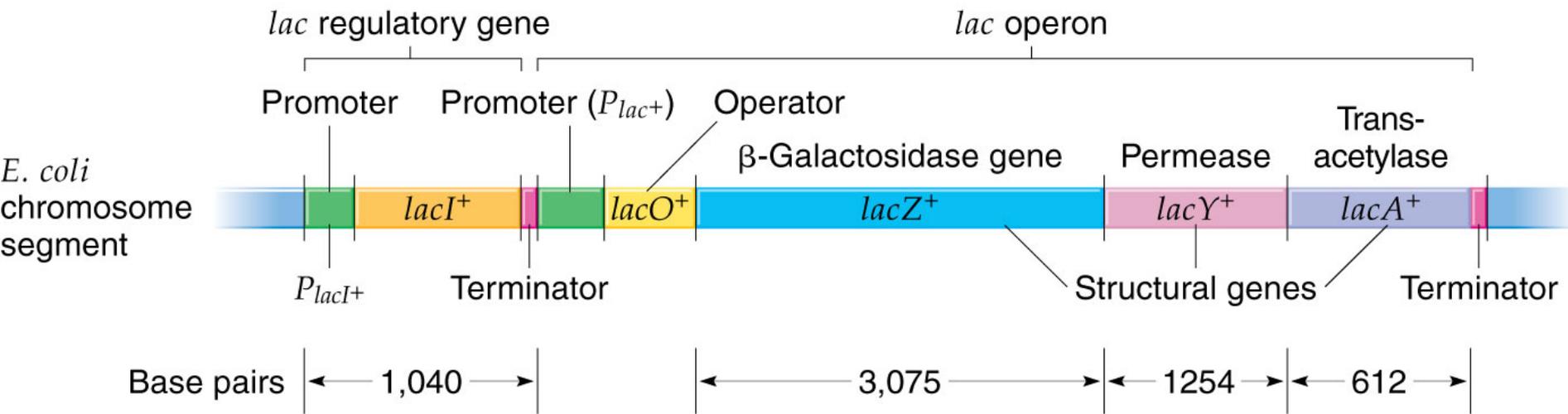


Jacob und Monod konnten mittels Mutationen eine Region als Operator (LacO) und eine als Repressor (lacI) identifizieren.

Mutationen zeigten, dass lacO in **cis** operiert (am gleichen Molekül).

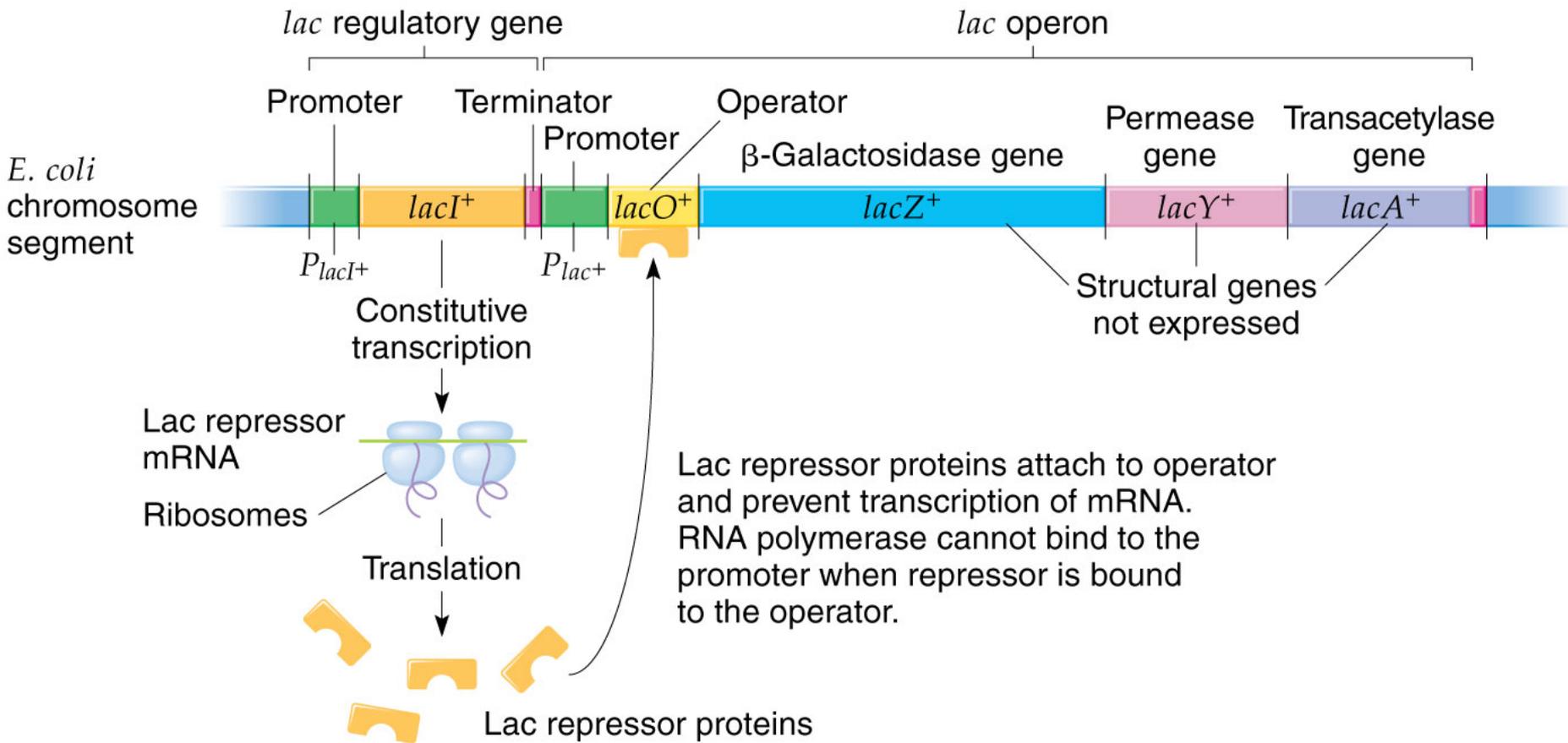
Mutationen in lacI zeigten, dass dieses in **trans** operiert (auch an anderen Molekülen)

Ein Operon ist ein Cluster von Genen welche durch Operator-Repressor Protein-Interaktionen reguliert ist.



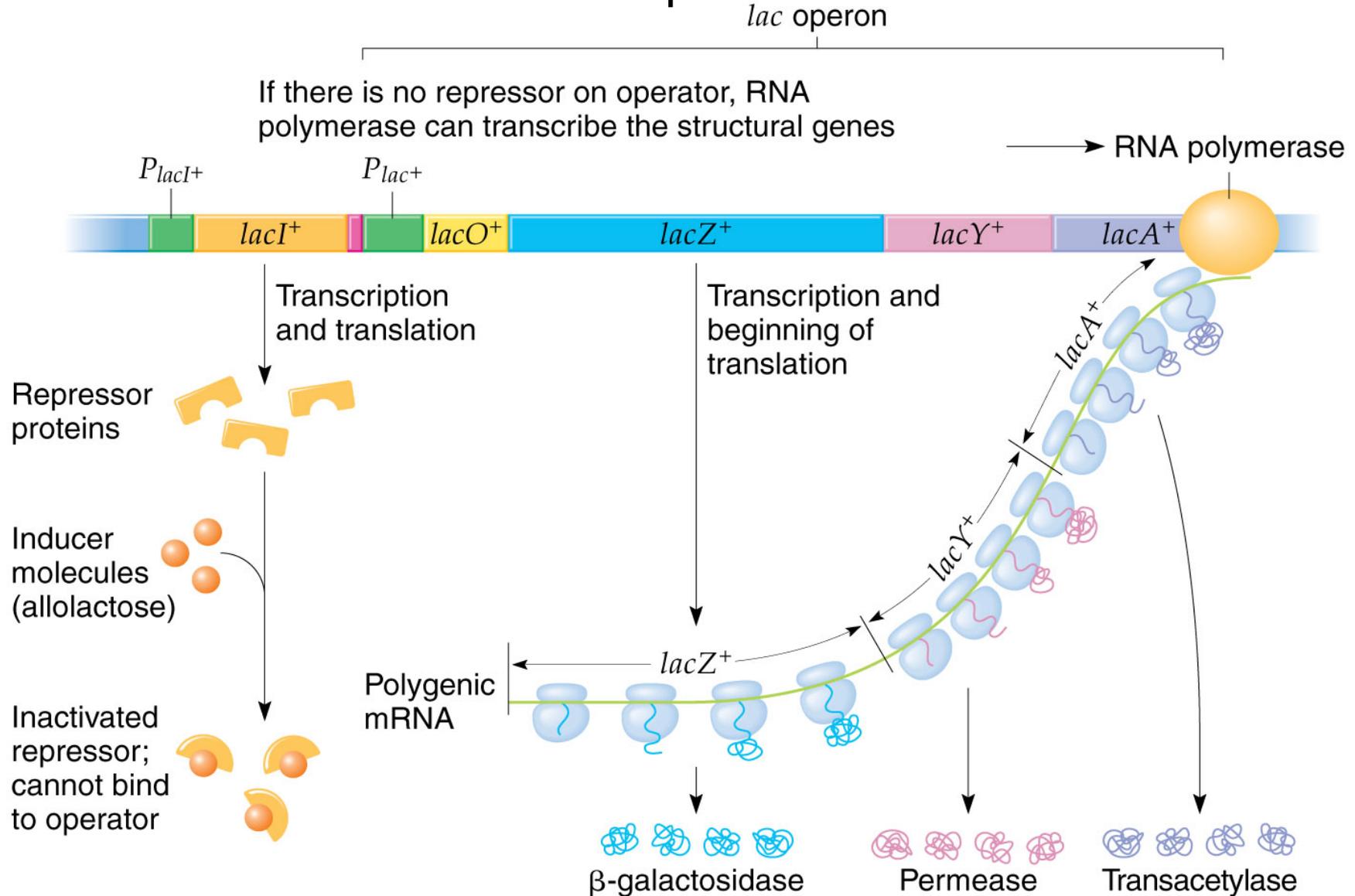
Der Lac-Repressor ist konstitutiv exprimiert. Ein Tetramer des Repressors bindet an den Operator und inhibiert so die Transkription. Die Operator Sequenz wird normalerweise von RNA-Pol gebunden. Der Repressor verhindert so das Binden der RNA-Polymerase.

(Negative Regulation)



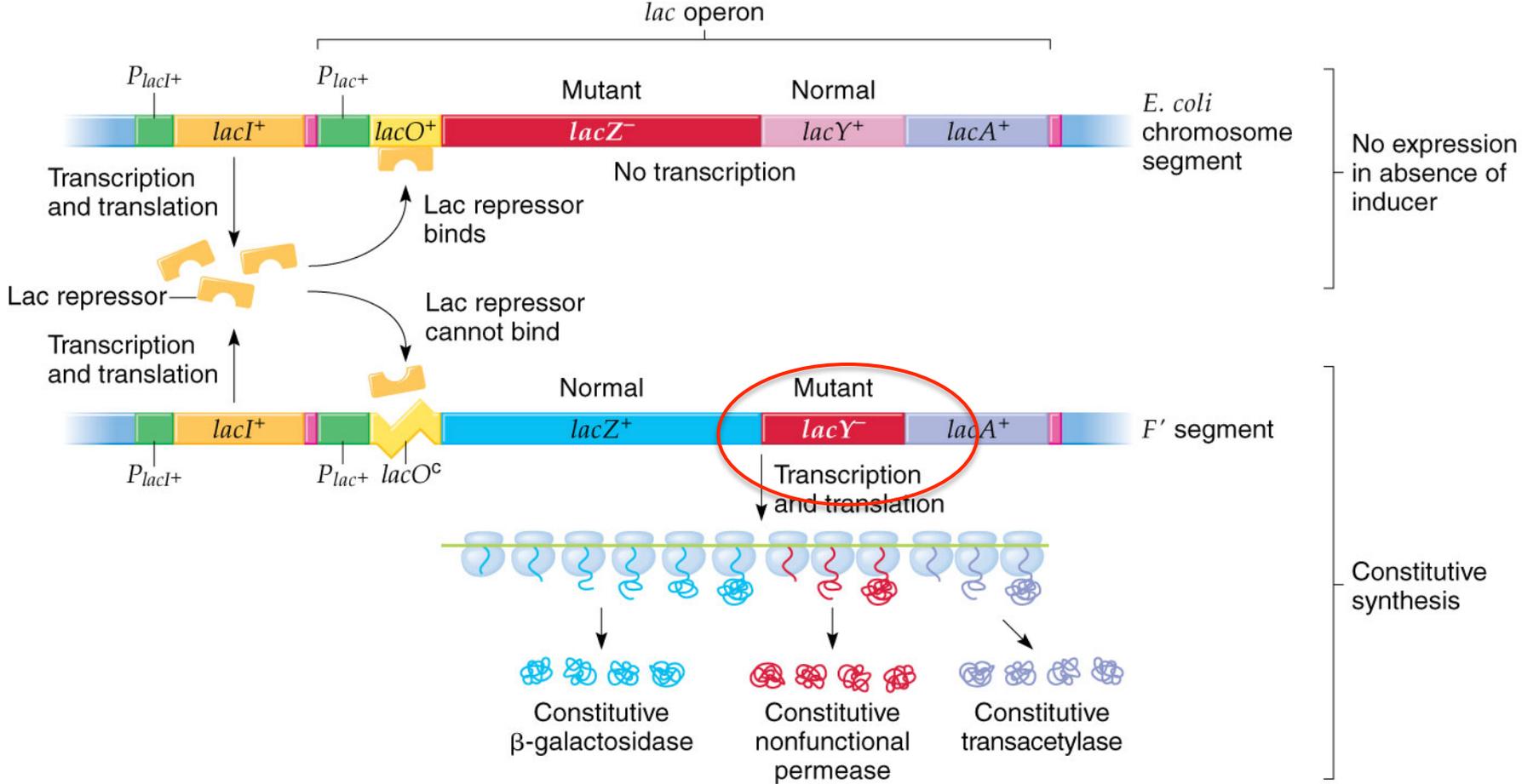
Induktion des Promoters durch Allolaktose.

Allolaktose bindet den Repressor und verhindert dessen Bindung an den Operator



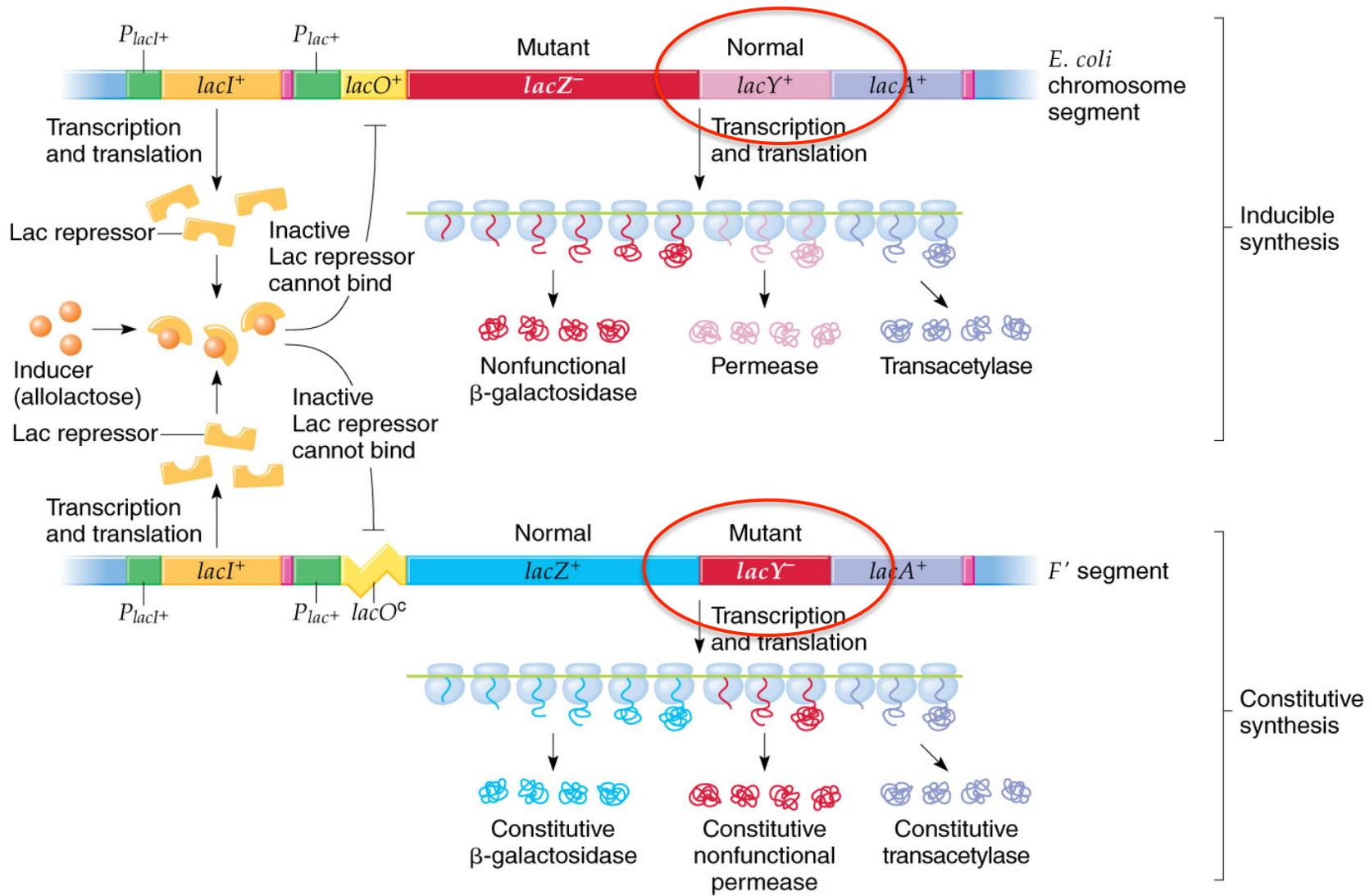
Jacob und Monod's Mutagenese Experiment zur cis Aktivität des Operators

a) Partial diploid in the absence of inducer. The *lacO⁺* operon is turned off, whereas the *lacO^c* operon produces functional β -galactosidase from the *lacZ⁺* gene and nonfunctional permease molecules from the *lacY⁻* gene with a missense mutation.



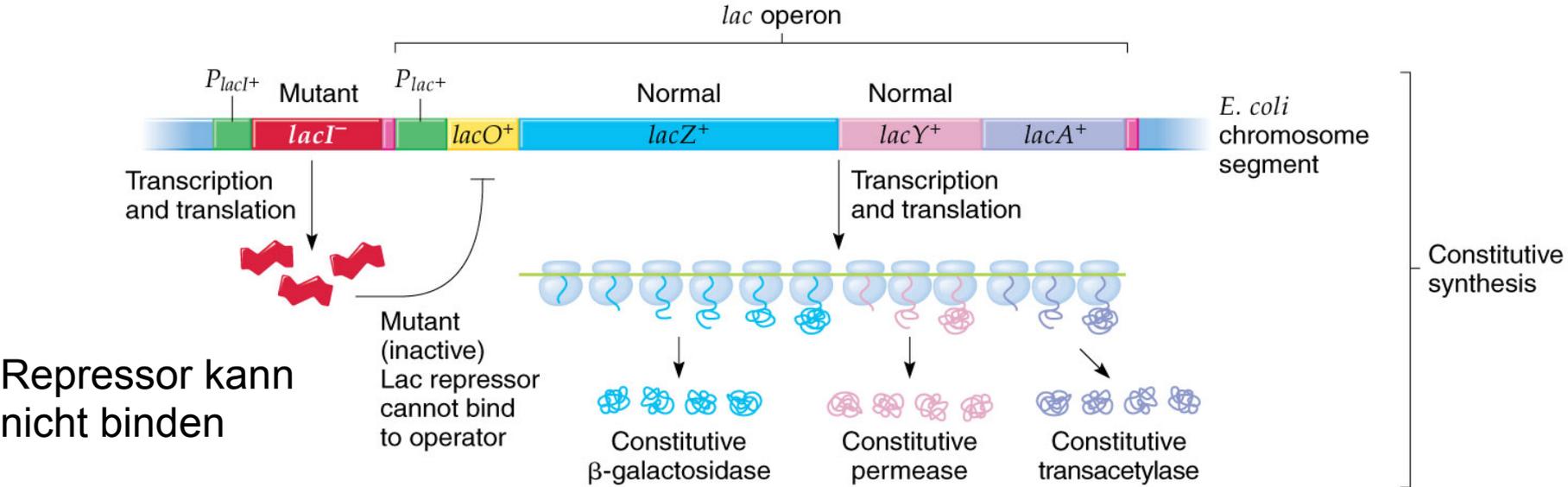
Jacob und Monod's Mutagenese Experiment zur cis Aktivität des Operators

b) Partial diploid in the presence of inducer. The *lacO⁺* operon is turned on and produces nonfunctional β -galactosidase from the *lacZ⁻* gene and functional permease from the *lacY⁺* gene. The constitutive *lacO^c* operon produces functional β -galactosidase from the *lacZ⁺* gene and nonfunctional permease from the *lacY⁻* gene. Between the two operons, functional β -galactosidase and permease are produced.



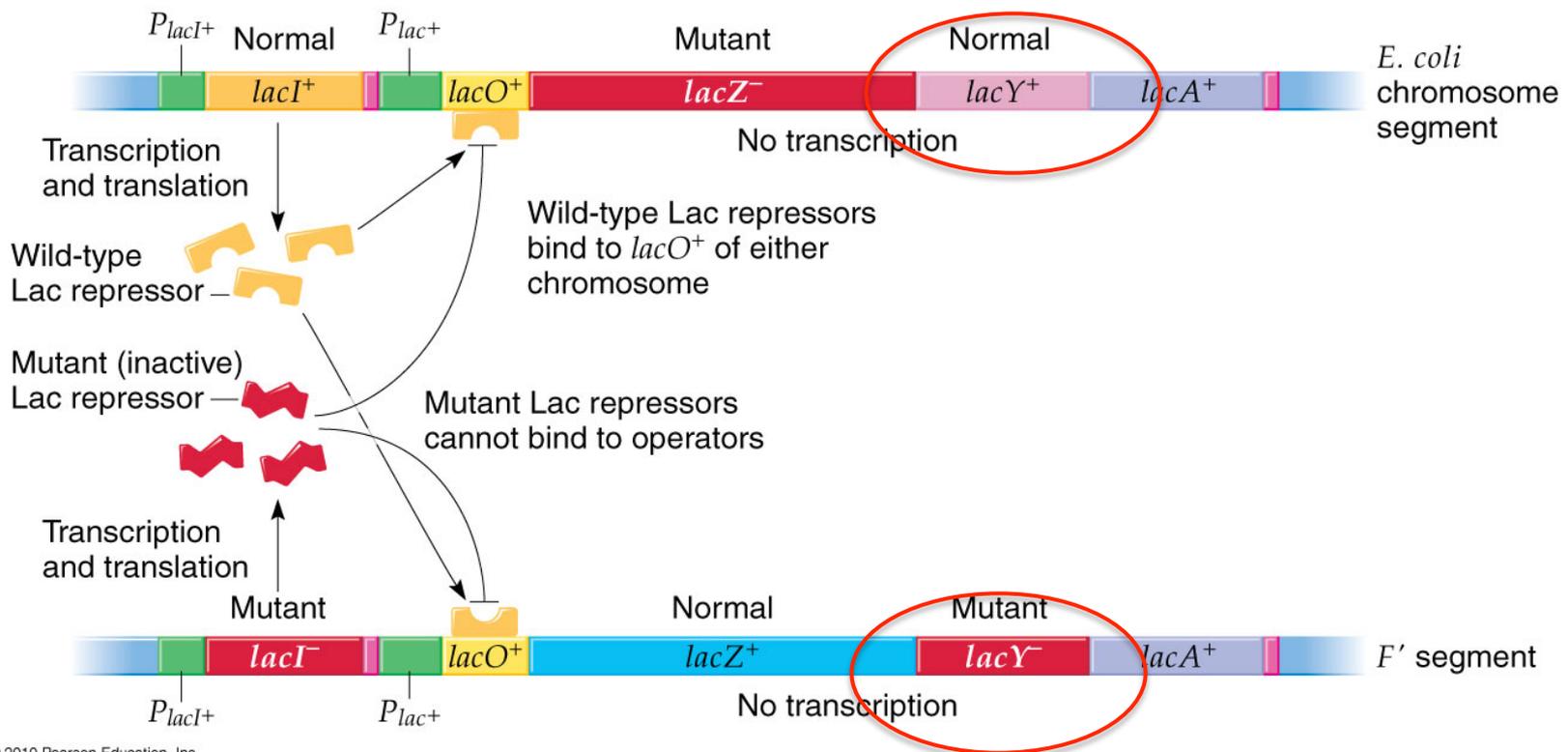
Jacob und Monod's Mutagenese Experiment zur **trans** Aktivität des Repressors

a) Haploid strain (in presence or absence of inducer). The mutant Lac repressor cannot bind to the *lacO*⁺ operator, resulting in constitutive synthesis of *lac* operon enzymes.



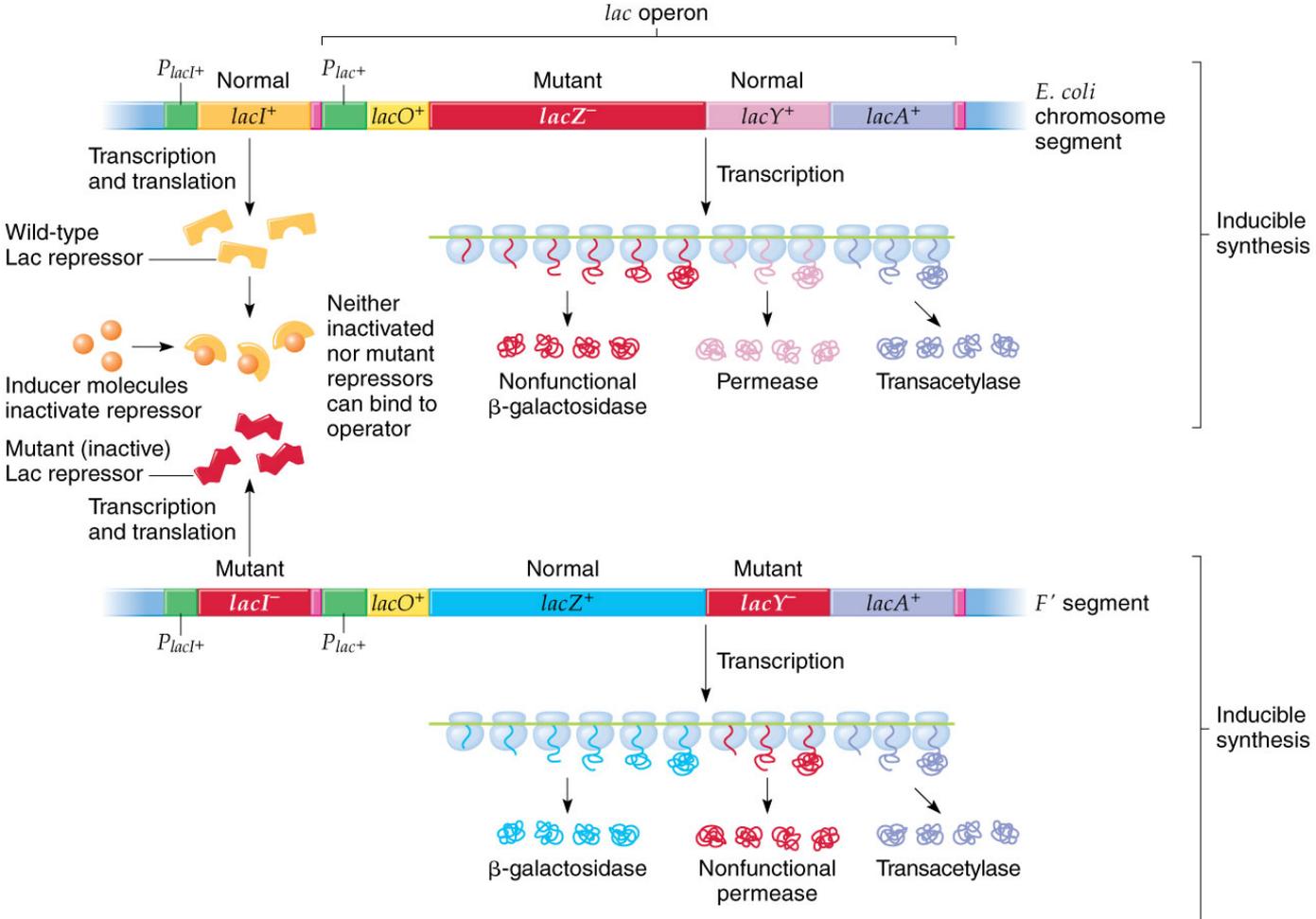
Jacob und Monod's Mutagenese Experiment zur **trans** Aktivität des Repressors

b) Partial diploid in the absence of inducer. The *lacI*⁺ operon produces wild-type Lac repressors, whereas the *lacI*⁻ operon produces inactive Lac repressors. The mutant Lac repressor cannot bind to the *lacO*⁺ operators, but the wild-type Lac repressors can, so no transcription occurs from either operon.

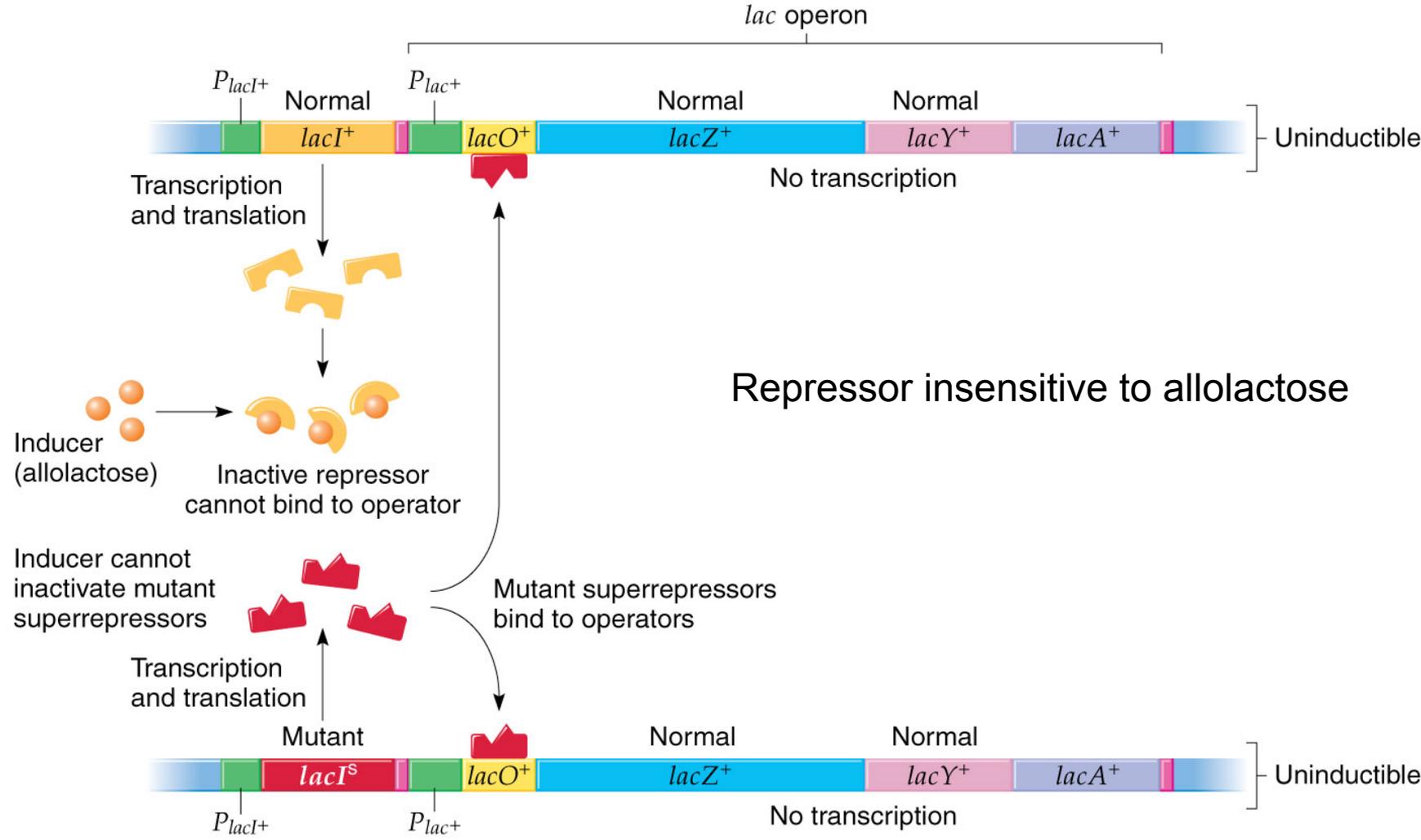


Jacob und Monod's Mutagenese Experiment zur **trans** Aktivität des Repressors

c) Partial diploid in the presence of inducer. The inducer inactivates the wild-type Lac repressor, preventing it from binding to the *lacO*⁺ operators. The mutant Lac repressor is unable to bind to those operators. The result is transcription of both operons: nonfunctional β -galactosidase and functional permease are produced from the *lacI*⁺ operon, and functional β -galactosidase and nonfunctional permease are produced from the *lacI*⁻ operon.

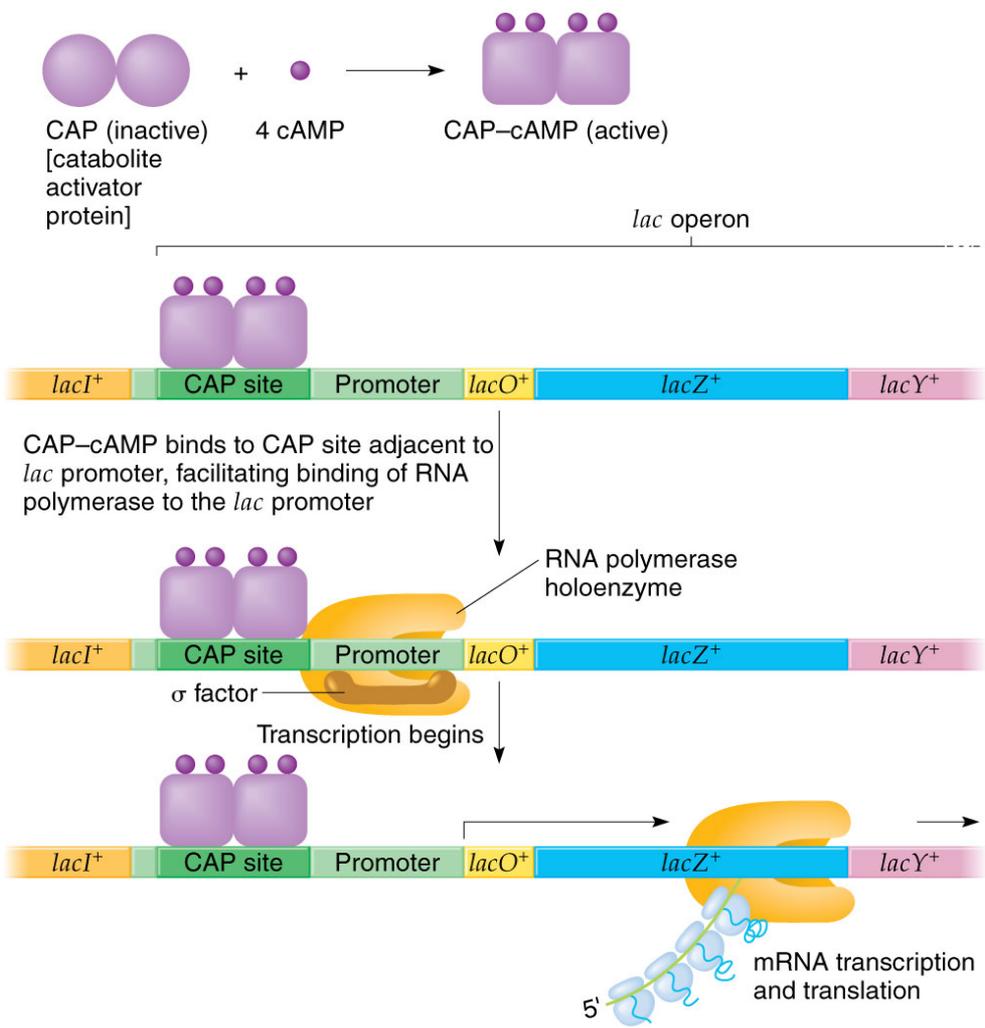
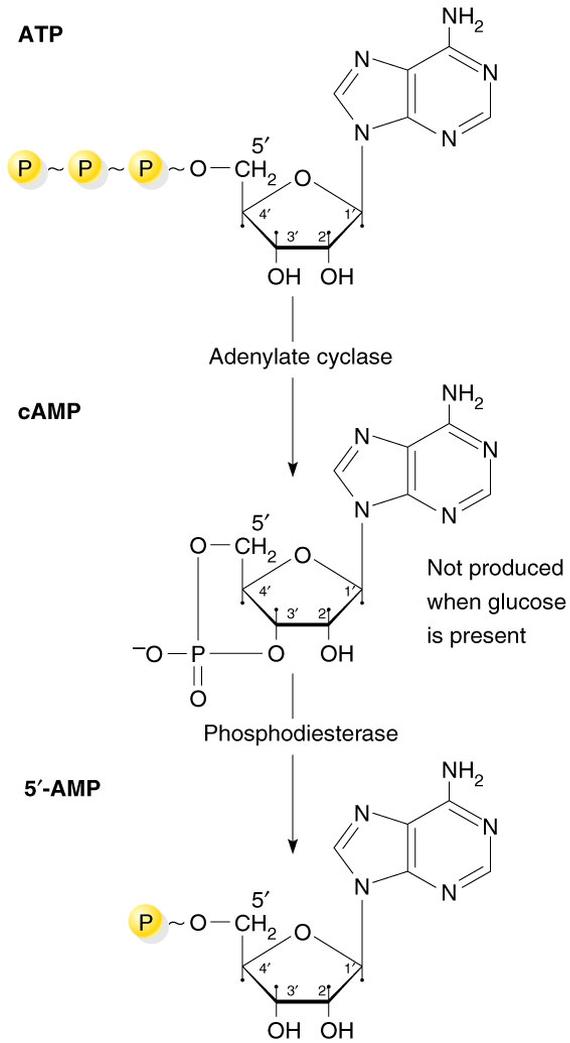


Jacob und Monod's Mutagenese Experiment zur **trans** Aktivität des Repressors



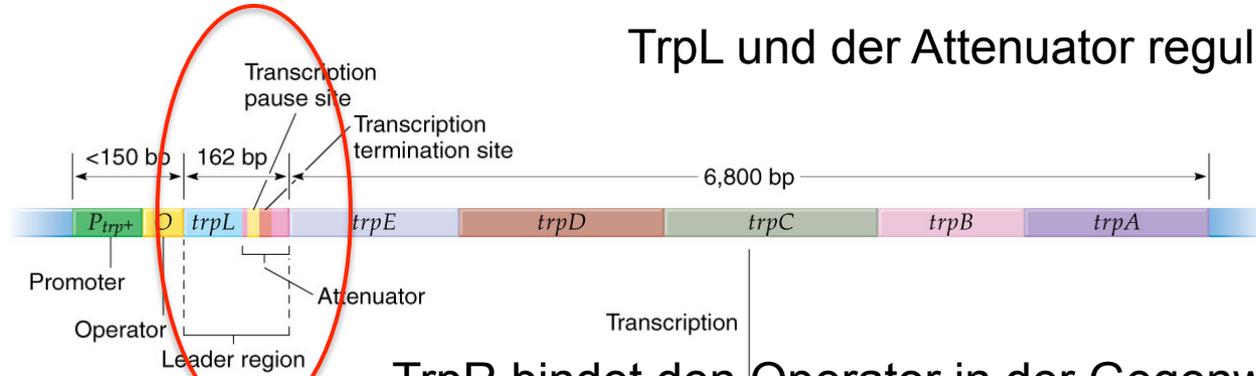
Glukose reprimmiert die Expression des Lac-operons. Glukose führt zu niedrigen cAMP levels.

Hohe cAMP levels erlauben die Expression des Lac-operons

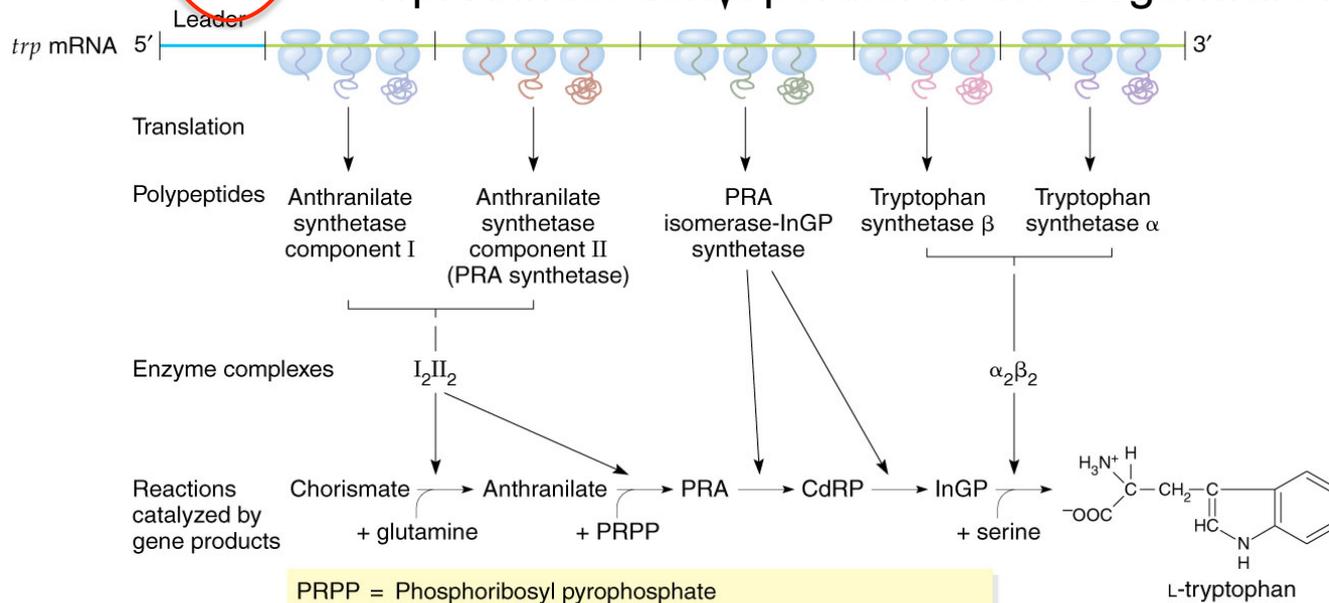


Das trp-operon kodiert für Proteine der Tryptophan Biosynthese und ist durch Tryptophan reprimiert

TrpL und der Attenuator regulieren Expression



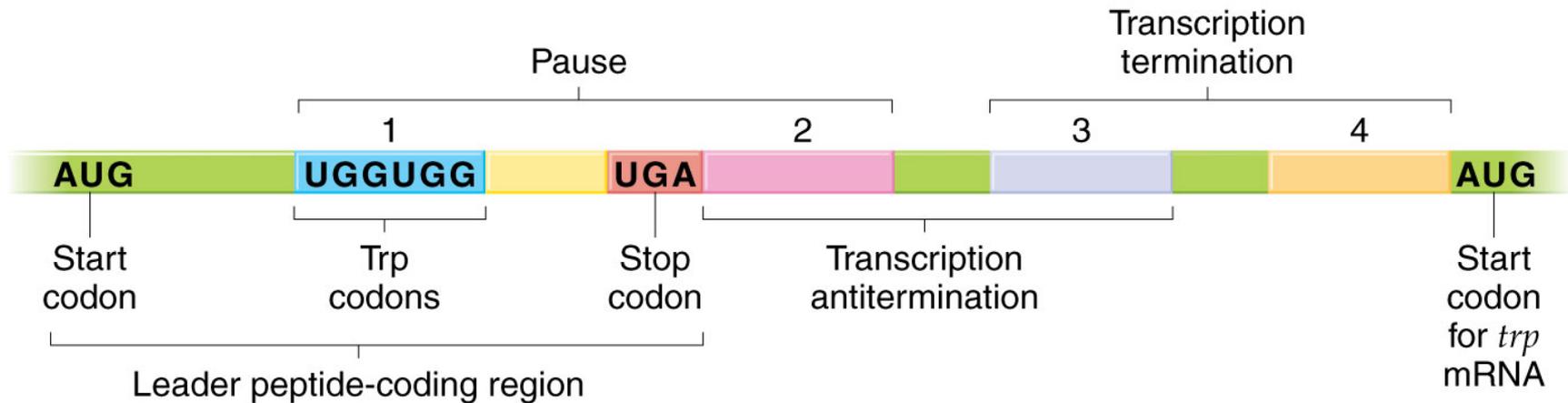
TrpR bindet den Operator in der Gegenwart von Tryptophan



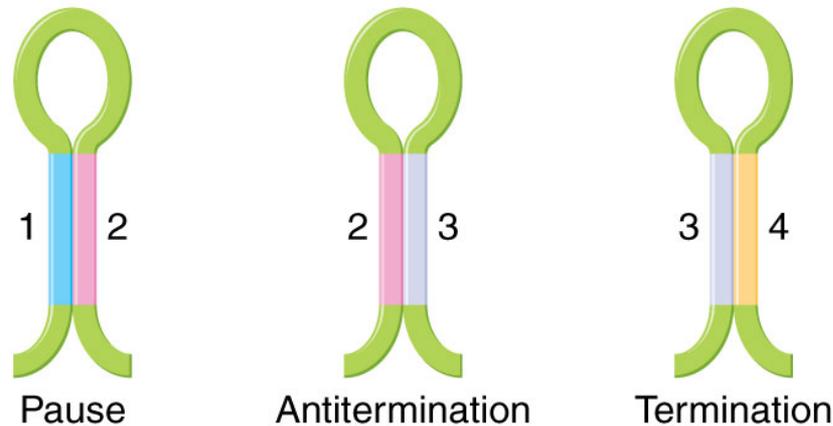
PRPP = Phosphoribosyl pyrophosphate
 PRA = Phosphoribosyl anthranilate
 CdRP = 1-(o-carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose 5-phosphate
 InGP = Indole-3-glycerol phosphate

Der Attenuator reguliert die Expression in Gegenwart von WENIG *trp*. Die 5' Region des operons kodiert für ein kurzes Peptid mit Trp codons UND kann Basenpaarungen eingehen, welche die Transkription terminieren können.

Organization of region:

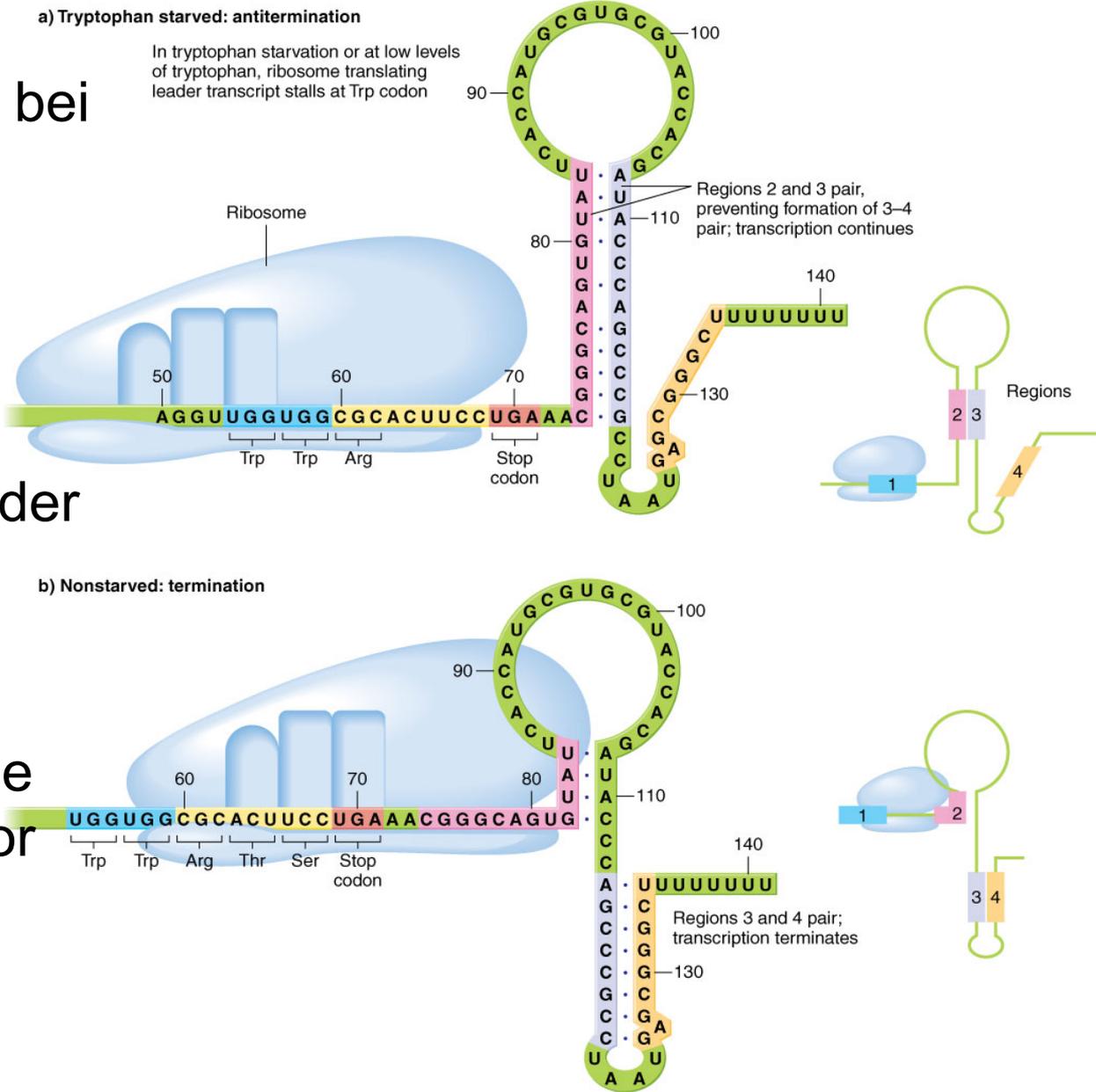


Alternative RNA structures:

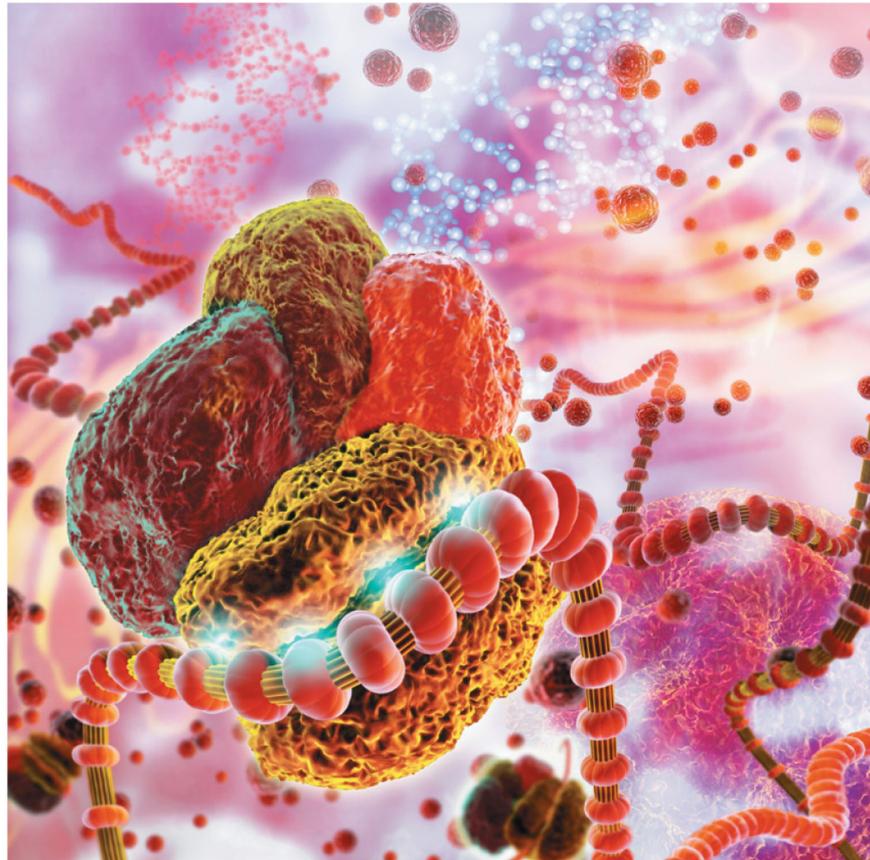


Das Ribosom "stalled" bei den Trp codons in Abwesenheit von genügend Trp. Die so ermöglichte Sekundärstruktur verhindert Termination der Transkription.

In Gegenwart von Trp forciert das Ribosom die Bildung einer Terminator Struktur.



Genregulation in Eukaryoten

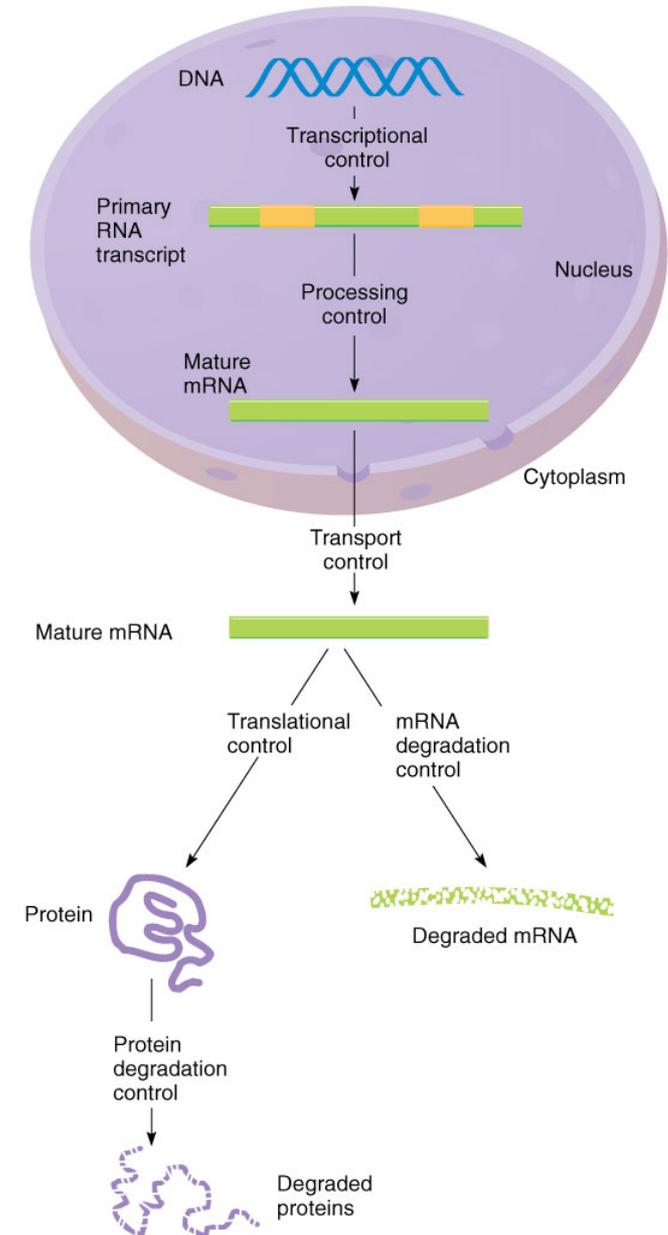


Genregulation kann auf mehreren Ebenen erfolgen:

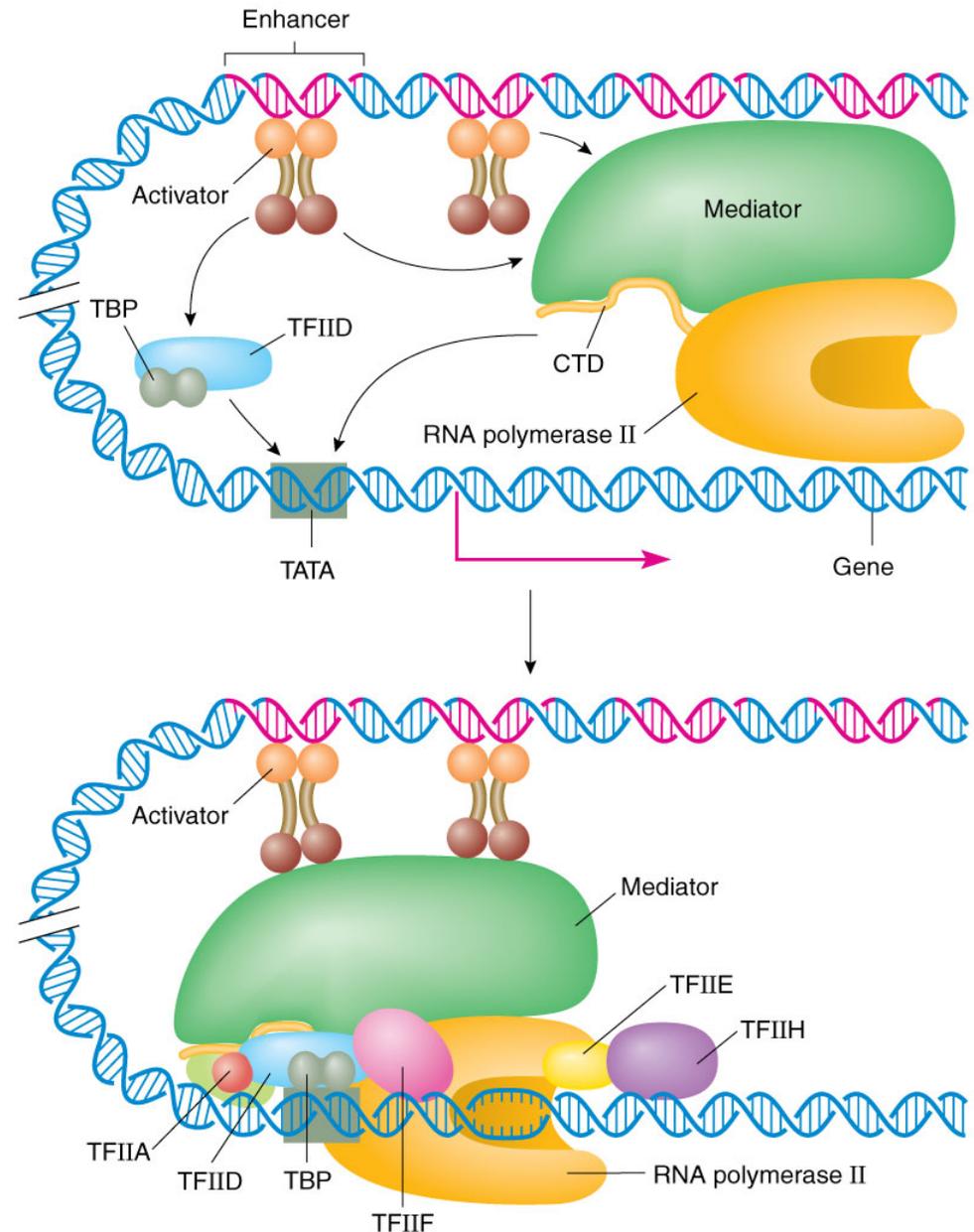
- Transkriptionskontrolle
- Regulation des RNA-Processings
- RNA Stabilität
- Translationskontrolle
- Proteininstabilität
- Protein Modifikation

Je weiter oben in der Kaskade gelegen, desto verzögerter ist die Antwort auf ein Signal

Proteinmodifikationen erlauben eine unmittelbare Antwort auf einen Stimulus



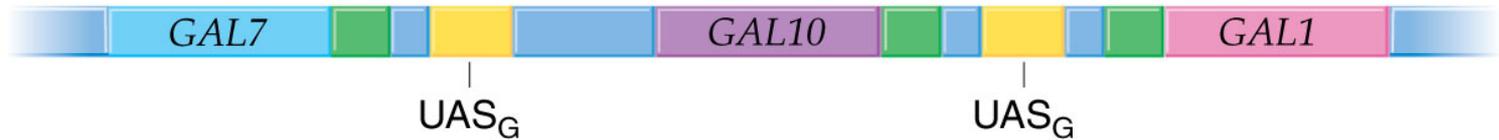
Transkriptionskontrolle erfolgt über Aktivatoren, welche an DNA binden. Aktivatoren können Transkription auf verschiedene Arten stimulieren.



Aktivierung von Galactose fermentierenden Enzymen in der Hefe

Der Transkriptionsaktivator Gal4p wird nur in der Abwesenheit von Glukose synthetisiert. Dieser bindet an die Gal UAS = UPSTREAM ACTIVATING SEQUENCE

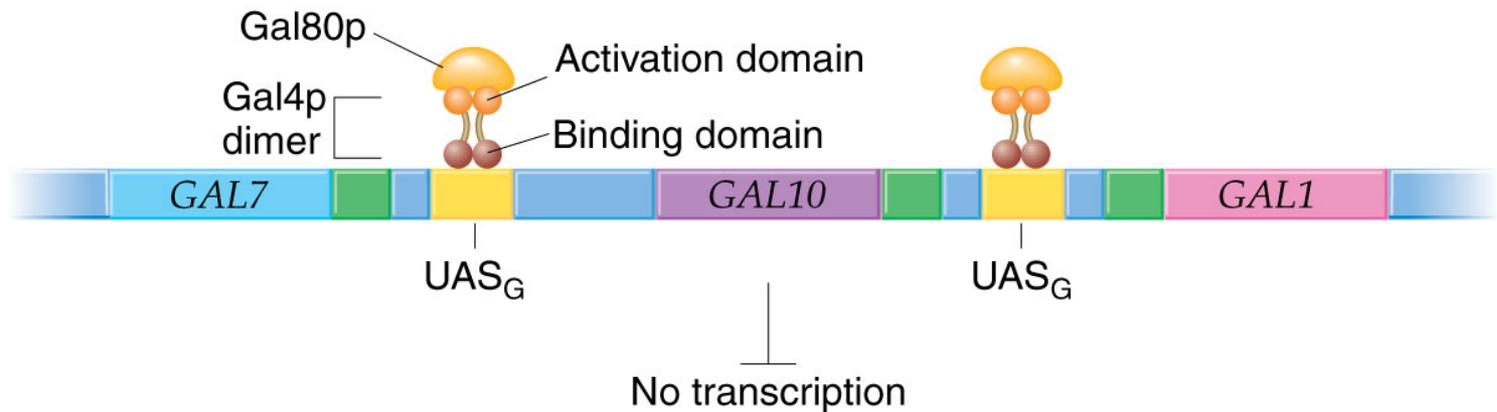
a) *GAL* structural genes



Gal-80 blockiert die activation domain von Gal4

b) Absence of galactose

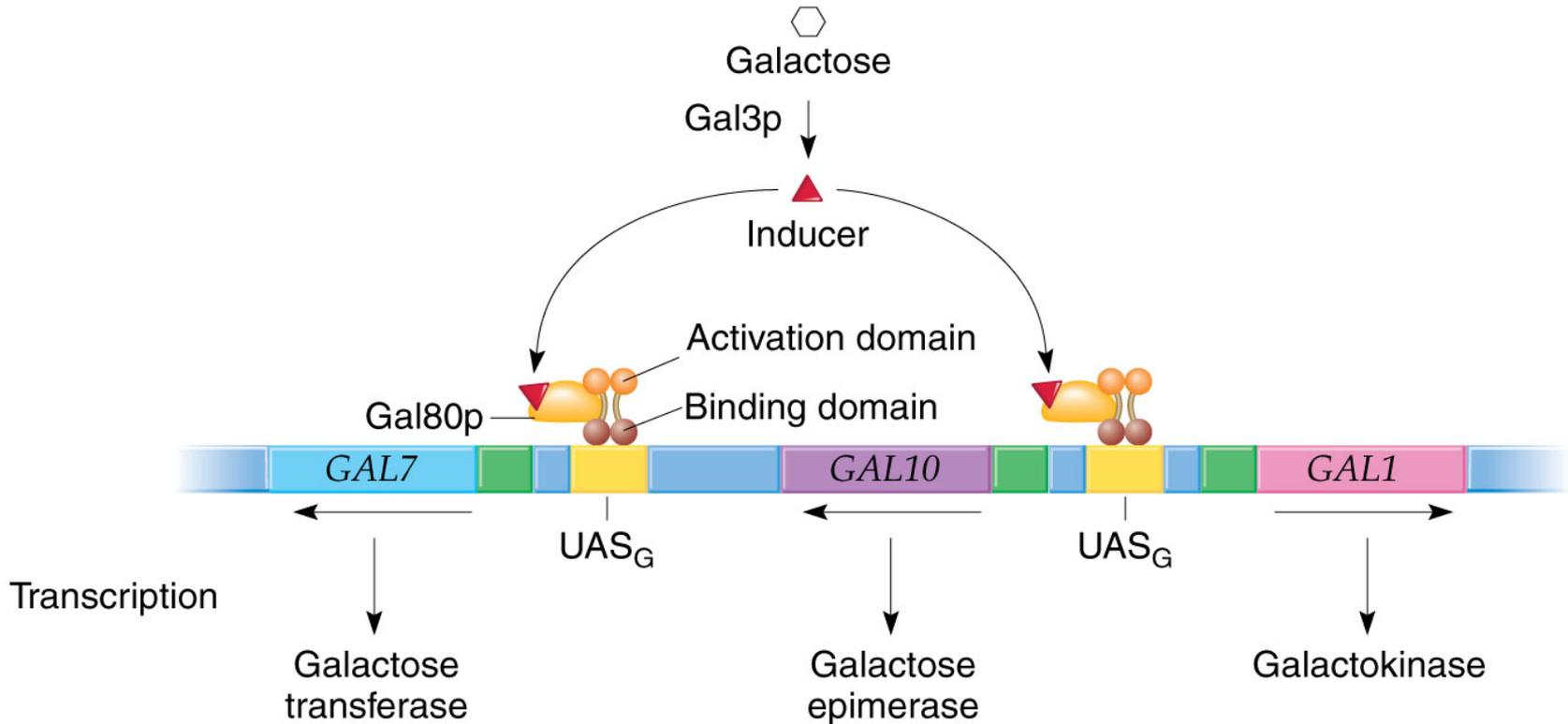
Gal80p binds to Gal4p activation domain, blocking it from activating transcription.



Galactose führt zur Bildung eines Inducers, dieser bindet Gal80, worauf Gal4 aktiv werden kann

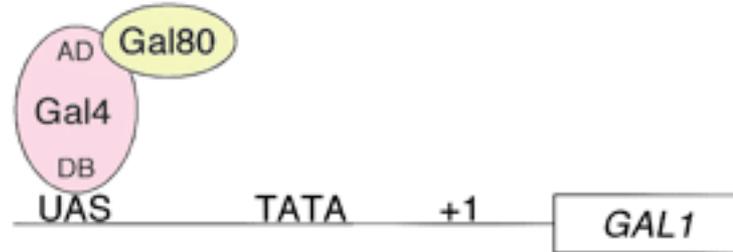
c) Presence of galactose

Gal3p converts galactose to the inducer which binds to Gal80p, causing it to move on Gal4p. The now exposed Gal4p activation domain activates transcription.

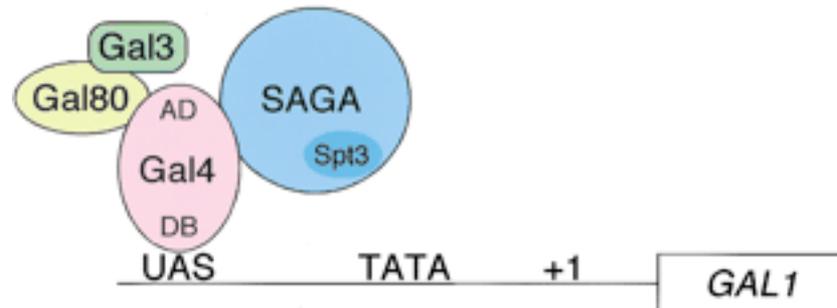


Transcriptional activation by

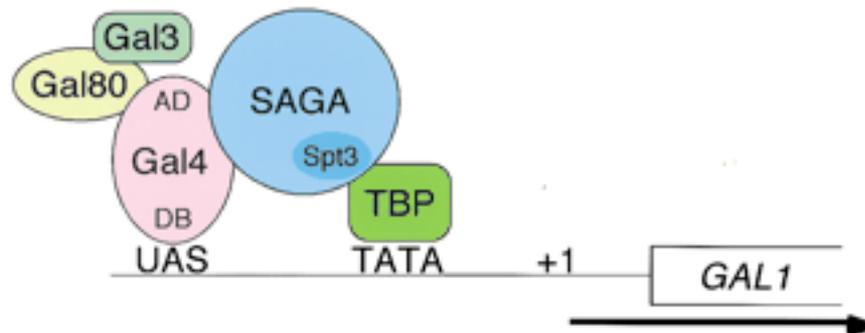
1. Noninducing conditions



2. Inducing conditions; first, Gal4 recruits SAGA



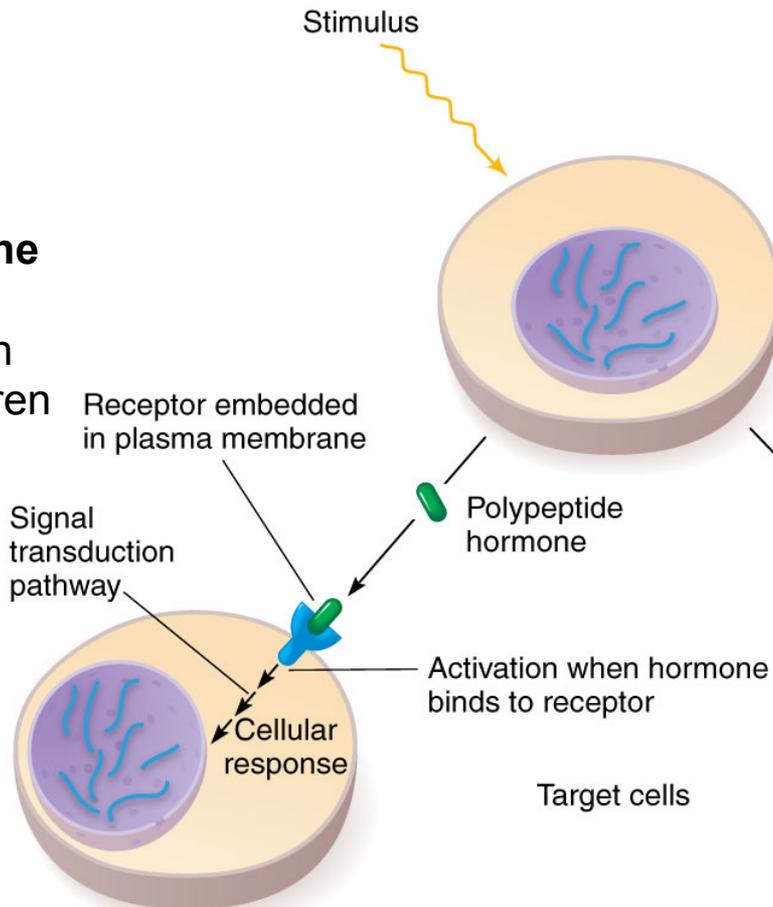
3. Then, SAGA recruits TBP



Mögliche Wirkweisen von Hormonen auf die Transkription

Membrangebundene

Rezeptoren binden Hormone und führen zu einer intrazellulären Signaltransduktion

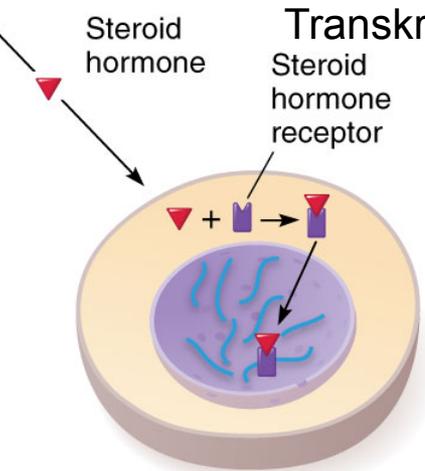


Hormone binds to receptor in target cell plasma membrane, activating it. The active receptor initiates a signal that is passed along a signal transduction pathway, leading to the cellular response

Cellular response

Membranpermeable

Hormone binden einen intrazellulären Transkriptionsaktivator



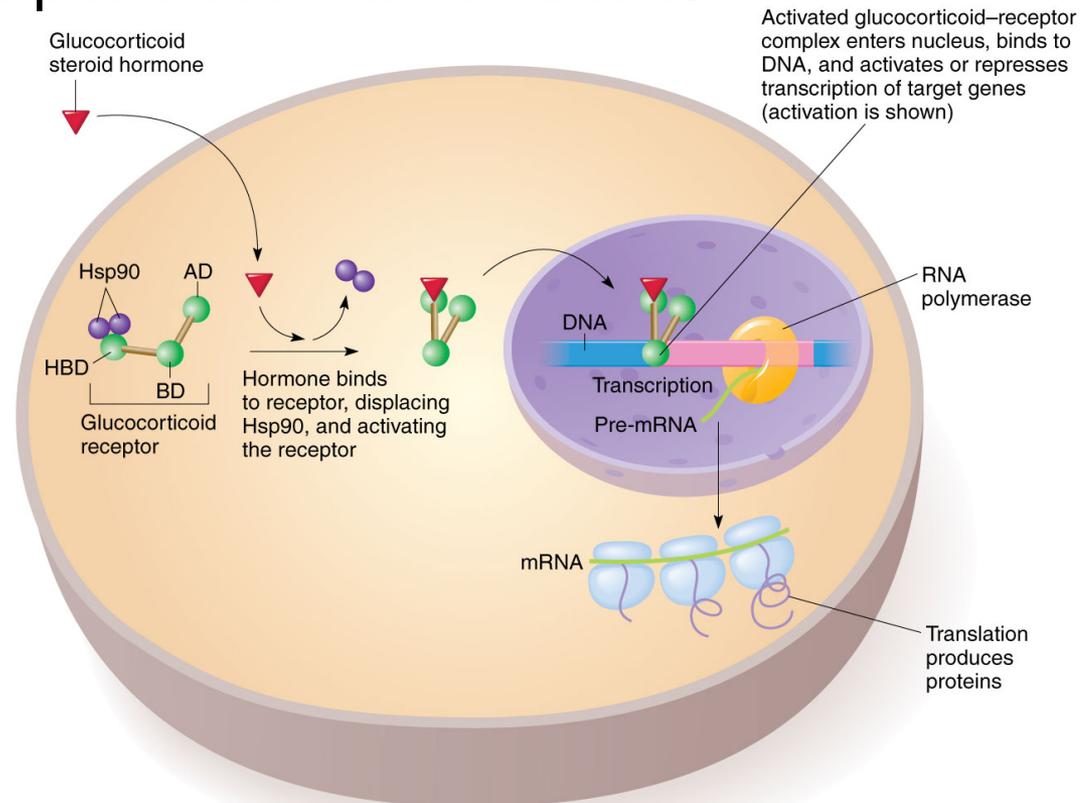
Hormone diffuses freely across the cell membrane, binds to receptor, and activates it; the complex binds to the genome and alters gene expression

Cellular response

Wirungsweise von Steroidhormonen

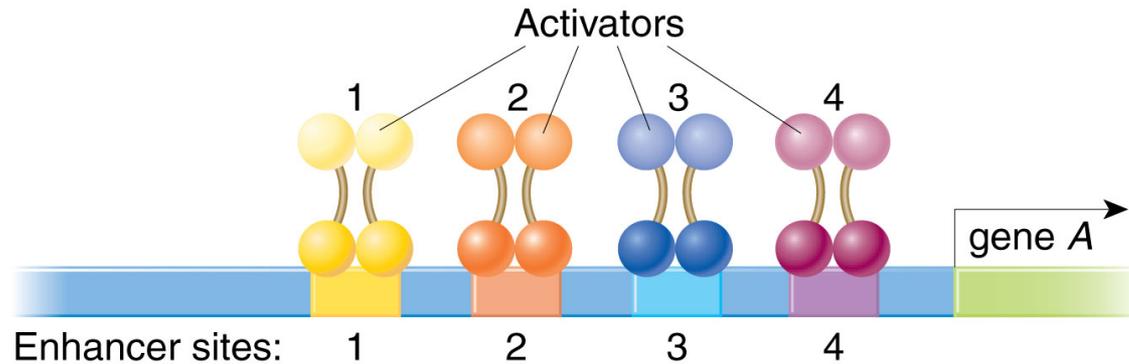
Hsp 90 (Heat shock protein 90) verhindert die vorzeitige Aktivierung des Steroidhormon-Rezeptors

SHRs binden hormone receptor elements (HREs) an der DNA und regulieren so die Transkription bestimmter Gene.

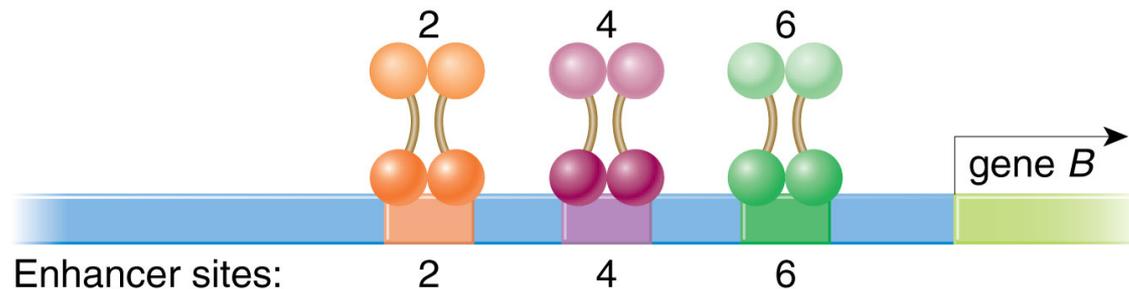


Kombinationen von Aktivatoren welche an Promotoren bzw Enhancer binden regulieren verschiedene Gene. Durch Kombination verschiedener Faktoren kann eine **große Zahl an Genen mit einer limitierten Zahl an Transkriptionsfaktoren** kontrolliert werden.

a) Transcription of gene A controlled by activators 1, 2, 3, and 4

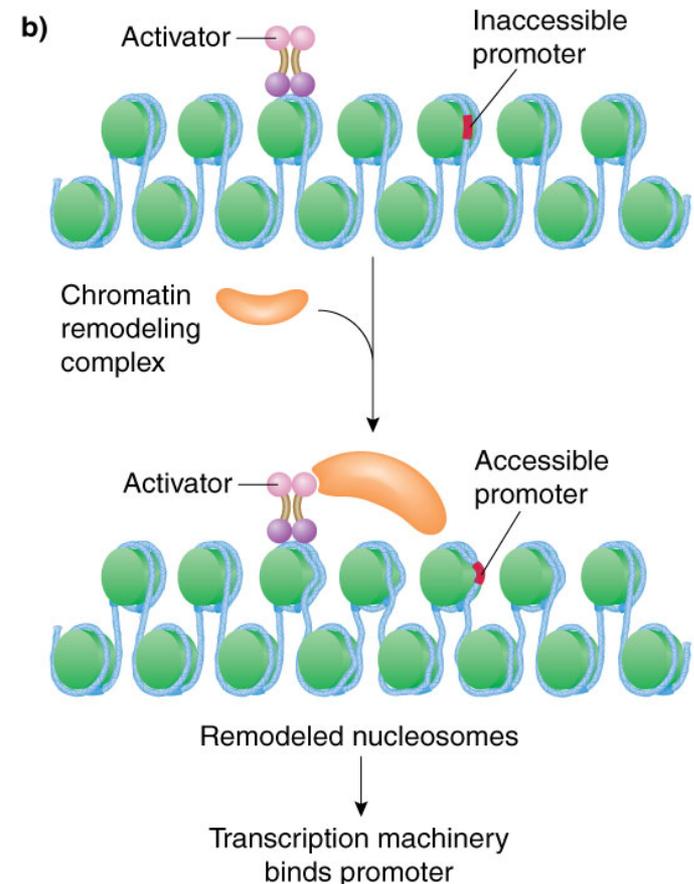
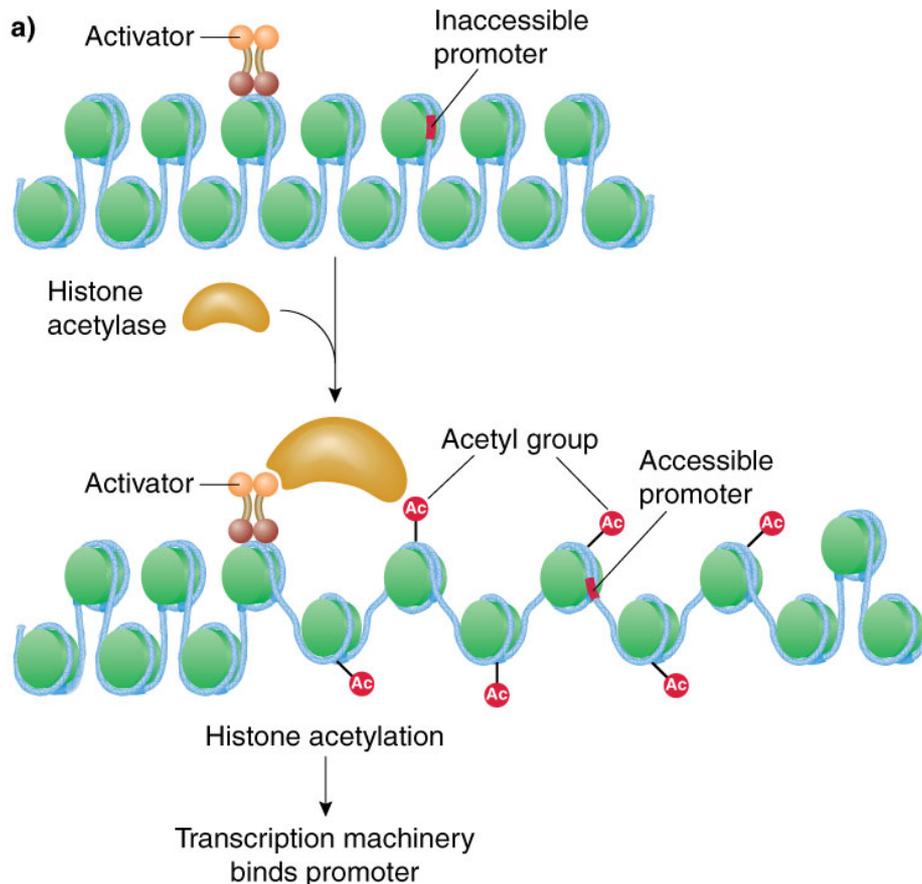


b) Transcription of gene B controlled by activators 2, 4, and 6



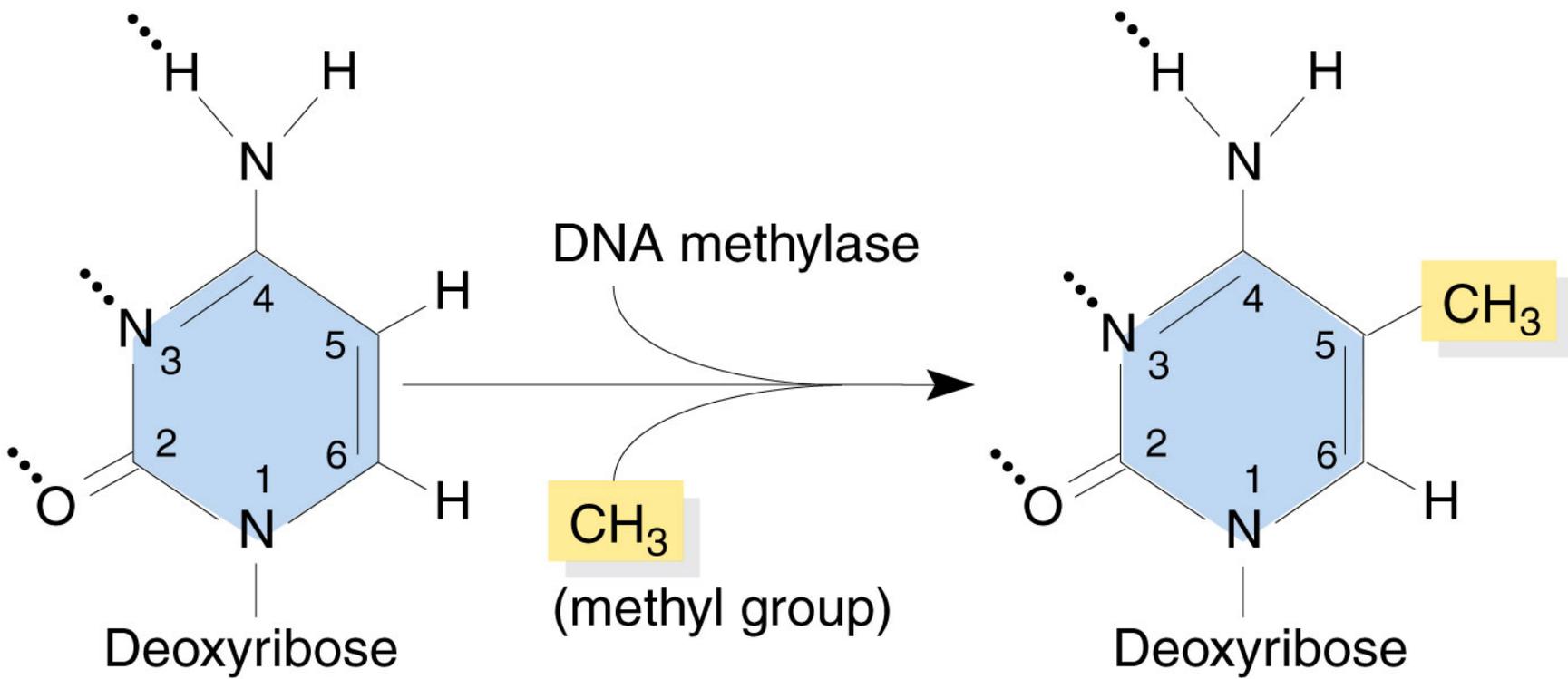
Globale Regulation:

Histon Modifikationen können Transkription regulieren indem Chromatin mehr oder weniger zugänglich verpackt wird (längerfristiger Einfluss auf die Genregulation)



Methylierte Cytosine befinden sich in der Promotorregion von inaktiven Genen (als CpG islands).

Methylierung von CpG islands kann die Transkription inhibieren
(Mittel- bis längerfristige Regulation)



Cytosine (in DNA)

5-Methylcytosine (5^mC)