Transkription bei Pro- und Eukaryoten

Im Rahmen der Transkription liefert ein Strang der DNA die Information für die Synthese eines RNA-Stranges. Die Enzyme, die in Pro- und Eukaryotenzellen für die Transkription zuständig sind, bezeichnet man als DNA-abhängige RNA-Polymerasen oder einfach als **RNA-Polymerasen**. Diese Enzyme bauen ein Nukleotid nach dem anderen in einen RNA-Strang ein, wobei dieser komplementär zur Matrize ist, einem der bei den DNA-Stränge.
Wenn eine RNA synthetisiert werden soll, besteht der erste Schritt in der **Anlagerung der Polymerase** an die DNA-Matrize.
Die Stelle auf der DNA, an die ein Molekül der RNA-Polymerase vor dem Beginn der Transkription bindet, bezeichnet man als **Promotor**. Die RNA-Polymerasen der Zellen erkennen Promotoren aber nicht allein, sondern sie sind dazu auf die Mitwirkung zusätzlicher Faktoren angewiesen, die man **Transkriptionsfaktoren** nennt.
Der Promotor stellt nicht nur eine Bindungsstelle für die Polymerase dar, sondern er enthält auch die Information darüber, welcher der beiden DNA-Stränge transkribiert wird und an welcher Stelle die Transkription beginnt.
Die Polymerase wandert an der DNA-Matrize entlang in Richtung von deren 5'-Ende (das heißt in 3' → 5'-Richtung). Wo die Polymerase entlangläuft, wird die DNA vorübergehend auseinander gewunden und die Polymerase baut einen komplementären RNA-Strang auf, der von seinem 5'-Ende aus in 3'-Richtung wächst.

Transkription bei Prokaryoten

Bakterien wie E. coli besitzen einen einzigen Typ einer RNA-Polymerase. Dieses Enzym besteht aus fünf Untereinheiten, die fest verbunden sind und das Core-Enzym bilden.

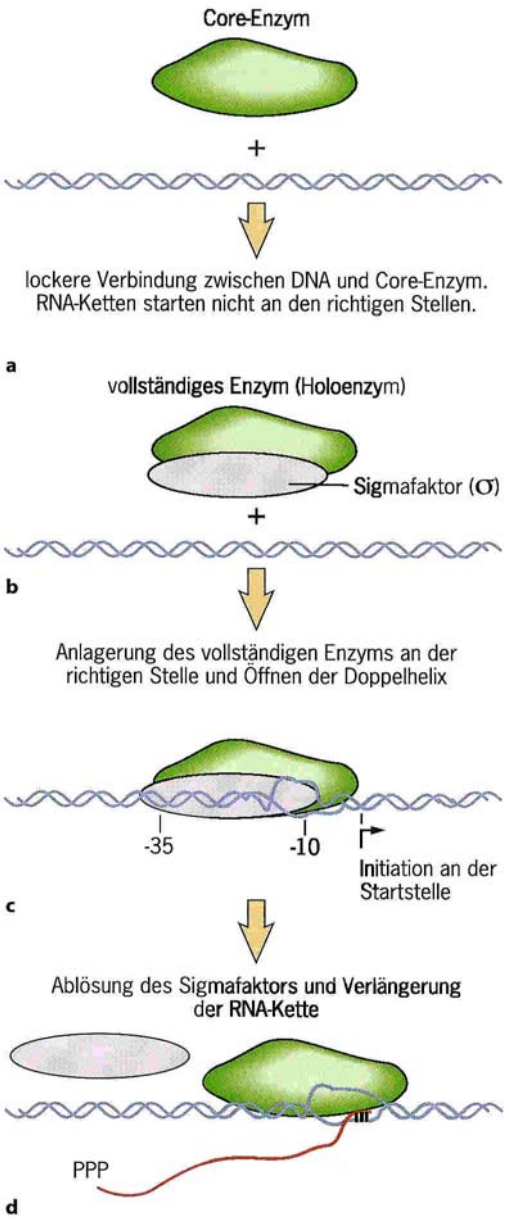
> Die Archaea, die die dritte große Domäne der Lebewesen bilden, besitzen ebenfalls eine einzige RNA-Polymerase, die aber eine ganz andere Untereinheiten-Zusammensetzung hat und stärker einer eukaryotischen RNA-Polymerase ähnelt.

Wenn man das Core-Enzym aus Bakterienzellen reinigt und einer Lösung mit Bakterien-DNA-Molekülen und Ribonukleosidtriphosphaten zusetzt, bindet es an die DNA und synthetisiert RNA. Eine solche gereinigte Polymerase erzeugt aber ganz andere RNA-Moleküle als das Enzym in der Zelle, weil das Core Enzym sich in der Lösung ganz zufällig an verschiedene Stellen der DNA heftet, die es in vivo übergehen würde. Setzt man der RNA-Polymerase aber vor der Anheftung an die DNA das Hilfs-Polypeptid Sigmafaktor (σ) zu, beginnt die Transkription nur an ausgewählten Orten. Durch die Anlagerung des σ-Faktors an das Core-Enzym steigt die Affinität des Enzyms für Promotorstellen in der DNA und seine Affinität für DNA im Allgemeinen nimmt ab.
Die Röntgenstrukturanalyse der RNA-Polymerase aus Bakterien zeigt ein Molekül, das wie eine „Krebsschere“ geformt ist: Es hat zwei bewegliche Zangenteile (Kiefer), die einen positiv geladenen Kanal umschließen. Wenn der σ -Faktor mit dem Promotor in Wechselwirkung tritt, greifen die Zangenkiefer nach dem stromabwärts gelegenen Doppelstrang, der sich in dem Kanal befindet. Anschließend trennt das Enzym in dem Bereich um die Startstelle die beiden DNA-Stränge. Durch die Strangtrennung wird die Matrize für das aktive Zentrum des Enzyms zugänglich, das sich an der Rückwand des Kanals befindet.
Nachdem die ersten zehn bis zwölf Nukleotide erfolgreich in ein neues Transkript eingefügt sind, macht das Enzym eine umfangreiche Konformationsänderung durch und verwandelt sich in den Transkriptions-Elongationskomplex, der prozessiv an der DNA entlang wandern kann. Auf die Ausbildung des Elongationskomplexes folgt im Allgemeinen die Freisetzung des Sigmafaktors.

Bakterienpromotoren liegen im DNA-Strang unmittelbar vor der Stelle, an der die Transkription beginnt. Das Nukleotid, an dem die Transkription beginnt, wird als + 1 bezeichnet, das Nukleotid unmittelbar davor heißt -1. DNA-Abschnitte vor dieser Initiationsstelle (d. h. näher am 3'-Ende der Matrize) liegen stromaufwärts (upstream) von dieser Stelle, nachfolgende Abschnitte (in Richtung des 5'-Endes der Matrize) heißen stromabwärts (downstream) gelegene Sequenzen. Bei der Analyse unmittelbar stromaufwärts gelegener Sequenzen aus zahlreichen Bakteriengenen stieß man auf zwei kurze Stücke, die bei vielen Genen sehr ähnlich sind. Eines davon hat seinen Mittelpunkt ungefähr 35 Basen stromaufwärts von der Initiationsstelle und besitzt im typischen Fall die Sequenz TTGA-CA. Diese **TTGACA-Sequenz** (die auch -35-Element genannt wird) bezeichnet man als **Consensussequenz**, das heißt, sie ist die am häufigsten vor kommende Version einer konservierten Sequenz, von Gen zu Gen gibt es aber Abweichungen. Die zweite konservierte Sequenz liegt ungefähr zehn Basen stromaufwärts von der Initiationsstelle und hat die Consensus-Sequenz **TATAAT**. Diese Stelle im Promotor, die nach ihrem Entdecker als **Pribnow-Box** bezeichnet wird, sorgt für die **genaue Festlegung des Nukleotids, an dem die Transkription beginnt**.

Bakterienzellen besitzen verschiedene σ-Faktoren, die unterschiedliche Versionen der Promotorsequenz erkennen. Das Protein σ70 wird als „Haushalts"-σ-Faktor bezeichnet, weil es die Transkription der meisten Gene in Gang setzt. Andere σ-Faktoren initiieren ganz gezielt die Transkription weniger Gene, die an einer gemeinsamen Reaktion mitwirken.

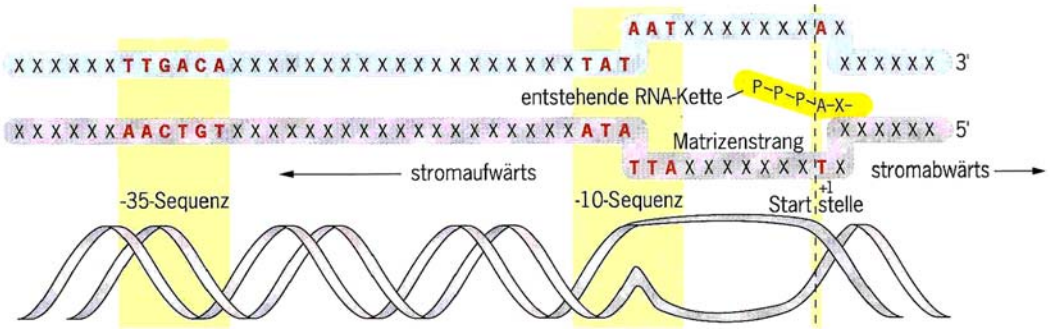
Setzt man E. coli-Zellen beispielsweise einer plötzlichen Temperatursteigerung aus, wird ein neuer σ-Faktor synthetisiert, der eine andere Promotorsequenz erkennt und für die koordinierte Transkription einer Gruppe von Hitzeschockgenen sorgt. Die Produkte dieser Gene schützen die übrigen Proteine der Zelle vor hitzebedingten Schäden.



Die Initiation der Transkription bei Prokaryoten (schematisch). a Ohne σ -Faktar kann das Core-Enzym nicht an spezifischen Initiationsstellen mit der DNA in Wechselwirkung treten. b-d Hat das Core-Enzym sich mit dem a-Faktor zusammengelagert, erkennt und bindet da! vollständige Enzym die Promotorregion der DNA, trennt die Stränge der DNA-Doppelhelix und setzt an der richtigen StartsteIle die Transkription in Gang. Anschließend dissoziiert der σ -Faktor vom Enzym, das nur ohne ihn für die Elongation sorgt

Die Transkription wird nicht nur an bestimmten Stellen des Chromosoms in Gang gesetzt, sondern sie **endet** auch, wenn sie eine **spezifische Nukleotidsequenz** erreicht. In ungefähr der Hälfte aller Fälle ist ein ringförmiges **Protein** namens **rho** bei Bakterien für die **Termination** der Transkription erforderlich. Rho umschließt die neu synthetisierte RNA, wandert an dem Strang entlang zur Polymerase und trennt die RNA von der DNA, an die sie gebunden ist. In anderen Fällen beendet die

Polymerase die Transkription, wenn sie eine Terminatorsequenz erreicht; dann setzt sie die fertig gestellte RNA-Kette frei, ohne dass weitere Faktoren notwendig wären.



Die wichtigsten Elemente der Promotorregion in der DNA des Bakteriums *E. coli*. Die entscheidenden Regulationssequenzen für die Initiation der Transkription liegen in zwei Bereichen um die Positionen -35 und -10 vor der Stelle, an der die Transkription beginnt. Diese Initiationsstelle ist die Grenze zwischen den mit - und + bezeichneten Teilen des Gens

Transkription und RNA-Processing bei Eukaryotenzellen

Eukaryotenzellen besitzen drei verschiedene Transkriptionsenzyme, die jeweils für die Synthese einer bestimmten Gruppe von RNAs zuständig sind:

- Die RNA-Polymerase I synthetisiert die größeren ribosomalen RNAs (28S, 18S und 5,8S).
- Die RNA-Polymerase II stellt Messenger-RNAs und die meisten kleinen RNAs im Zellkern (snRNAs und snoRNAs) her.
- Die RNA-Polymerase III synthetisiert verschiedene RNAs mit geringem Molekulargewicht, darunter die Transfer-RNAs, die ribosomale 5S-RNA und die U6-snRNA.

Man kennt keinen einzigen Prokaryoten mit mehreren RNA-Polymerasen, bei den einfachsten Eukaryoten jedoch (den Hefen) findet man bereits die gleichen drei Typen wie in Säugerzellen.

Dieser Unterschied in der Zahl der RNA-Polymerasen ist ebenfalls ein charakteristisches Merkmal, in dem sich Pro- und Eukaryotenzellen unterscheiden.

Von den zusätzlichen Untereinheiten der eukaryotischen Polymerasen sind einige wahrscheinlich von zentraler Bedeutung für die Wechselwirkungen des Enzyms mit anderen Proteinen. Ein wichtiger Unterschied zwischen der Transkription von Pro- und Eukaryoten besteht nämlich darin, dass bei Eukaryoten eine große Zahl von Hilfsproteinen (**Transkriptionsfaktoren**) erforderlich ist. Diese Proteine spielen für praktisch alle Aspekte der Transkription eine große Rolle, von der Bindung der Polymerase an ihre DNA-Matrize über die Initiation der Transkription und die Elongation bis zur Termination.

Alle drei Haupttypen der RNA - mRNA, rRNA und tRNA - stammen von RNA- Vorläufermolekülen ab, die erheblich länger sind als das fertige RNA-Produkt.

Die Vorläufer-RNA entspricht in ihrer Länge dem gesamten transkribierten DNA-Abschnitt und wird als Primärtranskript oder Prä-RNA bezeichnet. Der zugehörige DNA-Abschnitt, an dem das Primärtranskript transkribiert wird, heißt Transkriptionseinheit. Primärtranskripte liegen in den Zellen nicht als nackte RNA vor, sondern lagern sich schon während ihrer Synthese mit Proteinen zusammen. Sie haben in der Regel nur ein kurzes Leben, weil sie in einer Reihe von „Ausschneide- und Einfügereaktionen“ zu kleineren, funktionsfähigen RNA-Molekülen weiterverarbeitet werden.

Dieses **RNA-Processing** erfordert verschiedene kleine RNAs von 90 bis 300 Nukleotiden Länge und die mit ihnen assoziierten Proteine (small nuclear RNAs, **snoRNAs**; small nuclear ribonucleoproteins, **snoRNPs**).

Synthese und Weiterverarbeitung der Messenger-RNA

Wenn man Eukaryotenzellen für kurze Zeit (30 Minuten) mit [3H]-Uridin oder [32p]-Phosphat inkubiert und anschließend sofort abtötet, findet man den überwiegenden Teil der Radioaktivität in den RNA-Molekülen einer großen Gruppe, die mehrere gemeinsame Eigenschaften haben:

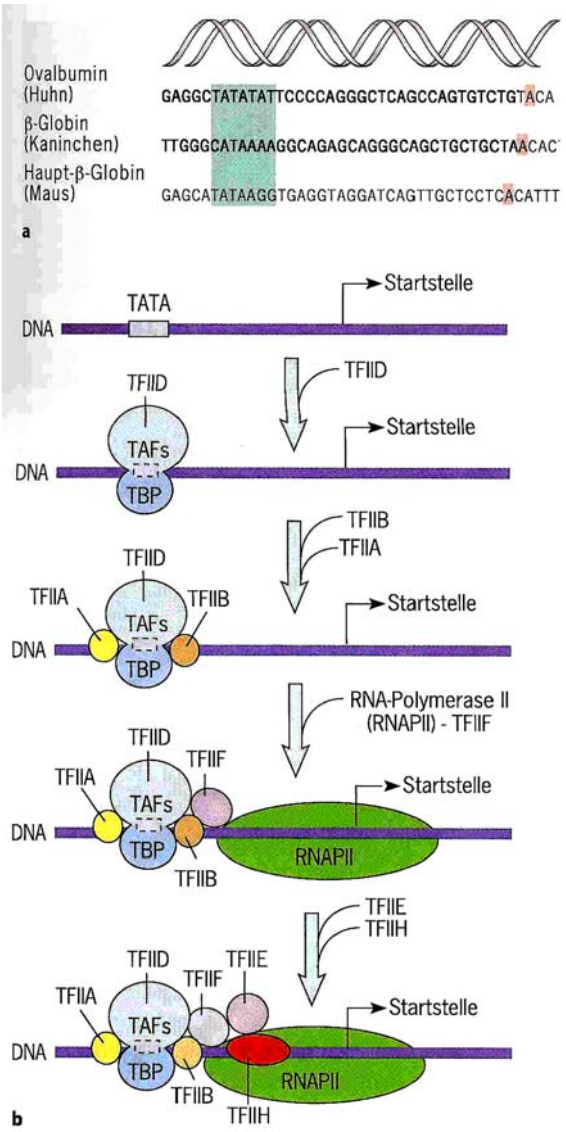
- ein hohes Molekulargewicht (bis zu 50000 Nukleotide),
- sehr vielfältige Nukleotidsequenzen und
- Lokalisierung ausschließlich im Zellkern.

Diese RNAs werden deshalb als **heterogene RNA im Zellkern** (heterogeneous nuclear RNAs, **hnRNAs**) bezeichnet.

Wenn man die markierten Zellen während einer Chase-Phase von mehreren Stunden in unmarkiertem Medium weiterzüchtet, bevor man sie abtötet und die RNA extrahiert, so geht die Radioaktivität in den großen RNA-Molekülen aus dem Zellkern stark zurück; stattdessen findet man sie in viel kleineren RNAs im Cytoplasma. Dies ließ darauf schließen, dass die großen, schnell markierten hnRNAs die **Vorläufer** der kleineren **mRNAs** aus dem Cytoplasma sind. Diese Interpretation wurde im Laufe der letzten Jahre durch zahlreiche Forschungsergebnisse erhärtet.

Der Apparat für die Transkription der mRNA

Bei Eukaryoten werden alle Vorläufer der mRNA von der RNA-Polymerase II synthetisiert, einem Enzym aus zwölf verschiedenen Untereinheiten, das in seiner Struktur von der Hefe bis zu den Säugetieren außergewöhnlich konstant geblieben ist. **Die Initiation der Transkription durch die RNA-Polymerase II erfolgt mit Hilfe mehrerer allgemeiner Transkriptionsfaktoren** (**general transcription factors, GTFs**), deren Funktion bisher nicht im Einzelnen geklärt ist. Als „allgemeine" Transkriptionsfaktoren werden diese Proteine bezeichnet, weil sie in genau der gleichen Form bei einem breiten Spektrum biologischer Arten für die Transkription ganz unterschiedlicher Gene gebraucht werden. Die Promotoren für die RNA-Polymerase II liegen jeweils auf der 5' -Seite der einzelnen Transkriptionseinheiten, den ersten Kontakt stellt das Enzym aber beiderseits der Transkriptions-Startstelle her. Bei der großen Mehrzahl der untersuchten Gene liegt ein entscheidender Bestandteil des Promotors 24 bis 32 Basen stromaufwärts von der Stelle, an der die Transkription beginnt. Häufig liegt in diesem Bereich eine **Consensussequenz**, die entweder genau 5'- TATAAA-3' lautet oder diesem Oligonukleotid sehr ähnlich ist und als **TATA-Box** bezeichnet wird.



Initiation der Transkription an einem eukaryotischen Promotor für die Polymerase II. Die Nukleotidsequenz des Abschnitts unmittelbar stromaufwärts von der Stelle, wo in drei verschiedenen Eukaryotengenen die Transkription beginnt.

An der TATA-Box der DNA wird ein **Präinitiationskomplex** zusammengesetzt, der die GTFs und die Polymerase enthält. Er muss sich bilden, bevor die Transkription des Gens beginnen kann.
Der erste Schritt beim Zusammenbau des Präinitiationskomplexes ist die Anheftung des TATA-bindenden Proteins (TBP), das die TATA-Box eukaryotischer Promotoren erkennt. Die gereinigte eukaryotische Polymerase ist also wie das Enzym der Prokaryoten nicht in der Lage, einen Promotor unmittelbar zu erkennen und die Transkription allein präzise in Gang zu setzen. Das TBP bildet eine Untereinheit eines viel größeren Proteinkomplexes, der als **TFIID** (transription factor for polymerase II, fraction D) bezeichnet wird.
TBP ist ein universeller Transkriptionsfaktor und vermittelt die Bindung aller drei eukaryotischen RNA-Polymerasen. Er ist als Untereinheit an drei verschiedenen Proteinkomplexen beteiligt. Als Untereinheit von TFIID begünstigt TB die Bindung der RNA-Polymerase II. Als Baustein der Proteine SL1 oder TFIIIB sorgt er für die Bindung der RNA-Polymerasen I bzw. III. Zahlreiche Promotoren enthalten keine TATA-Box, können aber dennoch TBP binden.
Wie man aus Röntgenstrukturanalysen weiß, kommt es durch die Bindung von TBP an einen Polymerase-II-Promotor zu einer drastischen Konformationsänderung der DNA. TBP lagert sich in die kleine Furche der Doppelhelix, und das führt dazu, dass die DNA an der Stelle ihrer Wechselwirkung mit dem Protein um mehr als 80° abknickt.
Mit der Bindung von TFIID sind die Voraussetzungen für den Zusammenbau des gesamten Präinitiationskomplexes geschaffen; dieser erfolgt wahrscheinlich schrittweise wie in der Abb. An den Promotor gebunden, bilden diese drei GTFs eine Art Sockel für die Bindung der riesigen, aus vielen Untereinheiten bestehenden RNA-Polymerase mit ihrem angehefteten TFIIF. Hat der Komplex aus RNA-Polymerase und TFIIF seine Position eingenommen, kommen zwei weitere GTFs (TFIIE und TFIIH) hinzu und verwandeln die Polymerase in einen aktiven Transkriptionsapparat.
So weit man weiß, besitzt TFIIH als einziger GTF enzymatische Aktivität. Eine seiner Untereinheiten wirkt als Proteinkinase und phosphoryliert die RNA-Polymerase. Zwei weitere Untereinheiten winden als Helikasen die DNA auseinander. Die Helikaseaktivität ist notwendig, damit die DNA-Stränge am Promotor sich trennen und der Polymerase den Zugang zum Matrizenstrang gestatten. Nachdem die Transkription begonnen hat, dürften manche GTFs (darunter auch TFIID) am Promotor zurückbleiben, während andere sich von dem Komplex lösen. Solange TFIID an den Promotor gebunden ist, können sich dort wahrscheinlich weitere Moleküle der RNA-Polymerase anlagern und unverzüglich neue Transkriptionsvorgänge beginnen.
Die carboxyterminale Domäne (CTD) in der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II hat eine ungewöhnliche Struktur. Sie besteht aus einer Sequenz von sieben Aminosäuren (- Tyr-SerPro- Thr-Ser-Pro-Ser-), die sich immer und immer wieder wiederholt. Bei Säugetieren enthält die CTD 52-mal dieses Heptapeptid. Von den sieben Aminosäuren sind die Serinreste Nummer 2 und 5 besonders gute Kandidaten für die Phosphorylierung durch Proteinkinasen. Wenn die RNA-Polymerase sich am Präinitiationskomplex anlagert, ist sie nicht phosphoryliert, während der eigentlichen Transkription dagegen trägt das Enzym zahlreiche Phosphatgruppen, die sich alle in der CTD befinden. Die Phosphorylierung der CTD kann durch mindestens vier verschiedene Kinasen katalysiert werden, unter anderem auch durch TFIIH. Die Phosphorylierung der Polymerase dürfte der Auslöser sein, der das Enzym von den GTFs und/oder der DNA des Promotors entkoppelt, so dass das Enzym sich vom Präinitiationskomplex lösen kann und an der DNA-Matrize entlang wandert. Während der Elongation dürfte die RNA-Polymerase mit mehreren großen Hilfsproteinen assoziiert sein. Manchen Schätzungen zufolge ist eine RNA-Polymerase während der Kettenverlängerung ein Teil eines riesigen Komplexes mit über 50 Bestandteilen und einem Gesamtmolekulargewicht von mehr als 3 Mio.

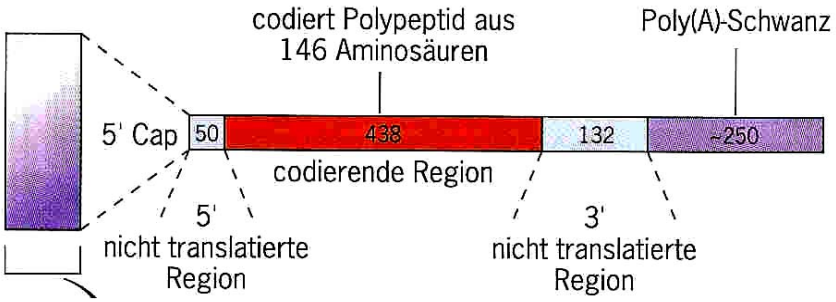
Gemeinsam reichen die RNA-Polymerase II und ihre GTFs aus, um an den meisten Promotoren unter In-vitro-Bedingungen ein niedriges Grundniveau der Transkription zu gewährleisten. Verschiedene **spezifische Transkriptionsfaktoren** binden an zahlreichen Stellen **an Regulationsabschnitte der DNA**. Diese spezifischen Faktoren bestimmen in vielen Fällen darüber, ob der Präinitiationskomplex sich an einem bestimmten Promotor zusammenlagert und mit welcher Geschwindigkeit die Polymerase an diesem Promotor neue Transkriptionsvorgänge beginnt. .

Die Struktur von mRNA

Messenger-RNAs haben eine Reihe gemeinsamer Eigenschaften:

- Sie enthalten eine ununterbrochene Nukleotidsequenz, die bestimmtes Polypeptid codiert.

- Sie liegen im Cytoplasma.
- Wenn sie translatiert werden, sind sie an Ribosomen angeheftet.
- Die meisten mRNAs enthalten einen beträchtlichen nicht codierenden Abschnitt, d. h. einen Teil, der nicht den Zusammenbau von Aminosäuren steuert. So bestehen beispielsweise nahezu 25% jeder Globin-mRNA aus nicht codierenden Regionen, die nicht translatiert werden (Abb. 11.21). Solche nicht codierenden Teile findet man am 5'- und am 3'-Ende einer Messenger-RNA; sie enthalten Sequenzen mit wichtigen Regulationsfunktionen.
- Die mRNAs der Eukaryoten tragen am 5'und 3'-Ende besondere Modifikationen, die man weder bei prokaryotischen Messenger-RNAs noch bei tRNA oder rRNA findet. Am 3'- Ende fast aller eukaryotischen mRNAs liegt eine Kette von 50 bis 250 Adenosinresten, die einen so genannten Poly(A)-Schwanz bilden. Das 5'-Ende trägt eine „Cap"-Struktur aus methyliertem Guanosin



Struktur der mRNA für das menschliche ß-Globin. Die mRNA enthält am 5'-Ende ein Methylguanosin-Cap, nicht codierende Abschnitte am 3'- und 5'-Ende beiderseits der codierenden Sequenz und am 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz. Der Poly(A)Schwanz kann unterschiedlich lang sein. Anfangs umfasst er in der Regel ungefähr 250 Nukleotide, später wird er allmählich kürzer.

Gestückelte Gene: eine unerwartete Entdeckung

Fast sofort nach der Entdeckung der hnRNA hatte man die Vermutung, dass es sich bei diesen schnell markierten, im Zellkern angesiedelten RNA-Molekülen um die Vorläufer der cytoplasmatischen mRNAs handelt. Die große Frage war dabei jedoch der Größenunterschied zwischen den Molekülen der beiden Populationen: Die hnRNAs waren um ein Mehrfaches länger als die mRNAs. Warum sollten die Zellen derart riesige Moleküle als Vorläufer wesentlich kleinerer Formen synthetisieren? Erste Untersuchungen am Processing der ribosomalen RNA hatten zu der Erkenntnis geführt, dass reife RNAs aus viel größeren Vorläufern herausgeschnitten werden.
Bis 1977 hatte man allgemein angenommen, eine ununterbrochene Nukleotidfolge in einer Messenger-RNA sei komplementär zu einer ununterbrochenen Nukleotidsequenz in einem DNA-Strang des zugehörigen Gens.
In dem genannten Jahr jedoch stellte man fes, dass in Genen Zwischenabschnitte eingestreut waren, die nicht zur Kodierung der Proteinsequenz genutzt wurden.
Wenig später fand man auch in anderen Genen intervenierende Sequenzen, und es stellte sich heraus, dass Gene mit solchen Zwischenabschnitten man sprach jetzt von gestückelten Genen - nicht die Ausnahme, sondern die Regel sind.
Die Teile eines gestückelten Gens, die zur reifen mRNA beitragen, nannte man **Exons**, die intervenierenden Sequenzen bezeichnete man nun als **Introns**.
Gestückelte Gene sind bei Eukaryoten allgemein verbreitet, bei einfachen Eukaryoten jedoch (z. B. bei Hefe und Fadenwürmern) sind die Introns meist weniger zahlreich und kleiner als bei den

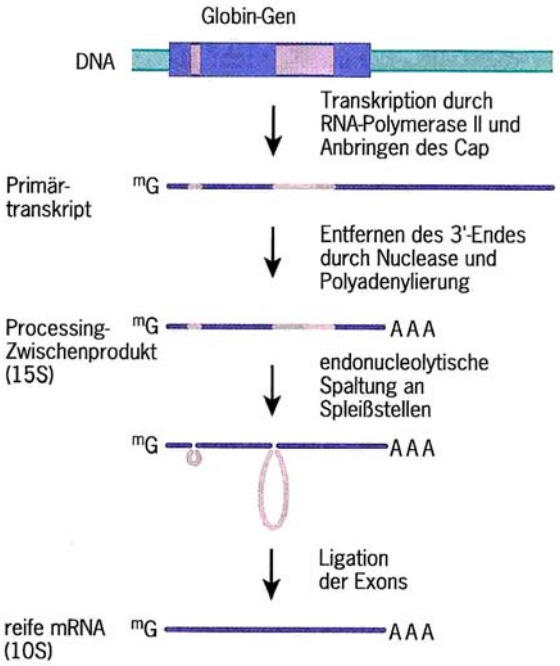
komplizierter gebauten Pflanzen und Tieren. Introns kommen in Genen aller Typen vor, nicht nur in denen für mRNA, sondern auch in solchen, die tRNA oder rRNA codieren.
Im Durchschnitt findet man in einem Gen des Menschen neun Introns.
Diese und andere Befunde sprachen stark für die Vorstellung, dass die mRNA in Eukaryotenzellen durch die Entfernung interner Ribonuckeotidsequenzen aus einer viel größeren Vorläufer-RNA entsteht.

Das Processing eukaryotischer mRNA

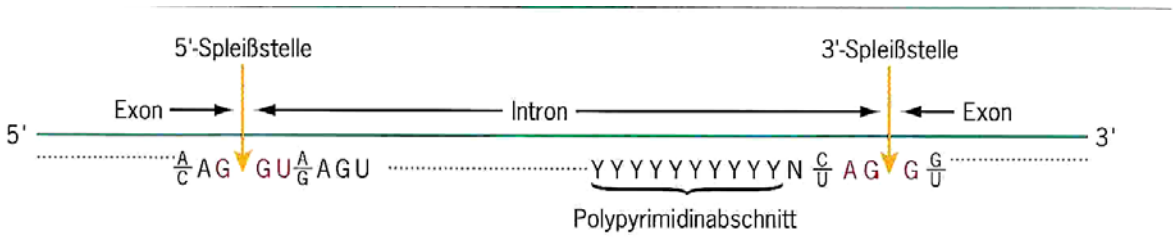
Die RNA-Polymerase setzt ein Primärtranskript zusammen, das zur DNA der gesamten Transkriptionseinheit komplementär ist. Dieses Transkript wird dann im Zellkern zur reifen mRNA weiterverarbeitet, die anschließend ins Cytoplasma gelangt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Genen mit aktiver Transkription zeigen, dass RNA- Transkripte sich bereits während ihrer Synthese mit Proteinen und größeren Teilchen zusammenlagern. Diese Partikel, die aus Proteinen und Ribonukleoproteinen bestehen, enthalten die notwendigen Bestandteile für die Umwandlung des Primärtranskripts in die reife Messenger-RNA.
Im Rahmen dieses Umwandlungsvorganges werden die 5'-CapStruktur sowie der 3'-Poly(A)-Schwanz angefügt, und die Introns werden entfernt. Das Methylguanosin am 5'- Ende der mRNA erfüllt mehrere Funktionen: Es verhindert, dass das 5'- Ende von Exonukleasen abgebaut wird, unterstützt den Transport der mRNA aus dem Zellkern und ist von großer Bedeutung für die Initiation der mRNA- Translation. Der Poly(A)-Schwanz in Verbindung mit assoziierten Proteinen schützt die mRNA vor vorzeitigem Abbau.

RNA-Spleißen: Entfernung von Introns aus einer Prä-mRNA

Die wichtigsten Schritte im Processing einer Prä-mRNA zeigt die Abb. Es müssen diejenigen Teile des Primärtranskripts, die den intervenierenden DNA-Sequenzen (Introns) entsprechen, entfernt werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als **RNA-Spleißen**. Dazu muss der RNA-Strang am 5'- und 3'-Ende des Introns (den SpleißsteIlen) geschnitten werden, und die Exons beiderseits der Spleißstellen müssen kovalent verbunden (ligiert) werden. Das Spleißen muss unbedingt sehr präzise erfolgen, denn schon ein einziges zusätzliches oder fehlendes Nukleotid an einer der Spleißstellen hätte eine falsche Ablesung der mRNA zur Folge.
Wie kann der gleiche grundlegende Spleißapparat die Exon-Intron-Grenzen in vielen tausend verschiedenen Prä-mRNAs erkennen? Bei der Untersuchung von Hunderten verschiedener Spleißstellen bei Eukaryoten von der Hefe über Insekten bis zu Säugetieren stellte sich heraus, dass sich dort eine konservierte, entwicklungsgeschichtlich sehr alte Nukleotidsequenz befindet. Die Sequenz, die man an den Exon-Intron-Übergängen der Prä-mRNAs von Säugetieren am häufigsten findet, zeigt die Abb.



Die Weiterverarbeitungsschritte der Globin-mRNA. Introns sind *hell* dargestellt. *Dunkelblaue* Genabschnitte sind Exons, d.h. DNA-Sequenzen, die sich in der ausgereiften Messenger-RNA wieder finden



Nukleotidsequenzen an den SpleißsteIlen von Prä-mRNAs. Die hier gezeigten Nukleotidsequenzen im Bereich der SpleißsteIlen sind das Ergebnis der Analyse zahlreicher Prä-mRNAs und werden deshalb als Consensussequenzen bezeichnet. Die *rot* gekennzeichneten Basen ändern sich praktisch nie, solche in *schwarz* werden an der jeweiligen Position bevorzugt. N bezeichnet ein beliebiges Nukleotid, Y ein Pyrimidin. Der Polypyrimidinabschnitt an der 3'-Spleißstelie besteht in der Regel aus zehn bis 20 Nukleotiden

Das G/GU am 5'-Ende des Introns (der 5'-Spleißstelle), das AG/G am 3'-Ende des Introns (der 3'-Spleißstelle) und der Polypyrimidinabschnitt in der Nähe der 3' -Spleißstelle findet man bei der großen Mehrzahl aller eukaryotischen Prä-mRNAs.5 Außerdem enthalten die Nachbarregionen des Introns bevorzugte Nukleotide, die für die Erkennung der Spleißstelle ebenfalls von großer Bedeutung sind. Die in der Abb. wiedergegebenen Sequenzen sind für die Erkennung der Spleißstelle notwendig, sie reichen dafür allein aber nicht aus. Introns sind in der Regel mehrere tausend Nukleotide lang und enthalten häufig auch interne Abschnitte, die zu der in Abb. gezeigten Consensussequenz passen, aber die Zelle erkennt sie nicht als Spleißsignale und beachtet sie dementsprechend nicht. Die zusätzlichen Hinweise, mit deren Hilfe der Spleißapparat zwischen Exons und Introns unterscheidet, befinden sich nach heutiger Kenntnis in spezifischen Sequenzen, den Exon-Spleißverstärkern (exonic splicing enhancers, ESEs), die sich in den Exons befinden. Veränderungen in der DNA-Sequenz einer SpleißsteIle oder eines ESE können dazu führen, dass ein Intron erhalten bleibt oder ein Exon entfernt wird. Schätzungsweise 15% der genetisch bedingten Erkrankungen entstehen durch Mutationen, die zu Veränderungen beim Spleißen der Prä-mRNA führen.
Zum Spleißen bei tierischen Zellen sind zahlreiche kleine Zellkern-RNAs (small nuclear RNAs, snRNAs) und die mit ihnen assoziierten Proteine nötig. Jedes große Molekül der hnRNA verbindet sich bereits während seiner Transkription mit verschiedenen Proteinen zu einem heterogenen Zellkern-Ribonukleoprotein (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP). Dieses bildet dann das Substrat für die nachfolgenden Weiterverarbeitungsreaktionen. Die assoziierten Elemente, die den Komplex für das Spleißen bilden, werden Speißosom genannt.

Steuerung der Genexpression bei Prokaryoten

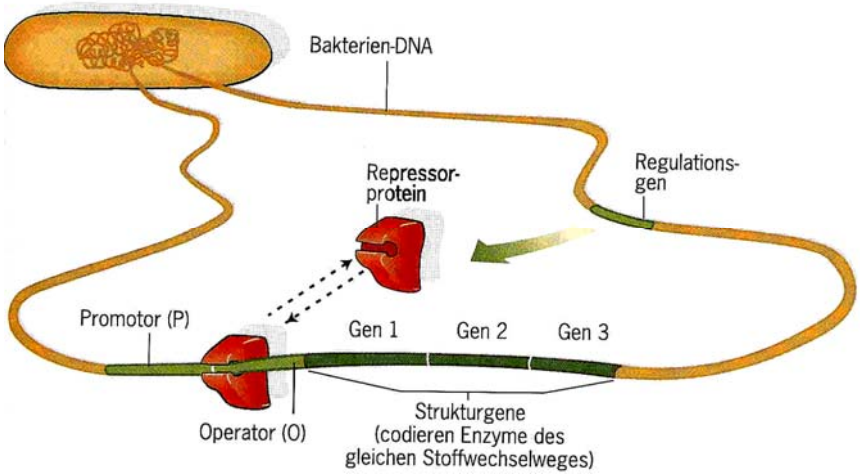
Bei Bakterien liegen die Gene, die die Enzyme eines Stoffwechselweges codieren in der Regel eng benachbart. Einen solchen Funktionskomplex bezeichnet man als **Operon**.
Alle Gene eines Operons werden koordiniert gesteuert. Ein typisches Bakterienoperon besteht aus **Strukturgenen**, einer **Promotorregion**, einer **Operatorregion** und einem **Regulationsgen**.

- Strukturgene codieren die Enzyme selbst. Die Strukturgene eines Operons liegen in der Regel unmittelbar hintereinander, und die RNA-Polymerase wandert von einem Strukturgen zum Nächsten, wobei sie alle Gene in eine einzige mRNA umschreibt. Diese lange mRNA wird dann in die verschiedenen Einzelenzyme des Stoffwechselweges translatiert. Schaltet man also ein Gen an, werden alle Enzym- produzierenden Gene eines Operons aktiv.
- Der Promotor ist die Stelle, wo die RNA-Polymerase vor Beginn der Transkription an die DNA bindet.
- Der Operator liegt in der Regel neben dem Promotor oder überschneidet sich mit ihm; er dient als Bindungsstelle für ein Protein, das man als Repressor bezeichnet. Der Repressor gehört zur Gruppe der Genregulationsproteine: Er erkennt eine spezifische Basenpaarsequenz

in der DNA und bindet mit hoher Affinität daran. Es spielen DNA-bindende Proteine wie die Bakterienrepressoren die beherrschen de Rolle, wenn es darum geht, ob ein bestimmter Genomabschnitt transkribiert wird.

- Das Regulationsgen codiert das Repressorprotein.

Der Schlüssel zur Expression des Operons liegt im Repressor. Wenn er an den Operator bindet, ist dieser gegenüber der Polymerase abgeschirmt und die Transkription der Strukturgene wird blockiert. Ob der Repressor an den Operator binden und die Transkription unterbinden kann, hängt von seiner Konformation ab: Diese wird, wie wir in Kürze noch genauer erfahren werden, allosterisch durch eine entscheidende Verbindung aus dem Stoffwechselweg beeinflusst, beispielsweise durch Lactose oder Tryptophan. Letztlich bestimmt also die Konzentration dieser Substanz aus dem Stoffwechsel darüber, ob das Operon zum jeweiligen Zeitpunkt aktiv oder inaktiv ist.

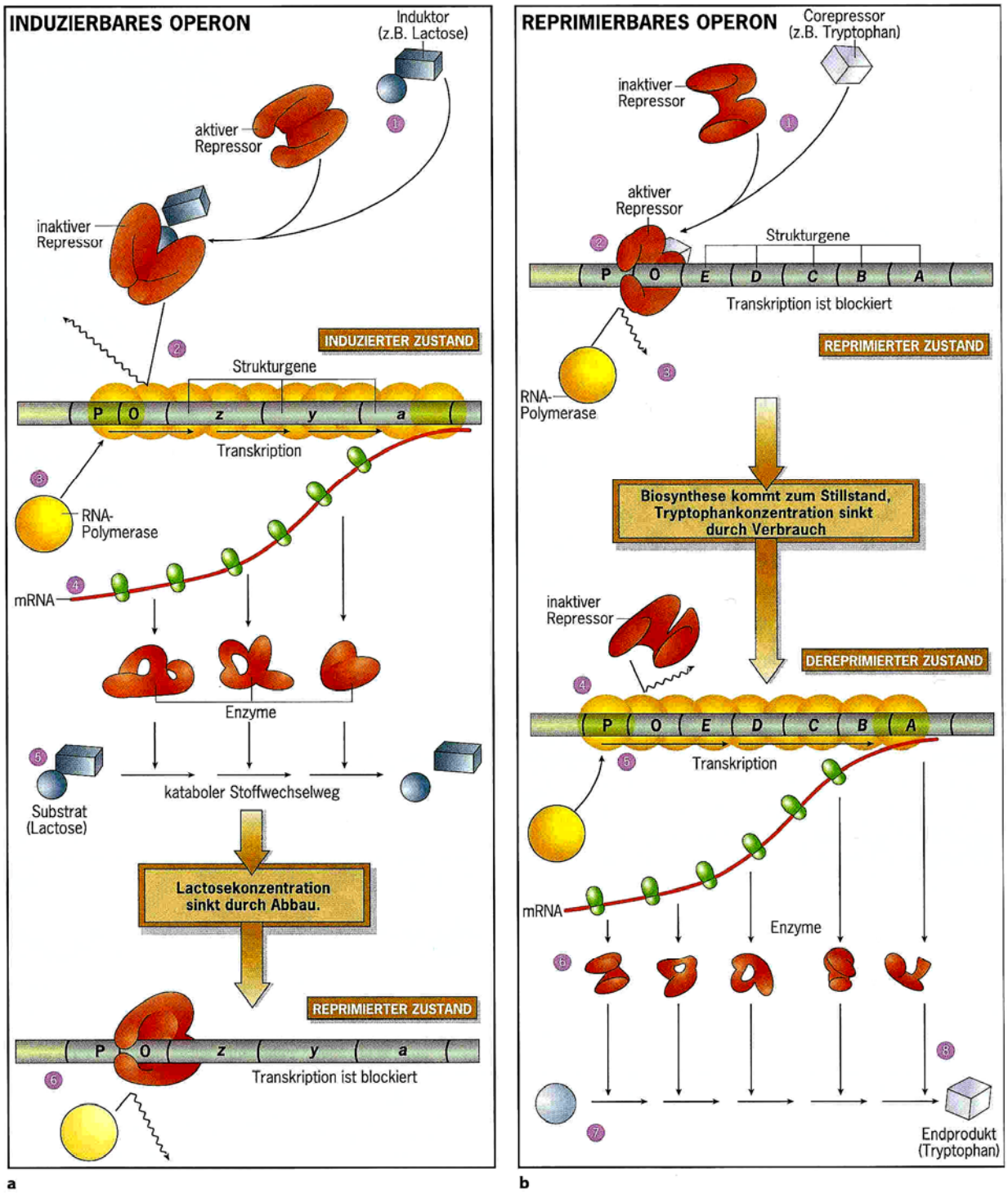


Aufbau eines Bakterienoperons. Die Enzyme eines zusammengehörigen Stoffwechselweges sind in einer Reihe von Strukturgenen codiert, die hintereinander auf dem Bakterienchromosom liegen. Alle Strukturgene eines Operons werden in eine ununterbrochene RNA umgeschrieben, an der dann durch Translation verschiedene Polypeptide entstehen. Reguliert wird die Transkription der Strukturgene durch ein Repressorprotein, das die Wanderung der RNA-Poymerase vom Promotor zu den Strukturgenen blockiert, solange es an die Operatorsteile auf der DNA gebunden ist.

Zu unterscheiden sind zwei Operon-Typen:

- **Induzierbare** und
- **Reprimierbare**,

je nachdem, ob die Produkte in Gegenwart einer wichtigen Stoffwechselsubstanz induziert oder unterdrückt werden.



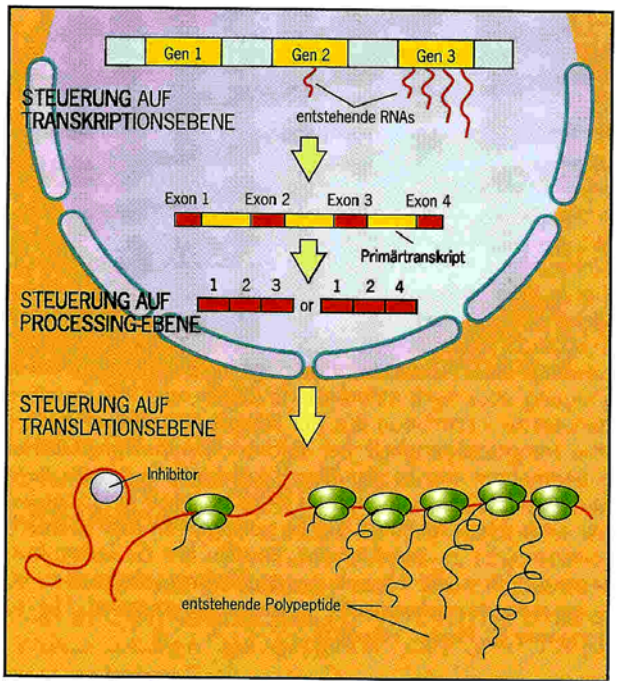
Induzierbares und reprimierbares Bakterienoperon; Beispiele: lac und tryp Operon.

Steuerung der Genexpression bei Eukaryotischen Zellen.

Die komplexen Pflanzen und Tiere besitzen nicht nur ein Genom mit mehreren zehntausend Genen, sondern sie bestehen auch aus vielen verschiedenen Zelltypen. Bei Wirbeltieren kann man beispielsweise mehrere hundert Zelltypen unterscheiden, die weit komplizierter gebaut sind als eine Bakterienzelle und jeweils ihre eigene Proteinausstattung benötigen, um ihre spezialisierten Tätigkeiten auszuführen.

Bei Eukaryoten ist die Steuerung der Genexpression sehr viel komplexer als bei Bakterien. Es gibt drei Ebenen der Steuerung:

- Steuerungsmechanismen auf Transkriptionsebene bestimmen darüber, ob ein bestimmtes Gen abgelesen wird und wenn ja, wie oft.
- Steuerungsmechanismen auf Processing-Ebene legen fest, auf welchem Weg das primäre mRNA-Transkript (die Prä-mRNA) zu der Messenger-RNA weiterverarbeitet wird, die dann in ein Polypeptid translatiert werden kann.
- Steuerungsmechanismen auf Translationsebene regeln, ob eine bestimmte mRNA tatsächlich translatiert wird und wenn ja, wie oft und wie lange.



Die Ebenen der Genexpressionssteuerung im Überblick. Auf Transkriptionsebene bestimmt die Steuerung darüber, welche Gene transkribiert werden und wie oft dies geschieht. Auf Processing-Ebene wird darüber entschieden, welche Teile der Primärtranskripte in die Gesamtmenge der zelleigenen mRNAs einfließen. Und auf Translationsebene wird reguliert, ob eine bestimmte mRNA translatiert wird und wenn ja, wie oft und wie lange.