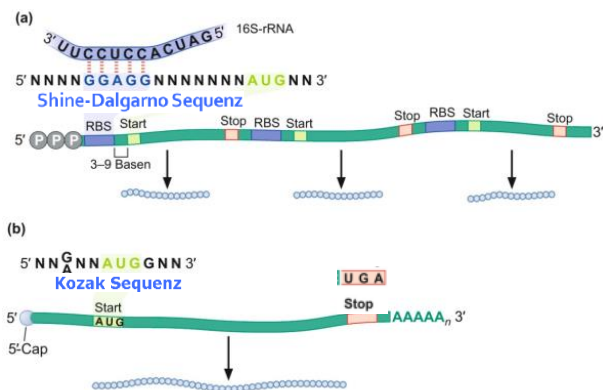


## Teil Moll - 2018

Moll: 'Don't fill your brain with abbreviations and names'

Die Hypothese „Zentrales Dogma der Molekularbiologie“ nach Crick 1958 besagt: *Wenn sequenzielle Information einmal in ein Protein übersetzt wurde, kann sie dort nicht wieder herausgelangen.* Information kann nicht von Protein zu einem Protein bzw. zu Nukleinsäure übertragen werden. Katalytisch und regulatorisch aktive RNA werden nicht translatiert.



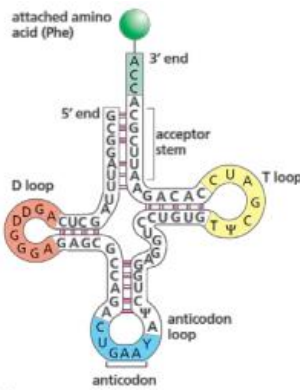
(a) Prokaryoten	(b) Eukaryoten
Spezialfall: IF3 Leaderless mRNA	Spezialfall: IRES-Mediated Initiation
gekoppelte Transkription- Translation-Transertion	Proteintransport
Intrinsische Einzelstrang-RNA faltet sich zum Schutz, dient ebenso zur Translations-Regulation	Cotranskriptionelles m7G Capping γ-P wird entfernt und ein Guanidinrest wird angefügt
Polycistronische mRNA	Monocistronische mRNA
EF-TU, EF-G	eEF1A, eEF2 sind dazu homolog

In Prokaryoten findet die Transkription, sowie Translation gekoppelt statt. Bei der Transertion werden die Peptide in die Membran transportiert. Davon verschieden laufen bei Eukaryoten die Vorgänge in unterschiedliche Kompartimente ab. Die mRNA mit 5'-Cap und PolyA-Anhang am 3' Ende wird aus dem Nucleus exportiert und im Cytoplasma translatiert. Bei Prokaryoten enthält die polycistronische mRNA mehrere offene Leserahmen (ORFs), oftmals slippery Sequences und sind als Operon zusammengefasst. Eine Aneinanderreihung von Ribosomen bildet ein Polysom. 90 % aller Start-Codons sind ATG, GTG (Valin) und TTG (Leucin) können vorkommen. Es wird aber jedesmal ein Methionin eingebaut.

### Der genetische Code

AGA	AGG	GCA	GCC	GCG	GCU	AGC	AGU	CCA	CCC	CCG	CCU	ACA	ACC	ACG	ACU	GUA	GUC	GUG	GUU	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	AAA	AAG	AUG	UUC	UUU	UAC	UAU	UAA	UAG	UGA
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	stop															
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V																

$4^3 = 64$  ergeben mögliche Kombinationen für 20 Aminosäuren, bei Punktmutationen kann es zum Einbau chemisch ähnlicher As kommen. Um eine konstante Translationsgeschwindigkeit von 20 As per min zu erreichen ist die dritte Base des Codons eine sogenannte wobble base. Die erste Position des Anticodon G erlaubt neben C eine U Basenpaarung. Doch nach G an der wobble Base am Codon erfolgt zwingend ein C am Anticodon. Der genetische Code wurde durch Marshall Nirenberg und Heinrich Matthai gelöst. Es war ihnen möglich poly-U/C/A mRNA zu synthetisieren, die Ribosomen zu isolieren und so eine in-vitro Translation durchzuführen. Jeweils nur eine As markierten sie radioaktiv. Phenylalanin war die erste gelöste As mittels einem poly-U tail. Mittels Filter gelang es Philip Leder interagierende tRNAs zurückzuhalten.



## tRNA

Prä-Poly-tRNAs werden transkribiert und werden mit der Endonuclease RNase E/III am 3' Ende, und mit der RNase P am 5' Ende geschnitten. Exonucleasen (RNase II, BN, D, PH, PNPase, T) prozessieren die RNA noch bis zum CCA 3' Ende.

Die Basen der tRNA sind modifiziert. Dies erhöht die Stabilität der tRNAs und die Erkennung von Proteinen, RNAs. Modifizierung am Anticodon

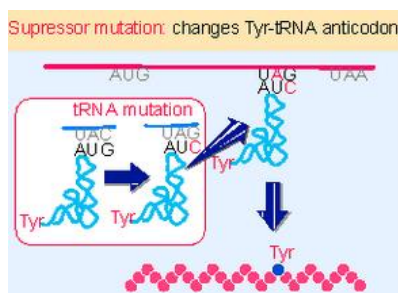
beeinflusst das wobbling und somit die tRNA Spezifität.

Die Beladung der tRNA mit As erfolgt durch Aminoacyl-tRNA Synthetasen. Jede Synthetase erkennt eine eigene tRNA. Die As + ATP bilden eine adenylierte As. Die AMP-linked Carboxylgruppe der As (Aminoacylierung) wird auf das 3' Hydroxyl-Ende der tRNA übertragen. AMP wird frei. Klasse I Synthetasen kommen meist in monomerer oder dimerer Form vor. Sie kontaktieren die tRNA an der minor groove des Akzeptor Stammes und am Anticodon. Klasse II Enzyme sind dimere oder multimere Proteine. Sie kontaktieren die tRNA an der Major Groove der Akzeptor Helix und am Anticodon Loop. GTPasen bringen sie zum Ribosom.

## Proofreading

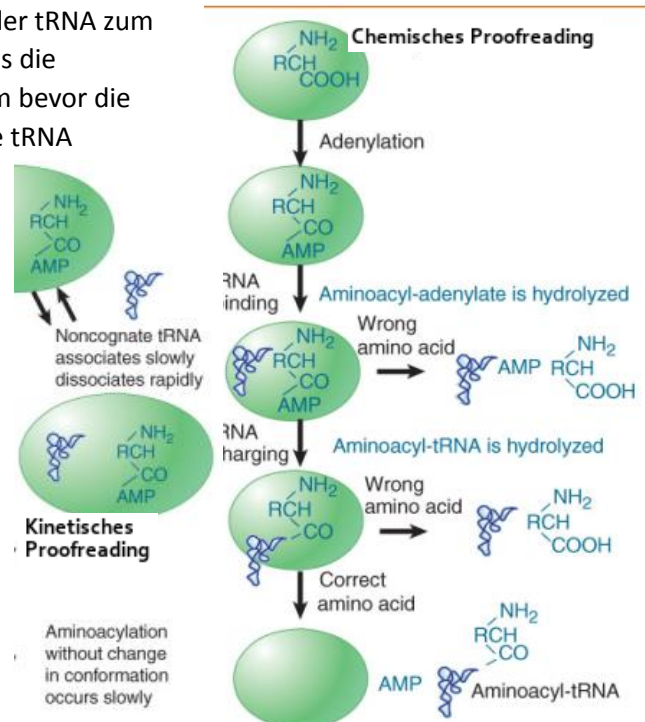
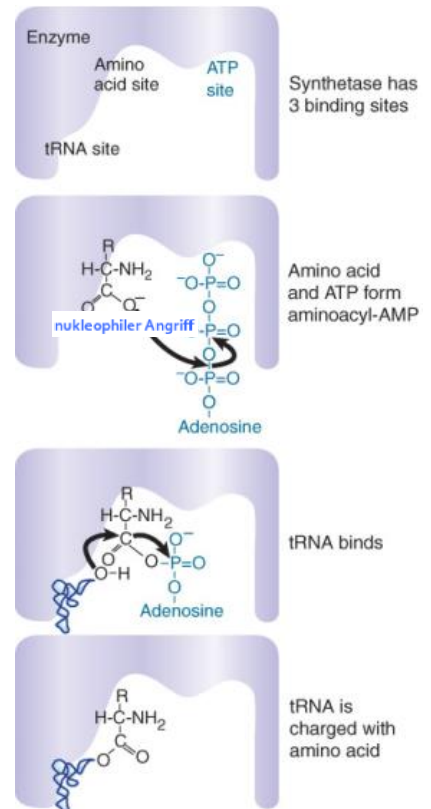
erfolgt entweder kinetisch, das bedeutet das die Affinität der tRNA zum korrekten Enzym höher ist, und die Assoziation schneller als die Dissoziation erfolgt. Das falsche Molekül verlässt das Enzym bevor die Reaktion stattfindet. Im ersten Schritt dissoziiert die falsche tRNA schneller, zweitens erfolgt die Aminoacylierung langsamer.

Beim chemischen Proofreading fand die Reaktion schon statt. Inkorrekte Aminoacyladenylate und Aminoacyl-tRNAs werden hydrolysiert.



## Die Suppressor tRNA

hat eine tRNA Mutation, die eine Nonsense Mutation (Stop-Codon) unterdrückt.



In einem Wildtyp wird das UUG-Codon von einer Leu-tRNA gelesen. Bei einer Mutation zu UAG, das normalerweise ein Stop-Codon darstellt, kann es dennoch von einer Suppressor tRNA gelesen werden, dessen Anticodon von AUG zu AUC verändert ist. Statt Leucin wird nun ein Tyrosin eingebaut. Dieser Mechanismus kann benutzt werden um eine As auszutauschen.

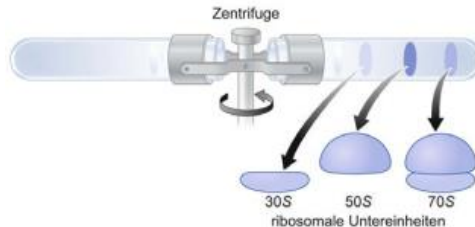
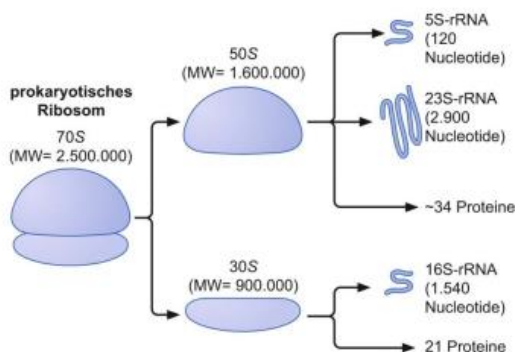
Das Codon wird in ein Stopp-Codon umgewandelt, dann eine Suppressor tRNA hinzugefügt. Das UGA Codon ist 'leaky' und wird in 1% - 3% der Fälle von einer Trp-tRNA gelesen.

## Das Ribosom

umfasst etwa eine Größe von 200 Å. Neben den beiden Untereinheiten besteht es aus rRNAs die die Struktur vorgeben und Proteinen die sich an der Oberfläche des Ribosoms befinden. Das Ribosom gilt für Antibiotika (Streptomycin, Paromomycin binden an die 30S Ue) als Hauptangriffsziel. Im Labor werden sie eingesetzt um Ribosomen nach einer bestimmten Zeit anzuhalten.

Die aminoacylierte tRNA betritt zuerst die A Seite, an der Peptidylseite hängt die wachsende Peptidkette und an der Exitseite verlassen leere tRNAs das Ribosom.

### Prokaryotes



In der Zentrifuge lassen sich mit einem Saccharosegradienten die Untereinheiten in Svedberg-Einheiten messen.

Mit einem Photometer lässt sich die rRNA Konzentration feststellen um auf die Ribosomenanzahl zu kommen. Pro *e. coli* Zelle befinden sich etwa 20.000 rRNA Kopien je Typ.

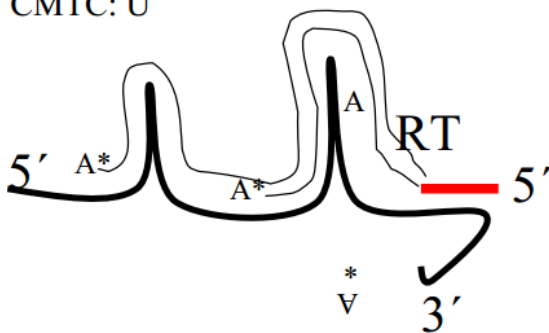
Die 16S rRNA enthält am 3' Ende die anti-Shine-Dalgarno Sequence (aSD). Sie interagiert direkt mit der mRNA, der 23S rRNA (50S Ue), und dem Anticodon der tRNA an der P/A Seite.



Kethoxal : G

DMS: A

CMTC: U



### Chemical Probing

Die Sekundärstruktur der 16S rRNA ließ sich mit dieser Methode erstmals darstellen. Die rRNA wird dabei stochastisch so chemisch modifiziert – Kethoxal für G, DMS für A, CMTC für U, ebenso RNasen, dass jeder Probe jeweils eine Chemikalie mit steigender Menge hinzugefügt wird. Die Modifikationen erfolgen nur an Single-Strand Bereichen. RNase V1 degradiert double-stranded RNA. Ein radioaktiv markierter Primer und Nukleotide werden hinzugegeben. Die reverse Transkriptase bricht bei jeder chemisch modifizierten Base ab, somit entstehen cDNA Fragmente unterschiedlicher Länge. Am Gel

läßt sich durch Lücken auf Sekundärstrukturen schließen.

rRNAs sind für die enzymatische Aktivität und die Interaktion zwischen Ue verantwortlich. Die beiden Proteine S1 und S21 sind ebenso bei der Ribosomenbindung aktiv. S21 befindet sich in der Nähe der SD und aSD Helix, und stimuliert so im Pocket eine gute Bindung des Ribosoms.

### Protection-Assay Footprint

Um die Ribosomenbindestelle zu finden wurde zu den Reagenzien 30S Ue, mRNA, jeweils eine Probe einmal ohne und mit tRNA, Nuclease hinzugefügt. Alle ungeschützten Stellen werden verdaut. Am Gel erkennt man so die isolierte geschützte Region. An allen mRNA wiederholen sich jeweils 2 gleichbleibende Konsensussequenzen. Die AUG Startregion inmitten des geschützten Fragments und 10 Basen upstream davon die SD Sequenz.



### Beweis der SD - aSD Interaktion – J.1987

Einer E. coli Kontrollgruppe wurde ein Plasmid mit dem human growth Hormon transfiziert bei dem die SD gegen die aSD Sequenz ausgetauscht wurde. Nach Zugabe von Spectinomycin wird jegliche 16S rRNA inhibiert. Für den Versuch kam zusätzlich zum hGH Reporter gen noch ein resistentes 16S rRNA Gen mit der SD Sequenz. Das mutierte Ribosom war funktionsfähig und konnte nun hGH translatieren.

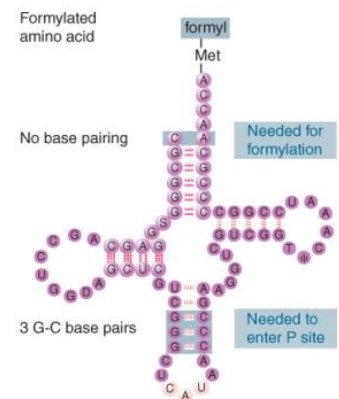
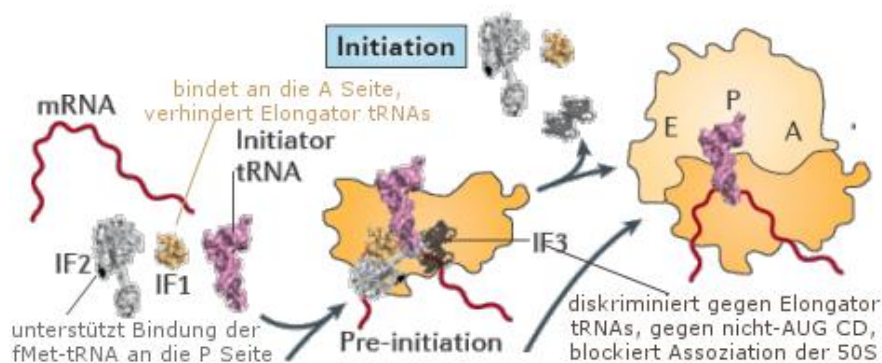
Ein weiterer Footprint kann mit Kethoxal, DMS, CMTC (Chemical Probing) durchgeführt werden.

### Initiation der Translation in Prokaryoten

benötigt nur die 30S UH, die Initiationsfaktoren 3, 1, 2 und die Initiator tRNA.

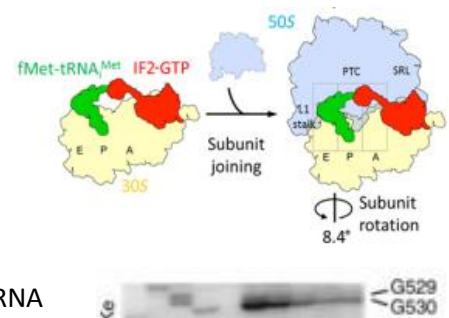
Nachdem die IF1,3 frei werden, assembliert die 50S UH. Der tRNA wird nach der Bindung mit Methionin durch die Methionyl-tRNA Formyltransferase ein Formylrest angehängt und somit die Aminogruppe blockiert.

Der N-Formyl-Methionyl-tRNA wird oft das Methionin während der Proteinsynthese abgespalten.



IF1 bindet an der A Seite und verhindert somit ein Docking von Elongator-tRNAs. Nebenbei festigt es IF2,3 und verstärkt deren Aktivität.

In Prokaryoten sitzt IF2 (GTPase bindet tRNA am C-terminal) an der A Seite und unterstützt die Bindung der tRNA<sup>MET</sup> an die P Seite und die Bindung der 50S Ue. Nach Hydrolyse und folgender 30S Rotation wird die SD – aSD Helix gefestigt und IF2 kommt frei.



Chemical Probing wurde am Ribosom mit steigender IF1 Konzentration durchgeführt und dabei ein ähnliches Muster erhalten wie mit steigender tRNA Konzentration, somit konnte man auf die A Bindungsseite (530er Loop) schließen.

IF3 diskriminiert gegen Elongator tRNAs und gegen nicht-AUG Startcodons (proofreads C-AC) durch Conformational-Dynamics. Nebenbei blockiert es die Assoziation der 50S Ue.

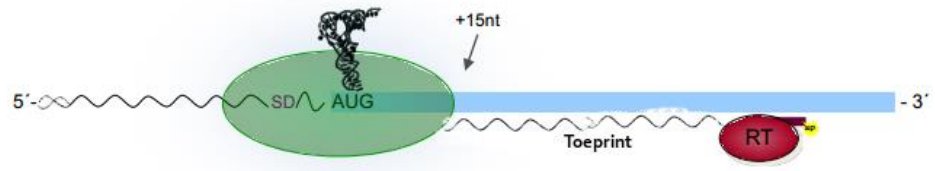
Die IF3-mRNA (infC-Gen) selbst hat AUU als Startcodon, steht also unter negativer Autoregulation.

Mit einem Reporterassay wird das infC Gen (rpo Protein bindet 16S rRNA) mit lacZ fusioniert. Wird beim Mutant19 AUU gegen /AUG ausgetauscht steigt die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität von 11 auf 322 Miller units bzw. erhält einen Derepression-Index von 23 während die Mutant19/AUG Aktivität nahezu gleichbleibend ist. Tests mit verschiedenen Initiationcodons ergaben, dass IF3 gegen alle Codons außer AUG diskriminiert.



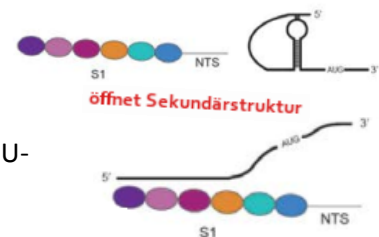
## Primer Extension Inhibition Assay – Toeprinting

Dafür benötigt man eine RT, 30S Ue, Nt und einen radioaktiv markiertem Primer. Eine cDNA wird hergestellt, da das Ribosom beim Startcodon bindet erhalten wir ein Toeprintsignal +15 Basen downstream von AUG. Am Gel läßt sich durch die Stärke der Toeprintbande im Vergleich zum Extension Signal (gesamte Länge) auf die Bindungsstärke an die mRNA schließen. Toeprinting wurde das erste Mal mit verschiedenen tRNAs gemacht und so der Spielraum +/- vom AUG des Ribosoms erkannt. Ein weiterer Toeprinting Assay mit zusätzlich IF3 ergab eine spezifische Selektion für AUG.



## S1

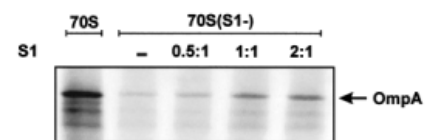
Das ribosomale Protein S1 ist essentiell in E. coli und ist nur schwach an das Ribosom durch Protein-Protein Interaktionen gebunden. Es ist für die kanonische Ribosomenbindestelle erforderlich, dort interagiert es mit einer U-reichen Sequenz upstream der SD Sequenz.



## Affinitätschromatographie

Zuerst werden verschiedene markierte mRNA Sequenzen mit der 30S Ue mithilfe UV gecrosslinked. Darauf folgend werden die Ue mit SDS/Lithiumchlorid gefällt. Der übrig gebliebene S1-mRNA Komplex wird mit einem Sucrosegradient isoliert. Gegen S1 wird ein an der Säule gebundener Ak eingesetzt, danach mit RNase die freie RNA verdaut. Nach der Markierung durch die  $\gamma$ -ATP Kinase wird mit UREA die U-reiche mRNA vom Protein gelöst um sie zu sequenzieren.

Eine in vitro Analyse zeigt, dass mit steigender S1 Konzentration die kanonische OmpA mRNA ansteigt. Dieser Effekt kann an der leaderless CI mRNA nicht beobachtet werden. Mit einem Toeprint Assay kann der ideale Abstand (SD6) zwischen SD und der AUG Sequenz festgestellt werden.



## Regulation der Translation durch RNA Sekundärstruktur

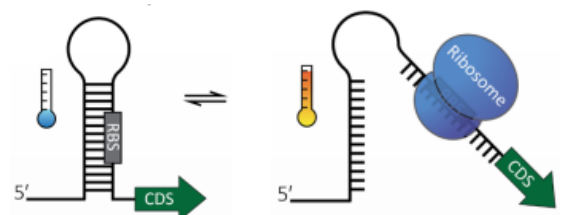
Am T4 Phagen wird die Translation des Gens zur Lyse von Zellen blockiert, da AUG in einer Sekundärstruktur liegt. Der späte Promoter transkribiert eine kürzere mRNA, die translatiert werden kann.

### Breathing

Sekundärstrukturen 'breathe', sie öffnen und schließen sich wieder. Beim  $\lambda$  Phage beeinflusst die Ratio von S105 (ein Holin) und S107 (Inhibitor mit einer 2 As-Verlängerung) den richtigen Zeitpunkt für die Zelllyse.

### Thermosensor

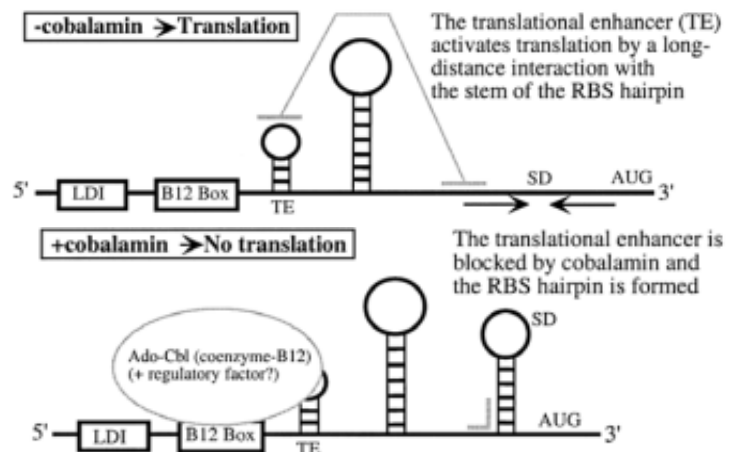
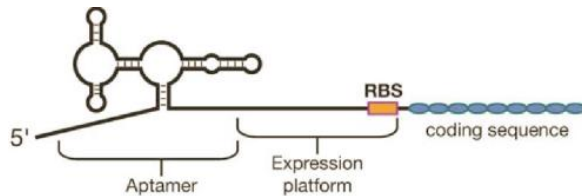
Beim Pathogen *Listeria Monocytogenes* (Lebensmittelvergiftung) öffnet sich die SD Sequenz der Sekundärstruktur erst bei 37 °C für das Protein prf A. Das ist ein sogenannter Zipper-Mechanismus.



Switches erlauben unter Ausbildung eines Pseudoknoten eine Proteintranslation (cspA) bei niedrigen Temperaturen. Eine andere Sekundärstruktur bildet die ROSE Familie (repressor of heat-shock gene expression) vieler Gram-Negativer Bakterien.

- *Riboswitches*

Vitamine, As und Purin führen zu einer Abschwächung der Proteintranslation durch Ausformung eines Stemloops an der SD Sequenz, der so die Translation blockiert.



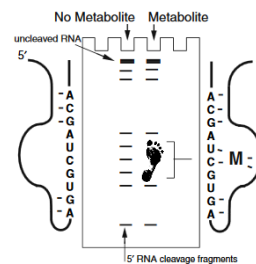
Die Bindungsdomäne (Aptamer) zeichnet sich durch eine hohe Affinität, Spezifität aus und ist hoch konserviert. Durch Conformational Change kommt es bei Ligandenbindung zur veränderter Genexpression.

Bei einer *transkriptionellen Kontrolle* formt der aktive Riboswitch ein Terminator-Stem {Term.(L) – Term.(R)}. Eine translatorische Kontrolle wird durch ein Anti-RBS stem (Anti-RBS/RBS) geformt.

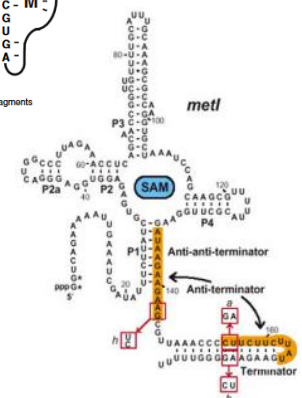


### In-Line Probing

Einzelsträngige RNA degradiert wesentlich schneller. Die mRNA wird radioaktiv markiert und nach einer gewissen Degradationszeit wird jeweils eine Probe einmal mit und einmal ohne Ligand aufs Gel aufgetragen. Mit Ligand wird die mRNA geschützt, das zeigt sich als Footprint am Gel.



SAM (S-Adenosyl-Methionin) ist am Schwefel Stoffwechsel und an der Methioninsynthese aktiv. SAM bindet bei gramnegativen Bakterien einen Repressor, dieser Komplex bindet an die Metbox der DNA und blockiert so die RNA-Polymerase. In grampositiven Bakterien bindet SAM an die mRNA und es kommt zur Ausbildung eines Terminator stem, der sich jetzt an der poly-U rut Sequenz befindet. Der schräge Hairpin dieser rho-unabhängigen Termination bricht so die RNA Transkription ab. In vitro konnte eine verstärkter Terminator-Bande durch SAM Zugabe angezeigt werden.



Thiamine Pyrophosphat (TTP =Coccarboxylase) fungiert im Kohlenstoffwechsel als Coenzym.

*Translatorisch Kontrolle:* In e. coli (gram -) führt TPP zu einer Sekundärstruktur am 5' Ende (UTR) welche die SD Sequenz verdeckt.

*Transkriptionelle Kontrolle:* In B. subtilis (gram +) führt die Bindung von TPP zu einem Terminator stem.

*Splicing Control:* Im roten Schimmelpilz führt die Bindung im Intron zu dessen Splicing.

*Processing/ Stabilitätskontrolle:* Im wilden Blaugras bindet TPP zur Stabilität nah am PolyA-Anhang.

### Translationale Repressoren und Aktivatoren

Das P32 Protein ist autoreguliert und bindet am 5' Pseudoknoten seiner eigenen mRNA. Bindet ein P32 können weitere P32 binden bis die SD Seq. überdeckt ist.



## Stringente Kontrolle als Antwort auf Nährstoffmangel – Guanidin Tetraphosphatzyklus (RelA-pppGpp)

Kommt es zu einem Mangel an Aminosäuren bleibt das Ribosom mit einer leeren A Seite stehen. Die Guanidintetraphosphatsynthetase (RelA) dockt mit hoher Affinität an die A Seite und hydrolysiert dort GTP+ATP zum Alarmon pppGpp. Das Alarmon bindet an die aktive Seite der RNA-Pol und diskriminiert dort gegen den  $\sigma^{70}$  Promoter. Folglich wird die Ribosomen- als auch die tRNA Synthese heruntergeschaltet. Die As-Synthese wird dafür erhöht. Daneben aktiviert es die rpoS ( $\sigma^S$ ) Transkription und darauf folgend Gene für die Glykolyse, Stressantwort. Bei C-Mangel erzeugt SpoT (Synthetase, Hydrolase für die Autoregulation) als Stressantwort ebenso pppGpp.

## Feedback Loops – Autoregulation der Translation

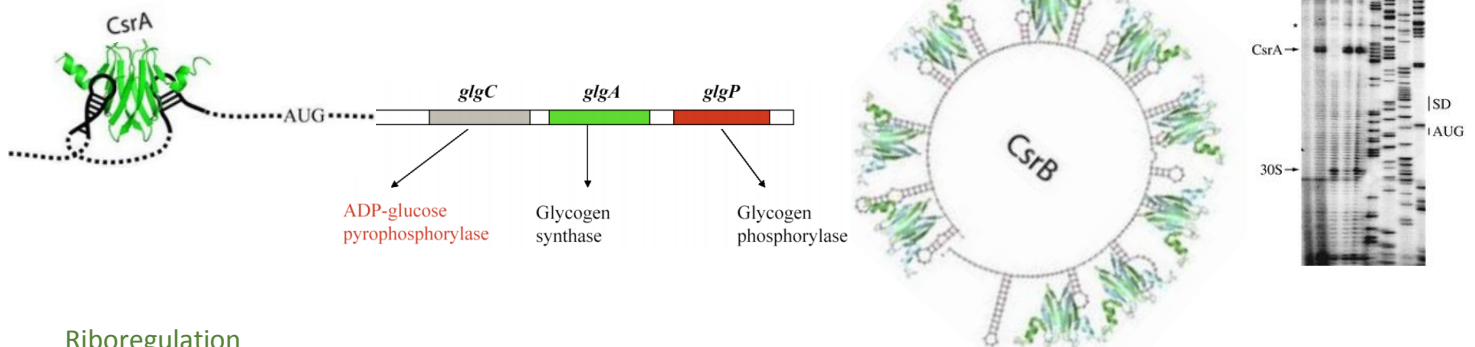
- Gene von ribosomalen Proteinen (mit Genen von nicht-ribos. Proteinen) sind in Operons organisiert.
- In jedem Operon gibt es ein Gen, dessen Protein an der eigenen rRNA als Regulator (< Affinität) wirkt.
- S15 bindet an einen Pseudoknoten der eigenen mRNA an dem sich das G des Startcodons befindet, dadurch kann keine Codon-Anticodon Interaktion stattfinden. Wenn gewollt kann ein Toeprint Assay durchgeführt werden. Feedback Lane wird am Gel oberhalb vom Tertiär Komplex liegen.

## Threonin-tRNA Synthetase

wird autoreguliert indem die Synthetase an die Domain 2 (mit SD Seq.) der eigenen mRNA bindet. Das Ribosom wird an der mRNA 'entrapped' wie bei S15.

## Das glgCAP-Operon

Ist zu wenig Glycogen vorhanden, bindet der Carbon Storage Regulator A (CsrA) als Repressor am 5'utr und bindet Stemloop 1 und 2 (SD) der glgC Operon-mRNA. Bei Zuckeraufnahme bindet sofort die ncRNA-CsrB mehrere CsrA Proteine, sodass das Ribosom binden kann. Die Endoribonuklease CsrD führt wiederum zur CsrB Degradation. Mit einer glgC-GFP Reporterfusionierung weist man verschiedene Level der glg Proteinsynthese nach bei unterschiedlicher Zugabe von CsrA,B,D. Zur Positionsbestimmung machen Sie einen Toeprint-Assay.



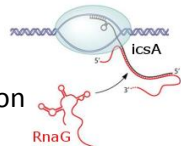
## Riboregulation

### Antisense-RNA Regulation und RNA Interference

Die Cis-Antisense RNA wird vom Gegenstrang desselben genetischen Loci transkribiert und bilden so perfekte Duplexe. Sie kontrollieren Plasmid-, Transposon- und Phagengene.

Phage  $\lambda$  transkribiert eine Cis-Anti *cro* und eine *ci* mRNA vom  $P_{RE}$  Promoter, dessen Protein den lysogenen Zyklus aufrechterhält. Das Protein *ci* aktiviert den  $P_{RM}$  Promoter für mehr *ci* mRNA. Durch das Protein *Cro* kommt es zur Lyse. Gute E. coli Bedingungen führen zu einem Anstieg an Proteasen die CII degradieren. CII reguliert den  $P_{RE}$  Promoter.

Die Anzahl des E. coli Plasmids ColE1 wird durch RNAII und RNAI reguliert. Für die Replikation bindet RNAII als Primer am Replikationsstart. Sind genug Plasmide in E. coli vorhanden kommt es zum RNAI/II Pairing.

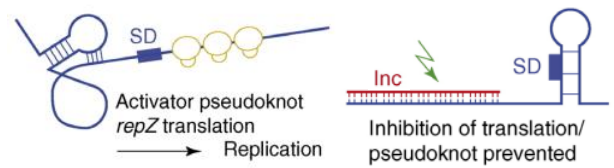


## Transkriptionale Attenuation

- RnaG bildet die asRNA von icsA. Bei Paarung kommt es zum Abbruch der Transkription des Virulenzgens icsA.

## Verhinderung eines Pseudoknoten am IncIα Plasmid

- repZ mRNA benötigt die Ausbildung eines Pseudoknoten für die Translation, die asRNA Inc verhindert dies.



## Post-Segregational Zelltod durch das hok/sok System des E. coli Plasmids R1

- Hok führt zum Zelltod. Die Cis-Antisense sok RNA geht eine Basenpaarung mit der mok RNA ein, dessen reading frame hok überlappt (Translational Coupling). Hok hat eine längere Halbwertszeit, bleibt bei Vererbung also länger aktiv.

Trans-Antisense RNA werden an einem anderen Locus kodiert und bilden so nicht perfekte Duplexe, benötigen aber ein Chaperon Hfq für die Interaktion. Sie werden als Reaktion auf Umweltstreß gebildet und können mehrere Ziele haben.

Hfq ist ein hitzestabiles (erleichtert Reinigung), Sm-artiges Hexamer in Krapfenringform. Es wurde im Phagen Q $\beta$  entdeckt. Es induziert durch Conformational Change mit der proximalen (bindet poly U Seq) und distalen Seite sRNAs und mRNA Interaktionen. Hfq spielt ebenso als Virulenzfaktor eine Rolle.

Nach der Entfernung des Pyrophosphats durch die RNA 5' Pyrophosphohydrolase (RppH) erkennt die Endonuklease RNase E (Bestandteil des Degradosoms) das 5' Monophosphat der 5' utr bindet und spaltet dort die (A)U reiche Sequenz. Die Tetramer RNase E und Hfq binden also zum selben Motiv. Die katalytische Domäne befindet sich am N-Terminal und ist allein ausreichend für eine in vitro Degradation der mRNA. Das C-Terminal bindet verschiedene Proteine. Mg<sup>2+</sup> agiert als Cofaktor, zur Inaktivierung wird EDTA eingesetzt.

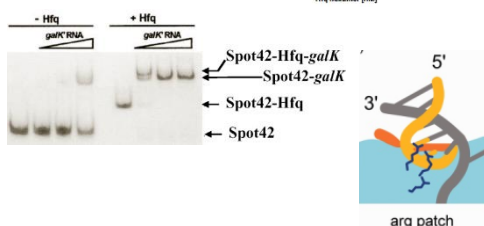
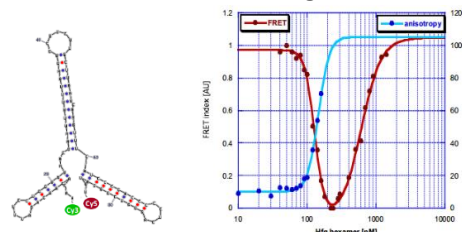
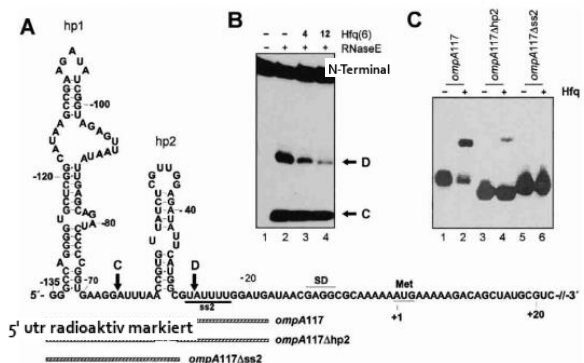
## [B] mRNA Schutz durch Hfq an einem Nativ-Gel

RNaseE schneidet die 5' utr an den Stellen C und D. Bei Zugabe von Hfq in steigender Menge wird sichtbar das Hfq vor allem die Stelle D schützt. Es handelt sich hier um einen

## Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) – Retention Assay

[C] Verschiedene Outer Membrane Protein A (ompA) mRNAs versuchte man mit Hfq zu binden. An der lane 6 ist ersichtlich, dass ohne ss2 es Hfq nicht möglich ist zu binden.

Wie gut Hfq die DsrA-ncRNA vor der RNase E schützt, wurde ebenfalls mit EMSA nachgewiesen.



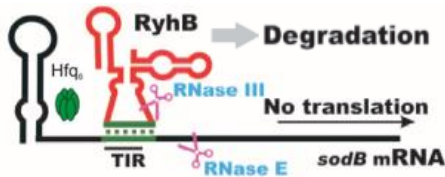
## Wirkungsweise als Chaperon - Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Die Auftrennung der DsrA-ncRNA bei Zugabe von Hfq wurde bei einer Änderung der Fluoreszenz mithilfe von Cytochromen beobachtet. Eine nochmalige Beobachtung der 670nm erklärt sich durch die Dodekamerbildung 2er Hfq Proteine.

Am native Gel wird sichtbar, dass nur bei hohen Spot42, galK Konzentrationen Annealing stattfindet. Geringe Hfq Konzentrationen reichen für eine Spot42-galK RNA Interaktion. Arginine an der lateralen Seite leiten durch die positive Ladung die mRNA-sRNA Bindung (distal Face – proximal Face) ein.

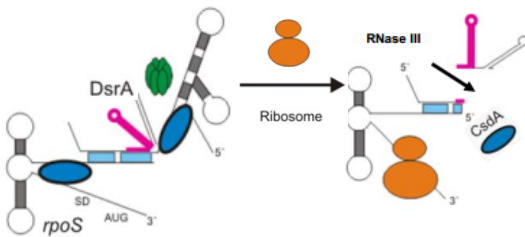


Translationales Silencing durch RyhB-sRNA mit folgender mRNA Degradation durch RNase III und dem Degradosom

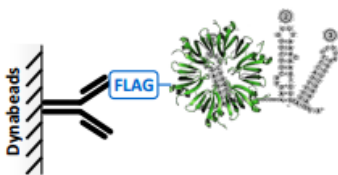


- Damit es zu keiner toxischen Fe-Oxidation (Fenton-Reaktion) kommt, ist die Transkription der RyhB mRNA unter direkter Kontrolle vom Ferric uptake Regulator (Fur). Bei Bindung von  $Fe^{2+}$  dimerisiert Fur, bindet am Promoter und blockiert so die RNA Polymerase. RyhB geht mithilfe Hfq eine Basenpaarung mit sodB an der TIR Sequenz ein und blockiert so die Translation der eisenhaltigen Superoxid Dismutase.

Translationale Aktivierung durch die DsrA-mRNA



- rpoS ist eine mRNA für den  $\sigma^S$ , der dauerhaft von der RNA Polymerase transkribiert wird. Unter Kältestress wird für die Auflösung der Basenpaarung zusätzlich zur DsrA mRNA, die Cold-Shock-Domain-Helikase CsdA benötigt, die am hp2 von DsrA und wenige Basen hinter der SD Sequenz von der rpoS mRNA bindet. Darauf schneidet RNase III den Ds, die Stemloops von DsrA werden entfernt, sodass die Ribosomen binden.



#### Co-Immunoprecipitation – RIP Seq

wird eingesetzt um sRNAs in Bakterien zu identifizieren. Der Vorteil eines FLAG-Tags gegen Hfq mit einem Ab gegen Hfq liegt darin, dass dadurch die Bindungsstelle der sRNA nicht blockiert wird. Enteropeptidasen schneiden am Lysin der hydrophilen FLAG-Kette. Nach der Aufreinigung erfolgt die RT-PCR, die

an der Illumina Sequenzierung gekoppelt ist. Aus der Emissionswellenlänge und der Intensität des Signals errechnet sich die korrekte Base (sequencing by synthesis). Um unspezifische sRNAs auszuschließen, arbeiten Sie zu Beginn zusätzlich mit einer Mock-Kontrollgruppe bei der die Transfektion mit einem leeren Plasmid erfolgt.



InvR cDNA ist nur in der Hfq coIP Gruppe auffindbar, es handelt sich also um die spezifische sRNA, im Gegensatz zur häufig vorkommenden 6S RNA. Die

Schwierigkeit liegt darin die Ziel-mRNAs zu finden. Als Bioinformatiker berechnen Sie die Affinität zu anderen mRNAs mit der dazugehörigen 'error rate'.



Bei der CLIP Seq (Cross-Linking Immunoprecipitation high-Throughput Sequencing) wird die mRNA mit Proteinen mittels UV-Bestrahlung in vivo ligiert. Hfq wirkt als Chaperon für die sRNA. Weiterer Einsatz von Ribonukleasen.

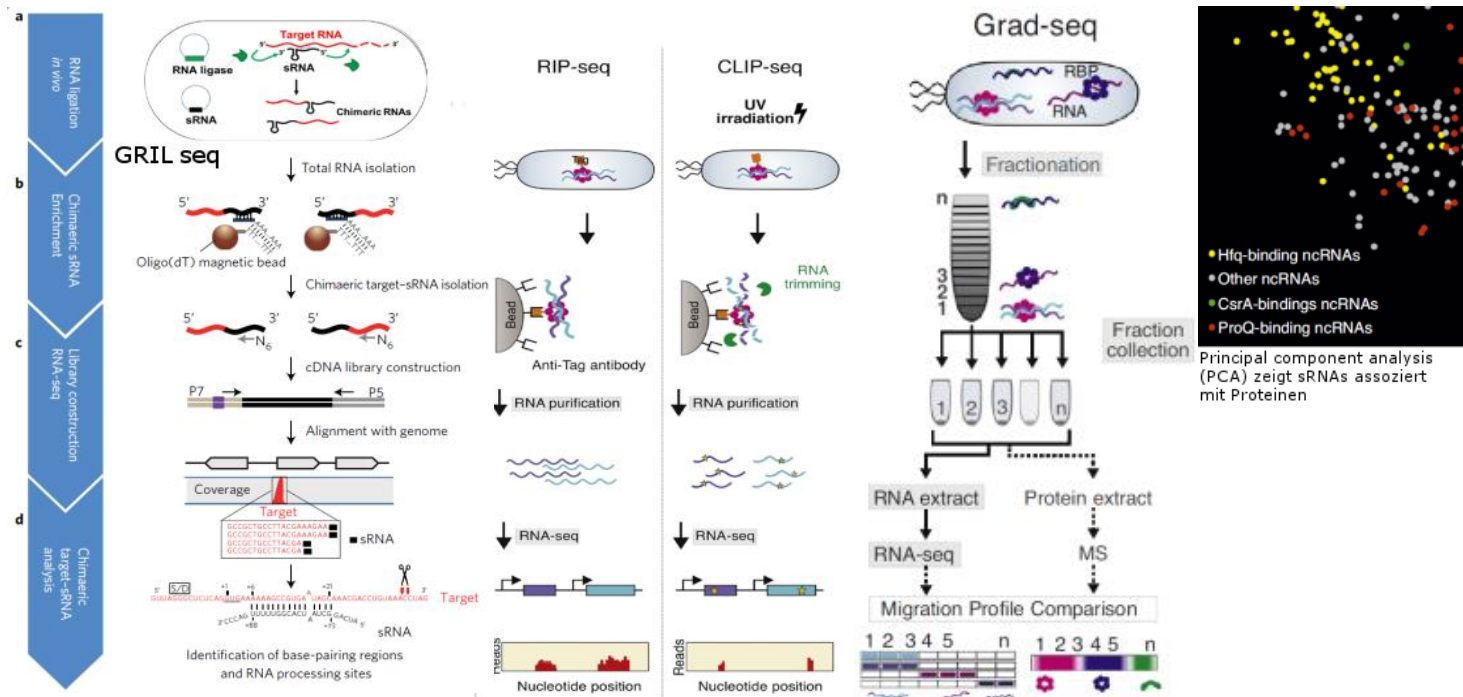
Bei der Pulse Expression lassen Sie die sRNA für 5 min überexpressieren, entnehmen eine Probe für eine Transkriptom- oder Proteomanalyse, um rückzuschließen welche RNAs oder Proteine in der Menge zu- oder abnehmen.

#### Die In vivo: Gril-Sequenzierung (Global sRNA Target Identification by Ligation and Sequencing)

gilt bereits als ein easy-to-use Tool. Sie führen eine Transfektion mit 2 miteinander kompatiblen Expressionsplasmiden durch. Einer überexpressiert die T4 RNA Ligase (t4rnl1), der andere ihre sRNA (mit bestimmten Linker- oder poly A Sequenz). Gewöhnlich wird die Transkription der Ligase durch IPTG induziert und 1h laufen gelassen. Anschließend folgt eine Induzierung ihrer sRNA mit bsw. L-Arabinose für 20min. Nun geht ihre gewünschte sRNA möglicherweise Bindungen mit verschiedenen mRNAs ein. Diese Ligase wird basengepaarte Duplexe an ihren 3' und 5' Enden ligieren. Das ist deshalb möglich, da in vivo im normalen Transkriptionsprozess RppH aktiv ist! Dadurch erhalten sie eine sRNA/mRNA Chimäre. Es folgt eine Isolierung der RNA mit Oligo(dT) beads mit anschließender RT-PCR (mit 2ter polyA Ligation) und Illumina-Sequenzierung.

## GRAD-Seq gilt für größere Assemblierungen

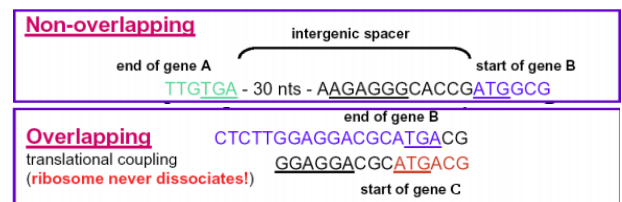
Nach der Basenpaarung der sRNA mit der mRNA findet die Fraktionierung in einem Saccharose Dichtegradienten statt. Bruchstücke werden nach Größe, je größer desto weiter unten, in verschiedenen Eppis gesammelt. Es erfolgt eine RNA-seq mit einer MS und vergleicht die Migration der Proteine mit deren RNAs.



## Translationelle Kopplung

kann mit oder ohne Überlappung der Gene stattfinden. Solange der Spacer keine 30-40nt übersteigt, ist keine Dissoziation des Ribosoms nötig. Bei der Überlappung beträgt das Coupling des Ribosoms 2nt.

Ein Fall von positiver Kopplung tritt beim Phagen MS2 auf. Erst nach Translatierung des Coat-Protein Gens geht eine Sekundärstruktur für ein anderes Ribosom auf die sonst die Startsequenz des Replikase-Protein-Gens verdeckt.

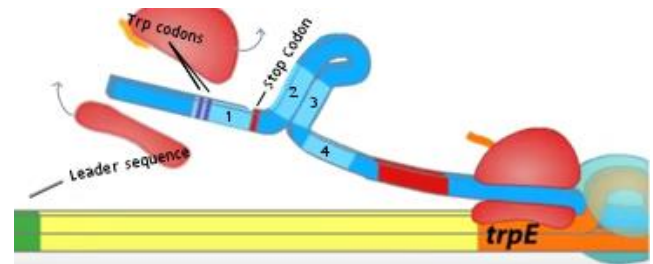


## Translationelle Attenuation

SecA ist eine ATPase von E. coli und unterstützt den Proteintransport durch den SecYEG-Kanal. Ist ausreichend SecA vorhanden wird andauernd SecM translatiert und mithilfe SecA durch den SecYEG-Kanal ins Periplasma transportiert wo es degradiert. Solange seine Translation stattfindet bildet sich eine Sekundärstruktur downstream davon, die die RBS von SecA blockiert. Ausgelöst durch Antibiotika, d.h. wenn zu wenig SecA vorhanden ist, bleibt das Ribosom inmitten der Peptidtranslation stehen. Dadurch öffnet sich die Sekundärstruktur und die RBS wird frei. Dieser angehaltene Arrest bleibt so lange aufrecht bis genug SecA zur Verfügung steht um die Antibiotika aus der inneren Membran hinaus zu befördern.

## Transkriptionelle Attenuation

Enzyme die für die Synthese von As verantwortlich sind, werden durch ein Stoppen der Translation gesteuert und dadurch das deren Operon upstream eine kleine Leader-Sequenz aufweist. Sie weist vermehrt jene Codons für diejenigen As auf, deren As das Enzym auch synthetisiert. Ist zb. Genug Tryptophan vorhanden, stoppt das Ribosom am Stop Codon, ein Transcription-Termination Loop bildet sich (Region 3 und 4). Es handelt sich um eine rho-unabhängige Transkription. Die RNA Polymerase bricht die Transkription ab. Bei zu wenig Tryptophan verlangsamt sich deren Einbau, es formt sich ein Anti-Terminations Loop (Region 2 und 3), das Ribosom stoppt in diesem Fall schon an den Trp Codons. Ein anderes Ribosom bindet nun an die *trpE* Sequenz. Es werden nun die nötigen Enzyme translatiert.

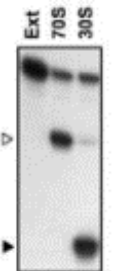


## Leaderless mRNAs

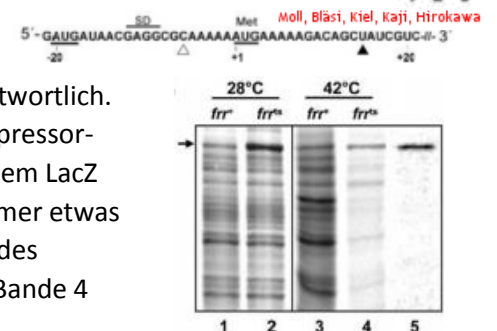
Diese starten mit dem AUG Codon. Ihnen fehlt die 5' utr. Es zeigt das allein die AUG Sequenz und die Codon-Anticodon Interaktion nötig ist. Unser Labormodell ist die leaderless mRNA CI des Repressors vom Phagen  $\lambda$ . Verschiedensten Organismen, Eukaryoten eingeschlossen, ist es möglich diese hoch konservierte mRNA zu translatieren. In menschlichen Mitochondrien sind ausnahmslos leaderless mRNAs. Für die Initiation benötigt es den tRNA Shuttle IF2. Sie steigert die Effizienz der Translation. Da IF3 die Affinität zur tRNA abschwächt, inhibiert sie die Ribosomenaktivität.

**Toeprint-Assay:** Die Wichtigkeit der Codon-Anticodon Sequenz legt nahe, dass allein ein 70S Monosom für die Bindung ausreicht. Die tRNA bindet schließlich ebenso an die 50S Ue. Der Beweis gelingt mit einer mRNA, die eine Leaderless und eine kanonische Startsequenz aufweist. Da  $Mg^{2+}$  für die Assoziation der Ue wichtig ist (bei nur 0.6 Å Radius folgt eine hohe Ladungsdichte), vereinfacht das die Reinigung. Ein chemisches Crosslinking der Amine der As-Sk ist ausreichend (Dimethyl-Suberimidat). Setzen Sie 1mM  $Mg^{2+}$  ein bleibt das Protein intakt, ihre unvernetzten Proteine dissoziieren! Wir erkennen hier ein schönes Toeprintsignal des Monosoms an der 5' AUG Bindung. Die kanonische Startsequenz wird wie erwartet von der 30S Ue bevorzugt.

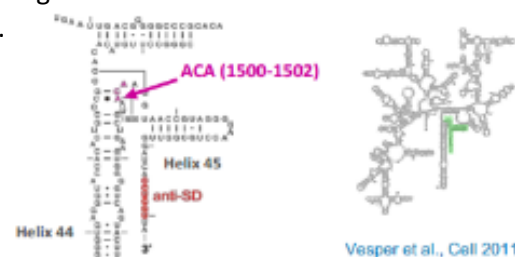
ompAΔ117



In vivo ist der Ribosomen-Recycling Faktor für die Dissoziation der Ue verantwortlich. Mit einer thermosensitiven Mutante gelingt es diesen RRF mithilfe einer Repressor-Translation bei 42°C zu inaktivieren. Zusätzlich wird die CI-DNA noch mit einem LacZ Reporter gen fusioniert. Banden zu interpretieren ist bei in-vivo Kulturen immer etwas schwerer. Man hilft sich indem man die prozentuale Verteilung der Ue und des Monosoms bei der Reinigung mit einem Saccharose Gradienten bestimmt. Bande 4 zeigt, dass bei 42°C fast ausschließlich die CI-LacZ (Pfeil) zu sehen ist.

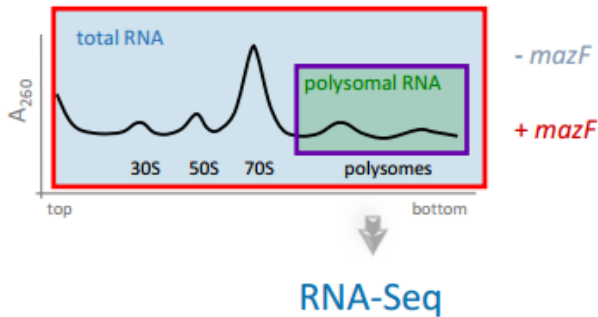


Ganze drei mRNAs sind bekannt die schon leaderless transkribiert werden. Alle anderen entstehen dadurch, dass die stressinduzierte Endoribonuklease MazF die in der Initationsregion und in der am 3' Ende der 16S rRNA vorkommende ACA Sequenz spaltet. Die Anti-SD Sequenz wird entfernt. Das MazEF Modul ist Teil eines Toxin-Antitoxin Systems. Unter Stress ist die Translation dieser Gene ungleich verteilt. Das Antitoxin kommt nun ungebunden von MazF vor und wird von Proteasen degradiert.



## Moll Poly-Seq in vivo – Welche mRNAs werden zu lmrnAs prozessiert?

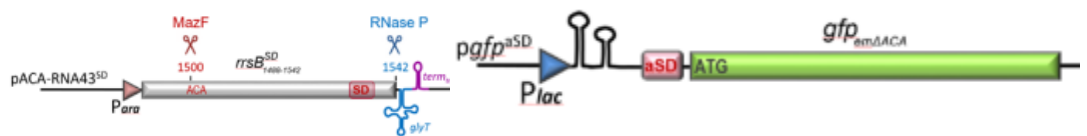
Bei der Poly-Seq handelt es sich um eine Fraktionierung der Polysomen gekoppelt mit einer RNA-Seq Analyse. Eine Überexpression von MazF wird mit IPTG induziert. Die Zellkulturen werden entnommen und nach einem bestimmten Zeitabstand folgt ein Saccharose Gradient um die prozentuale Verteilung der Ribosomeneinheiten zu bestimmen. Die gesamte mRNA wird jeweils für ein Transkriptom sowie Translatom extrahiert. DNase I setzt man immer ein um DNA Reste zu entfernen. Ebenso verfährt man mit der Kontrollgruppe. Für die polysomale wie die gesamte 16S rRNA wird eine PCR durchgeführt. Das Verhältnis der Ribosomen mit geschnittener zu intakter 16S rRNA lässt sich hochrechnen, da es möglich ist verschiedene Primer upstream oder downstream der



MazF Cleavage-Site zu verwenden. Die MazF Ziel-mRNA ist isoliert und ein Primer davon kann für einen Toeprint Assay eingesetzt werden.

Führen Sie eine PCR für diese mRNA mit dem Transkriptom und dem Polysom mit beiden Primern (für 5' utr und lmrnA) durch kommen Sie auf die jeweilige Menge. Um nun auf alle mRNAs zu kommen an denen MazF wirkt, wird eine cDNA Bibliothek hergestellt und geschaut bei welchen mRNAs eine Mengenverschiebung eintritt.

Der Arbeitsgruppe gelang es eine RtcB Ligase nachzuweisen, die der 16S<sup>AC\*</sup> eine Anti-SD Sequenz wieder anlegt. Ein Plasmid mit dem 16S Gen wird eingeführt, bei der die anti-SD gegen die SD Sequenz vertauscht wird. Das fehlende Stück mit der Anti-SD Sequenz wird mit einem gfp Reportergen fusioniert. Die Schwierigkeit eines in vivo Nachweises lag am 3' Ende. Zur Sicherheit verschob man die 16S<sub>SD</sub> Basen ein wenig upstream, gefolgt von einer tRNA Sequenz am 3' Ende mit einem intrinsischem Terminator Stem-Loop. Die RNase P wird am 5' Ende der tRNA schneiden. Die Kontrollgruppe hat die 16S rRNA ohne ACA Sequenz.

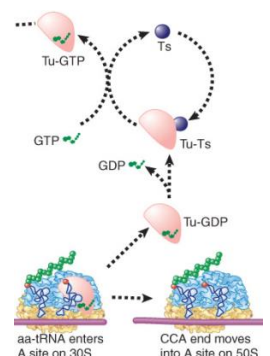
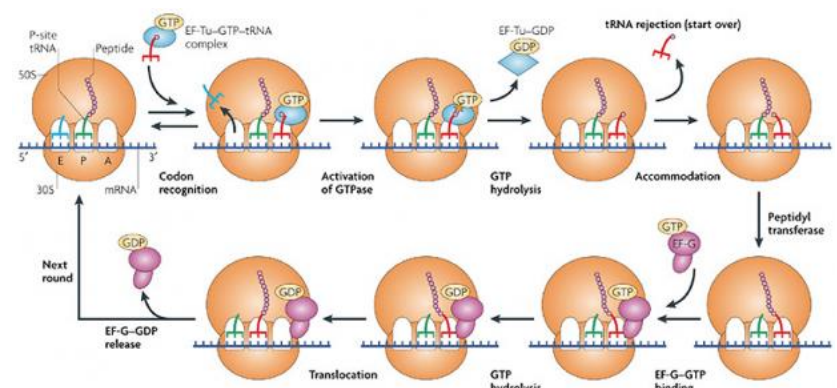


## Elongation

Die Energie kommt von den beiden GTPasen EF-Tu und EF-G. Die enzymatische Reaktion der Peptidbindung wird im Peptidyl- Transferase-Center (PTC) ribosomal katalysiert.

Zu Beginn der Elongation agieren die Proteine L7, L12 als Shuttle für die GTPase

EF-Tu-GTP-tRNA und bringen sie an die A Seite. Bei korrekter Codon-Anticodon Interaktion kommen sich GTP + H<sub>2</sub>O aufgrund des Ribosoms so nahe, dass es zur *GTP Hydrolyse* kommt. EF-Tu-GDP und γ-P werden frei, es kommt zur Peptidbindung. N der neuen As macht dabei einen nukleophilen Angriff auf die Carboxylgruppe der wachsenden Kette, die an die Peptidyltransferaseseite gebunden ist. Ef-Ts wird zur Beladung von GTP an EF-TU benötigt. EF-TU bindet an EF-Ts, dadurch kommt es zur Umgruppierung des GTP-Bindepockets.

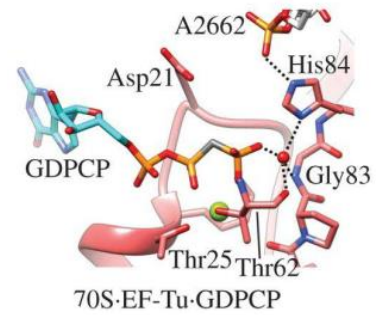
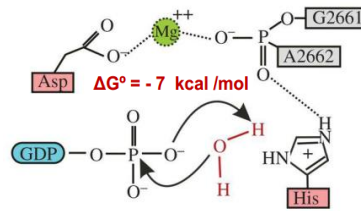




## Mechanismus der GTP Hydrolyse und molekulare Mimikry

GDPNP ist ein nicht hydrolysierbares GTPase Analogon. Das erlaubt es die Struktur zu analysieren. Ein Aspartat im P-Loop und ein protoniertes Histidin am Motif II tragen zur Positionierung des H<sub>2</sub>O Molekül zum  $\gamma$ -P bei. Mg<sup>2+</sup> positioniert die Carboxylgruppe des Aspartats zur ribosomalen RNA.

Puromycin ist ein Antibiotikum und stoppt die Proteinsynthese. Deren Molekül ähnelt einer Aminoacyl-tRNA.



## EF-G verschiebt beide tRNAs um ein Triple

Das PTC katalysiert nun die anwachsende Polypeptidkette von der P zur A Seite. Den Ue ist es jetzt möglich relativ zueinander um 7° zu rotieren. Die 3' Enden beider tRNAs sind um ein Triple (bzw. von der A zur P Seite) nach vorne verschoben, die Anticodonloops bleiben dabei unbeweglich. Diese *Hybridstellung* der tRNAs, die A/P und P/E Positionen wirken als Substrat für EF-G-GTP. EF-G-GTP ahmt dabei, um als GTPase an A binden zu können den EF-TU-tRNA nach. Diese GTP-Hydrolyse führt zu einem Conformational-Change von EF-G. Während dieser Translokation rotiert die 50S Ue und die Anticodonloops der tRNAs schiebt es dabei nach. Ist die Verschiebung vollständig vollzogen, dissoziiert EFG-GDP. Es ist Platz um den Zyklus von neuem mit EF-Tu zu beginnen.

## Frameshifting

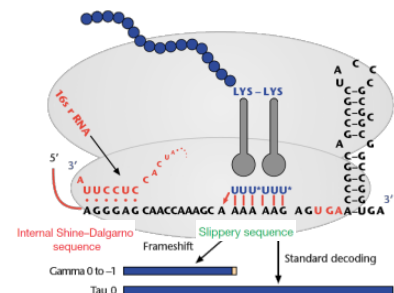
Befindet sich in einem Open-Reading-Frame ein Frameshift (bzw. zwischen orfA und orfB), ist es dem Ribosom möglich ein chimäres Protein zu translatieren. Kommt es zu keinem FS stoppt das Ribosom.

Frameshift +1 des Gens RF2 in E. coli

- Bei genug RF2 von E. coli, erkennt es das Stoppcodon (UGA an der A Seite) und es kommt zur Termination. Ist nicht genug vorhanden stellt das Ribosom, die SD-aSD Interaktion ist nicht optimal und es kommt zur Einrückung des Ribosoms um + eine Base.

Frameshift -1 des Gens dnaX in E.coli

- DNA Polymerase III besitzt die beiden Ue  $\gamma$  und  $\tau$ , die im Verhältnis 1:1 translatiert werden. Die SD Sequenz hält das Ribosom zurück, sodass es an der A-reichen Slippery Sequenz eine Base zurückrutscht. Der Hairpinloop hat ebenso Einfluß bei dem -1 Frameshift. Ein Triplet später folgt das Stoppcodon für das  $\gamma$  Protein. T ist der Standardweg.

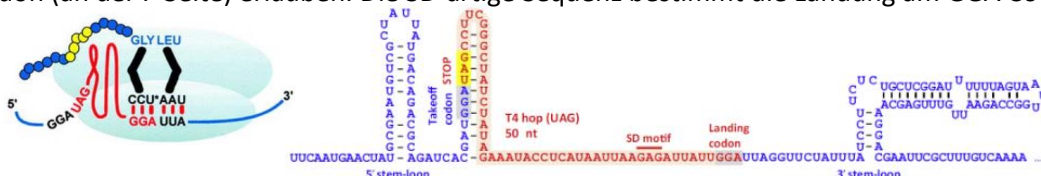


+1 Frameshift bei Säugetieren

- Die Ornithin Decarboxylase (ODC) stellt aus der nichtproteinogenen As Ornithin das Polyamine Putrescin her. Sind genug Polyamine vorhanden, kommt es zum Frameshifting wodurch das Antizym (AZ) translatiert wird, welches ODC degradiert.

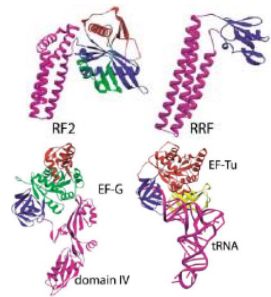
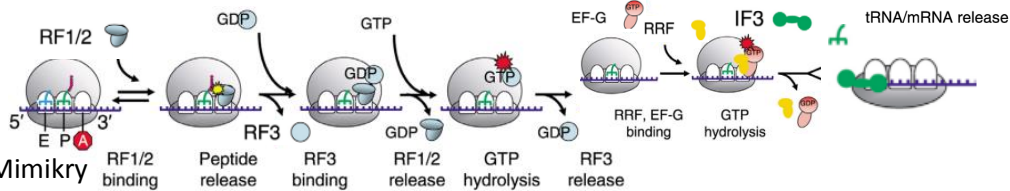
T4 DNA Topoisomerase Gen 60 Bypassing für Ue der Typ II Topoisomerase im 1:1 Verhältnis

- Ein temperaturabhängiges System, bei dem das Ribosom ganze 50 Nukleotide bei 37°C umgeht oder bei 10°C ganz dissoziiert: Die freiwerdende Lys As Kette (+ gel.) mit dem 5' stem loop verlangsamen das Ribosom, verursachen eine Strukturänderung im Ribosom, die eine Bindung von RF verhindern und ein Abheben am GGA Codon (an der P Seite) erlauben. Die SD-artige Sequenz bestimmt die Landung am GGA Codon.



## Termination

### Molekulare Mimikry



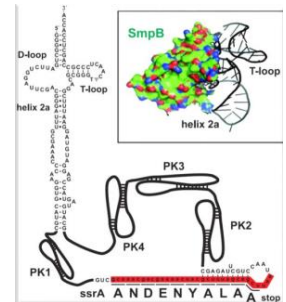
erlaubt Release Faktoren 1/2 an derselben Position A wie EF-Tu zu landen.

RF1 erkennt UAG/UAA als Stopp Codons.

RF2 --/-- UGA/UAA als Stopp Codons. Die Esterbindung der Peptidyl-tRNA wird nach Landung von RF1/2 an der A Seite hydrolysiert, es kommt zur Freilassung der Peptidkette. Mithilfe RF3 dissoziiert RF1/2. Es kommt zur GTP Bindung an der A Seite. *Hydrolyse* des gebundenen GTP befreit RF3. RRF mit EF-G leiten durch *Hydrolyse* die Dissoziation der Ue ein. IF3 bindet an die 30S Ue und verdrängt die tRNA und mRNA.

## Trans-Translation mittels tmRNA

Während der Translation kann es zu vorzeitiger Translation, Transkription, zu mRNA Schaden, Frameshifting, ein Überlesen des Stop Codons oder zu einem vorzeitigem Ribosomenstopp kommen. Ohne lesbares Codon, ist die A Seite des stillgestandenen Ribosoms leer. Dies wird von einer mit einem Ala beladenen tmRNA erkannt, eine Kombination aus tRNA und mRNA. Das Gen, welches die tmRNA codiert, heißt ssrA. Die 4 Pseudoknoten helfen beim Einlesen des ORF der tmRNA. SmpB ist ein Proteinfaktor, der die Bindung von der tmRNA ans Ribosom stimuliert. Die Protease ClpXP erkennt zur Degradation die As des translatierten ORF. Ebenso werden von der tmRNA RNases rekrutiert.



In E. coli, ist die tmRNA nicht unbedingt erforderlich aufgrund deren Alternative Rescue Faktoren ArfA/B die die leere A Seite erkennen. ArfA imitiert ein Stop Codon an der A Seite und rekrutiert so RF2. Dieser Weg benötigt keine Degradation des Proteins und der mRNA. ArfB ist ein separater Weg und kommt als größeres Protein ohne RF2 aus. Die RrfA mRNA selbst hat ein Hairpin mit einer RNase III Schneidestelle. Dieser fehlt so ein Stopp Codon. Ist genug tmRNA vorhanden, wird daher die mRNA wie das Peptid abgebaut. Da immer eine gewisse Menge ArfA in der Zelle ist, ist es ihr möglich bei keiner tmRNA, das verkürzte aber aktive 58 As lange ArfA zu retten, indem es das Peptid vom Ribosom entkoppelt. Das führt zu einem positiven Feedbackloop. Schneidet die RNase III die mRNA nicht, imitiert die letzte translatierte hydrophobe Peptidkette ein SsrA-Tag, und es kommt so zur Degradation durch ClpPX.

## RNA Stabilität

- Ribosomenbindung und Translation

Je mehr Ribosome an der mRNA binden, desto besser ist sie vor der RNaseE geschützt. Die RNA Polymerase transkribiert etwa 40-80nt pro Sekunde, ein Ribosom um die 20 As pro Sekunde (~ 60nt). Die Bindungsstärke der SD Sequenz ist ein Zeichen für die Bindungsanzahl an Ribosomen. Die T7 RNA Polymerase hat eine viel höhere Umsatzgeschwindigkeit und erlaubt so eine schnellere mRNA Degradation zu simulieren.

- Intramolekulare Basenpaarung

Eine ompA mRNA mit 5' Hairpin hat eine Halbwertszeit von etwa 15min. Werden am 5' Ende ss Nt hinzugefügt verkürzt sich die Halbwertszeit auf 6min, die RNaseE (an MonoP, und AUU-reiche Sequenzen) kann so viel leichter zugreifen. Hairpins am 3' Ende verhindern ein trimmen von Exonukleasen wie der PNPase. In vitro kann beobachtet werden das die PNPase das 3' Ende trimmt bis es ein Hairpin erreicht.

- sRNA Bindung

Kleine RNAs können Degradation entweder initiieren oder verhindern.

## Chemische und funktionelle Halbwertszeit von mRNA

Die chemische Halbwertszeit der mRNA zeigt den 50%igen Abfall der Konzentration des dazugehörigen gesamten Transkriptes an, nachdem die Transkription blockiert wurde (in vitro Northern Blotting). Die Inhibition der RNA Polymerase erfolgt durch Rifampicin (eing. bei Tuberkulose, Lepra, Legionärskrankheit). Bei *E. coli* reichen die Halbwertszeiten von 30' bei housekeeping Genen bis 15'. Instabile mRNAs haben eine HWZ von 3'.

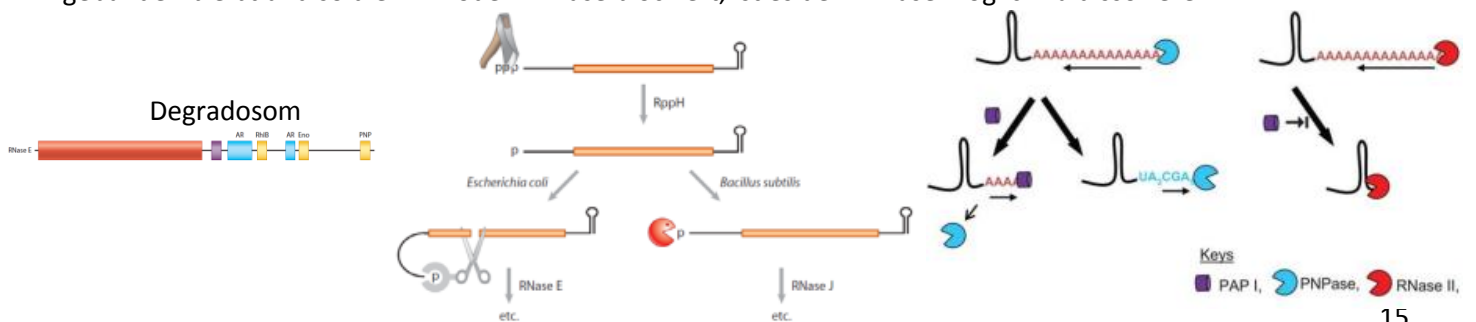
Die funktionelle Halbwertszeit zeigt den 50%igen Abfall in der Kapazität des dazugehörigen Transkriptes an, eine vollständige Synthese des Proteins nach der Blockierung der Transkription zu ermöglichen.

## RNasen

Endoribonucleases cleave internally			
Name	Essential for cell survival	Description of the reaction catalyzed	Specific functions in vivo
RNase E/G	Yes	Cleavage of A/U-rich ss regions of RNA yielding 5'-monophosphorylated products; 5'-end-dependent hydrolase	Ribosomal and transfer RNA processing, initiation of decay of non-coding and mRNAs, turnover of messenger, non-coding and stable RNA decay intermediates
RNase III	Yes	Endonucleolytic cleavage of ds regions of RNA yielding 5'-monophosphorylated products	Ribosomal and transfer RNA processing and mRNA processing and decay
RNases J1/J2*	RNase J1/Yes	Endonucleolytic cleavage of ss regions of RNA yielding 5'-monophosphorylated products; 5'-end-dependent hydrolase	RNA processing and decay in <i>B. subtilis</i>
RNase Y	Yes	Endonucleolytic cleavage of ss regions of RNA yielding 5'-monophosphorylated products; 5'-end-dependent hydrolase	Degradation of <i>B. subtilis</i> transcripts containing SAM-dependent riboswitches
Exoribonucleases start from the ends			
Name	Essential for cell survival	Description of the reaction catalyzed	Specific functions in vivo
RNase PH	No	tRNA nucleotidyltransferase	Exonucleolytic trimming of the 3'-termini of tRNA precursors
PNPase	No	(i) Phosphorolytic 3' to 5' exoribonuclease and (ii) 3'-terminal oligonucleotide polymerase activities	3' to 5' decay of ssRNA
RNase II	Yes	Exonucleolytic cleavage in the 3' to 5' direction to yield ribonucleoside 5'-monophosphates	Removal of 3'-terminal nucleotides in monomeric tRNA precursors, 3' to 5' exonucleolytic decay of unstructured RNAs
RNase R	No	Exonucleolytic cleavage in the 3' to 5' direction to yield ribonucleoside 5'-monophosphates	3' to 5' exonucleolytic decay of structured RNAs (e.g. mRNA and rRNA)
RNase J1/J2*	Yes	Exonucleolytic cleavage in the 5' to 3' direction to yield nucleoside 5'-monophosphates	5' to 3' exonucleolytic decay of <i>B. subtilis</i> RNAs
Oligoribonuclease	yes	Exonucleolytic cleavage of short oligonucleotides to yield nucleoside 5'-phosphates	Completion of the last steps of RNA decay
Ancillary RNA-modifying enzymes			
Name	Essential for cell survival	Description of the reaction catalyzed	Specific functions in vivo
RppH	No	Removal of pyrophosphate groups from the 5'-end of triphosphorylated RNAs	Facilitation of endoribonucleolytic cleavages of primary transcripts by RNase E/G
PAP I Poly A Polymerase I	No	Addition of adenosines to the 3'-end of RNA for allowing PNPases to work	Facilitation of 3' to 5' exonucleolytic decay of structured RNAs by adding 3' poly(A) tails
DEAD-box helicases	No	ATP-dependent unwinding of ds regions of RNAs	Facilitation of the PNPase- dependent decay of structured RNAs

Endonukleolytischer Schnitt durch Arg-reiche Bindedomäne und katalytischer Domäne der RNaseE führt zu einem 5' Monophosphat Ende. Deren C-Terminal bindet Proteine wie eine Enolase (wandelt 2-PG in PEP um), die RNA Helikase B (RhIB) und die Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase), die zusammen das Degradosom bilden. RNase J in *Bacillus subtilis* agiert ebenso als Exoribonuklease die RNA von der P Seite degradieren kann. Die RNA 5' Pyrophosphohydrolase (RppH) entfernt das PP am PPP.

PAPI fügt Adenosine am 3' Ende an, sodass die als Trimer aktive PNPase als Exoribonuklease in der Lage ist das 3' Ende zu degradieren bei Anwesenheit von Phosphat, solange sie auf keine Stem-Loops trifft. Sind keine Phosphate, dafür Nukleotide vorhanden fügt die PNPase am 3' Ende sie einfach an. Beide Exoribonukleasen, RNaseII wie die PNPase pausieren, wenn sie auf eine GC reiche Sequenz stoßen. Während RNaseII an der mRNA gebunden bleibt und so die PAPI oder PNPase blockiert, ist es der PNPase möglich zu dissoziieren.



## Transkription in Eukaryoten

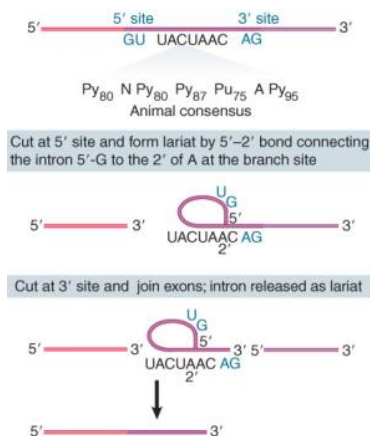
- RNA Polymerase I synthetisiert rRNAs im Nukleolus, RNA Polymerase II mRNAs im Nukleoplasma und RNA Polymerase III sRNAs im Nukleoplasma

Die prä-mRNA erhält im Nukleus ein Cap am 5' Ende und einen PolyA(200)-Anhang am 3' Ende. Dieser Anhang ist notwendig für die Initiation der Translation und ebenso für die Stabilisierung der mRNA. Die prä-mRNA wird in einer Menge von heterogenen Kern-RNAs (hnRNAs) mit Proteinen zusammen gehalten. Der 5' Cap wird geformt durch Hinzufügung von Guanin ( $m^7G$ ) via 5'-5' Linker. S-Adenosylmethionin (SAM) ist ein Schlüsselprodukt bei der Synthese zum  $m^7G$ . Diese Cap-Struktur dient zur Stabilisierung. Sie ist das erste Erkennungsmotiv für den Translations-Initiationskomplex und beeinflusst außerdem die Stabilität im Splicing, den Export sowie die Translation. Es folgt Splicing der Introns und Zusammenfügung der Exons. Durch die Kernpore (NPC) erfolgt der Transport ins Cytoplasma.

### Splicing

Beinah alle Introns folgen der GU-AG (oder GT-AG) Regel. Sie gibt die beiden ersten und letzten Basen an. Dem Branching Point folgt nach dem Adenosin ein Pyrimidin in Säugetieren. Fünf katalytisch aktive snRNAs sind im Splicing (Ribozym) involviert. Das Spliceosom ist ein RNA-Proteinkomplex (snRNPs) von 12MDa, wobei die sRNAs unter 1/3 der Masse ausmachen. Die Proteine haben nur eine unterstützende Funktion.

Die Erkennung der 5' Seite erfolgt durch U1. U2 basenpaart mit dem Branching Point und definiert so wo das Lasso geformt wird. U4/U6 zusammen mit U5, dass die Exons zusammenzieht, treten den Komplex bei. Wird U1/U4 frei, formt sich ein katalytisches Zentrum mit  $Mg^{2+}$ . Damit ist es U6 möglich an der 5' Seite zu schneiden. Bei folgender Transesterifikation greift das Adenosin des Branching Points (A-OH) das 5' Phosphat, nach dem Zucker der Basen GU (O-P-O-GU), zur Formung des Lassos an. Das Intron formt nun ein Lasso, dass das 5'-G Intron Ende zum 2'-A Intro verbindet. Sogleich wird das 3' geschnitten, der Intron

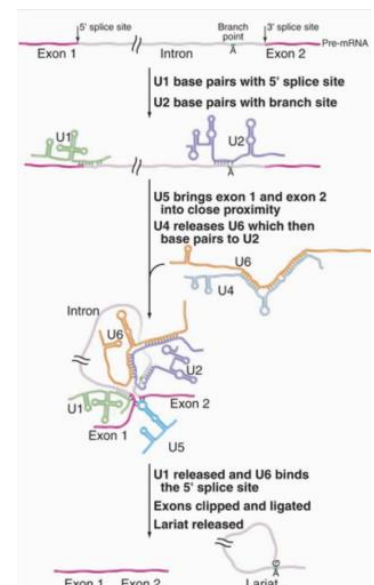


Seitenzweig wird frei und die Exons werden verbunden. Bei dieser zweiten Transesterifikation greift das 3'OH des Exon1 das 5'OH des Exon2 an.

Das katalytische Zentrum ist vergleichbar mit dem autokatalytisch aktiven Group IIA Intron.

Das GroupIIA Intron findet man in Eubakterien, Archaeen und in Organellen von Pflanzen sowie Pilzen.

Es gibt ebenso autokatalytisch aktive GroupIC1 Introns, die in manchen Bakterien, Mitochondrien, Chloroplasten, Phagen, eukaryotischen Viren und im Kern von eukaryotischen Mikroorganismen aktiv sind.



### Der Exon Junction Complex (EJC)

lagert sich zuerst während dem Splicing an und wird mit ins Cytoplasma transportiert. Der EJC besteht aus verschiedenen Proteinkomponenten (wie RNPS, Y14, SRm160, Aly/REF, Magoh), die als Anknüpfungsort für weitere Proteine fungieren. Er agiert als Positionsmarker des Splicings, beeinflusst den Transport und legt den weiteren Weg der mRNA fest, sowie stimuliert die Initiation der Translation. Es leitet sogar die Degradation der mRNA ein. Eine recht gut bekannte Funktion des EJC ist seine Rolle im Nonsense-mediated mRNA Decay.

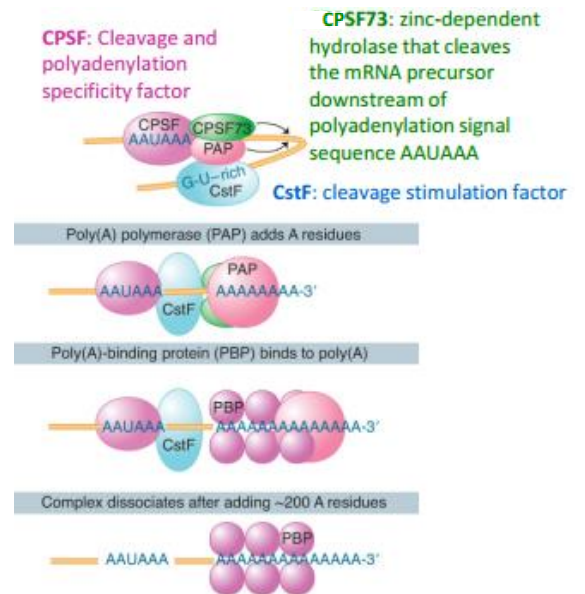


## Alternatives Splicing

ist mehr die Regel als die Ausnahme. Erst während des Spleißvorgangs entscheidet sich welche RNA-Sequenzen Introns und welche Exons sind. Bestimmte Proteine, sog. Splice Faktoren beeinflussen dabei die Auswahl der Splice-Sites. Man kennt das Überspringen von Exons (Exon Skipping), das Beibehalten von Introns (Intron-Retention), Kassettenexons (mutually exclusive Exons) und sogar das Benutzen unterschiedlicher 5' oder 3' Splice Sites (alternative 5'/3' Splice-Site), sowie alternative Promoter und alternative Polyadenylation. Beim Menschen wird jedes zweite Gen alternativ gespleißt.

## Hinzufügung des PolyA-Anhangs

Kurz vor Ende der Transkription bindet ein Cleavage und Polyadenylation specificity Faktor (CPSF) an eine AAUAAA Signalsequenz. Das rekrutiert den Cleavage-Stimulation-Faktor (CstF) am Downstream-Sequence-Element (DSE) an eine GUU reiche Sequenz. Die mRNA wird dabei so gebogen, dass CstF und CPSF miteinander interagieren. Einer zinkabhängigen Hydrolase vom CPSF ist es nun möglich, die enzymatische Spaltung 15-30 nt downstream der Signalsequenz durchzuführen. Unabhängig davon fügt die PolyA-Polymerase nun den ~ 200 langen PolyA-Anhang hinzu. Zum Schutz vor Degradation sowie zur Rekrutierung des Translationskomplexes binden unmittelbar folgend PolyA-Bindeproteine (PABP).

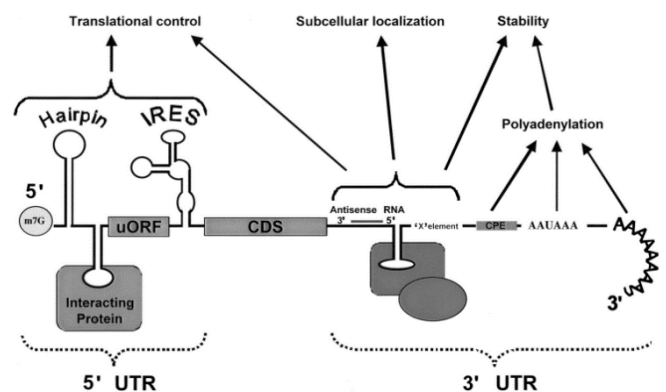


Die 5S rRNA wird von der Pol III transkribiert, alle anderen entstehen im Polkörperchen durch Pol I. Ein 90S Präribosom wird noch im Nukleolus zu den Prä-40S und Prä-60S Ue geschnitten. Assemblierungsfaktoren und r Proteine werden dafür zurück in den Nukleolus und ins Nukleoplasma transportiert. Manche Proteine verlassen den Komplex wieder. Bevor die Ue durch die NPC gelangen durchlaufen sie sogenannte Quality-Control-Points.

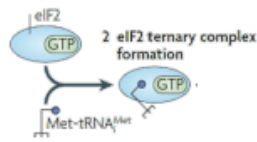
Bei der eukaryotischen tRNA ist in den allermeisten Fällen nötig, dass eine Endonuklease Introns vom Vorläufer herausschneidet. Das freie 5'-OH Ende wird phosphoryliert, am 3' Ende muss das cyclische Phosphat noch durch eine Diesterase geöffnet werden, sodass eine RNA Ligase beide Enden ligieren kann. Das freie 2' Phosphat wird zuvor entfernt. Die tRNA Ligase ist mit der bakteriellen RtcB Ligase homolog.

## Translation in Eukaryoten

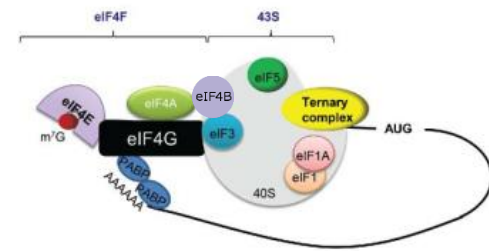
startet generell am 5' Cap. Eine besondere Form der Initiation der Translation wird durch IRES (Internal-Ribosome-Entry-Site) ausgelöst. Besonders Viren benutzen die an eine mRNA erinnernde Sequenz. Proteine, die an die RNA Signatur am 3' Ende binden, bestimmen den Transportort für die Translation. Die Interaktion der PolyA-Bindeproteine (PABP) mit dem Translation-Initiationskomplex markieren die Intaktheit der mRNA. IF2 als hochkonserviertes Protein ist in Eubakterien, Eukaryoten als auch in Archea vorhanden.



## Cap-abhängige Initiation der Translation



Die Faktoren eIF1/1A/3 stimulieren die Bindung des eIF2-GTP-Met-tRNA ternären Komplexes an die P Seite der 40S Ue. Eine Formylierung der tRNA findet bei Eukaryoten nicht statt. Weiters fördert eIF3 die Anlagerung des 43S Komplexes an die mRNA mit anschließendem Scanning. Solange eIF3 vorhanden ist, kann die 60S Ue sich nicht anschließen.



eIF1 verhindert die vorzeitige durch eIF5 induzierte Hydrolyse von eIF2-GTP.

Das Scannen des Ribosoms an das Initiationscodon geschieht in der Kooperation von eIF1/1A.

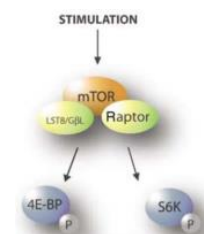
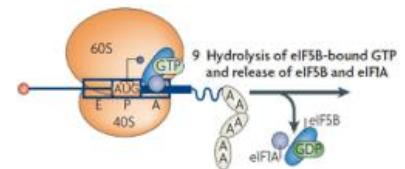
An die Cap-Struktur bindet eIF4E. Die Interaktion mit 43S erfolgt über eIF4G und eIF4A. eIF4A ist eine DEAD-Box-ATPase und ATP abhängige mRNA-Helikase. Sie öffnet sekundäre Strukturen und ermöglicht so das Scannen. Deren Aktivität wird durch eIF4G/B/H noch verstärkt. Der gesamte eIF4F Cap-Bindekomplex (eIF4E/G/A) entspannt die mRNA, interagiert direkt mit dem 43S Komplex und dem PolyA-Anhang und unterstützt so den Scanvorgang.

Die zu Bakterien homologen IF

Bacteria	Eukaryotes
IF1 <sup>1</sup>	eIF1A <sup>1</sup>
IF2 <sup>1</sup>	eIF5B <sup>1</sup>
IF3 <sup>2</sup>	

Bei Erkennung des Initiationscodons wird die *eIF2-GTPase* durch eIF5 *hydrolysiert*. Die GTPase eIF5B an der A Seite steht in Kontakt mit dem Akzeptorstamm der tRNA und der 40S Ue und ermöglicht erst den Beitritt der 60S Ue.

Die Faktoren eIF2-GDP, eIF1/3/5 verlassen die Ue. Das Bindungszentrum der 60S Ue erwirkt die *Hydrolyse* der *eIF5B GTPase*. Der 80S Initiationskomplex liegt gebunden vor, somit werden eIF5B-GDP, eIF1A frei.



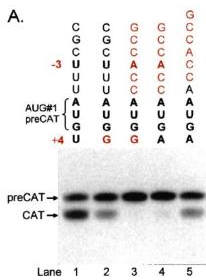
## Modulation der Translation – mTOR stimuliert die eIF3-eIF4G Interaktion

Die eIF4E Level werden in der Zelle durch den mTor/Rapor/ LST8-GβL Komplex streng kontrolliert, der durch Nährstoffe, Hormone, Wachstumsfaktoren aktiviert wird. Dadurch das mTor den IF 4E-Bindeprotein (4E-BP) und die Serin-6-Kinase (S6K) phosphoryliert, löst sich das Bindeprotein von eIF4E und die Kinase von eIF3. Das RNA-Bindeprotein eIF4B wird phosphoryliert, assoziiert mit eIF3 und die eIF3-eIF4G Interaktion kommt zustande. Wird die Kaskade blockiert, ist immer noch die Translation mittels IRES möglich.

Die Cap-unabhängige (IRES) Initiation wird durch ITAFs und eIF4GI, an dem PABP binden ermöglicht. Manche Wachstumsfaktoren, Onkogene wie c-myc, einige Apoptosefaktoren werden nur mittels IRES translatiert.

## Translation anhand viraler IRES

Da viraler mRNA das 5' Cap fehlt und die ncr zu hochstrukturiert ist wird die Translation mittels euk. Ribosom an der IRES Seite durchgeführt. Die virale Protease 2A spaltet dafür eIF4G. PolyA-Bindungsproteine werden beim Rotavirus durch eigene NSP3 Proteine (kein PolyA-Anhang) verdrängt. Die 3C Proteinase vom Poliovirus spaltet die PABP und verhindert so die CAP-abhängige Initiation. Die Picornavirusfamilie kommt beim Typ 1 (Poliovirus) und Typ 2 (EMCV, der für Myocarditis und Encephalitis verantwortlich ist) ohne eIF4E aus. Bei der Hepatitis C mRNA (Typ 3) bindet die P Seite der 40S Ue direkt an die IRES, sodass eIF1/1A/4A/4B und eIF4F nicht benötigt werden. Die Sekundärstruktur von IRES beim Cricket Paralysis Virus (Typ 4) formt eine tRNA-artige Struktur an der P Seite die die C-AC Interaktion (PK1) imitiert, selbst eIFs fallen weg. Es folgt Ala als erstes Codon. Neue tRNAs werden an die A Seite durch den EF eEF1A gebracht, eEF2 verschiebt beide tRNAs um ein Triplet.



## Kozak Sequenz

In vitro wurde die mit [<sup>35</sup>S]Met markierte Chloramphenicol Acetyltransferase translatiert. Mit einer optimalen Kozak Sequenz (Bande 3) wird nur preCAT translatiert.

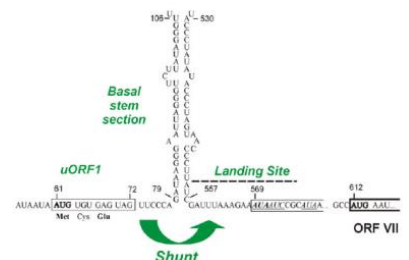
Bei einer suboptimalen Kozak Sequenz kommt es zu einem Leaky Scanning. Das erste AUG wird mit einer gewissen Häufigkeit überlesen und erst beim zweiten mit der Translation begonnen. Das kürzere CAT entsteht.

## eIF2α als Hauptregulator bei der Initiation der Translation

Arg<sub>55</sub> mit Arg<sub>57</sub> von eIF2α scannen die Position nach dem A von AUG der Kozak Sequenz (-3, -2, -1) ab. Alle 3 Ue werden an verschiedenen Stellen acetyliert und phosphoryliert, dort wo sie die Initiator-tRNA umschließen. Die γ Ue enthält die Tasche für GTP. Stressfaktoren aktivieren Kinasen (PERK, PKR, GCN2, HRI), die Ser<sub>52</sub> der α Ue phosphorylieren. Das führt zur Inhibition des Guanin-Exchange Faktors eIFB.

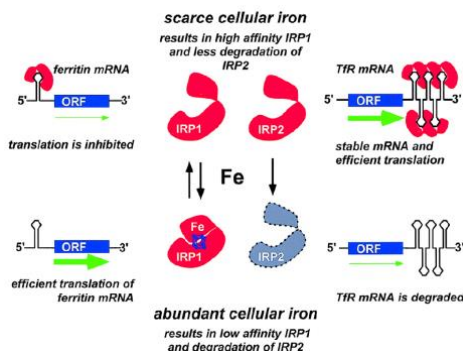
## Beim Ribosom-Shunting

wird die Sekundärstruktur der viralen 5' utr beim Einlesen vom Ribosom überbrückt. Virale Proteine können dies auslösen, indem sie die Sekundärstruktur fester binden, sodass es dem Ribosom unmöglich ist die Struktur zu öffnen.



## Translationale Kontrolle durch das Iron Responsive Protein (IRP)

Da zu hohe Eisenkonzentrationen toxisch sind, wird die Translation des Eisen Speicherstoffes Ferritin (Leber, Milz, Knochenmark) streng kontrolliert.



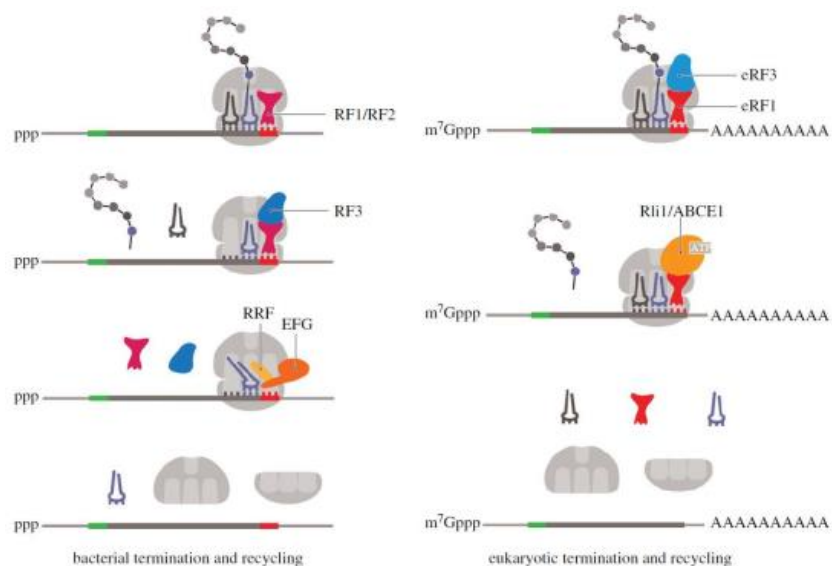
Ist Eisen rar bindet IRP an die 5' Sekundärstruktur Iron-Responsive-Element (IRE). Die Ferritin Synthese wird so inhibiert. Die mRNA des Transferrinrezeptors enthält 5 IREs an der 3' utr. Binden IRPs daran kommt es zur Rezeptorsynthese für den Eisentransporter Transferrin.

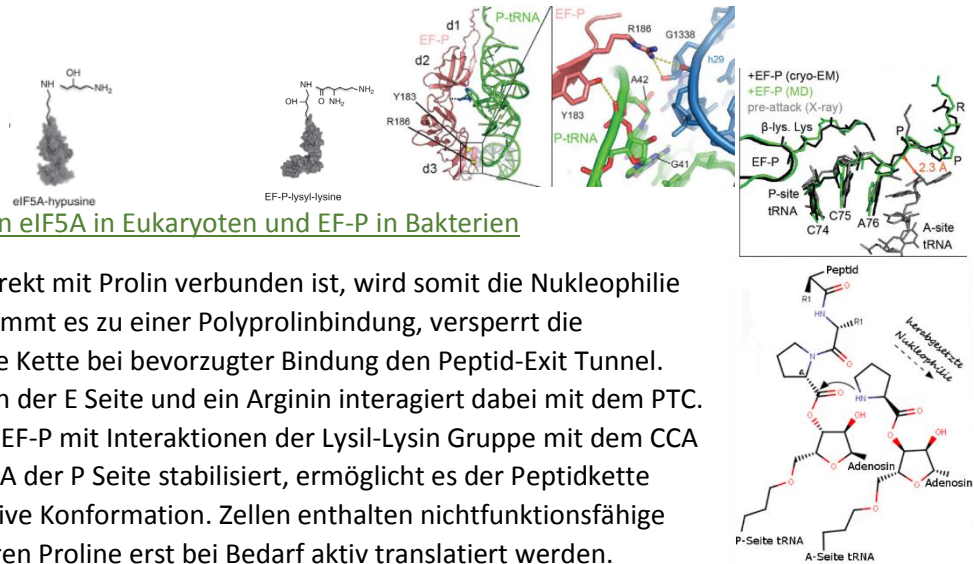
Ist Eisen reichlich vorhanden, formt IRP einen Eisen-Schwefel Cluster. Die Ferritin 5' utr ist nicht blockiert, die Translation findet statt. Da die IREs der Transferrin mRNA frei vorliegen, wird die mRNA degradiert.

## Termination der Translation

### im Vergleich zwischen

### Prokaryoten und Eukaryoten





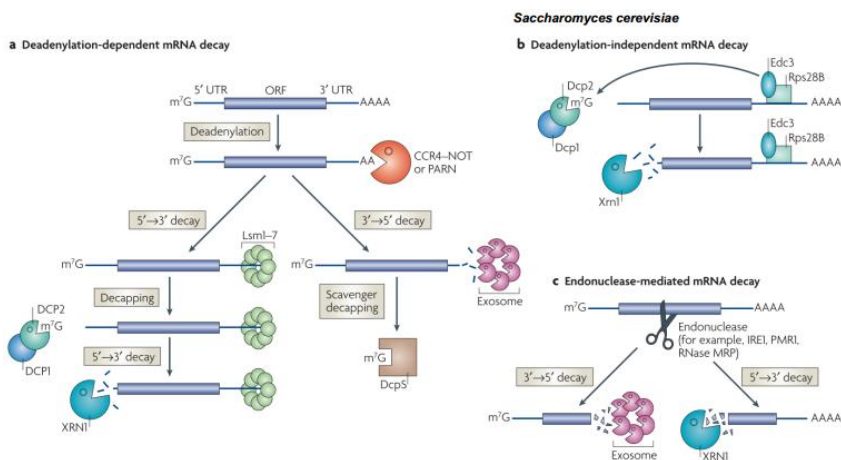
Peptidyl transfer rate constants ( $k_{\text{pep}}$ ) and ap binding ( $K_{1/2}$ )

P-site substrate	$k_{\text{pep}}$ $s^{-1}$
fMet-Ala-tRNA <sup>Ala</sup>	$57 \pm 4$
fMet-Arg-tRNA <sup>Arg</sup>	$90 \pm 7$
fMet-Asp-tRNA <sup>Asp</sup>	$8 \pm 1$
fMet-Lys-tRNA <sup>Lys</sup>	$100 \pm 7$
fMet-Phe-tRNA <sup>Phe</sup>	$16 \pm 1$
fMet-Pro-tRNA <sup>Pro</sup>	$0.14 \pm 0.02$
fMet-Ser-tRNA <sup>Ser</sup>	$44 \pm 2$
fMet-Val-tRNA <sup>Val</sup>	$16 \pm 1$

## RNA Stabilität und deren Abbau

Eine Reihe von intrinsischen wie extrinsischen Faktoren, wie der PolyA-Anhang, CDR Motive in der Coding Region, 3' utr Motive, RNasen wie auch Proteine die die mRNA binden beeinflussen die RNA Stabilität.

Ein 5'-3' Abbau ist nur in Eukaryoten und den Bacillus Bakterien möglich. Lsm am 3' rekrutiert Decappingenzyme am 5' Ende. Das heptamere Lsm selbst ist ein Homolog zu Hfq. Entdeckt wurde es an einer an Lupus erkrankten Patientin, bei der Antikörper (anti-Smith) gegen jenes Protein isoliert wurden. Bei Lupus werden antinukleäre Antikörper(ANA) Tests und ELISA Essays durchgeführt. Bei Abwesenheit von Lsm trimmen Exosome von 3'-5'. Hier erfolgt Decapping durch Dcp5.

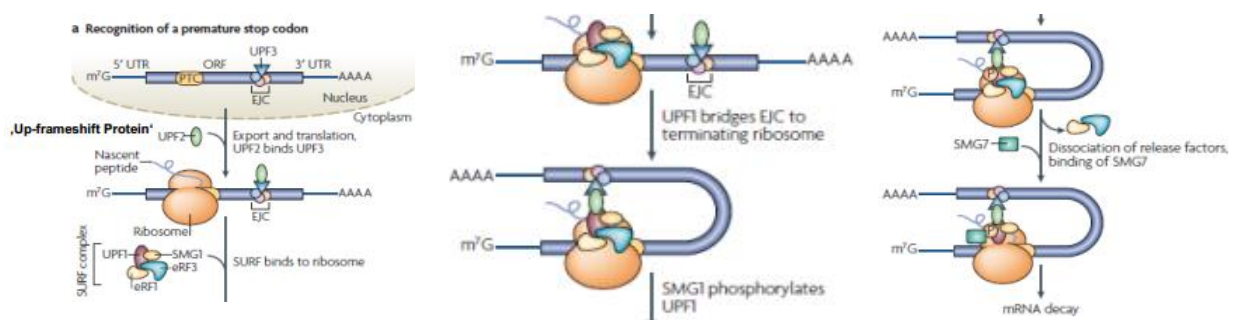


Bei Hefe ersetzen ribosomale Proteine der 40S Ue Lsm, die schon vor einer Deadenylation binden.

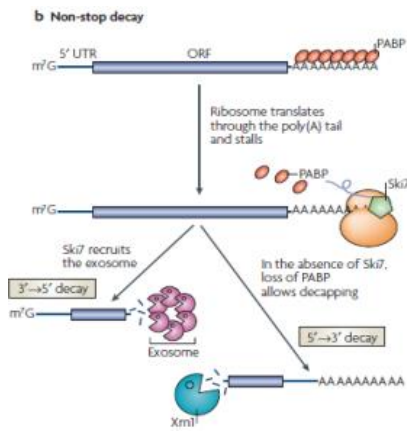
Exosome ähneln einer Krapfenringform bestehend aus 4 verschiedenen Ue. Diese sind homolog zu der bakteriellen RNase, PNPase.

## Nonsense-Mediated Decay (NMD) bei vorzeitigem Stoppcodon

Befindet sich ein Stoppcodon aufgrund Transkriptionsfehler oder Frameshifting upstream des EJC, binden Up-Frame-shift Proteine 3 (UPF3) und darauffolgend UPF2 an diesen. Am angehaltenen Ribosomen setzt sich der SURF Komplex (UPF1 + Recyclingfaktoren). Mithilfe des EJC formt die mRNA eine Schleife, die UPFs treten in Kontakt zueinander, die Verbindung erfolgt durch Phosphorylierung am UPF1. Es folgt der Abbau der mRNA.

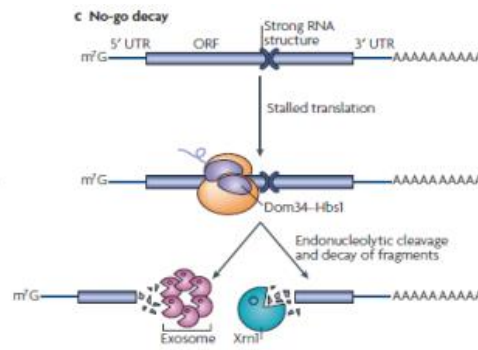






### Der Non-Stop Decay (NSD)

kommt ganz ohne Stoppcodon aus. Das Ribosom translatiert bis zum 3' Ende. Es entfernt dabei die PABPs. Bindung von Ski7 rekrutiert Exosome. Weitere Ribosomenbindung ist durch Fehlen der PABPs nicht möglich.



### No-Go Decay (NGD)

Starke utr Sequenz oder mRNA stabilisierende Proteine verunmöglichen eine weitere Translation. Das stehende Ribosom löst eine endonukleasische Spaltung aus.

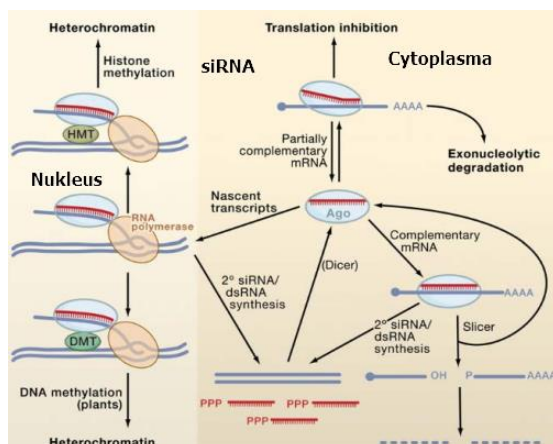
## Micro RNA und Small Interfering RNA Silencing

Antisense RNA bindet in erster Linie an die 3' utr und löst so Degradation aus. Im Jahre 2004 wurde erstmals eine siRNA Anwendung für therapeutische Zwecke angemeldet.

Die RNA für den Silencingkomplex stammt aus dem Genom oder von invasiven Ns (Viren, Transposons, fremde Gene). Oft stellen Introns, und weniger häufig konvergierende RNAs die Information für siRNAs.

Die Ribonuklease Dicer besteht unter anderem aus zwei RNase III Domänen und einer PAZ Domäne. Gefunden wurde sie, indem nach einem RNase III homologen Protein gesucht wurde. Die beiden RNase III spalten die doppelsträngige DNA an 2 Seiten in 20-25 nt lange Stücke. Die PAZ Domäne interagiert mit der RNA.

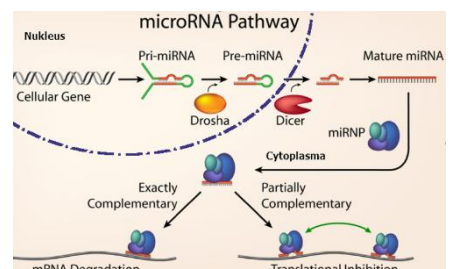
Nach der Öffnung der dsRNA bindet die PAZ Domäne eines Argonaute Proteins (Ago) im Bindepocket mit einem mi/siRNA Stück und der Ziel-mRNA. Dies reguliert den Abbruch der Transkription, die Translation; schützt Heterochromatin und führt zu RNA/DNA Degradation. Der gesamte RNA-, Protein-Komplex nennt sich RNA induced Silencing-Complex (RISC). Die Bindung der siRNA an die mRNA kann bei einigen Arten durch die RNA dependent RNA-Polymerase (RdRP) aufrechterhalten werden.



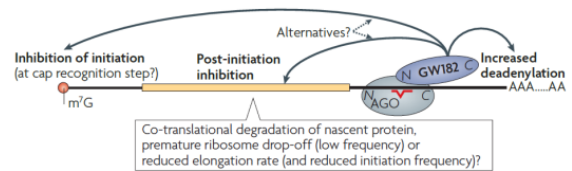
Die siRNA ist oft 100% komplementär mit der viralen RNA (dsRNA). Sie wird dann durch die Endonuklease Slicer gespalten. Ago kann ebenso in den Nukleus eindringen und dort durch Bindung an die RNA Polymerase die Transkription beeinflussen. Das kann zu Histonmethylation in Hefe, Tieren oder zu DNA-Methylation in Pflanzen und so zu Heterochromatin führen.

miRNA sind endogen (ssRNA), formen einen Loop und basenpaaren seltener vollständig. Sie haben dafür diverse Ziel-mRNAs. Am 3' und 5' werden sie durch die Ribonuklease Drosha geschnitten und mittels dem

Protein Exportin 5 aus dem Nukleus transportiert. Dicer entfernt den Loop, sodass an der mature miRNA der RISC (miRNP) bindet. Ist die miRNA 100% komplementär führt dies zur mRNA Degradation. Bei einigen Fehlern in der Basenpaarung wird die Translation inhibiert, es kommt so zu indirekter mRNA Degradation.



Ausgelöst werden diese Mechanismen vom GW 182 Protein, dass vom an der 3' utr sitzenden AGO Komplex rekrutiert wird. Es konkurriert bspw mit eIF6 (katalysiert die 40S/60S Assoziation) oder blockiert die Zirkulation der mRNA. lin-4 und let-7 sind miRNA Beispiele für Post-Transkriptionele Genexpression die in *C. elegans* entdeckt wurden.



Die mit RISC beladene mRNA verhindert weitere Ribosomenbindung und kann mit deadenyliertem PolyA-Anhang in ein P-body transportiert werden. Dort werden sie gespeichert oder degradiert.

#### Einsatz und Anwendungen von siRNA

Bei transienter Expression wird Duplex RNA der Zelle zugeführt. Das erfolgt in Form von Mikroinjektion einer Long dsRNA oder mittels Transfektion/Mikroinjektion einer schon mit Dicer geschnittenen synthetischen siRNA. Gewünschte stabile Expression wird durch Expression eines Vektors (Transfektion: Plasmidbasierter shRNA Vektor; Transduktion: Retrovirus, Adenovirus) erreicht, dessen RNA einen Hairpin formt. Hier erfolgt die Transkription im Nukleus durch die Pol III. Der Transport ins Cytoplasma erfolgt mittels dem Protein Exportin 5.

Die Downregulation um die Proteinfunktion herauszufinden ist einfacher als ein Knockout. Bei einem lebenswichtigem Protein ist das auch die einzige Möglichkeit. Bei klinischen Studien wird es angewendet um die Funktion von bestimmten Proteinen bei Krebs, Infektionen oder Entwicklungsdefekten herauszufinden.

*Für praktische Anwendungen der Methoden empfehle ich [openwetware.org](http://openwetware.org), sowie [bio-protocol.org](http://bio-protocol.org)*

*Dávila: 'Jede Sache die zufriedenstellt, löst Probleme, mit denen sie nichts zu tun hat.'*

Also alles Gute und viel Glück!

Anhang: Für die Prüfung ist es ausdrücklich nicht notwendig alle Proteinennamen zu kennen. Wird die Funktion richtig erklärt, die Namen aber vertauscht gibt es dafür keinen Punkteabzug. Zu Riboregulation besprach sie jeweils für Cis- und Trans-Acting 2, 3 Beispiele. Für Nachweise zur lmrRNA genügt eine grobe Beschreibung.

Beispielfrage von Prof. Moll: Geben sie 2 Beispiele für Translationsregulatoren an.

Sie beeinflussen Sekundärstrukturen, verbessern oder verschlechtern die Ribosomenbindung.

Das glgCAP-Operon

Ein Protein bindet 2 Hairpinloops, bei einem wird so die SD Sequenz verdeckt. Somit ist jegliche Translation abgeschaltet. Einer ringförmiges RNA Struktur, deren Sekundärstruktur den Hairpinloops ähneln, ist es möglich mehrere Proteine zu binden und so von der 5' utr weg zu leiten. Dies geschieht, wenn genug Kohlenstoff vorhanden ist, da so das Protein translatiert werden kann. Die RNA Struktur baut eine Endoribonuklease ab.

Stringente Kontrolle

wird aktiv bei einem Mangel von Aminosäuren. RelA dockt an die A Seite und hydrolysiert GTP zum Alarmon. Alarmone binden an die aktive Seite der RNA-Pol und diskriminiert dort an den  $\sigma^S$  Promoter.

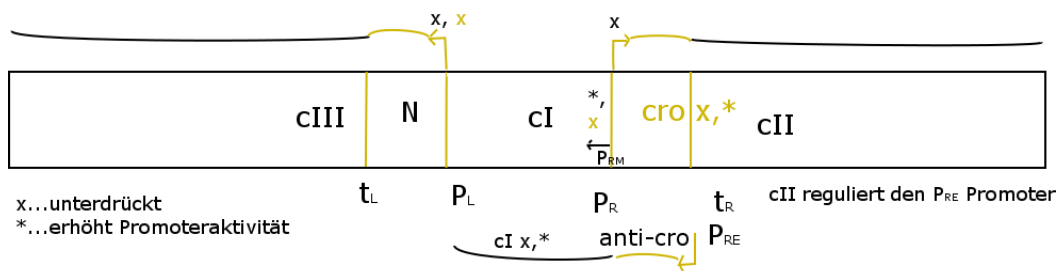
Ribosomensynthese wird heruntergeschaltet, die As Synthese erhöht. Der Stresspromoter wird aktiviert. Ein anderes Protein hydrolysiert GTP bei Nährstoffmangel (C).

Prüfungsfragen vom 6.7. 2018

Was ist Riboregulation? Erklären Sie zu cis- sowie transencoded sRNAs die Unterschiede an 2 Beispielen.

Cis-Antisense RNA bildet perfekte Duplexe, da sie vom Gegenstrang desselben Loci transkribiert wird.

Der Phage  $\lambda$  stellt eine Cis-Antisense mRNA die ein Duplex zur cro mRNA bildet. Das Protein cI ( $\lambda$  Protein) ist für den lysogenen, das Protein cro für den lytischen Zyklus verantwortlich. Das cII Protein erhöht wiederum cI. Proteasen von E. coli degradieren cII bei guten Bedingungen.



Trans-Antisense RNA werden an einem anderen Locus kodiert und bilden nicht perfekte Duplexe. Sie benötigen Hfq als Chaperon.

Eine mRNA basenpaart an der TIR Sequenz der mRNA für die eisenhaltige Superoxid-Dismutase. Deren Translation ist somit blockiert. Ist zu viel Eisen in der Zelle vorhanden, dimerisiert ein Fur Protein bei Eisenbindung. Der Fur Dimer bindet am Promoter und blockiert so die RNA Polymerase der Trans-Antisense mRNA zur Dismutase-mRNA.

### Wie kann das Binden von Ribosomen an die RBS verhindert werden? Wie können Sie die Mechanismen detektieren?

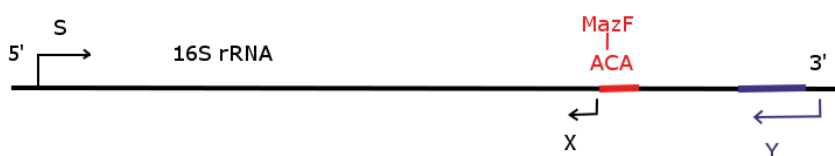
In vivo: Die Endoribonuklease MazF schneidet bei Überexpression die ACA Sequenz in der Initiationsregion von mRNAs und die von 16S rRNAs. Ribosomen sind so nicht mehr länger fähig an die RBS zu binden. Sie können nun nur mehr an die hergestellten ImRNAs binden.

Verwendung eines E. coli Stammes mit einem mazF Plasmid. Das Plasmid steht unter Kontrolle eines Phagenpromoters, sowie eines Lac Operators. MazF wird mit IPTG ungefähr eine Viertelstunde überexprimiert. Beim folgenden Saccharose-Gradienten werden die Ribosomen in 30S Ue, 50S Ue, Monosomen und Polysomen aufgetrennt. mRNA wird von rRNAs aufgereinigt; um DNA Reste nach der Reinigung zu entfernen wird immer DNase I eingesetzt. Dasselbe führt man mit der Kontrollgruppe durch. Das erlaubt die Selektion der Polysomen, und so der mRNAs die aktiv translatiert wurden (Translatom).

Man führt eine RT-PCR an der gesamten rRNA und an der polysomalen 16S rRNA durch. Dafür setzt man S/X Primer ein, die an der ganzen, wie an der abgeschnittenen 16S rRNA binden. Für die ungeschnittene 16S rRNA setzt man einen Y Primer am 3' Ende ein.

$$\{p1RT-PCRMazF | 16SrRNA(s/x)\} = \{p1RT-PCR_{alle} | 16SrRNA(s/x)\} - \{p1RT-PCR_{intakt} | 16SrRNA(s/y)\}$$

Jetzt läßt sich das Verhältnis von der  $70S_{intakt} : 70S_{MazF}$  berechnen. Einmal für die gesamte rRNA (T+) und einmal für die polysomale rRNA (P+). Die prozentuale Verschiebung der Ribosomenmenge die an die ImRNA binden können von der gesamten RNA Menge zu der polysomalen RNA Menge wird nun errechnet.



Namen von Stressgenen und deren Proteinen ist bei EcoGene einsehbar. Ist ein Stressgen bekannt erfolgt eine RT-PCR von der polysomalen und der gesamten mRNA. Um die MazF Prozessierung der mRNA zu bestätigen führt man einen Extension-Assay mit der polysomalen mRNA durch. Profile der Next-Generation Illumina Sequenzierung werden von der polysomalen (P+) und der gesamten (T+) erhalten, zum Vergleich auch P- und T- vor MazF Expressierung.

Die Primer werden wieder für die gesamte kanonische Startsequenz und spezifisch für die leaderless mRNA gewählt. Man sollte nun eine deutliche Reduzierung der Menge der verbrauchten PCR Produkte mit Primern für die ungeschnittene mRNA nach MazF Überexpressierung erhalten.

Legt man eine cDNA Bibliothek an und kartiert die Reads gegen das Referenzgenom, lassen sich Veränderungen der Transkriptmenge nach MazF+ darstellen. Für verschiedenste mRNAs von Genen die leaderless transkribiert werden erfolgen Toeprinting-Assays mit aufgereinigten  $70S^{\Delta 43}$  Ribosomen.

In vitro: Die Ue der Ribosomen werden chemisch gecrosslinked. Bei etwa  $1mM Mg^{2+}$  dissoziieren alle unvernetzten Proteine. Mit einer mRNA die eine kanonische RBS und eine leaderless Startsequenz aufweist,  $70S$  Monosom, radioaktiv markierter Primer, Nukleotide sowie RT wird Toeprinting durchgeführt. An der selben mRNA wird Toeprinting mit einer  $30S$  Ue durchgeführt. Das  $70S$  Monosom zeigt das kürzere Toeprintingsignal auf.