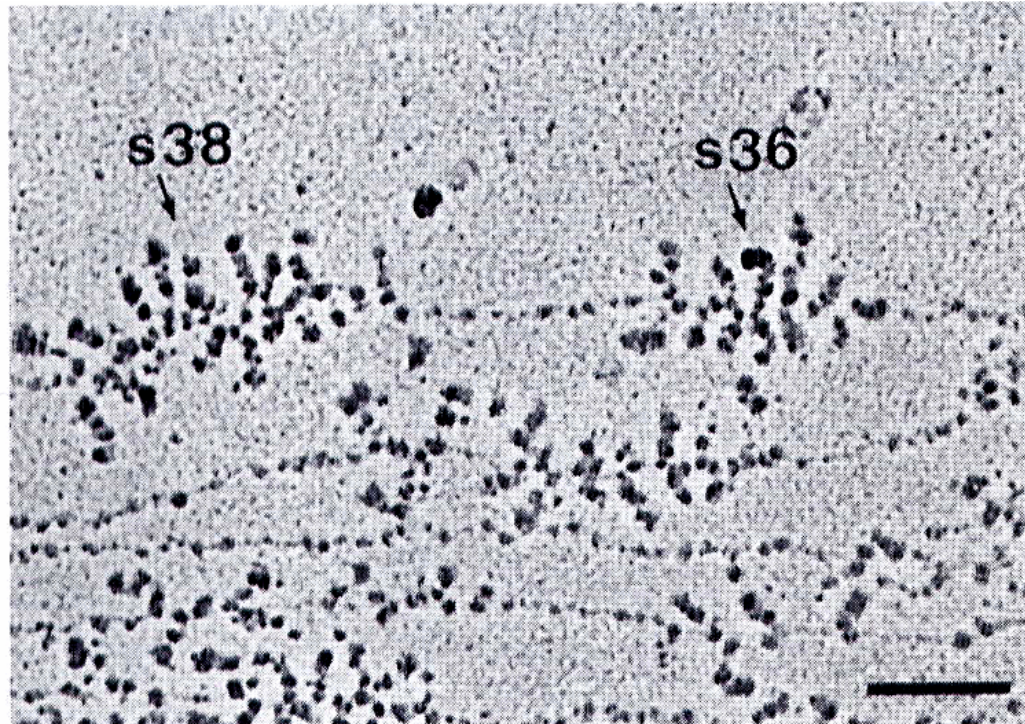


Spleißen und Prozessieren von mRNA



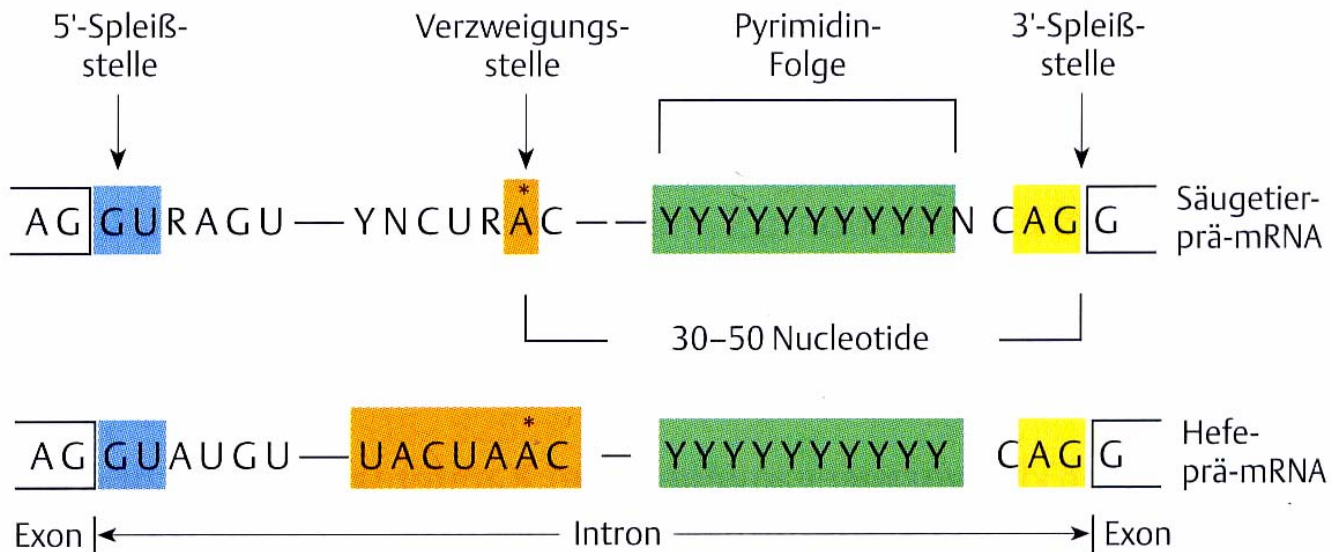
Spleißen und Prozessieren von mRNA

Spleißen, die Aneinanderreihung von Exons:

Prä-mRNAs sind 4-10x länger als die eigentlichen mRNAs.

Funktionelle Sequenzabschnitte in den Introns der Prä-mRNA:

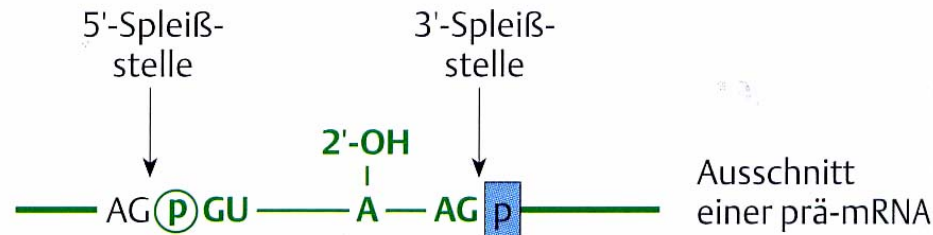
- 5'-Spleißstelle
- 3'-Spleißstelle
- Pyrimidin-Folge vor der 3'-Spleißstelle
- Adenosin-Baustein als Verzweigungsstelle, 20-40 Nukleotide stromaufwärts der 3'-Spleißstelle



Spleißen und Prozessieren von mRNA

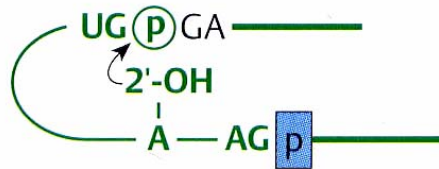
Spleißen, ein Zweischnitt-Prozess:

Beide Schritte sind Transester-Reaktionen.



erster Schritt:

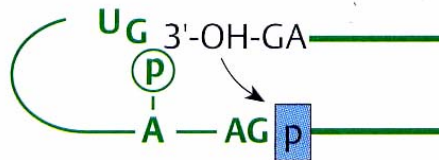
Öffnung der 5'-Spleißstelle
und Bildung der
Verzweigung



Verknüpfung der 5'-
Phosphatgruppe mit dem
2'-OH in der Ribose des
Adenosin-Bausteins

zweiter Schritt:

Öffnung der 3'-Spleißstelle
und Verknüpfen
der Exons



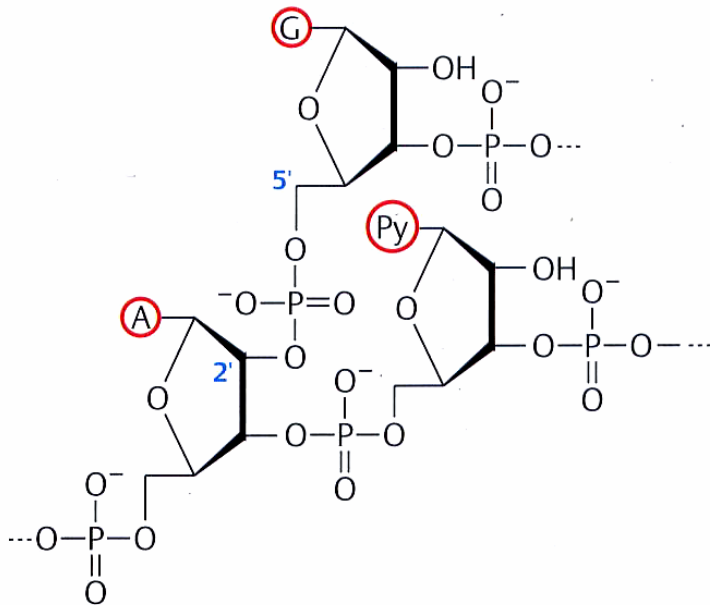
Lösen der Phosphodiester-
Bindung an der 3'-
Spleißstelle



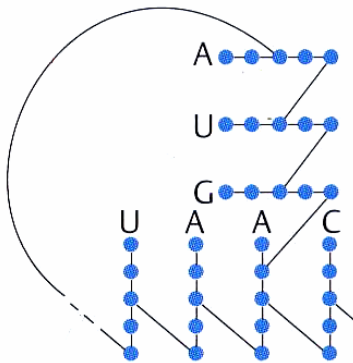
Das Intron fällt in seiner
Lasso-Struktur heraus

Spleißen und Prozessieren von mRNA

Die Verzweigung: 2'-5'-Phosphodiester-Bindung:



Durch den nucleophilen Angriff der 2'-OH-Gruppe an der Verzweigungsstelle wird eine Phosphodiester-Bindung an der 5'-Spleißstelle gelöst

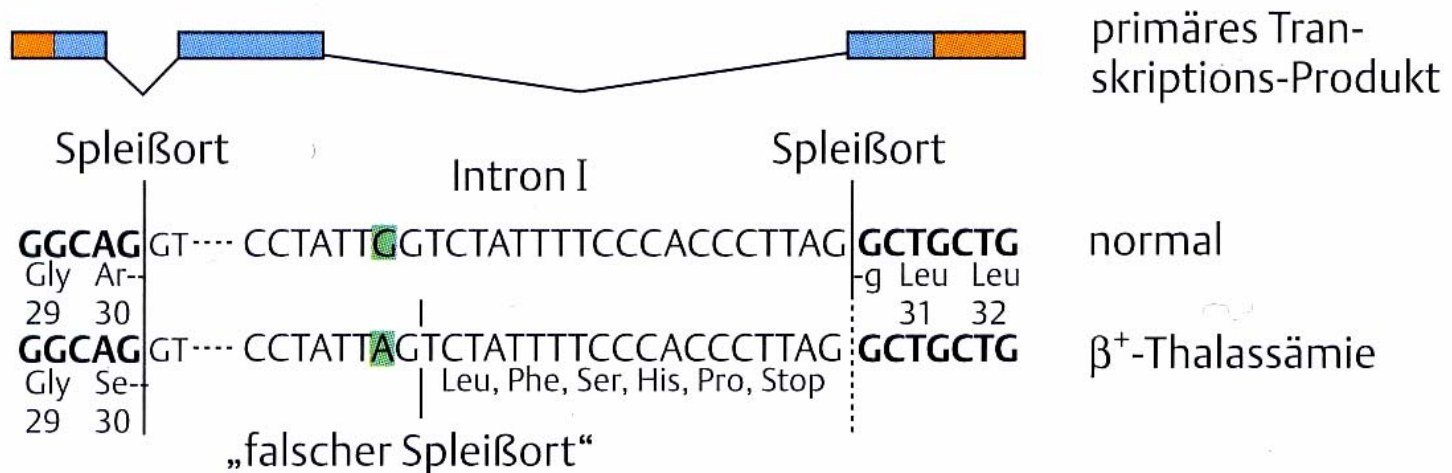
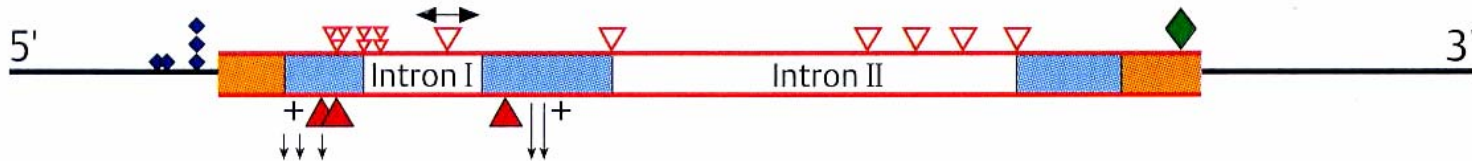


Es entsteht ein OH-Ende am ersten Exon und eine Phosphodiester-Bindung (die sog. Verzweigung)

Spleißen und Prozessieren von mRNA

Mutation an Spleißstellen:

- ◆ Mutationen im Promotor
- ▲ Nonsense-Mutationen
- ▽ Spleißen
- + Insertion
- ↔ Deletion
- ↓ Leseraster-Mutationen
- ◆ Poly A-Anheftung



Spleißen und Prozessieren von mRNA

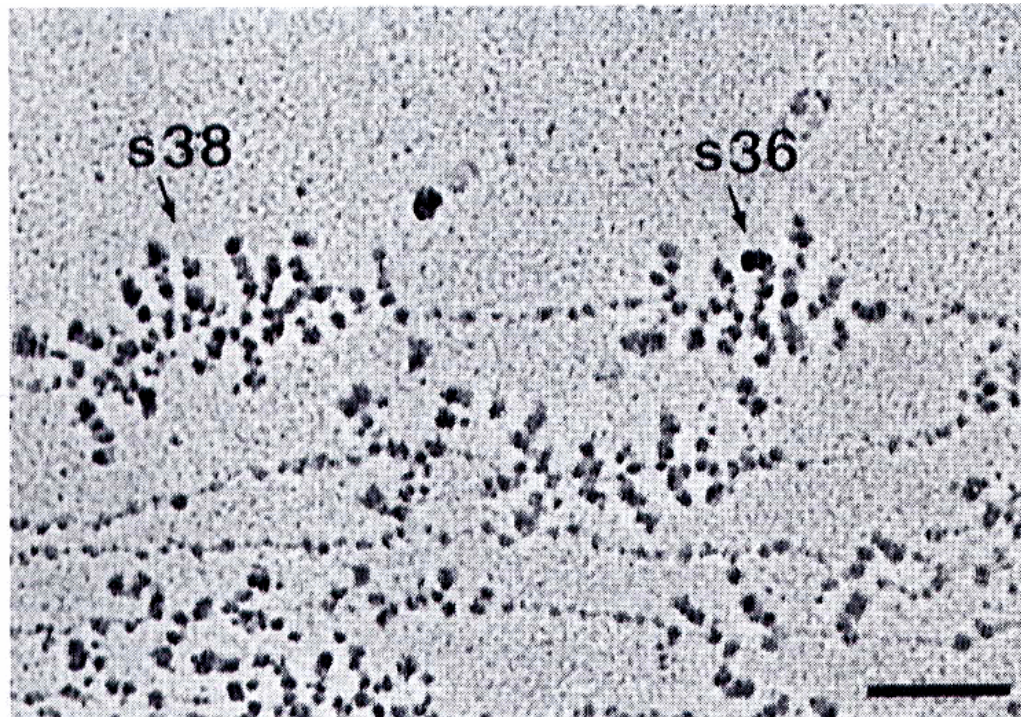
Komponenten des Spleiß-Apparates:

RNA liegt im Zellkern nie frei vor.

Sie ist auch während der Transkription mit Proteinen bedeckt.

Heterogenes nukleares Ribonucleo-Protein (hnRNP):

Viele unterschiedliche Funktionen: Schneiden und Wiederverknüpfen von RNA, Anhängen des poly(A)-Endes, Transport der RNA aus dem Kern



Spleißen und Prozessieren von mRNA

snRNPs (snurp) *small nuclear ribonucleoprotein*:

Enthalten RNA-Komponenten.

Diese RNA-Komponenten zeichnen sich durch eine starke Sekundärstruktur aus.

100-200 Nucleotide lang mit einem hohen Urazilanteil.

Besondere Modifikationen am 5'-Ende.

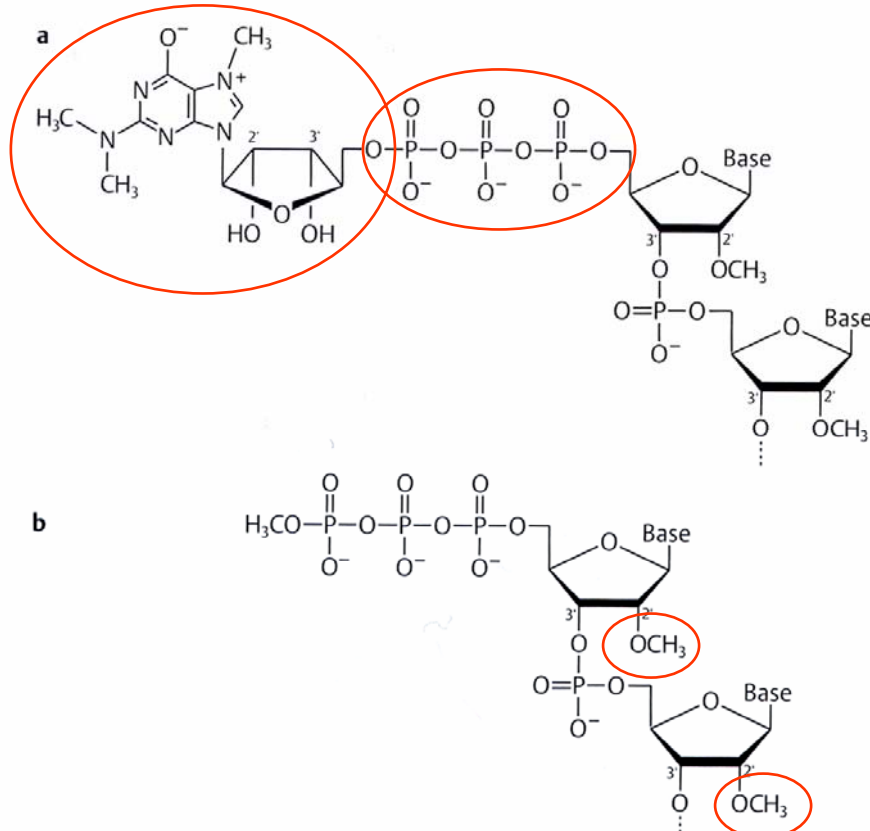
Einige U-snRNAs in Säugetier-Zellen

snRNA	Größe (Nucleotide)	N,N,7-Tri- methylguano- siniumat- Kappe	Trans- kription durch
U1	164–165	ja	Pol II
U2	187	ja	Pol II
U5	116–117	ja	Pol II
U4	145	ja	Pol II
U6	106	nein (Methyl- phosphat)	Pol III

Spleißen und Prozessieren von mRNA

snRNPs *small nuclear ribonucleoprotein*:

Modifikation am 5'-Ende: N,N,7-Trimethylguanosiniumat-Kappe.
Zum nächsten Nucleotid wird eine 5'-5'-Triphosphatbrücke gebildet.
Die ersten beiden Nucleotide nach der Kappe sind meist methyliert.



Spleißen und Prozessieren von mRNA

Zusammenbau des Spleißosoms:

Alle snRNPs besitzen den gleichen Satz von 8 Core- oder Sm-Proteinen (9-29kDa).

Zusätzlich hat jedes snRNP noch spezifische Proteine.

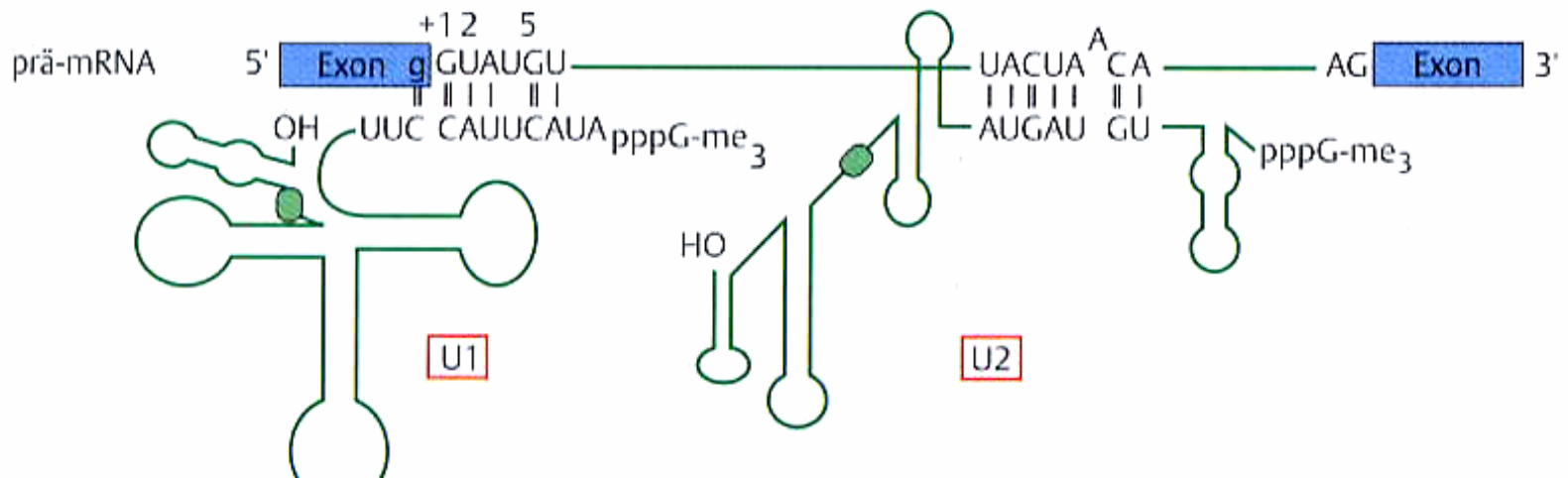
1: Binden von U1-snRNP an die 5'-Spleißstelle

2: Binden von U2-snRNP an die Verzweigungsstelle, das Adenosin wird präsentiert.

Zusätzliche Proteine und ATP sind notwendig um die Bindung zu stabilisieren.

3: Der Zusammenbau des Spleißosoms wird durch das Rekrutieren von U5- und U4/U6-snRNP abgeschlossen.

4: Das Spleißosom durchläuft eine Vielzahl von Konformationen um die reaktiven Gruppen der Zweischnitt-Spleißreaktion in jeweils funktionell korrekte Positionen zu bringen.

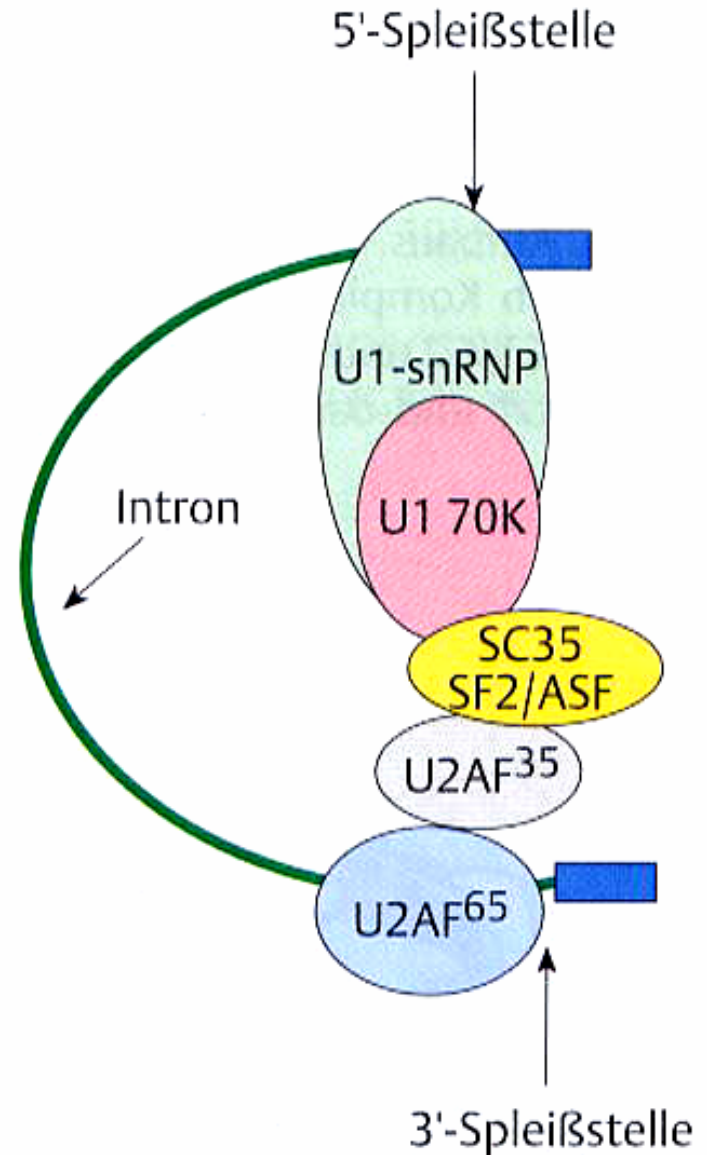


Spleißen und Prozessieren von mRNA

Zusammenbau des Spleißosoms:

Spleiß-Faktoren und deren mögliche Anordnung im Spleißosom

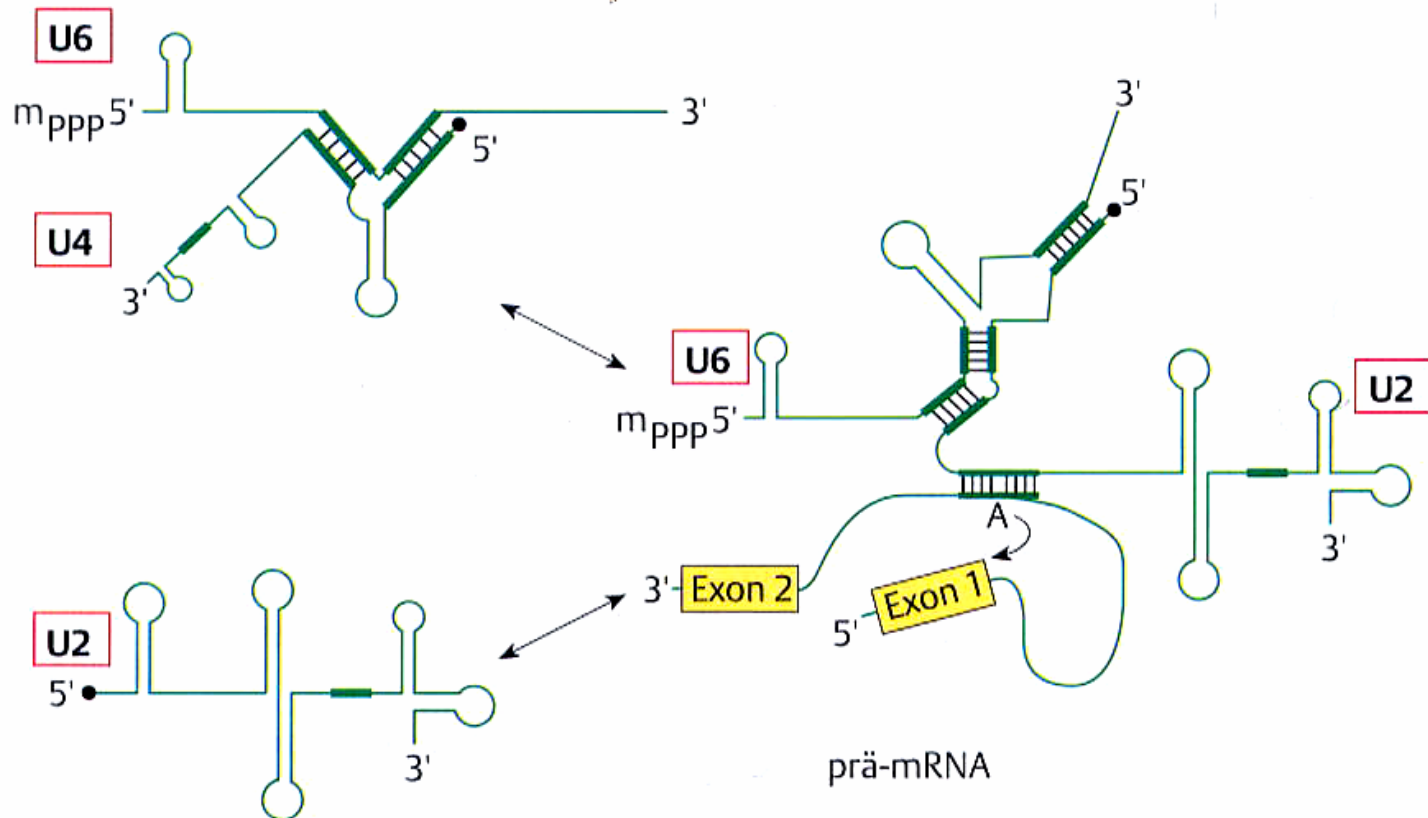
Alle beteiligten Proteine besitzen SR-Domänen (sind ein gemeinsames Kennzeichen von Spleiß-Faktoren).



Spleißen und Prozessieren von mRNA

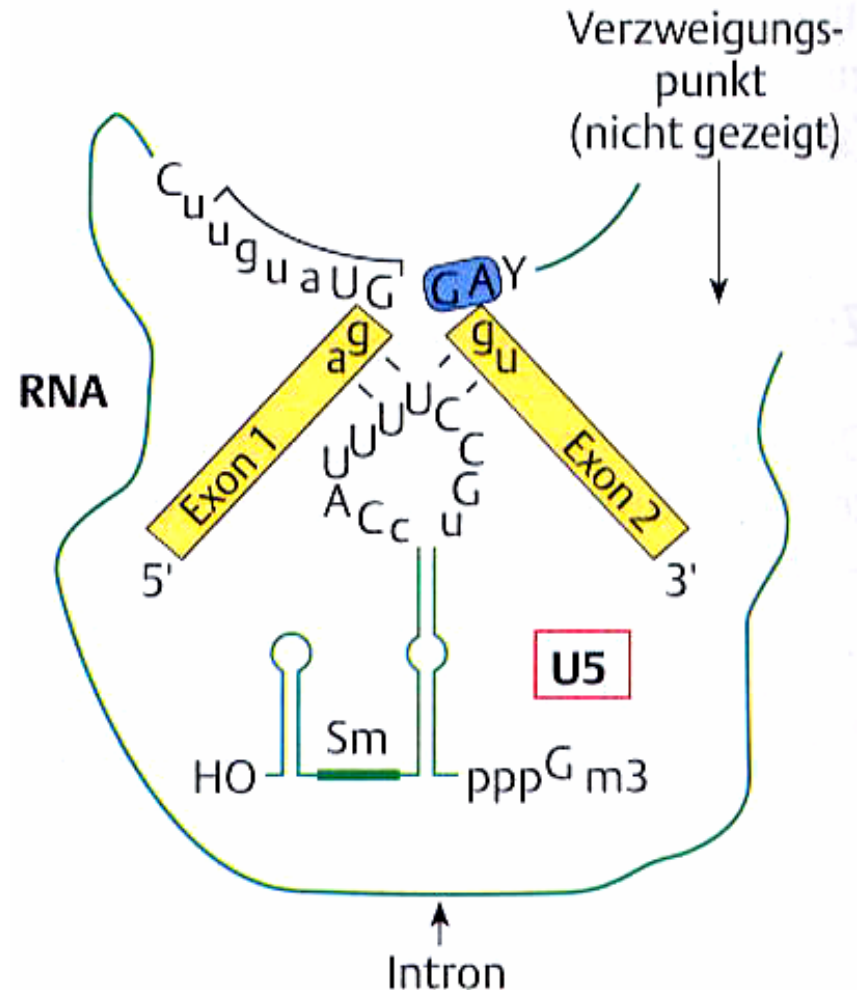
Konformationsänderungen im Spleißosom:

U6-snRNA wechselt den Partner, U4-snRNA wird durch U2-snRNA ausgetauscht; die Lage an der Verzweigungsstelle ändert sich.



Spleißen und Prozessieren von mRNA

Konformationsänderungen im Spleißosom:

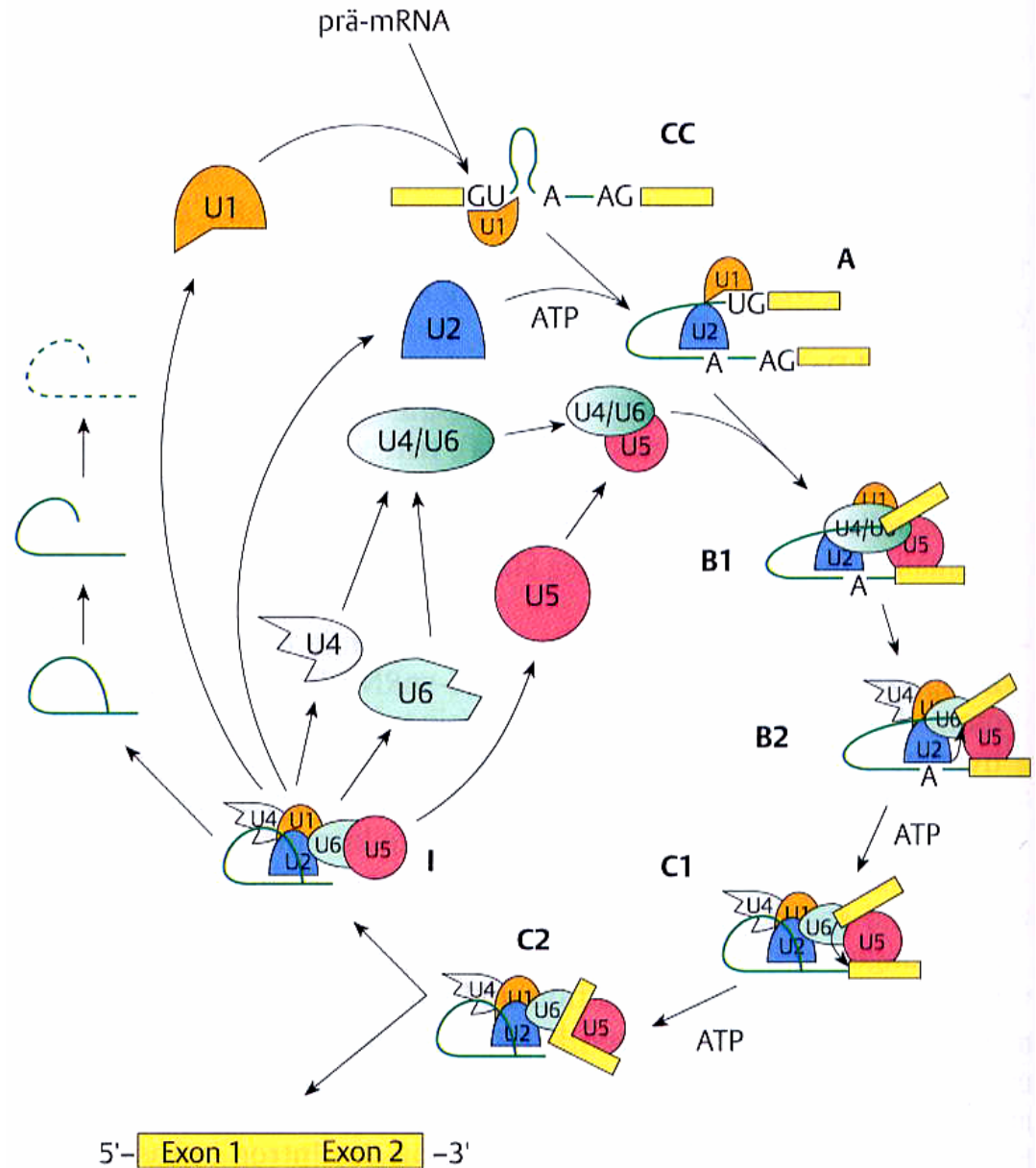


U5-snRNA tritt an Stelle von U1-snRNA.

Die Enden der beiden Exons werden in unmittelbare Nachbarschaft gebracht

Spleißen und Prozessieren von mRNA

Aufbau und Zerfall des Spleißosoms:



Spleißen und Prozessieren von mRNA

Spleiß-Faktoren: RNA-bindende Proteine

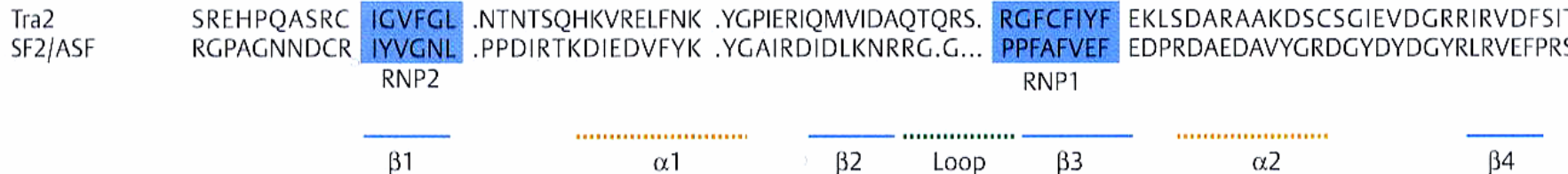
Externe Proteine (außerhalb der snRNPs) sind für die korrekten Funktionen im Spleißosom zuständig. Viele weisen Strukturmerkmale wie RNA-Helikasen auf.

Der Spleißvorgang wird maßgeblich durch das Binden von Proteinen an RNA bestimmt

Spezielle Domänen vermitteln diese Wechselwirkungen:

Das RNP (ribonucleoprotein) oder RRM (RNA recognition motif):

Die Domäne besteht aus ca. 80 Aminosäuren mit zwei konservierten Regionen (RNP1 und 2)



Spleißen und Prozessieren von mRNA

Spleiß-Faktoren: RNA-bindende Proteine

Weitere Motive von Spleiß-Faktoren:

SR-Motiv:

Proteine mit Di-Peptidfolgen aus Serin (S) und Arginin (A); vermutete Funktion: Protein-Protein Wechselwirkung (kommt daher auch in allen Spleiß-Faktoren vor)

RGG-Boxen:

Abfolge von Arginin-Glycin-Glycin (RGG); vermittelt die sequenzspezifische Bindung an RNA.

DEAD- oder DEAH-Boxen:

Sind essentielle Bestandteile von RNA-Helikasen; mögliche Rolle ist das Auflösen von RNA-Sekundärstrukturen.

Spleißen und Prozessieren von mRNA

Spleiß-Faktoren: RNA-bindende Proteine

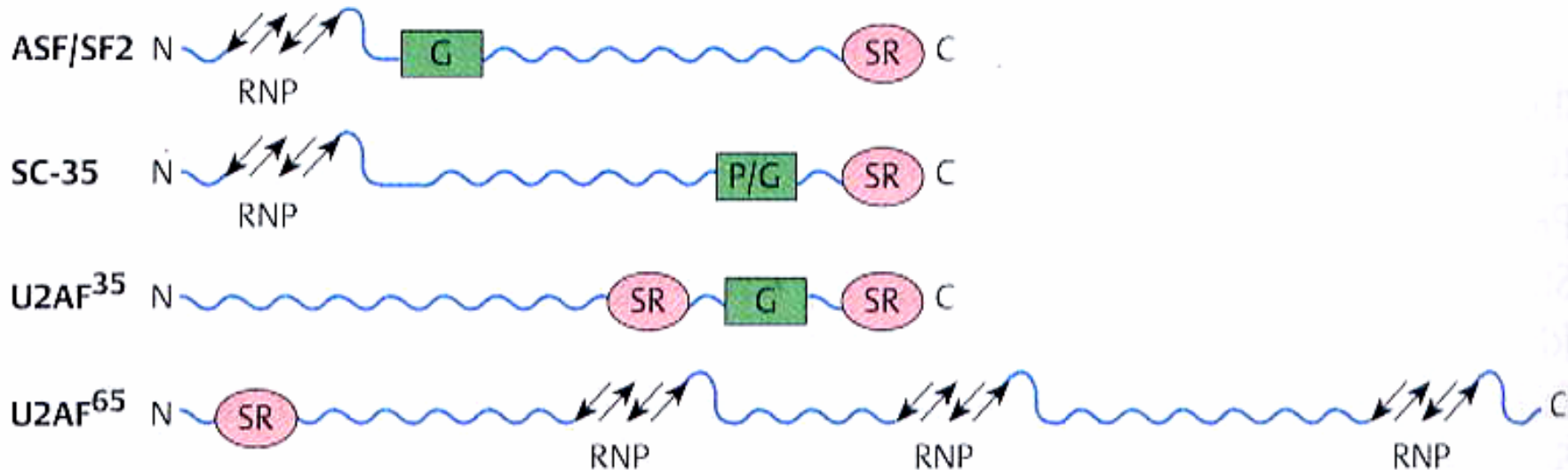
Beispiele für die Anordnung von Sequenzmotiven in Spleiß-Faktoren:

RNP: RNA-Erkennungs-Region

G: Folge von Glycin-Bausteinen

PG: Folge von Prolin/Glycin-Bausteinen

SR: Folge von Serin/Arginin Di-Peptid-Mustern



Spleißen und Prozessieren von mRNA

Selbst-Spleißen:

Manche RNA-Moleküle sind im Stande sich ohne Beteiligung von Proteinen zu spleißen:

Autokatalytisches Spleißen oder Selbst-Spleißen (*self splicing*)

Mg²⁺ und Guanosin sind die benötigten Co-Faktoren.

Unterscheidung von 2 Gruppen von Introns, die durch Selbst-Spleißen entfernt werden:

Gruppe I Introns:

In einigen prä-RNAs von einfachen Eukaryonten (z.B. Ciliaten, Schleimpilzen), in einigen prä-RNAs von Mitochondrien einzelner Pilze und in Chloroplasten von Pflanzen.

Einige Gene des Bakteriophagen T4 besitzen ebenfalls Gruppe I Introns.

Gruppe II Introns:

In einigen prä-RNAs von Mitochondrien von Hefen und anderen Pilzen.

Spleißen und Prozessieren von mRNA

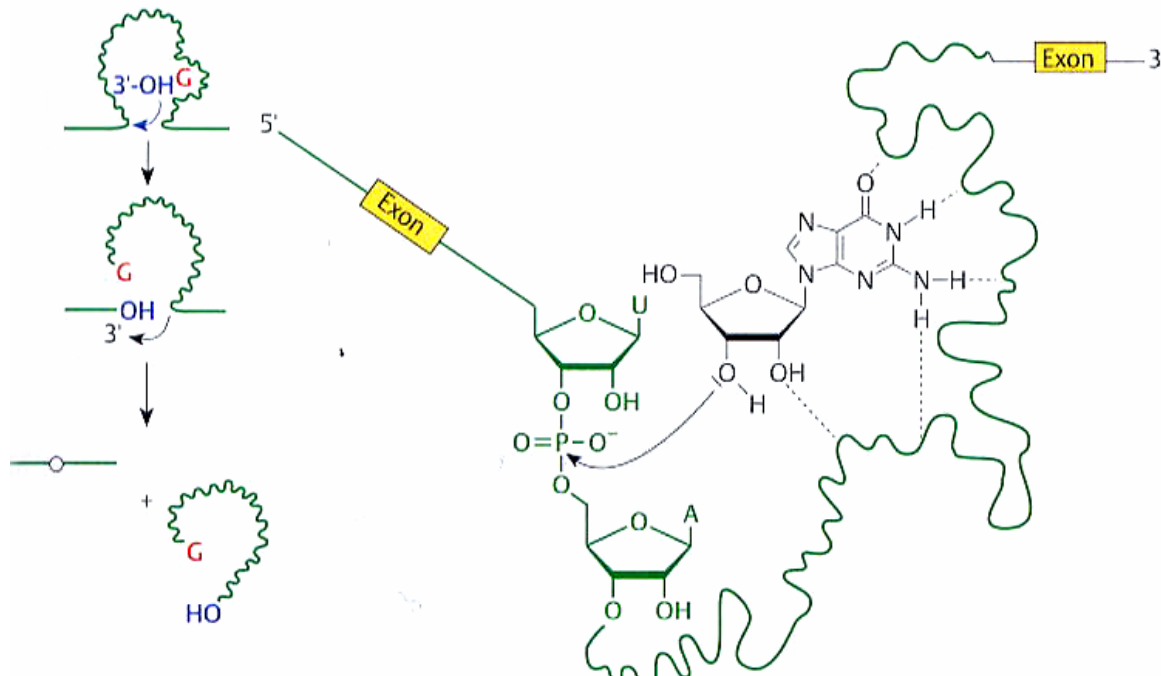
Selbst-Spleißen:

Die Selbst-Spleiß-Reaktion von Gruppe I Introns läuft in 2 Schritten ab:

1.: Die OH-Gruppe des freien Guanosins greift nucleophil die 5'-Spleißstelle an.

2.: Die neu entstandene 3'-OH-Gruppe an der 5'-Spleißstelle greift ihrerseits die 3'-Spleißstelle an.

Voraussetzung ist die Sekundärstruktur des Introns, das Guanosin muss in einer Tasche gehalten werden.

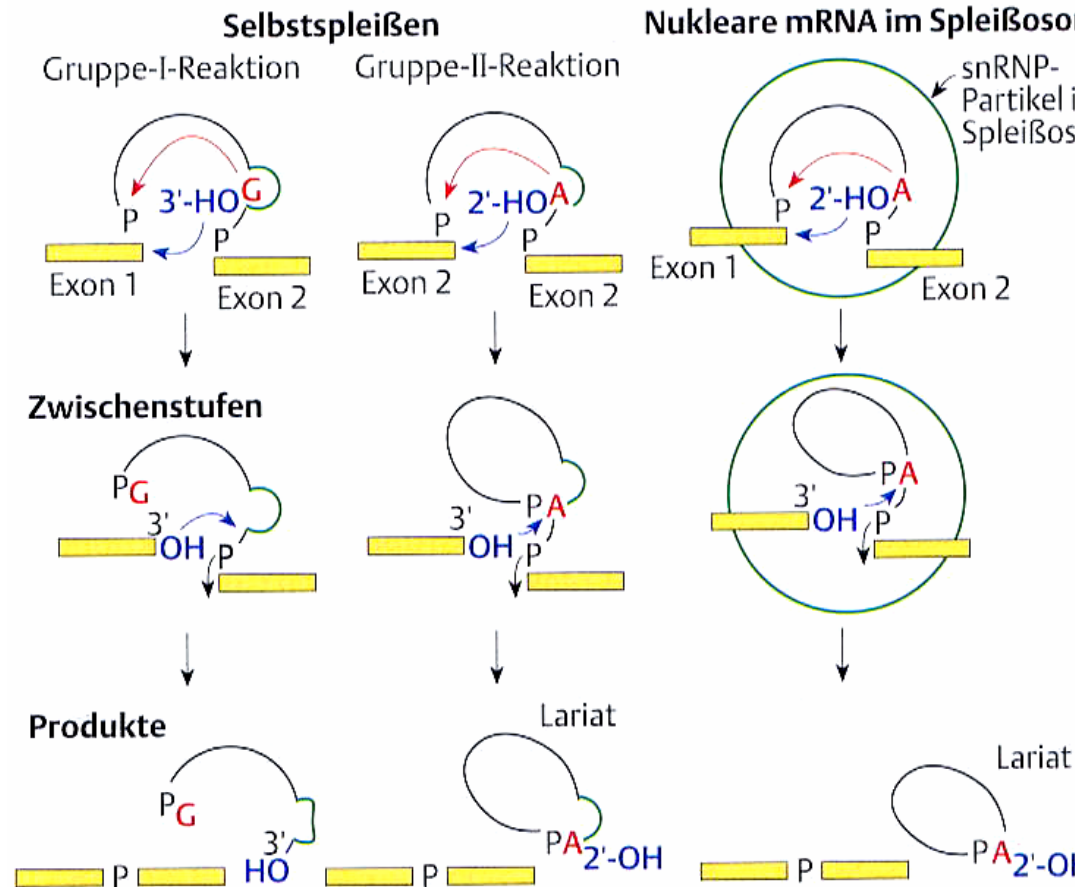


Spleißen und Prozessieren von mRNA

Selbst-Spleißen:

Die Selbst-Spleiß-Reaktion in **Gruppe II Introns** geht von einem nucleophilen Angriff der 2'-OH Gruppe eines **Adenosin-Restes** auf die Phosphodiesterbindung an der 5'-Spleiß-Stelle aus.

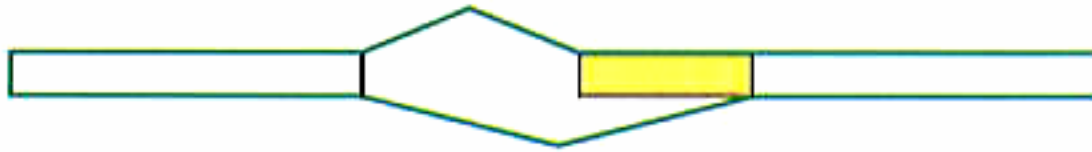
Es wird angenommen, dass prä-RNAs im Spleißosom eine Art Selbst-Spleißen wie in Gruppe II Introns durchlaufen.



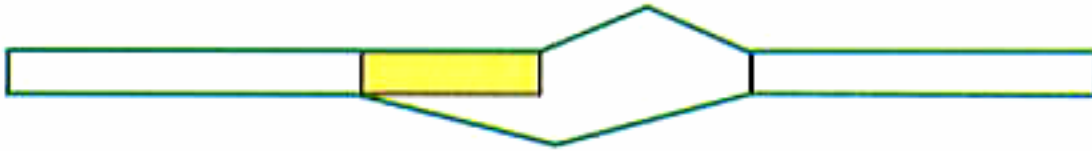
Spleißen und Prozessieren von mRNA

Alternatives Spleißen:

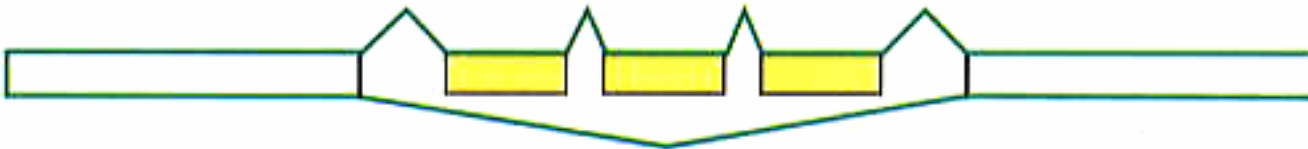
Manche prä-RNAs werden nicht nach einem streng vorgegebenen Schema gespleißt. Aus einer prä-RNA können verschiedene reife mRNAs entstehen.



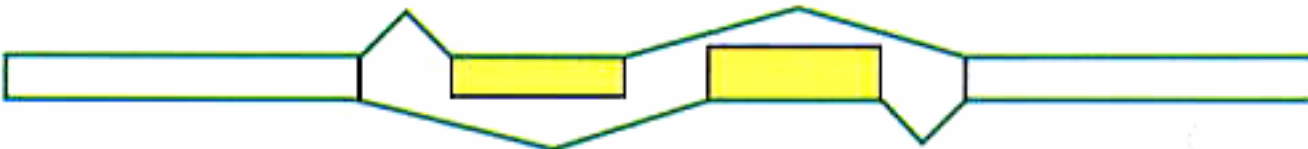
Teil eines Exons wird entfernt oder bleibt erhalten.



Ein Exon wird entfernt oder bleibt erhalten.



1, 2 oder 3 Exons werden entfernt oder bleiben erhalten.

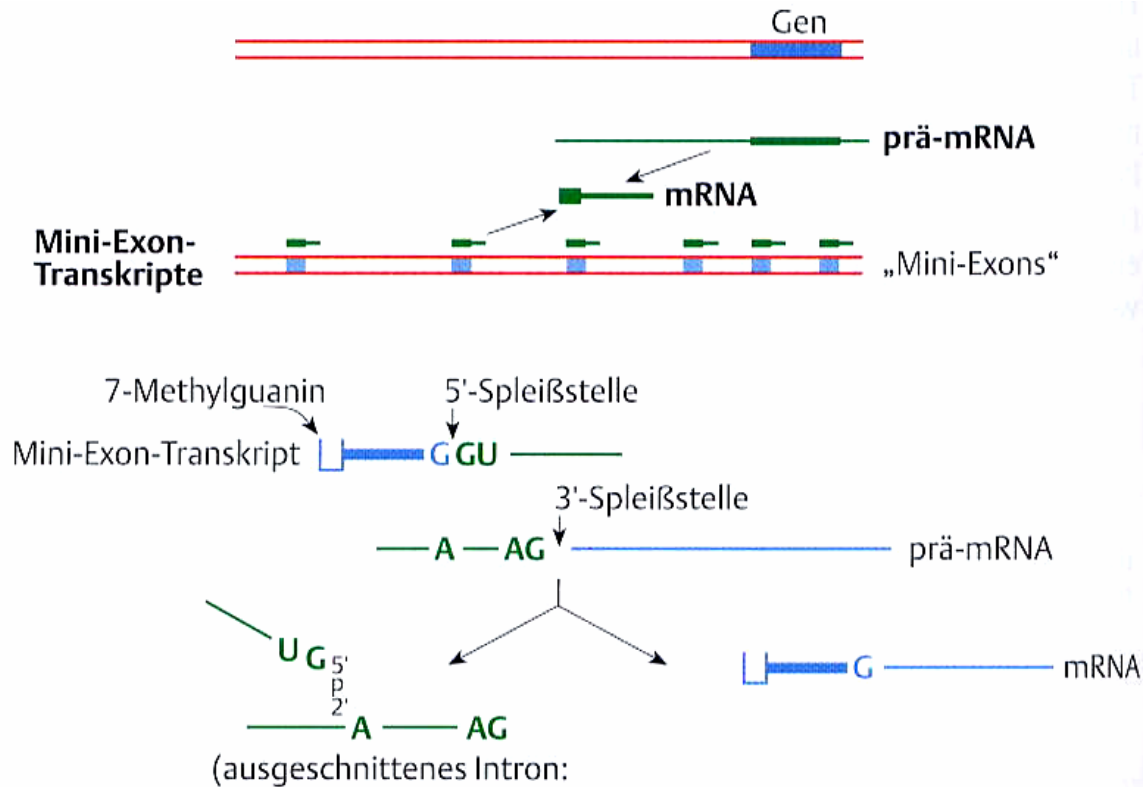


Spleißen und Prozessieren von mRNA

Trans-Spleißen:

Unabhängige Primärtranskripte werden durch Spleißen **miteinander verknüpft**.
Derzeit nachgewiesen in Trypanosomen, bei Rund- und Fadenwürmern und in Chloroplasten.

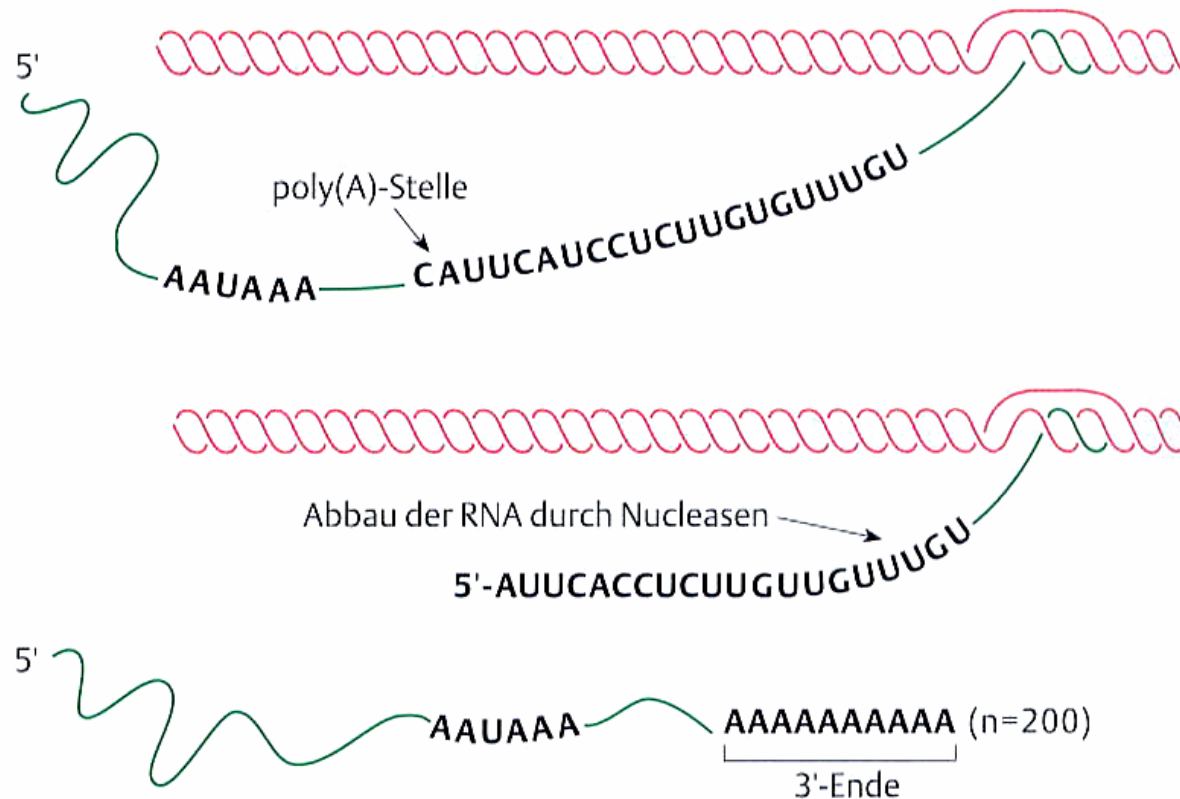
Mini-Exon-Transkripte werden an mRNAs gespleißt.



Spleißen und Prozessieren von mRNA

Das Ende des Transkripts:

Das Ende der prä-mRNA entsteht während der laufenden Transkription. Es erfolgt ein Schnitt an der Polyadenylierungs-Stelle. Am 3'-Ende werden 150-200 Adenylat-Reste angefügt.



Spleißen und Prozessieren von mRNA

3'-prä-RNA Sequenzsignale:

Polyadenylierungs-Signal AAUAAA: Vermittelt die Bindung des CPFS-Proteins

Poly(A)-Stelle CA: RNA wird geschnitten und der Poly(A)-Schwanz angehängt

UU und UG Bausteine: daran binden die CF-Proteine

β-Globin (Kaninchen)

AAUAAA--16 Nucleotide--CAUUCACCUCUUGUGUGUUUGUCUGU

Ovalbumin (Huhn)

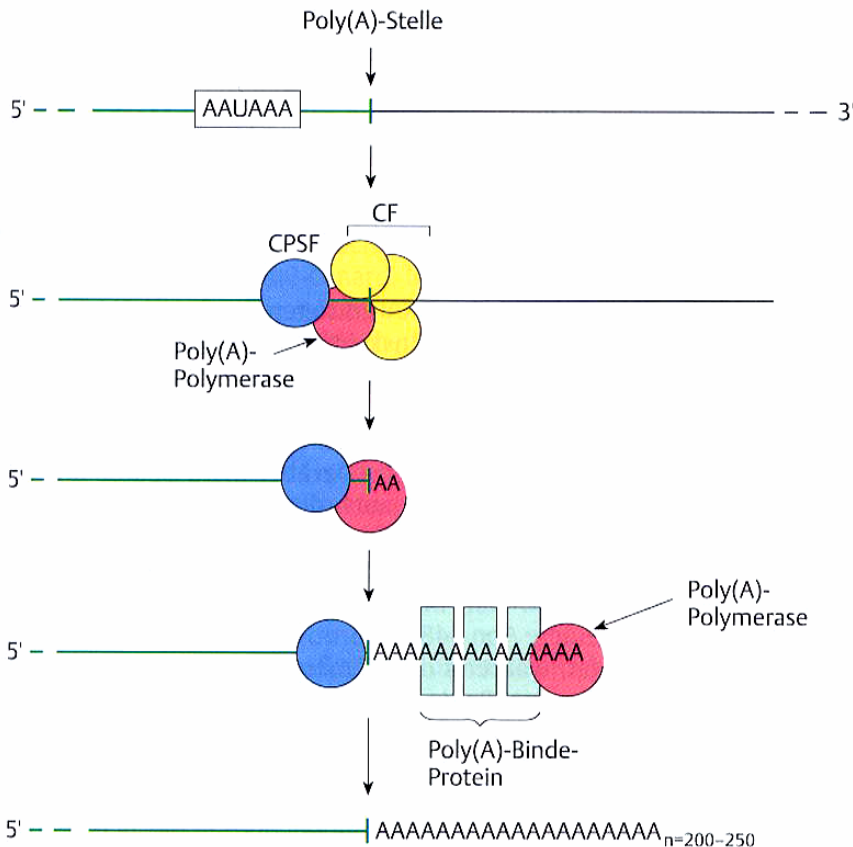
AAUAAA--12 Nucleotide--CAAACACUUUUCACUUGUAGUAUUUGAA

Amylase (Maus)

AAUAAA--16 Nucleotide--CAUAAUUUGGAUUUCCUGUCUUUUATG

Spleißen und Prozessieren von mRNA

Faktoren der Prozessierung am 3'-OH-Ende:



CPSF (*cleavage and polyadenylation specificity factor*): Bindet an AAUAAA und rekrutiert CF-Proteine

CFI und CFII (cleavage stimulation factor) führen die Endonucleolytische Spaltung der RNA durch.

Poly(A)Polymerase: Heftet Adenin-Bausteine an die RNA

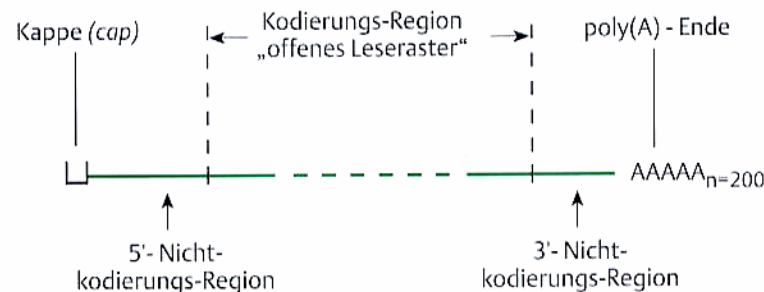
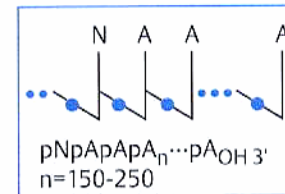
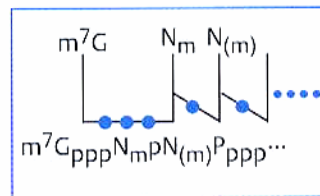
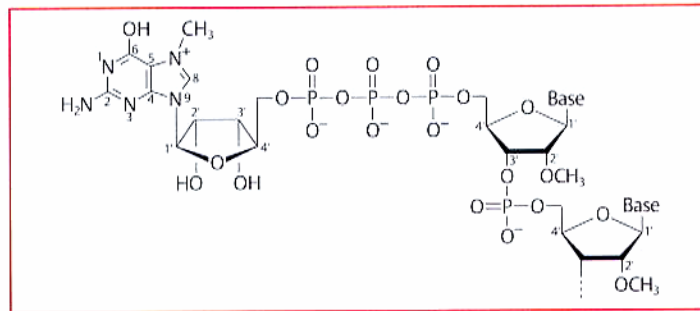
Schritt 1: Anheften von ca. 10 Adenin-Bausteinen.

Schritt 2: Anlagern von Poly(A)-Bindeproteinen und Verlängerung des Poly(A)-Schwanzes um bis zu 200 Adenin-Reste

Spleißen und Prozessieren von mRNA

Die mRNA im Cytoplasma:

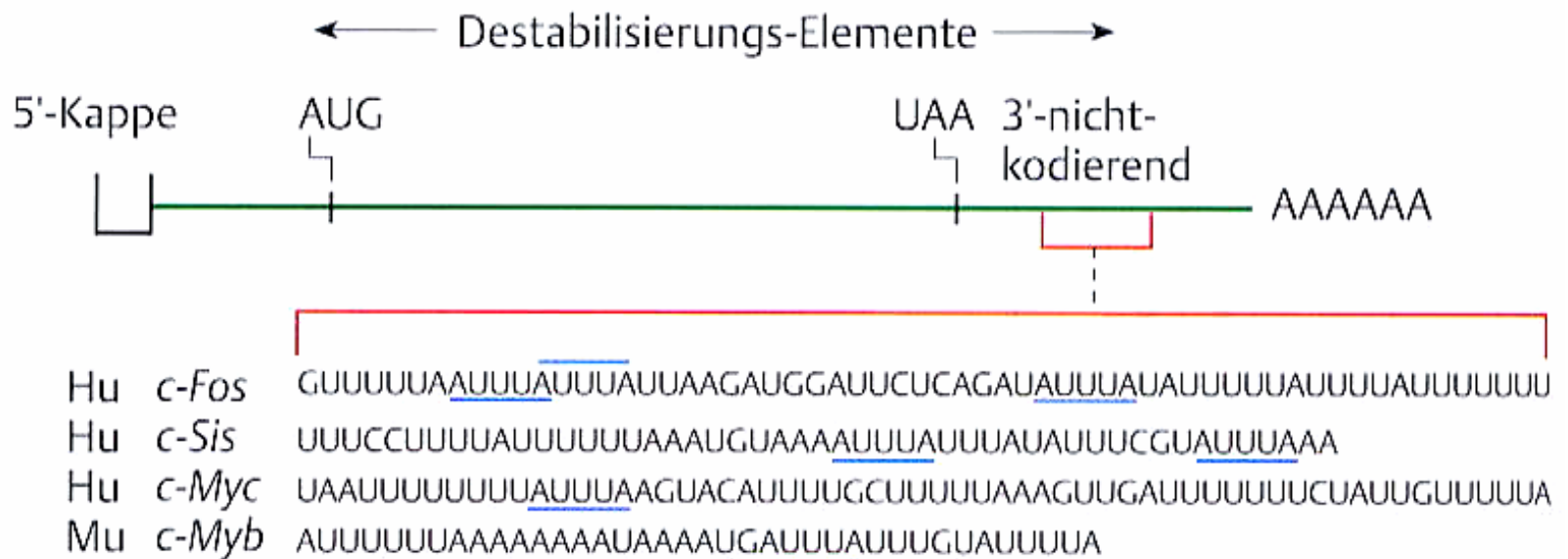
Das 5'-Ende einer eukaryontischen mRNA beginnt mit einer **7-Methylguanosinium-Kappe**. Diese ist mit dem nächsten Nucleotid über eine **5'-5'-Triphosphat-Brücke** verknüpft.



Spleißen und Prozessieren von mRNA

Die Stabilität von RNA:

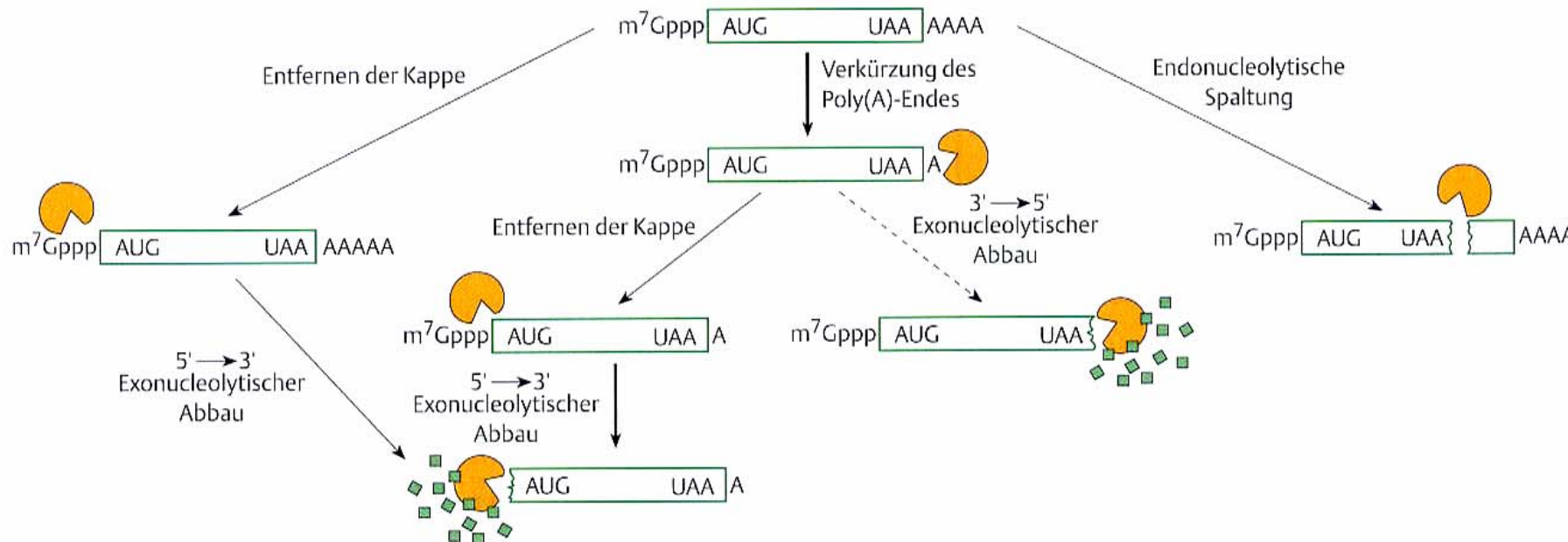
Destabilisierungselemente befinden sich besonders im 3'-Bereich von kurzlebigen RNAs



Spleißen und Prozessieren von mRNA

Wege des Abbaus von mRNA:

Entfernung des Poly(A)-Endes, 3'-5'- oder 5'-3'-exonucleolytischer Abbau, Entfernung der 5'-Kappe, endonucleolytischer Abbau.



Spleißen und Prozessieren von mRNA

Regulations-Proteine :

Proteine die an mRNA-Schleifen binden, beeinflussen die Stabilität von mRNA

TR-mRNA

