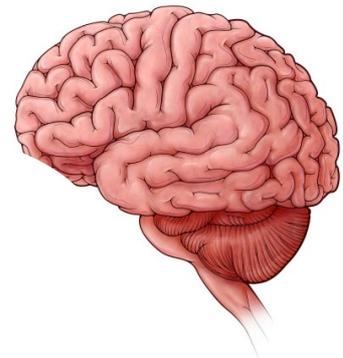


# Neurowissenschaften

- Was macht unser Gehirn so einzigartig?
- Welche Funktionen werden wie ausgeübt?
- Wie entsteht das Gehirn?
- Welche Zelltypen gibt es?
- Warum sind Neurone postmitotisch?
- Wie verdrahtet sich das Gehirn?
- Was ist Gedächtnis?
- Wie wird Verhalten gesteuert?
- Wie wird Individualität gesteuert?

# Neurowissenschaften

- Was macht unser Gehirn so einzigartig?
- Welche Funktionen werden wie ausgeübt?
- Wie entsteht das Gehirn?
- Welche Zelltypen gibt es?
- Warum sind Neurone postmitotisch?
- Wie verdrahtet sich das Gehirn?
- Was ist Gedächtnis?
- Wie wird Verhalten gesteuert?
- Wie wird Individualität gesteuert?



Mensch

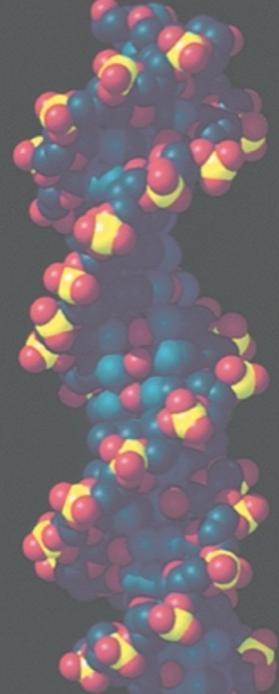
$10^{11}$

Zahl der Zellen:

- Was muss man machen?
- Manipulation einzelner Nervenzellen.
- Messen von Aktivität und Verhalten.

# Einführung in die Molekulargenetik

Folien -> unsere homepage, Passwort: Drosophila



„Klassische Genetik“	Was ist ein Gen, Mutation,
<b>Rekombination</b>	Cre/Lox FRT/FLP Anwendung Transgene Organismen
<b>Chromosomen</b>	Aufbau und Modifikationen
<b>Transkription</b>	Regulation, Methoden
<b>Splicing</b>	Beispiele
<b>RNAi/CRISPR</b>	Mechanismen, Anwendungen
<b>Translation</b>	Mechanismus, Regulation
<b>Signalkaskaden</b>	Notch, RTK, Wnt, Hh, TGFβ
Nervensystementwicklung von Drosophila	

# Einführung in die Molekulargenetik

## **Bücher:**

Knippers

Molekulargenetik (49,95 €)

Janning/Knust

Genetik (39,95 €)

Alberts et al.,

Molecular Biology of the Cell (82,50 €)

**Squire et al.,**

**Fundamental Neuroscience (80,00 €)**

# Gene kontrollieren den Phänotyp



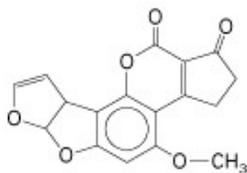
Hypertrichose

Um Gene zu „sehen“ brauchen wir Mutationen !

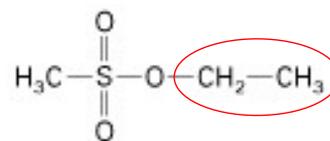
## Mutagene Stoffe wirken direkt oder indirekt



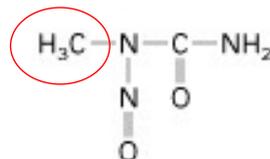
3,4 Benzopyren



Aflatoxin B<sub>1</sub>



Ethylmethansulfonat (EMS)

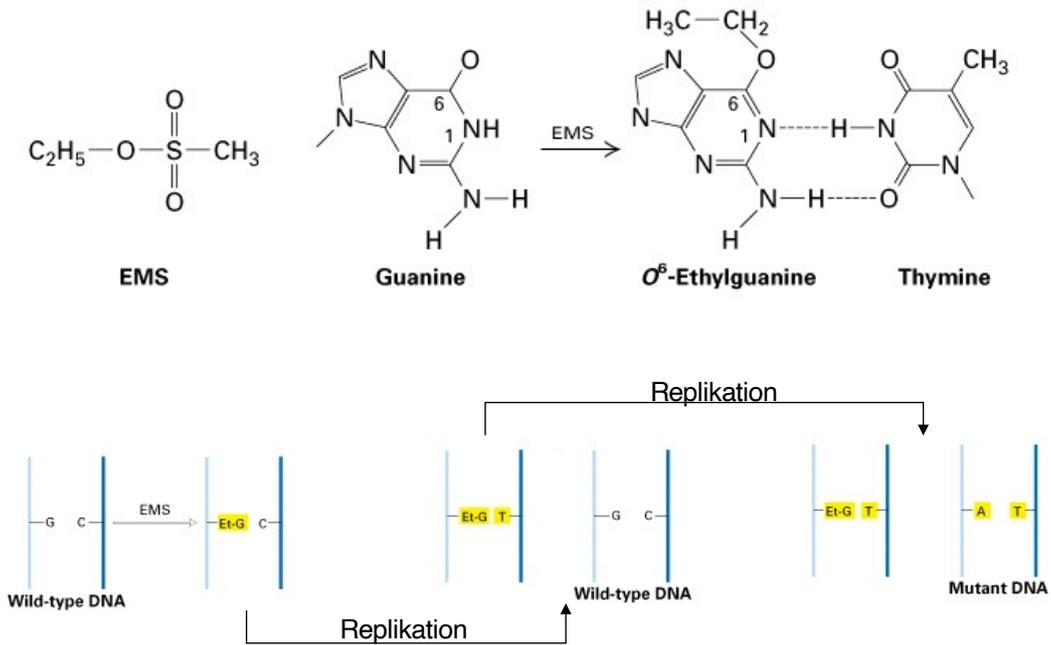


Methyl-nitroharnstoff  
Methyl-nitrosourea (MNU)  
Ethyl-nitrosourea (ENU)

UV Licht →  
Thymindimere

Röntgen-Strahlung →  
Chromosomale Abberationen

# EMS induziert G ->A Austausch



# C->T Mutation nach (spontaner) Desaminierung von Cytosin



Reparatur zu Thyminid

RNA editing

Antiviral wirkende Enzymaktivität !

# Weitere Möglichkeiten der Mutagenese

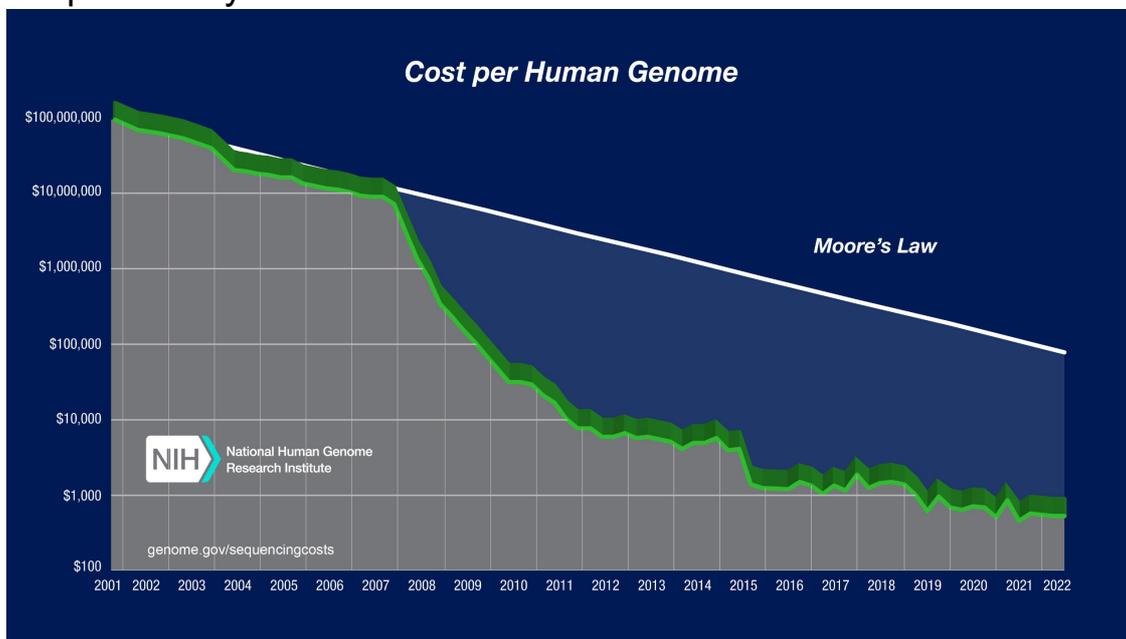
Transposons, mobile DNA

TALEN, CRISPR

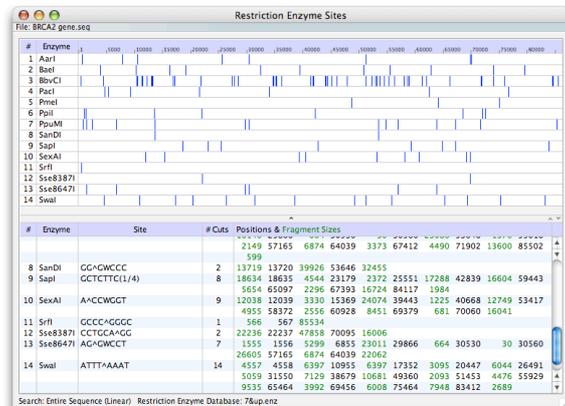
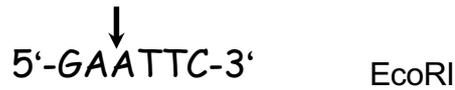
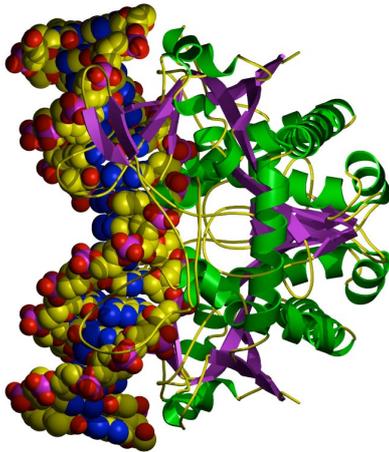
Gene targeting -> homologe Rekombination

## Detektion von Mutationen:

### Sequenzanalyse



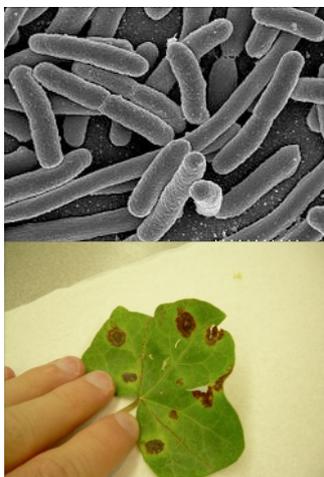
# Restriktionsenzyme



Abwehrsystem von Prokaryoten. Restriktionsenzyme sind Endonukleasen. Schutz der endogenen DNA durch Methylasen.

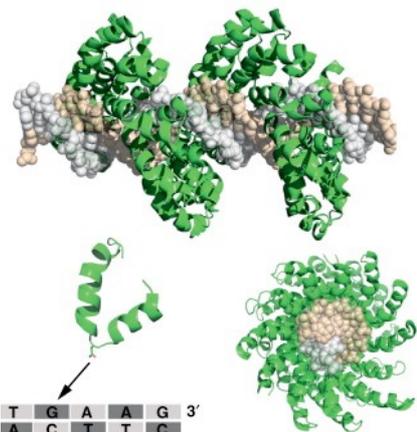
Typ I- Typ IV Restriktionsenzyme. In der Molekulargenetik werden Typ II Enzyme verwendet. Erkennungssequenz 4-6 (8) bp  
**Homing Endonukleasen: I-Sce I**  
 Erkennungssequenz: 18 bp (1 / 7x10<sup>10</sup>)

# TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)

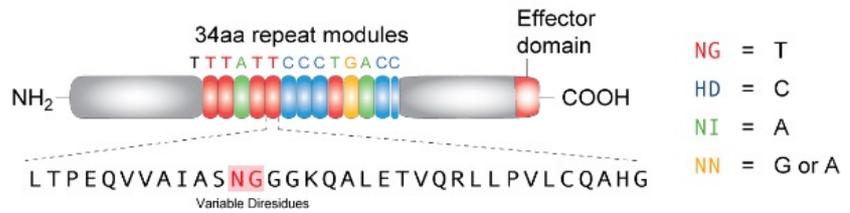
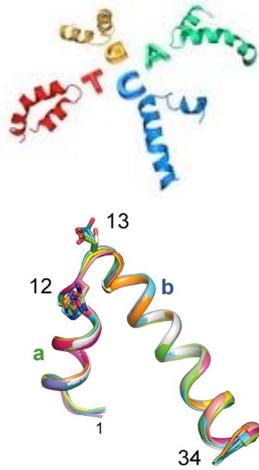


**TAL (transcription activator-like)** Effektoren sind Proteine die von *Xanthomonas* Bakterien sezerniert werden um pflanzliche Wirtszellen zu infizieren. TAL Proteine binden in den Pflanzenzellen Promotoren und aktivieren die Transkription.

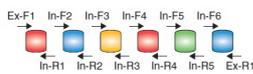
TAL Effektoren erkennen die DNA durch eine ca 34 Aminosäuren große Proteindomäne in der nur zwei Aminosäuren die Bindungsspezifität vermitteln.



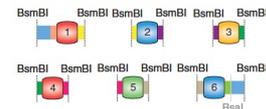
# Herstellung eines Proteins mit einer definierten DNA Bindungssequenz



## Golden Gate cloning



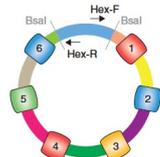
Stage 2 | Procedure Steps 10–15



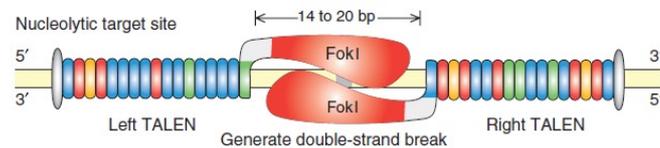
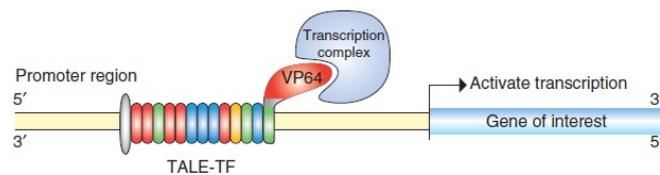
Stage 3 | Procedure Steps 16–17



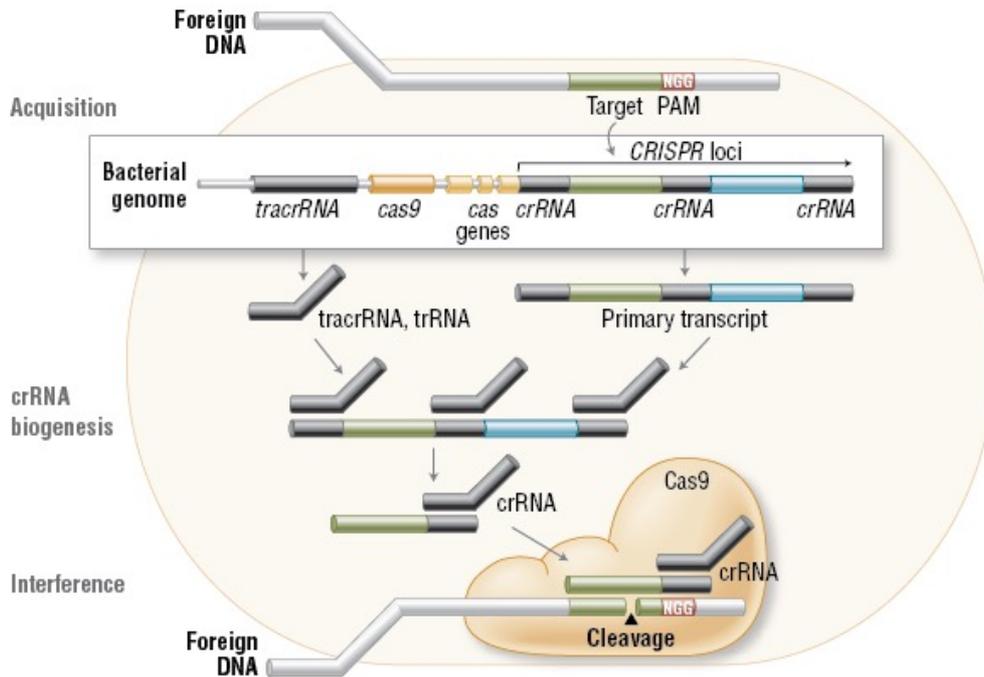
Stage 4 | Procedure Steps 18–25



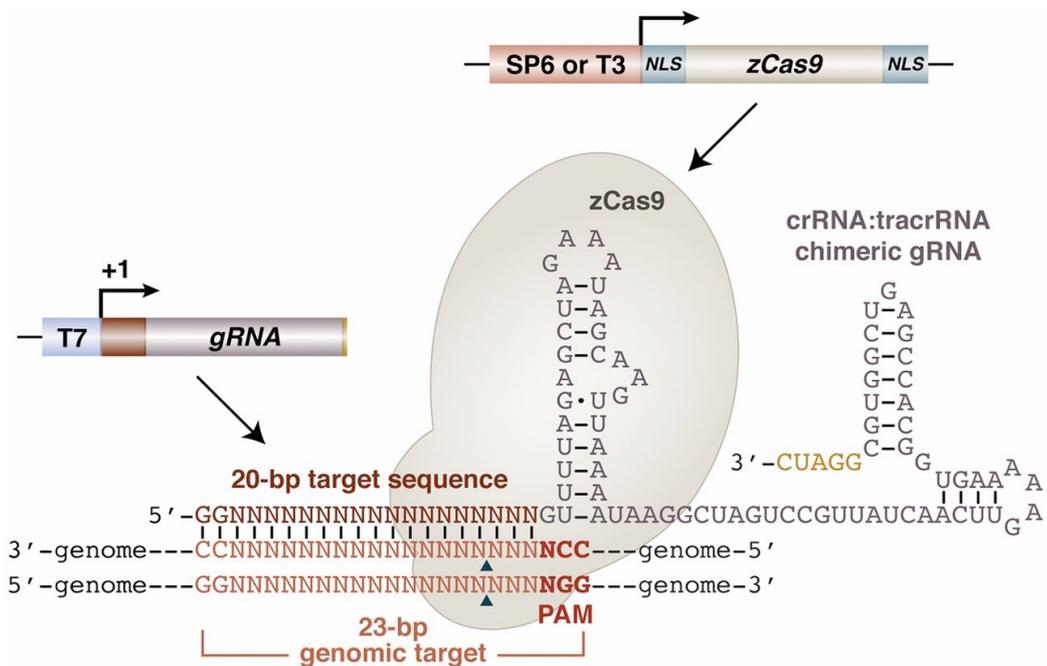
Restriction Enzyme Bsu I



# CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)



## CRISPR associated (Cas)



# Die Möglichkeiten der Genetik



G. Mendel

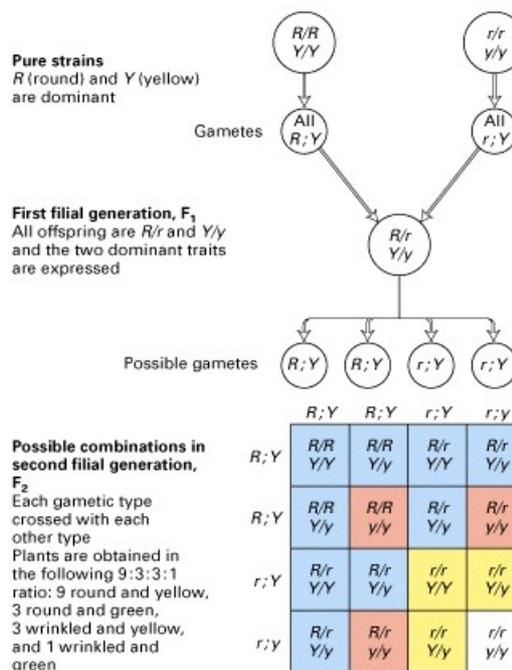
Gene  
Mutationen,  
Allele

Kreuzungsgenetik

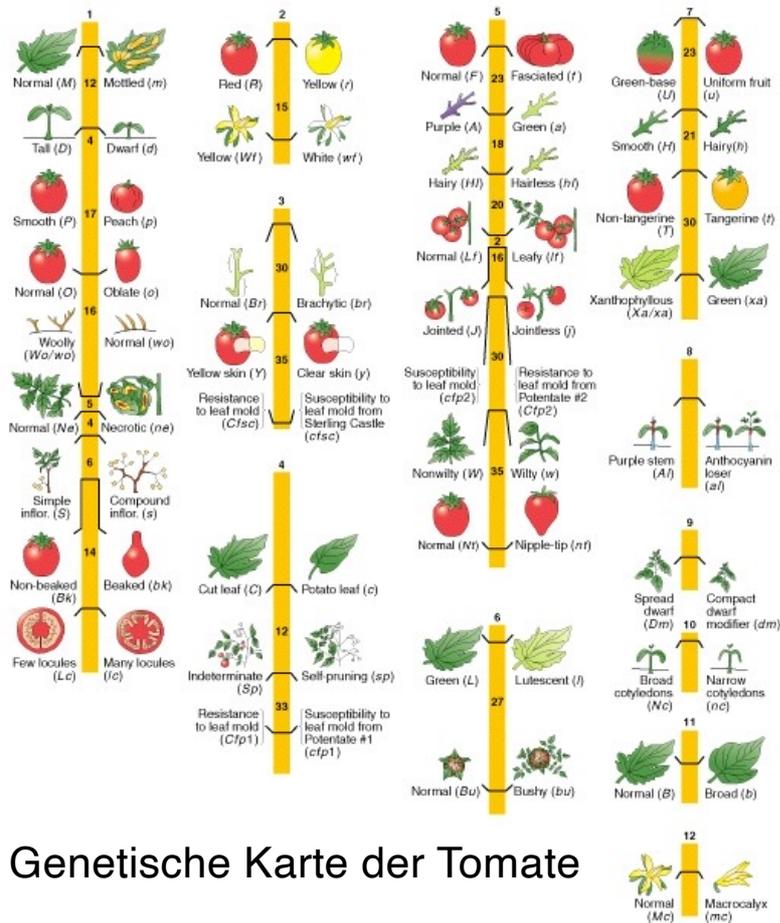
Rezessiv

Dominant

## Ungekoppelte Allele



9:3:3:1

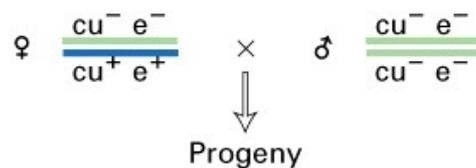


Gekoppelte Allele auf einem Chromosom! werden gemeinsam vererbt, es sei denn, es tritt Rekombination auf



Genetische Karte der Tomate

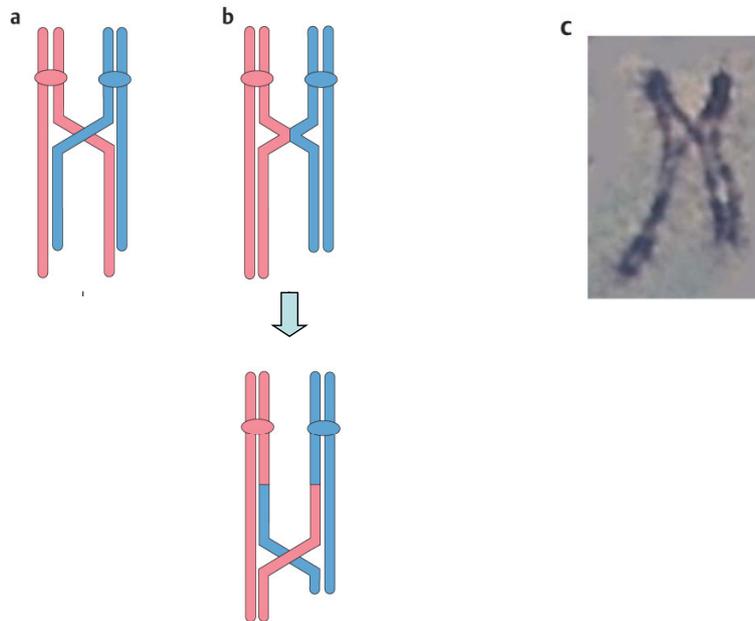
## Genetische Kartierung durch Rekombination



Phenotype	Genotype		Total
	From ♀	From ♂	
Parental: curled wings, dark body	<u>cu<sup>-</sup> e<sup>-</sup></u>	<u>cu<sup>-</sup> e<sup>-</sup></u>	389
normal wings, normal body	<u>cu<sup>+</sup> e<sup>+</sup></u>	<u>cu<sup>-</sup> e<sup>-</sup></u>	414
Recombinant: curled wings, normal body	<u>cu<sup>-</sup> e<sup>+</sup></u>	<u>cu<sup>-</sup> e<sup>-</sup></u>	104
normal wings, dark body	<u>cu<sup>+</sup> e<sup>-</sup></u>	<u>cu<sup>-</sup> e<sup>-</sup></u>	93
			<u>1000</u>

$$\begin{aligned} \text{Genetischer Abstand} &= \frac{\sum \text{Rekombinanten}}{\sum \text{Rekombinanten} + \sum \text{Parentalgenotyp}} \times 100 \\ &= \frac{104 + 93}{1000} \times 100 = 19,7 \text{ centimorgan (cM)} \end{aligned}$$

# Erst Cross Over dann Strangtausch



## Rekombination

### **Homologe Rekombination**

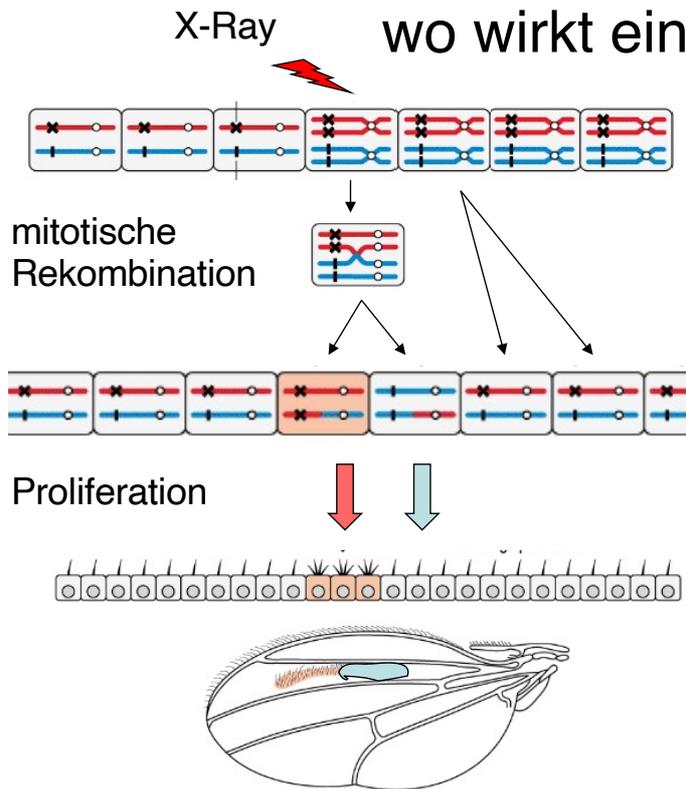
Rekombination zwischen identischen DNA Sequenzen (in trans, zwei Chromosomen).  
In der Meiose aber auch in der Mitose.....

### **Illegitime Rekombination**

Rekombination ohne Sequenzübereinstimmung  
Kurze Sequenzidentitäten **Rekombinase**

Rekombination in Cis und Trans möglich

# Rekombination während der Mitose, wo wirkt ein Gen?



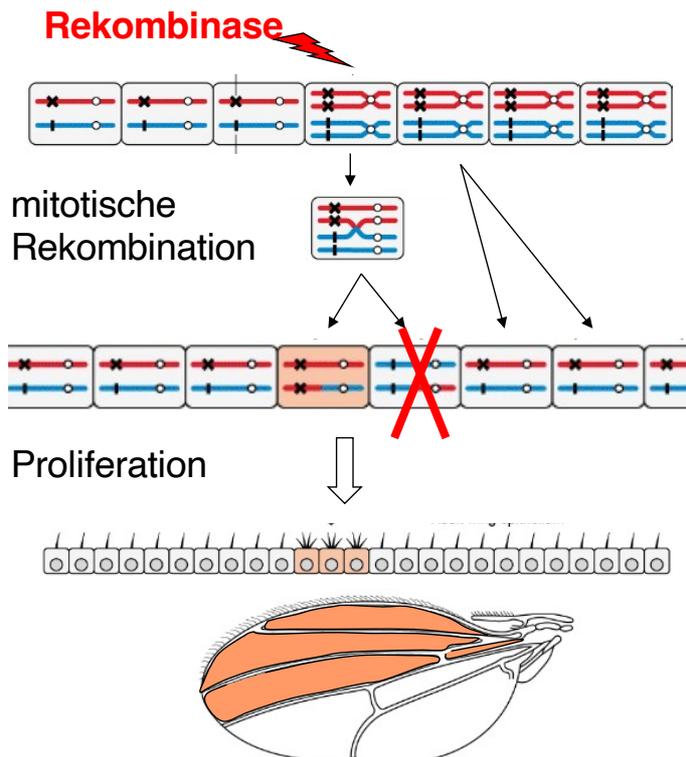
Um in einem heterozygoten Tier einen Teil homozygot zu machen verwendet man die **Mitotische Rekombination**.

Twin spots; Zwillingsfleck

Diese sogenannte **klonale Analyse** hilft Fragen nach der **Zellautonomie** einer Genfunktion zu klären.

Nachteil: Geringe Frequenz

# Wie bekommt man mehr Klone?



Der Einsatz einer **Rekombinase** und der entsprechenden Zielsequenzen führt zu einer sehr hohen Klonausbeute  
**Flp** (Hefe) -> **FRT**  
**Cre** (Phage) -> **LoxP**.

*Minute* Technik

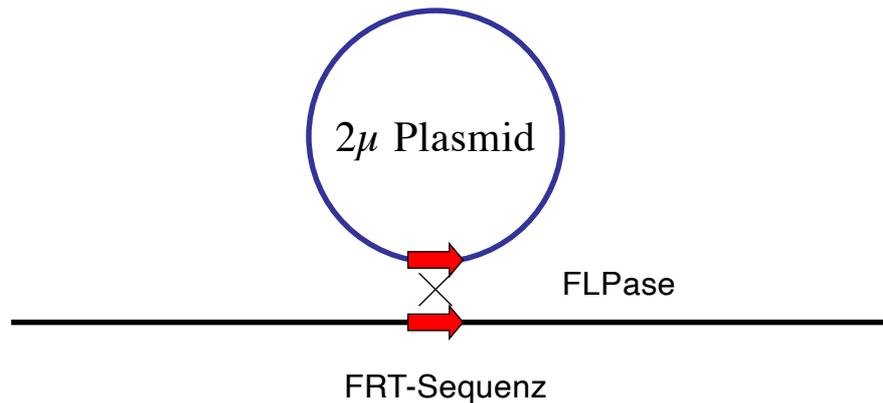
# Rekombinationssysteme

## 1) Rekombination des Hefe $2\mu$ Plasmids

50-100 Kopien / *Saccharomyces cerevisiae* Zelle

6.318 bp groß; kodiert 4 Proteine,

darunter die sequenzspezifische Rekombinase **FLP**, die eine 14 bp lange **FRT** Rekombinationssequenz erkennt.

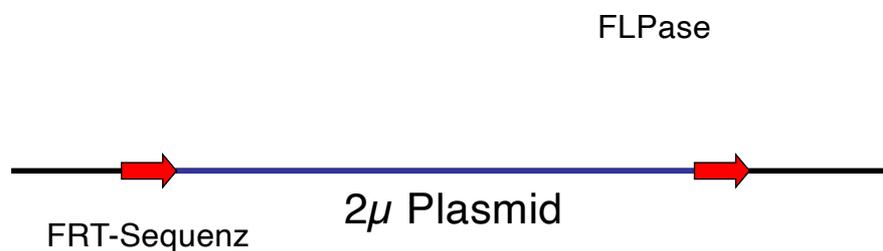


# Rekombinationssysteme

## 1) Rekombination des Hefe $2\mu$ Plasmids

Die sequenzspezifische Rekombinase **FLP** induziert einen DNA Strangbruch (Rekombination) und bewirkt die Integration des Plasmids.

Die Integration ins Chromosom ist reversibel.

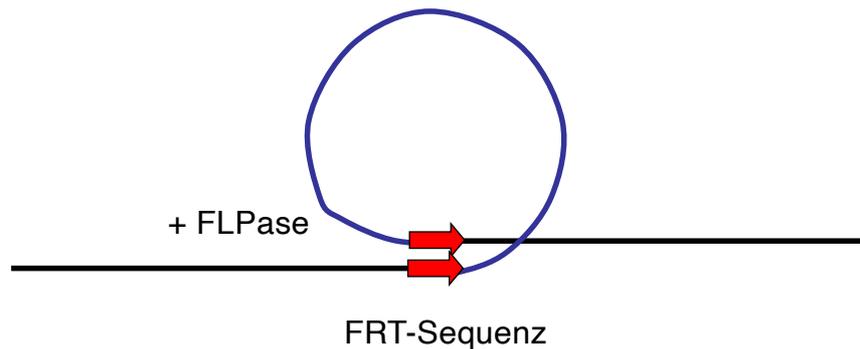


# Rekombinationssysteme

## 1) Rekombination des Hefe $2\mu$ Plasmids

Wenn die **FRT-Sequenzen** in Tandem angeordnet sind kommt es zu einer Deletion des  $2\mu$  Plasmids.

Wenn die **FRT-Sequenzen** invertiert vorliegen, wird der eingeschlossene DNA Bereich umgedreht.

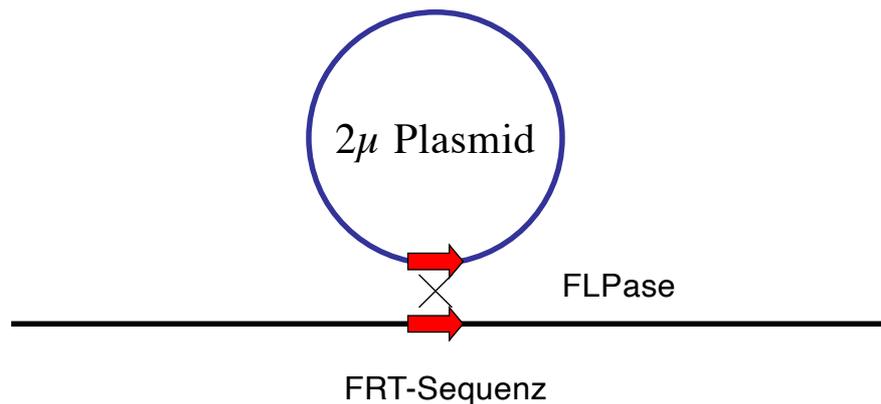


# Rekombinationssysteme

## 1) Rekombination des Hefe $2\mu$ Plasmids

Wenn die **FRT-Sequenzen** in Tandem angeordnet sind kommt es zu einer Deletion des  $2\mu$  Plasmids.

Wenn die **FRT-Sequenzen** invertiert vorliegen, wird der eingeschlossene DNA Bereich umgedreht.

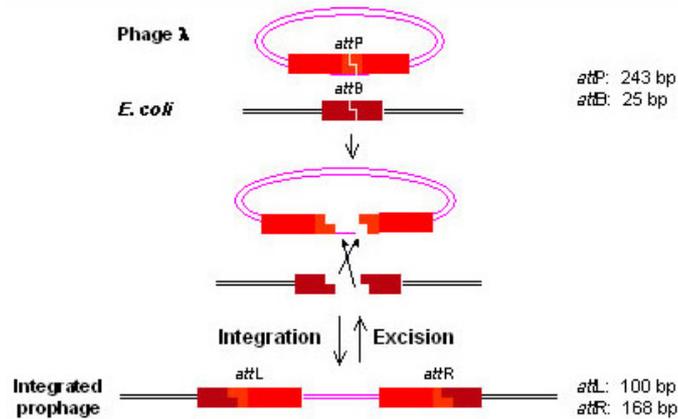


# Rekombinationssysteme

## 2) Rekombination bei Prokaryoten

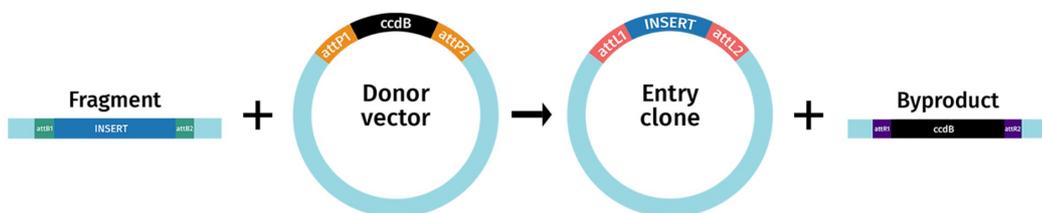
Integration temperenter Phagen z.B. Lambda

**Integrase** vom *int* Gen kodiert, benötigt den integration host factor (IHF), der aus zwei Proteinen zusammengesetzt ist. Erkennt die *attP* und *attB* sites. Öffnung des DNA Doppelstrangs über eine 3' Phosphodiesterbindung an einem Tyr-Rest.

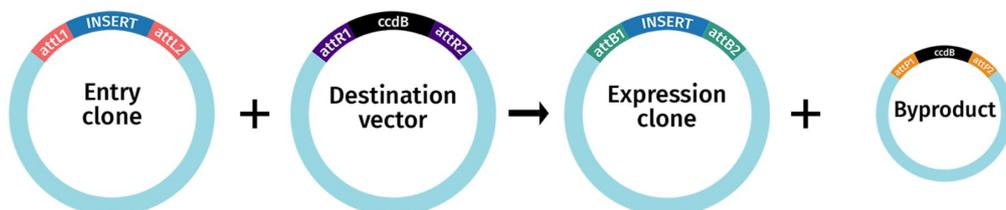


## Gateway-System

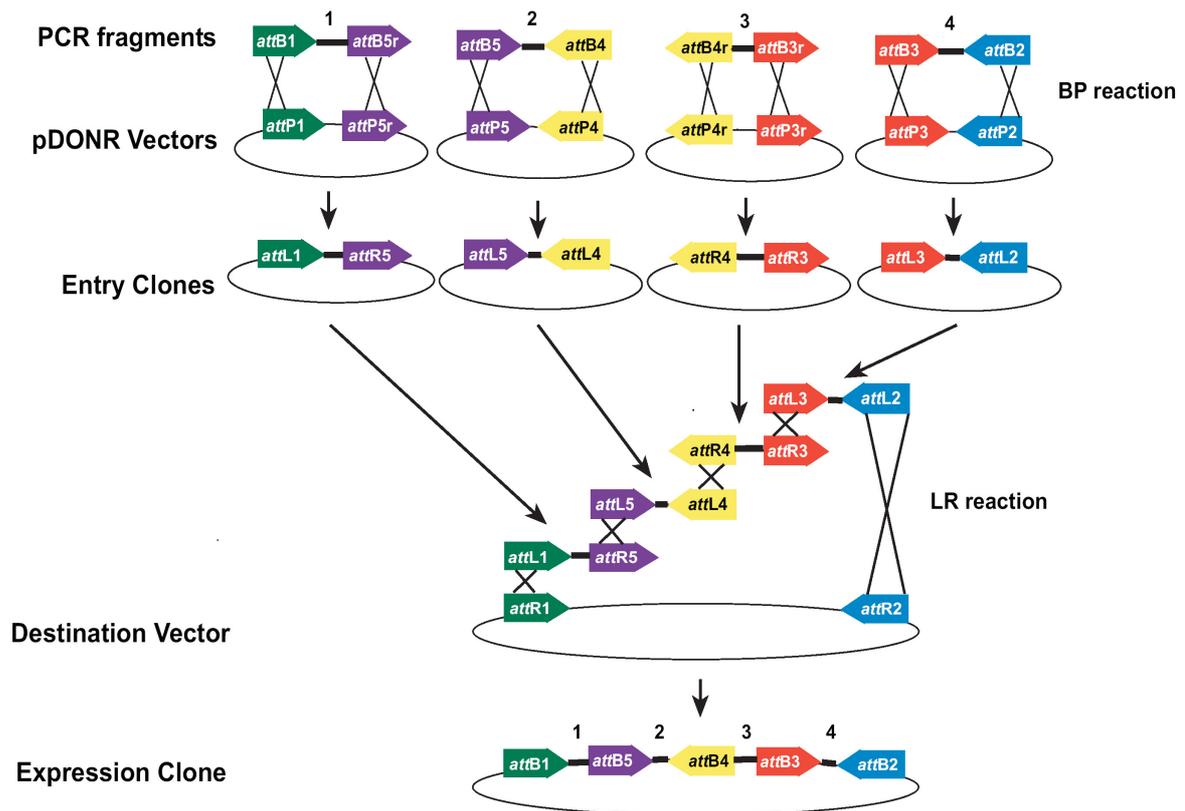
### Step 1: BP Reaction



### Step 2: LR Reaction



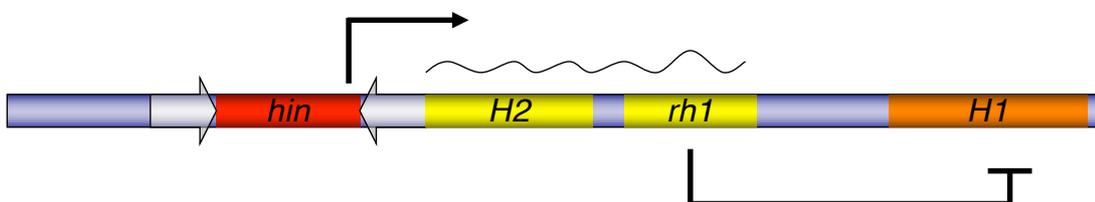
# MultiSite Gateway



## Rekombinationssysteme

### 2) Rekombination bei Prokaryoten

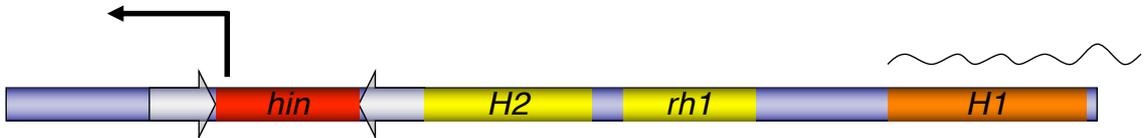
**Invertasen:** Änderung des Phänotyps durch Inversion eines DNA Fragmentes. Bis auf **Cre** und **FLP** Enzyme benötigen diese Enzyme supercoil DNA zur Bindung.  
z.B. **Invertase Hin** bei *Salmonella* (oder Gin Page Mu).



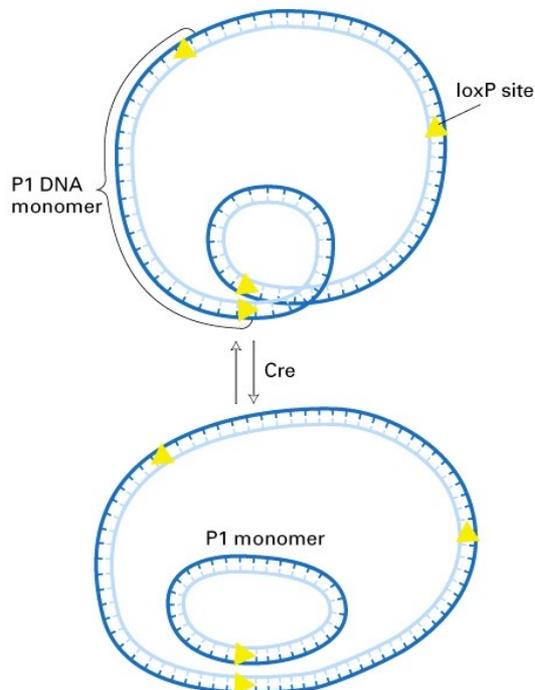
# Rekombinationssysteme

## 2) Rekombination bei Prokaryoten

**Invertasen:** Änderung des Phänotyps durch Inversion eines DNA Fragmentes. Bis auf **Cre** und **FLP** Enzyme benötigen diese Enzyme supercoil DNA zur Bindung.  
z.B. **Invertase Hin** bei *Salmonella* (oder Gin Page Mu).



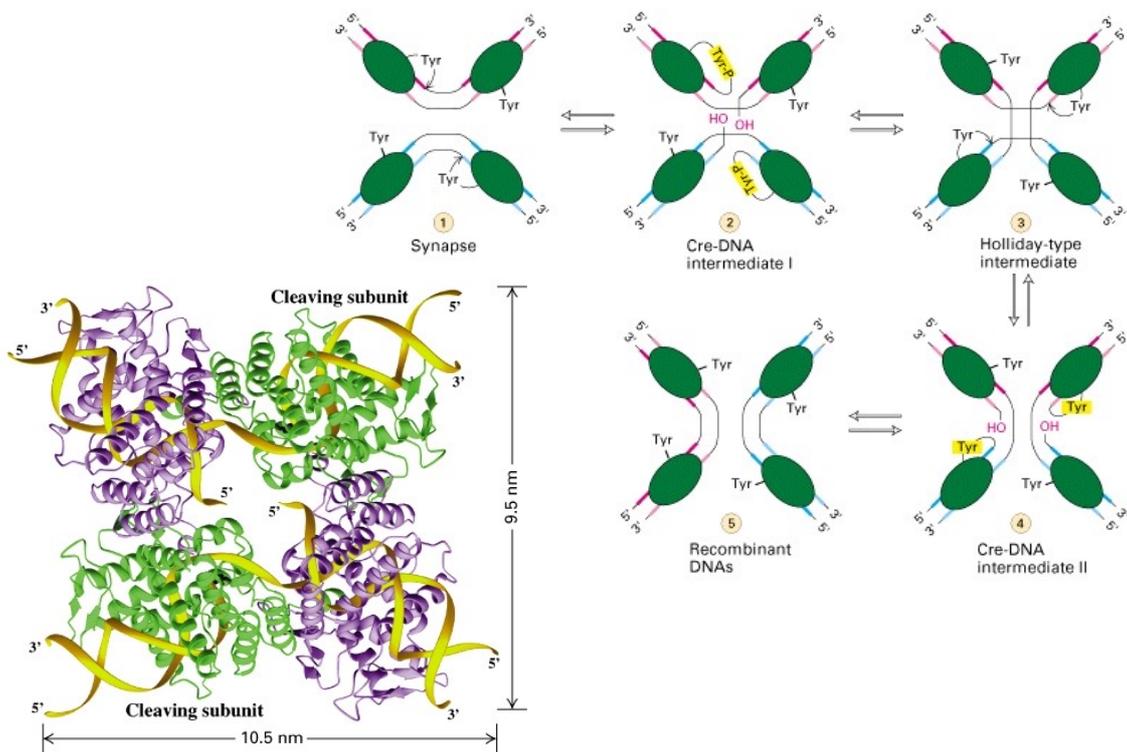
# Rekombinationssysteme



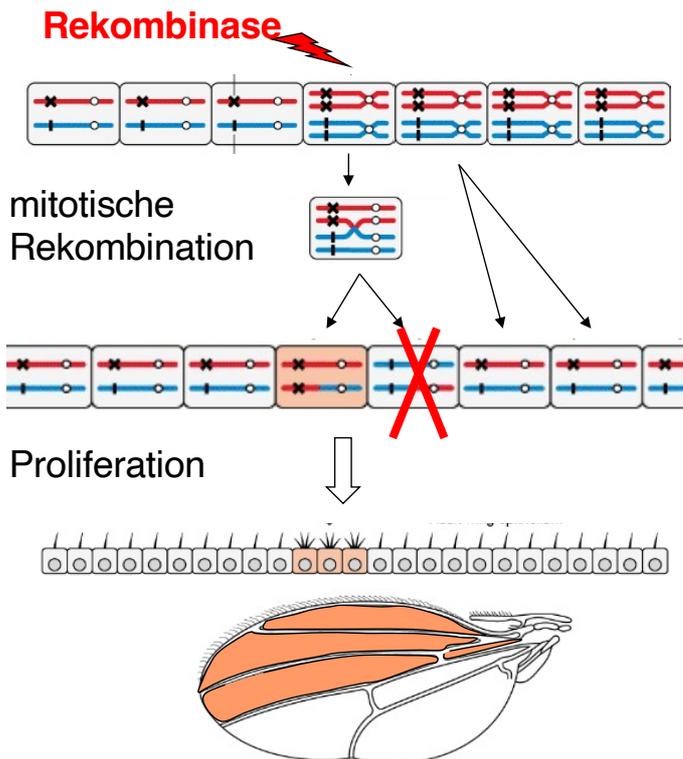
Phage P1

Auflösung der *rolling circle* Replikationsstruktur durch **Cre Rekombinase** die an die **loxP** site bindet.

# Mechanismus der Cre Rekombinase



## Wie bekommt man mehr Klone?

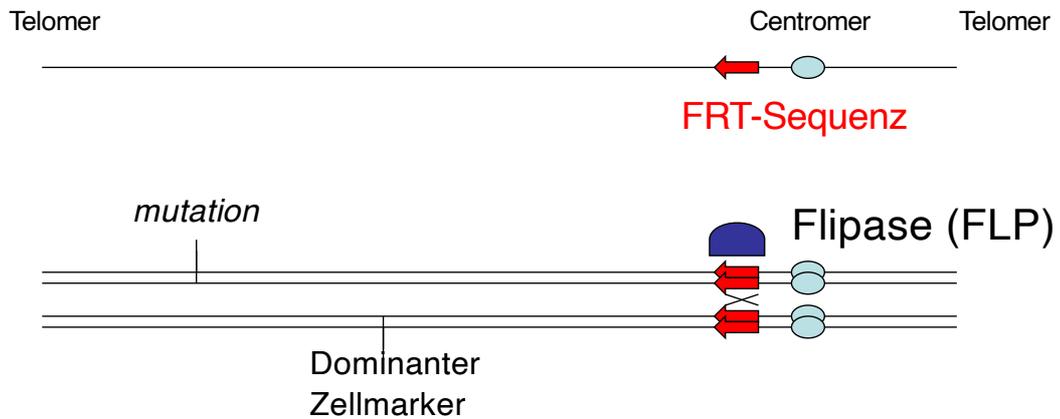


Der Einsatz einer **Rekombinase** und der entsprechenden Zielsequenzen führt zu einer sehr hohen Klonausbeute

**Flp** (Hefe) -> **FRT**  
**Cre** (Phage) -> **LoxP**.

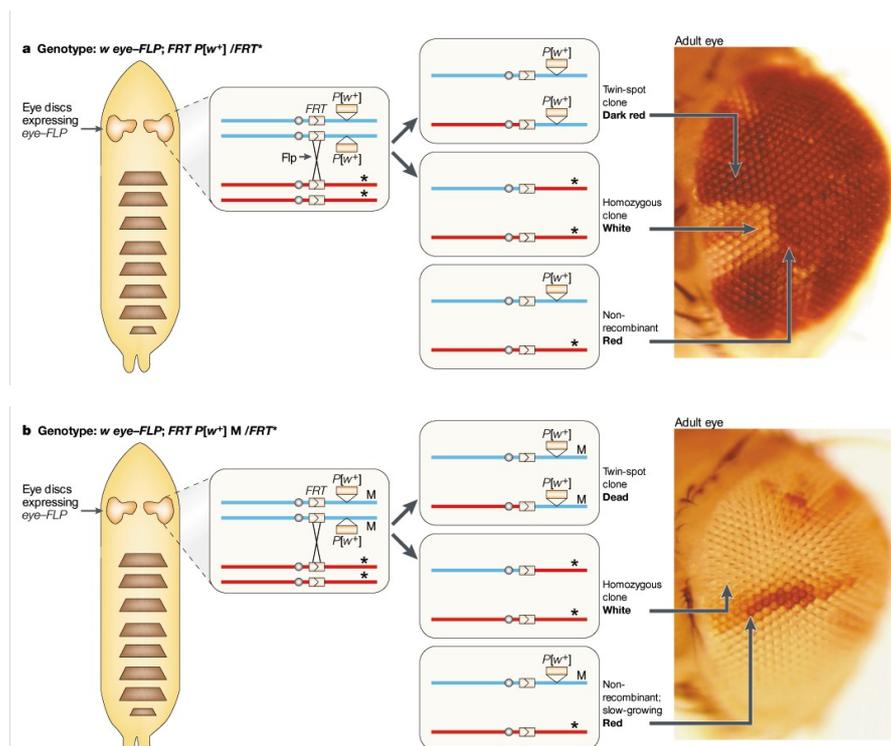
*Minute* Technik

# Sequenzspezifische, mitotische Rekombination in *Drosophila*



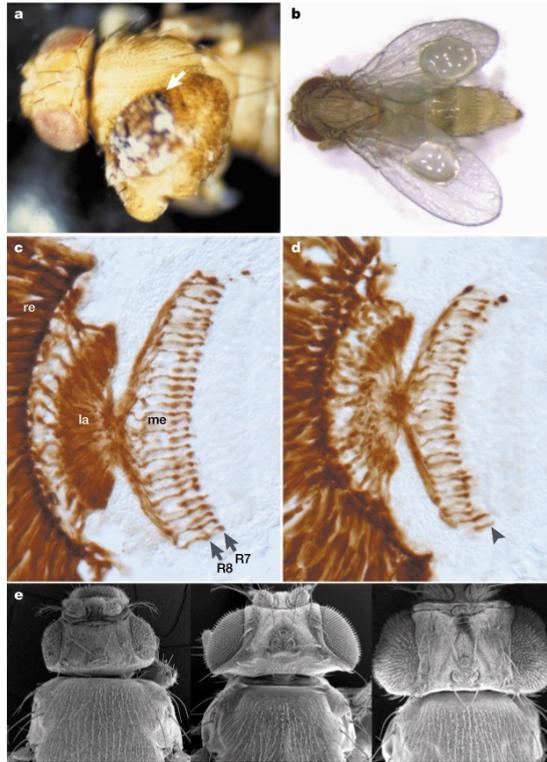
Während der Mitose kommt es zur Verdopplung der Chromatiden. Anschließend kann FLP eine mitotische Rekombination induzieren.

## Das FRT/FLP System in *Drosophila*



Die Verwendung der **Minute-Technik** erlaubt die Erzeugung großer mutanter Klone.

# Das FRT/FLP System, Beispiele



## Mitotische Rekombination: MARCM Technik

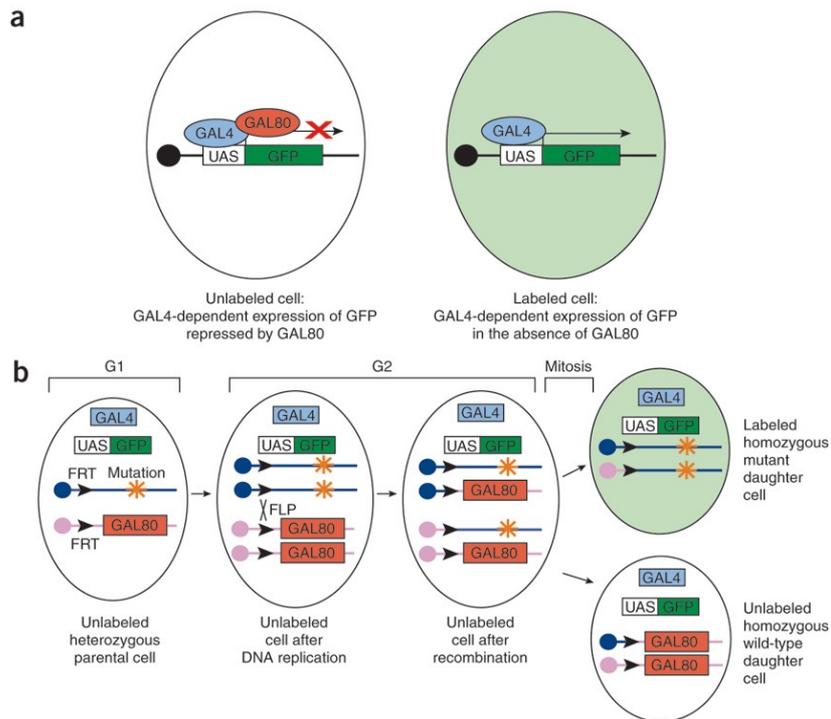
MARCM: Mosaic analysis with a repressible cell marker

Ermöglicht die spezifische Markierung der mutanten Zellklone mit Hilfe von Gal4/Gal80

Gal4 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Hefe

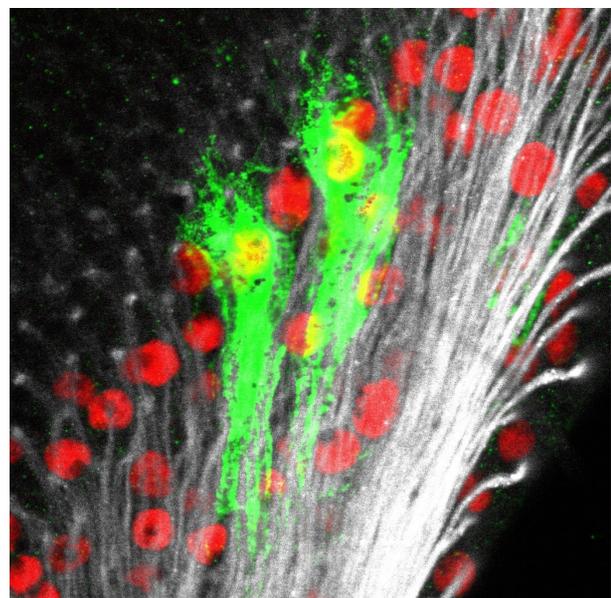
Gal80 ist ein Inhibitor dieses Transkriptionsfktors

# Mitotische Rekombination: MARCM Technik

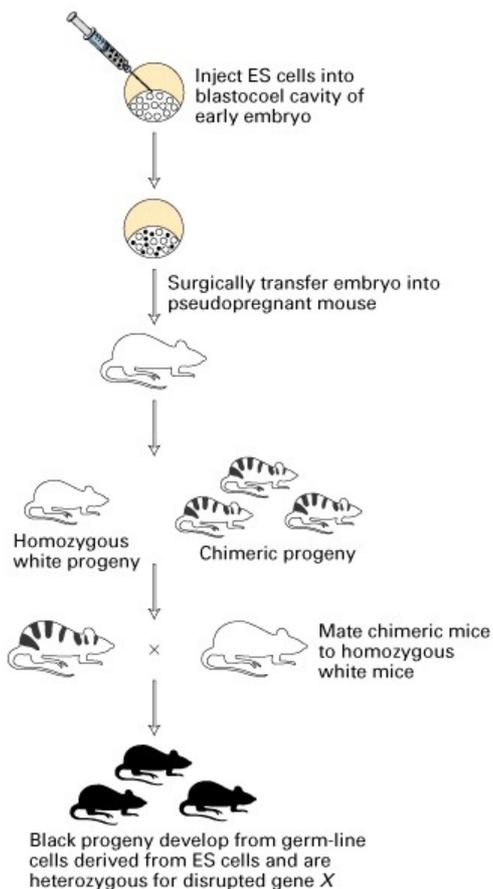
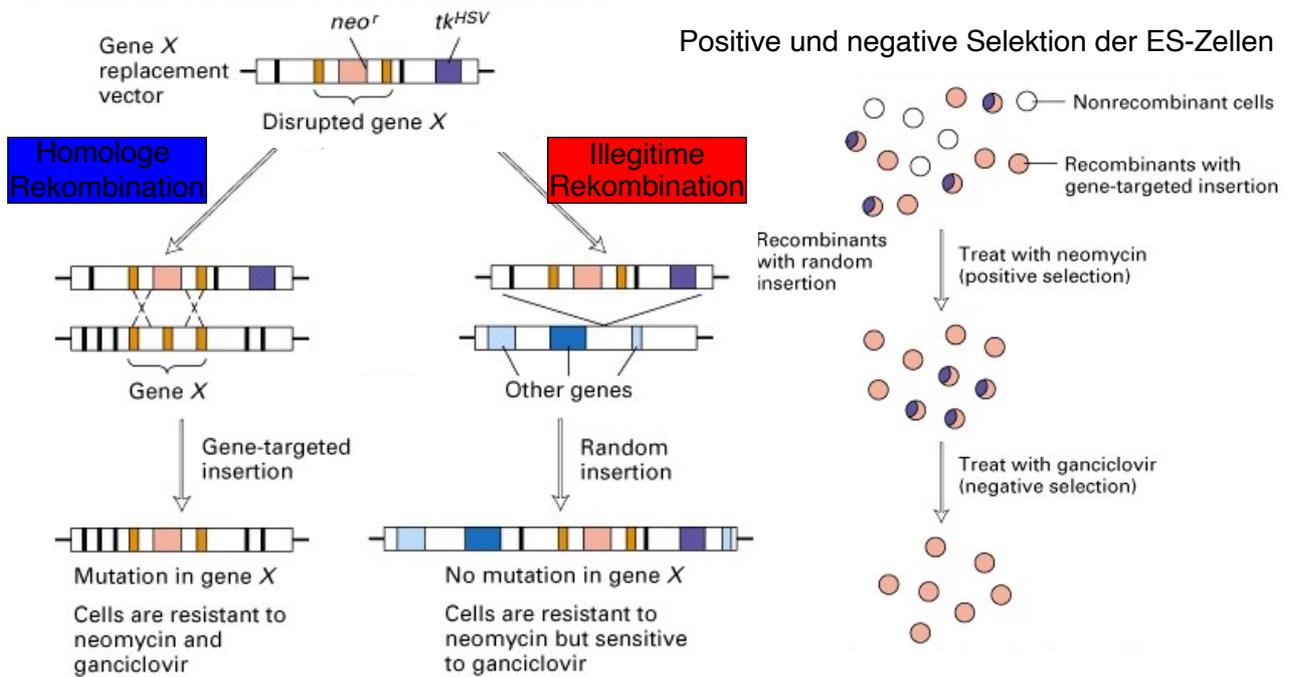


# Mitotische Rekombination: MARCM Technik

In der F1 kann die phänotypische Konsequenz einer Mutation in Zellklonen untersucht werden.



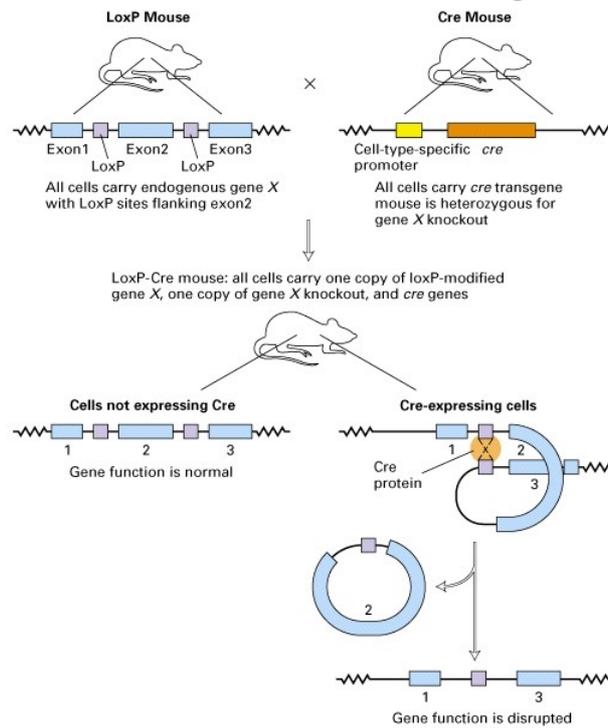
# Knockout (KO) Strategie durch homologe Rekombination in ES-Zellen



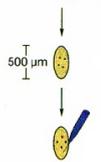
## Der Weg zur KO Maus

Die richtigen Genotypen müssen durch PCR (Schwanzspitze) bestimmt werden.

# Rekombination in Cis bei der konditionalen Geninaktivierung

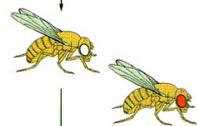


# Die Keimbahntransformation bei Drosophila über Transposon-Integration und illegitime Rekombination

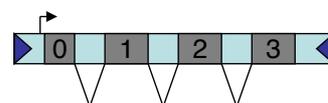


Mikroinjektion P-Element Vektor

Das P-Element kodiert eine Transposase, die an einem 31 bp langen terminalen *inverted repeat* angreift.

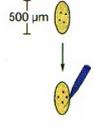


Einige der sich entwickelnden Fliegen tragen das Transgen in ihrer Keimbahn



*Drosophila*

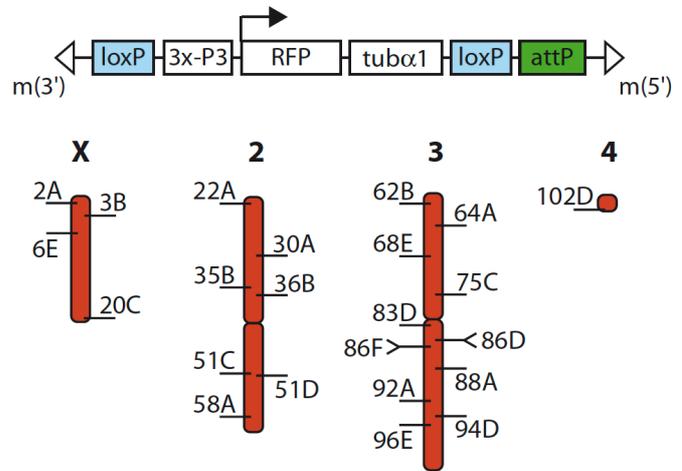
# Die Keimbahntransformation bei Drosophila über Transposon-Integration und illegitime Rekombination



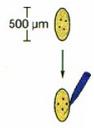
*Drosophila*

Mikroinjektion  
pUAST attP  
Vektor

Genom trägt nun  
eine attP landing  
site

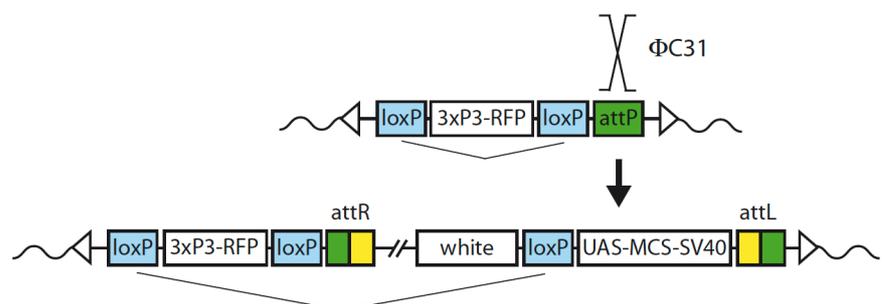
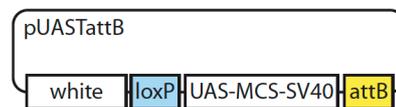


# Die Keimbahntransformation bei Drosophila über Transposon-Integration und illegitime Rekombination

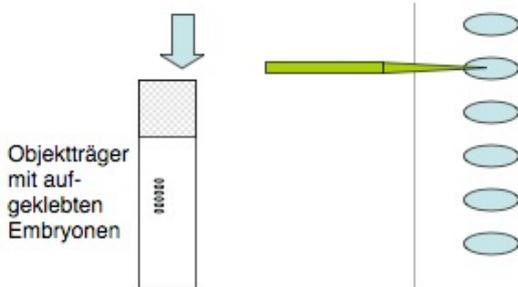


*Drosophila*

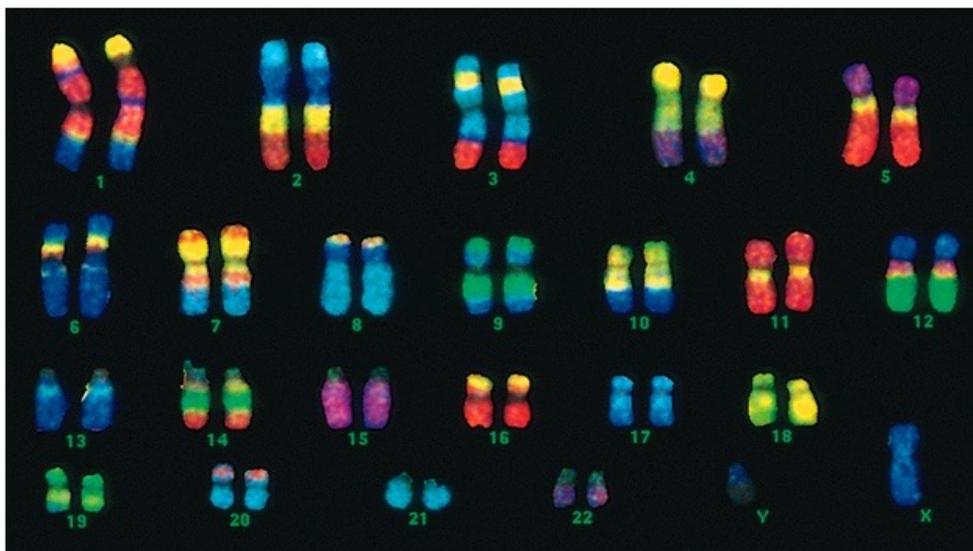
Mikroinjektion  
pUAST attB Vektor



# Keimbahntransformation



Gene sind auf den Chromosomen in Kopplungsgruppen angeordnet



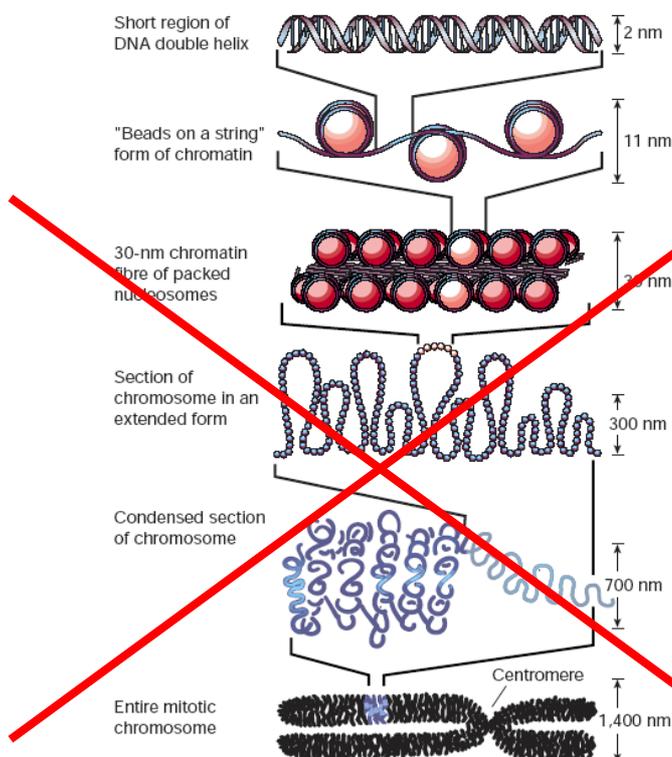
Mensch	ca. 30.000 Gene
<i>Drosophila</i>	ca. 13.000 Gene
<i>C. elegans</i>	ca. 19.000 Gene

# Interphasenchromosomen liegen geordnet im Kern vor



<https://youtu.be/cJSpWClqb7k>,  
<https://www.youtube.com/watch?v=Pl44JjA--2k>

## Verpackung der DNA

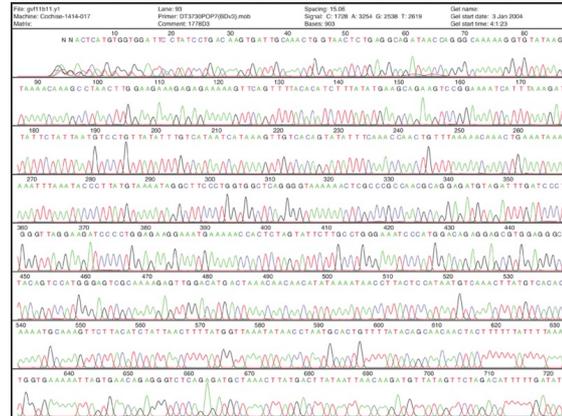
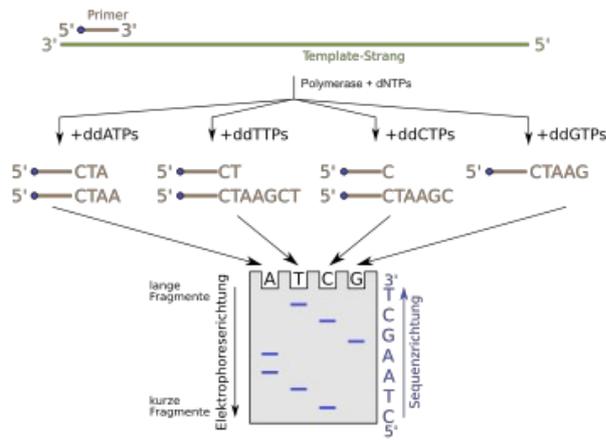


Wie bringe ich etwa 2m DNA in einen Kern mit einem  $\varnothing 10\mu\text{m}$  ?

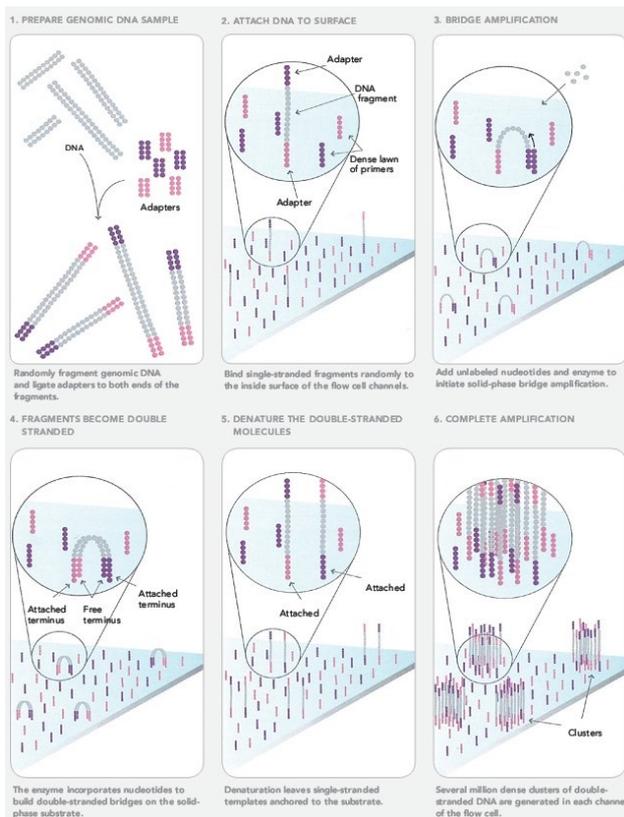
**Euchromatin**

**Heterochromatin**  
konstitutives  
fakultatives

# Sequenzierung nach Sanger



# Illumina Sequenzierung

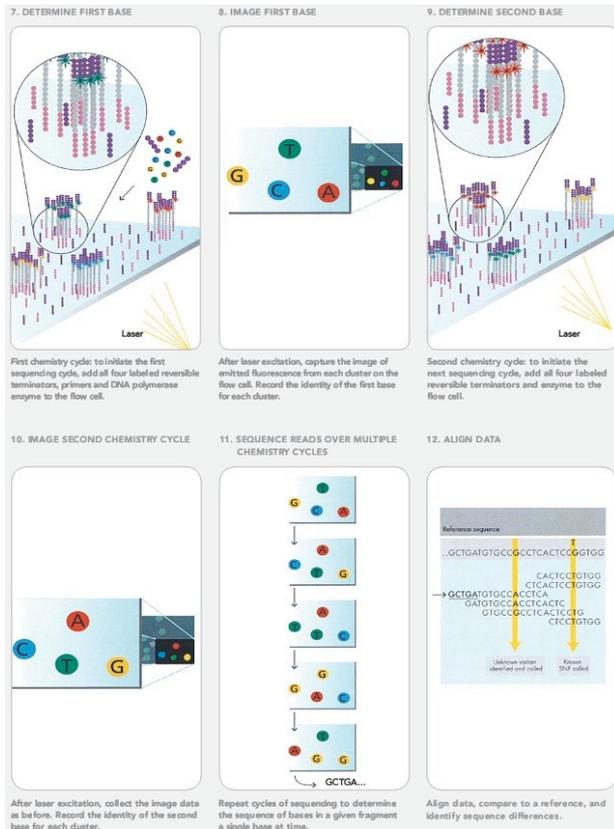


- Die DNA-Chip-Technologie der Firma [Illumina](https://www.illumina.com) verwendet kleine Silica-Kügelchen. Jedes Kügelchen hat einen Durchmesser von 3 Mikrometern und trägt mehr als 100 000 kurze DNA-Stränge.
- Im unteren Bild ist eines der Silica-Kügelchen so stark vergrößert, dass man die DNA-Stränge, die es trägt, als weißen Flaum erkennen kann.



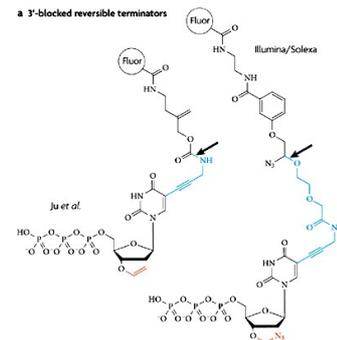
©2006, Illumina Inc. All rights reserved.

# Illumina Sequenzierung

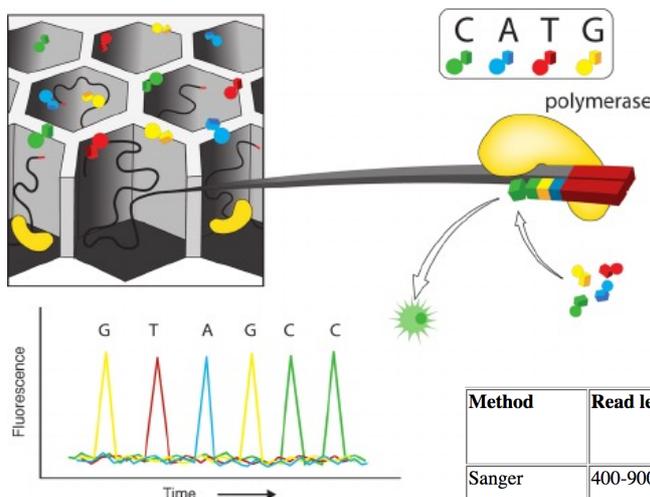


Mit der Illumina Technik werden kurze ca. 50-100 Basen Sequenzen bestimmt. Mehrere 100 Millionen „reads“ werden pro Lauf über Nacht generiert. Das menschliche Genom hat ca 3 Milliarden Basenpaare.

Man kann z.B. auch nur die mRNA sequenzieren...



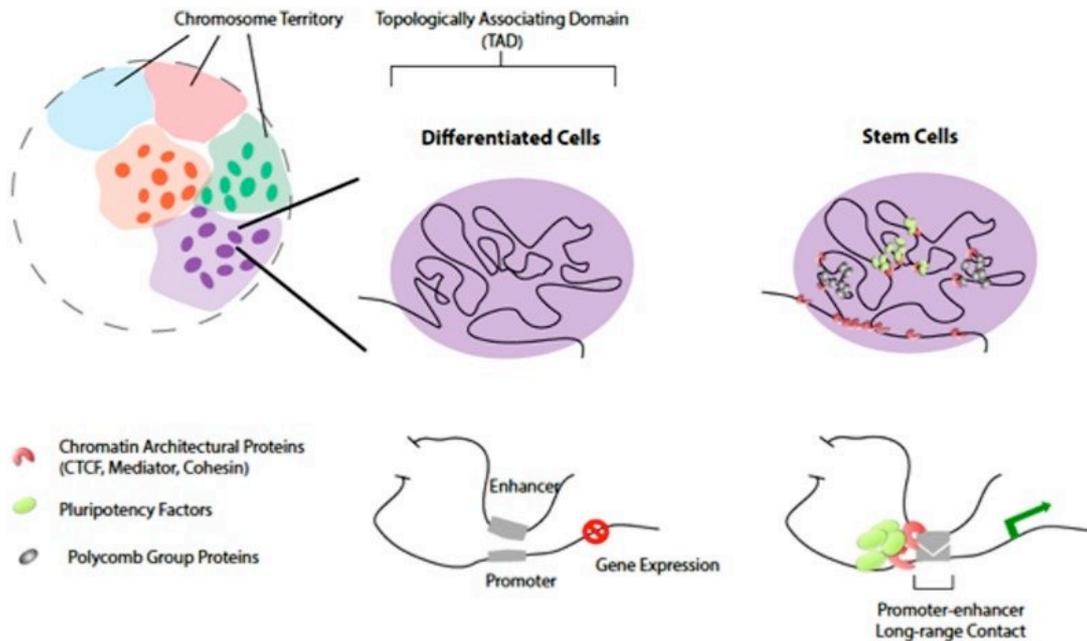
# Pac-Bio Sequenzierung



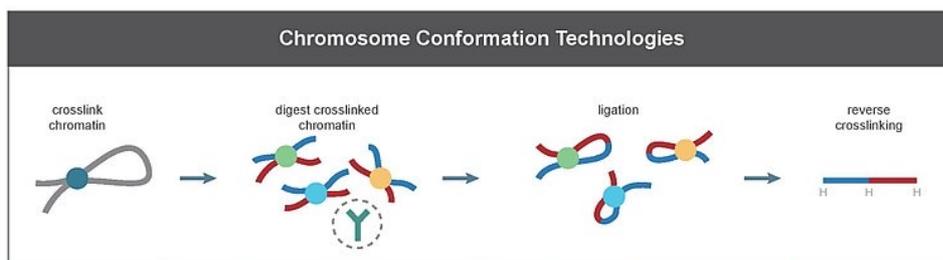
Mit der PacBio: Single molecule real time sequencing (SMRT)

Method	Read length	Accuracy	Reads per run	Time per run	Cost per 1million bases (in US\$)
Sanger	400-900 bp	99.9%	N/A	20 minutes to 3 hours	\$ 2400
454	700 bp	99.9%	1 million	24 hours	\$ 10
Illumina	50-300 bp	99.9%	Up to 6 billion	1 to 11 days	\$ 0.05-\$ 0.15
ABI/ SOLID	35- 50 bp	99.9%	1.2-1.4 billion	1-2 weeks	\$ 0.13
SMRT (PacBio)	10,000 bp to 15,000 bp	85.0%	50,000 per SMRT cell	30 minutes to 4 hours	\$ 0.13 - \$ 0.60

# Topologisch assoziierte Domänen: TAD



## Verpackung der DNA



Chromosome conformation capture **3C**

High-throughput sequencing on 3C **Hi-C**

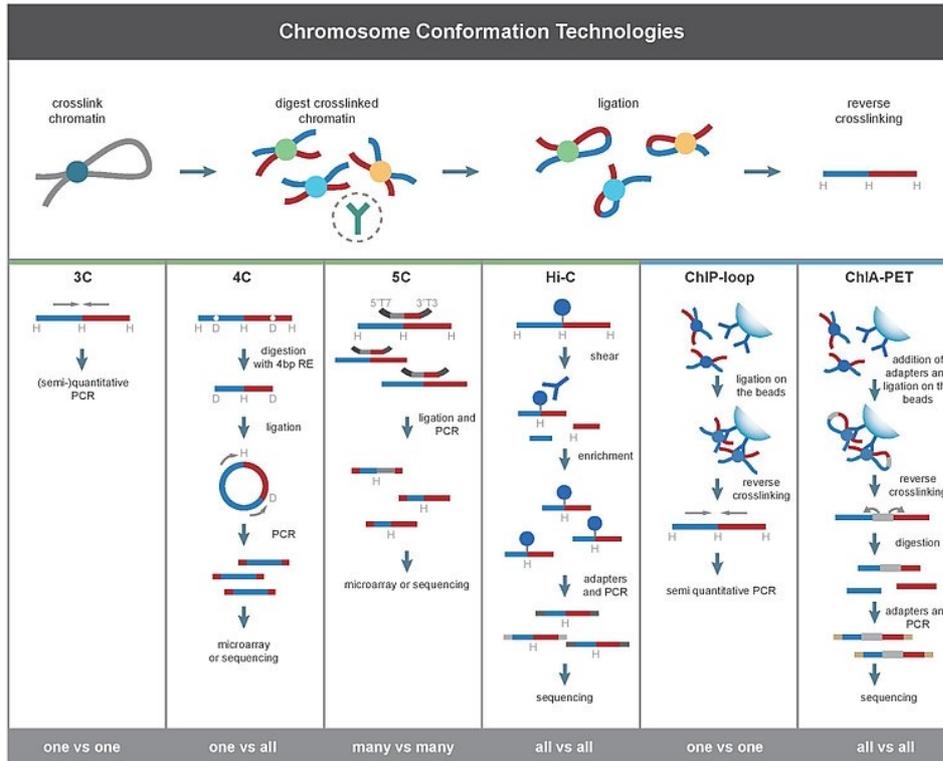
Chromosome conformation capture-on-chip **4C**

Chromosome conformation capture carbon copy **5C**

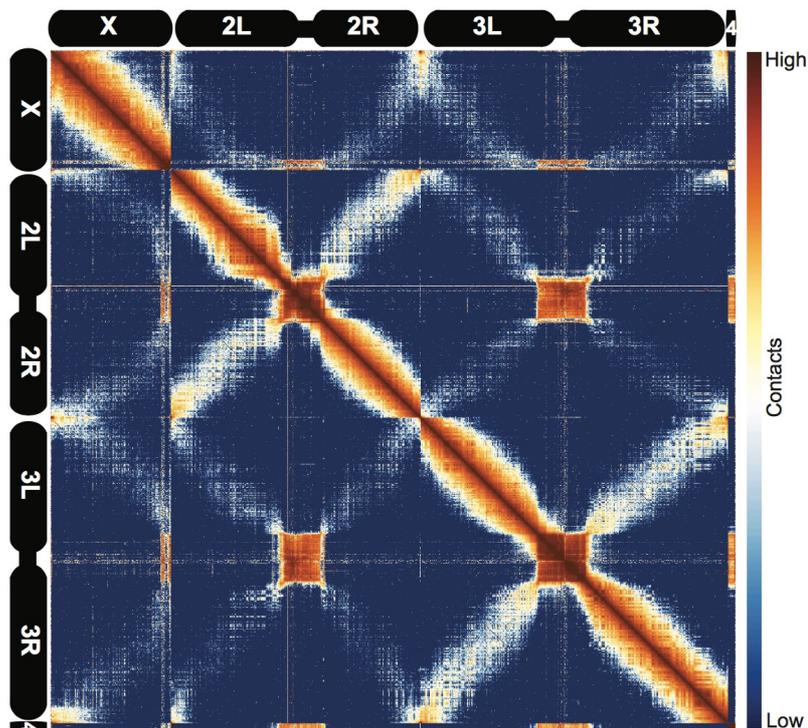
**ChIP-loop** 3C und ChIP-seq

**ChIA-PET** (chromatin interaction analysis by paired-end tag) Hi-C und ChIP-seq

# Verpackung der DNA

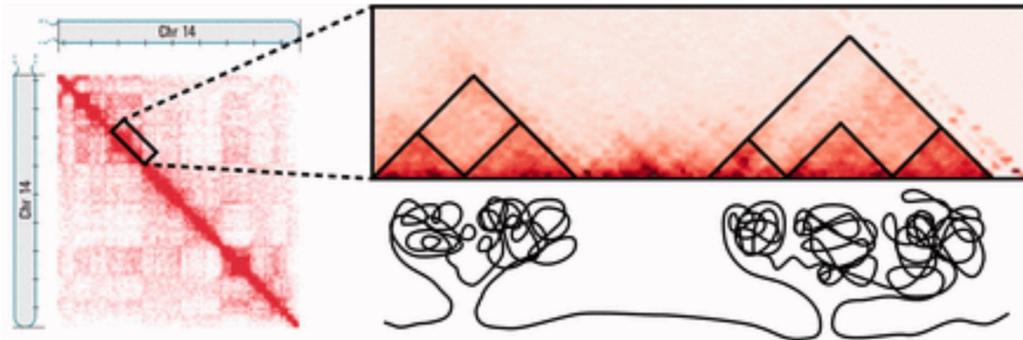


# Verpackung der DNA

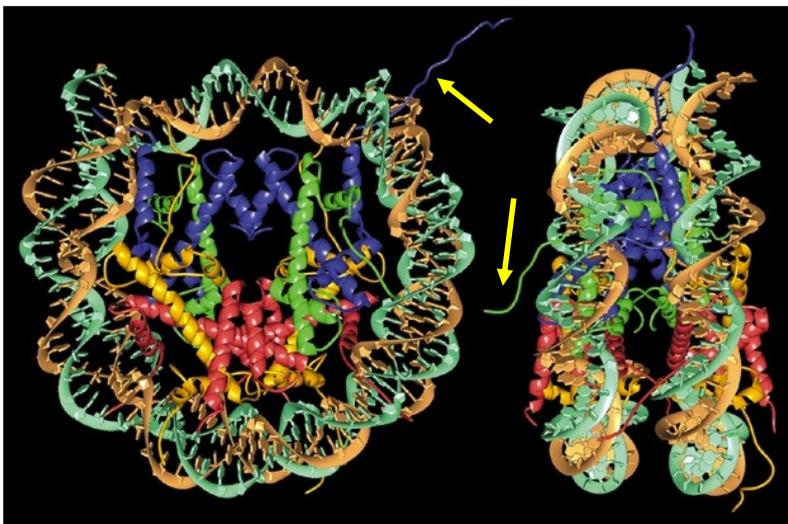


Hi-C Karte der Drosophila Chromosomen mit einer Auflösung von 100kb

# Verpackung der DNA



## Aufbau der Nucleosomen Histon-Oktamer 2x (H2A, H2B, H3, H4)



Sehr stark konserviert.  
Erbse Kuh 2/102 AS des  
H4 sind unterschiedlich.

N-terminale Bereiche sind  
draußen!

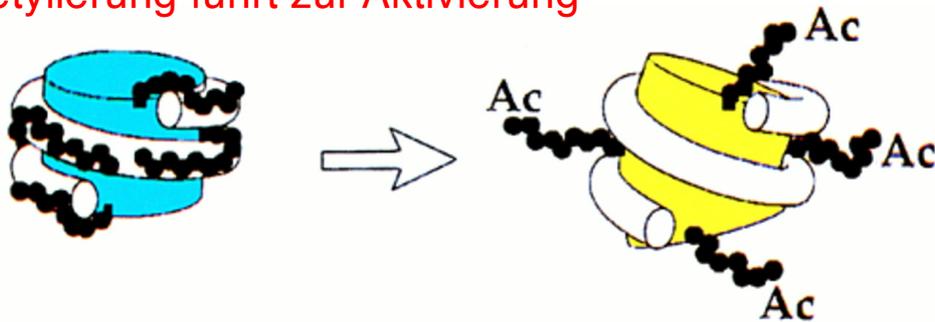
146 bp DNA,  
variabler Spacer 20-55 bp

H1 verbindet  
Nucleosomen

Histonvarianten mit besonderer Funktion: CENP-A  
(Centromer), macroH2A (Inaktivierung des X-Chromosoms)

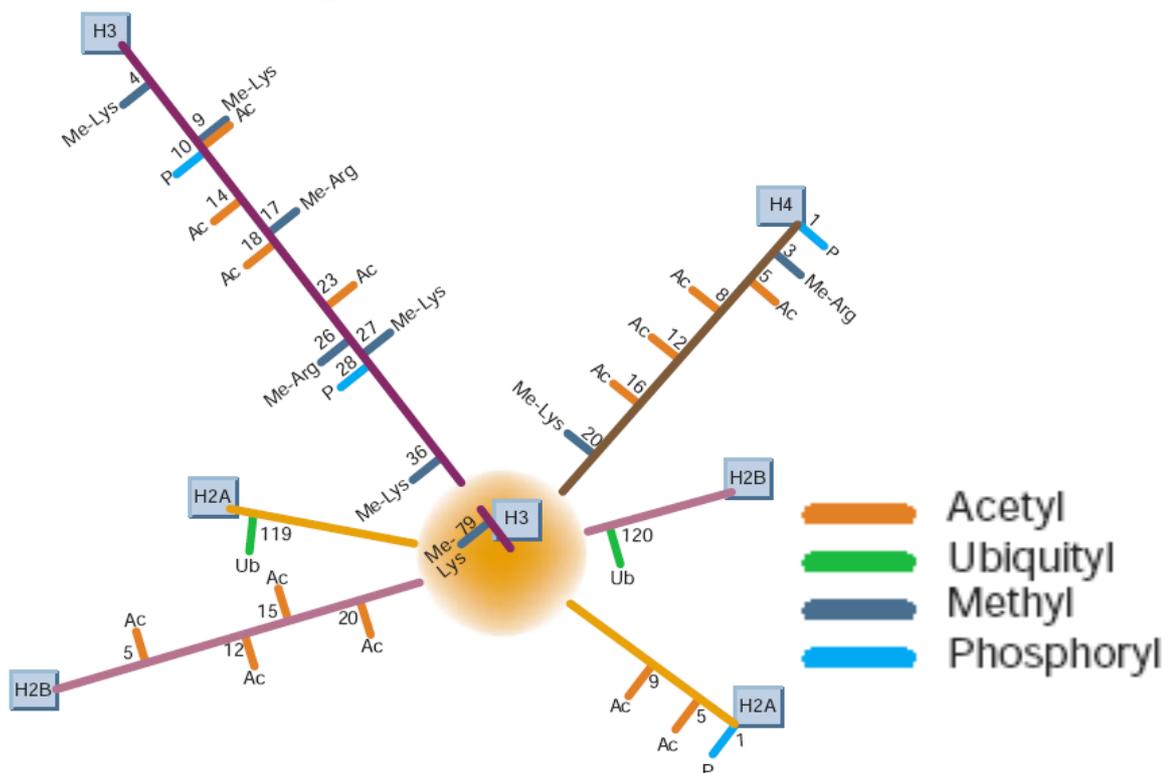
# Modifizierung von Histonen führt zur Öffnung oder Kondensation des Chromatins

Acetylierung führt zur Aktivierung

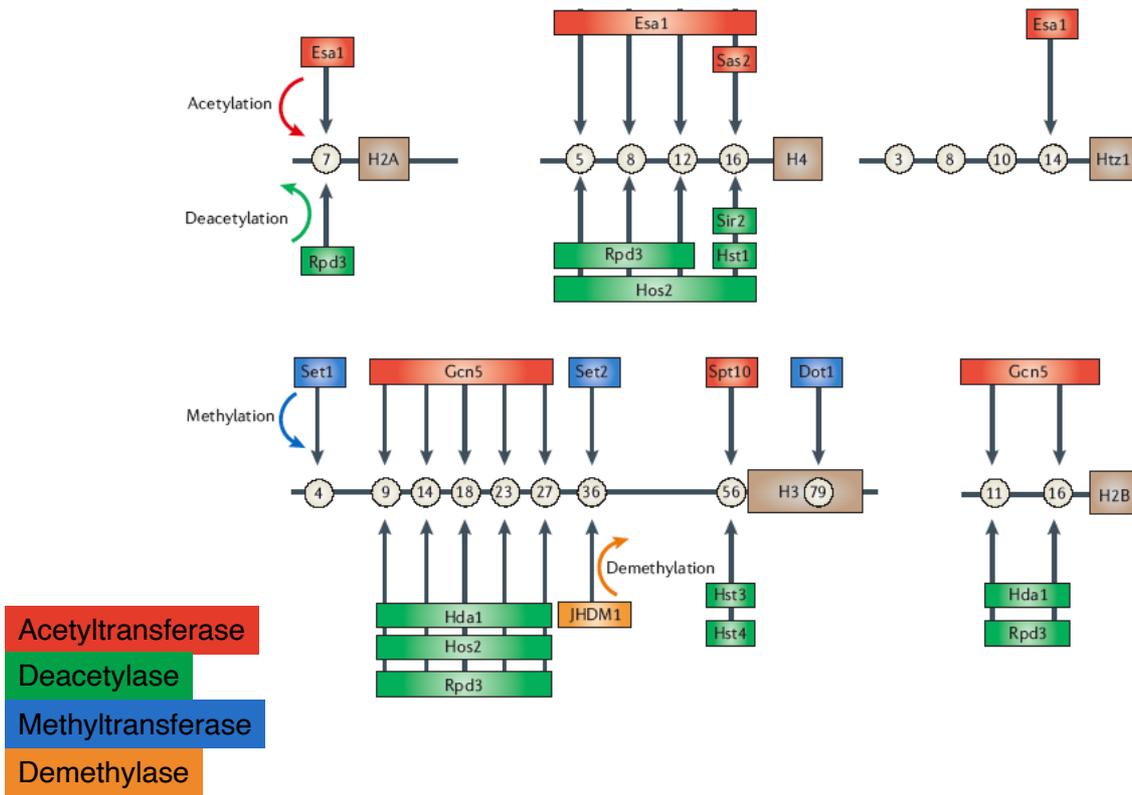


- |                                   |                        |
|-----------------------------------|------------------------|
| Histon-Acetyltransferase (HAT)    | Aktivierung            |
| Histon-Methyltransferase (HMT)    | Repression/Aktivierung |
| Histon-Deacetylase (HDAC)         | Repression             |
| Phosphorylierung, Ubiquitinierung |                        |

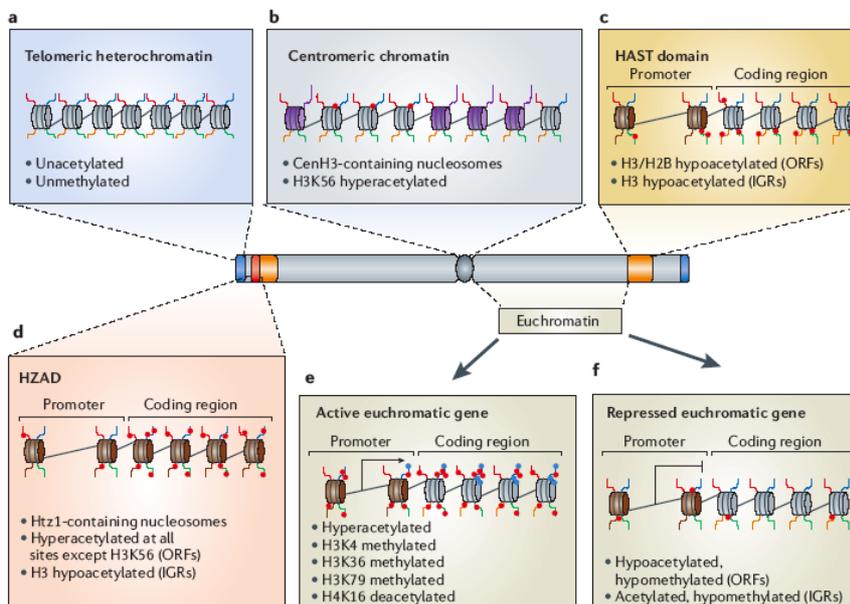
## Der Histon-Code



# Der Histon-Code

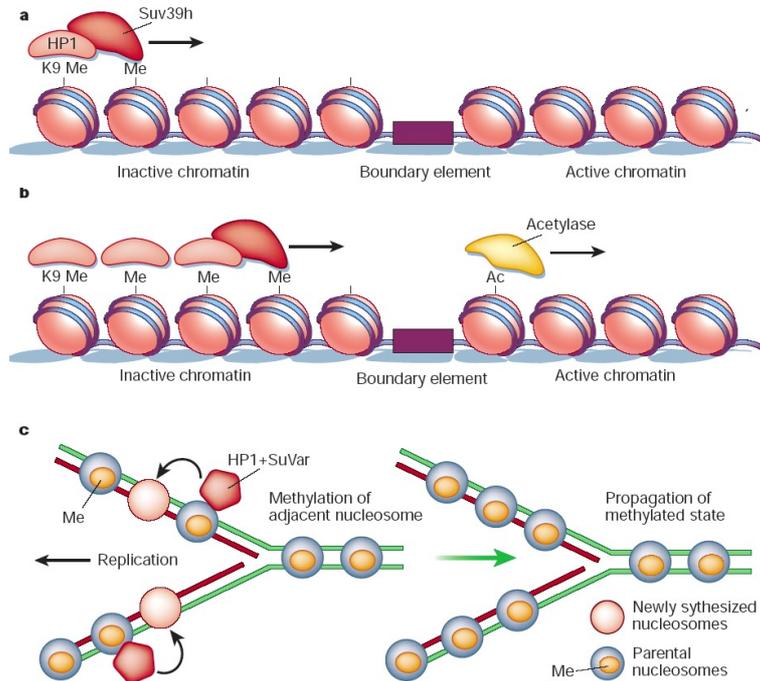


## Unterschiedliche Regionen des Chromosoms haben unterschiedliche Histon-Codes

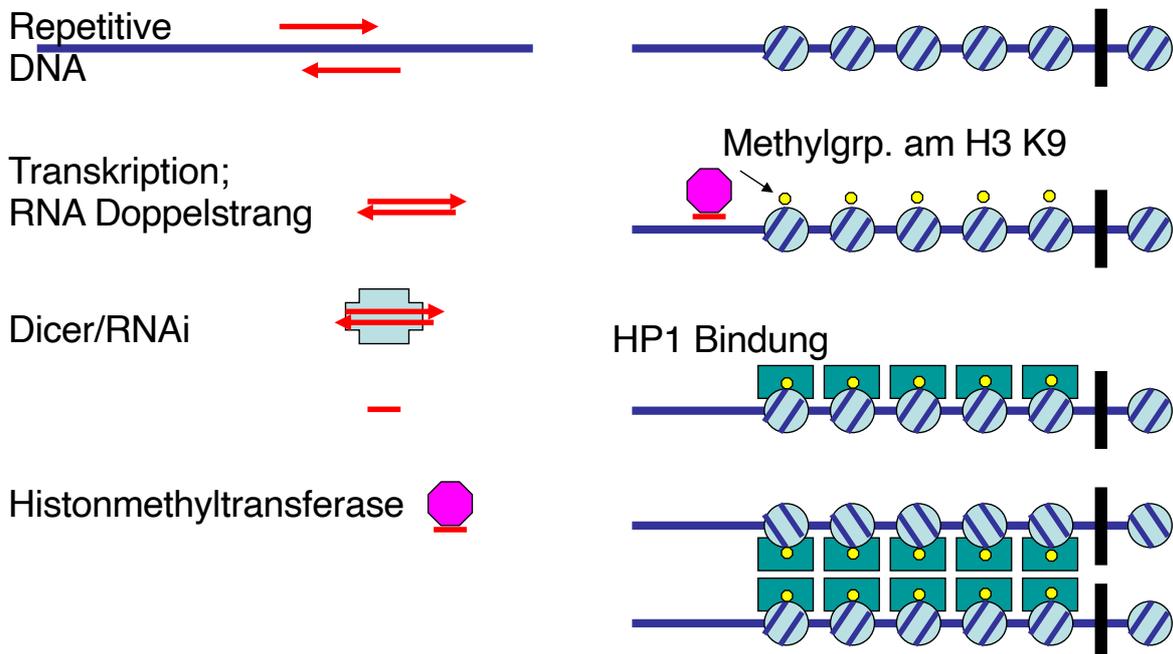


Spezifische Antikörper gegen modifizierte Histone, Chromatin Immunoprecipitation, microarrays

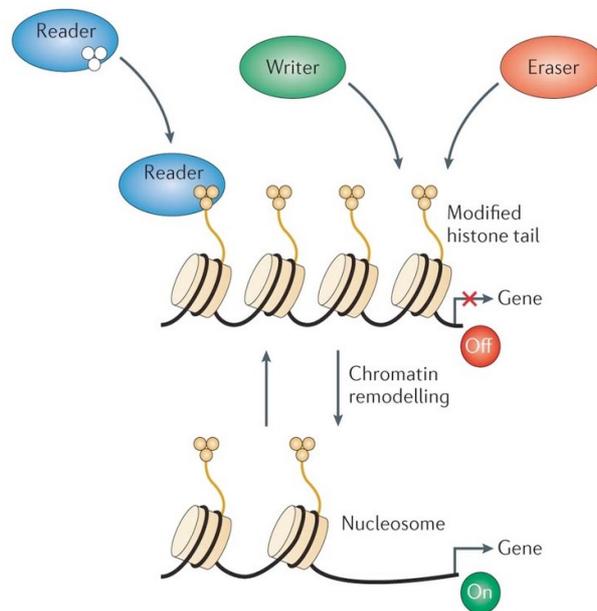
# Weitergabe von methylierten bzw. acetylierten Nucleosomen



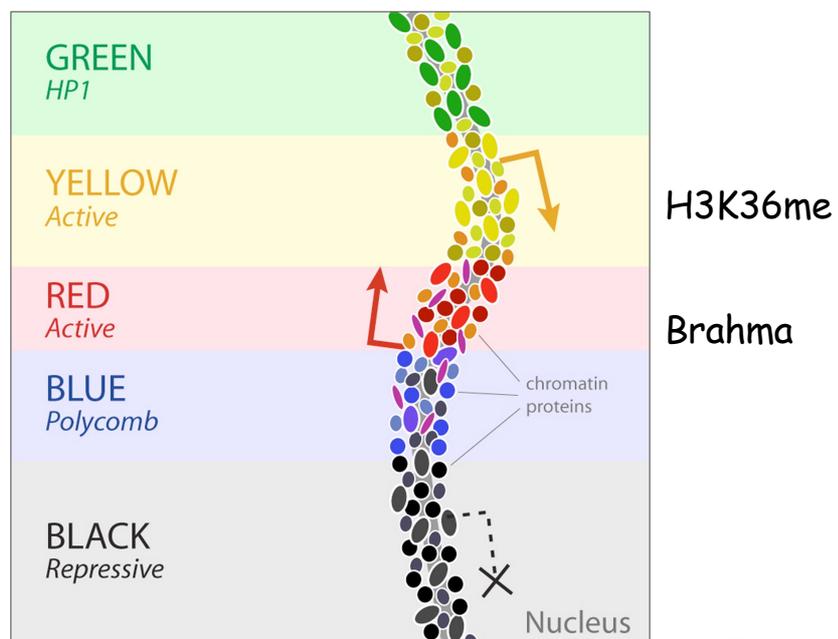
## Histon Modifikationen Induktion der Heterochromatisierung



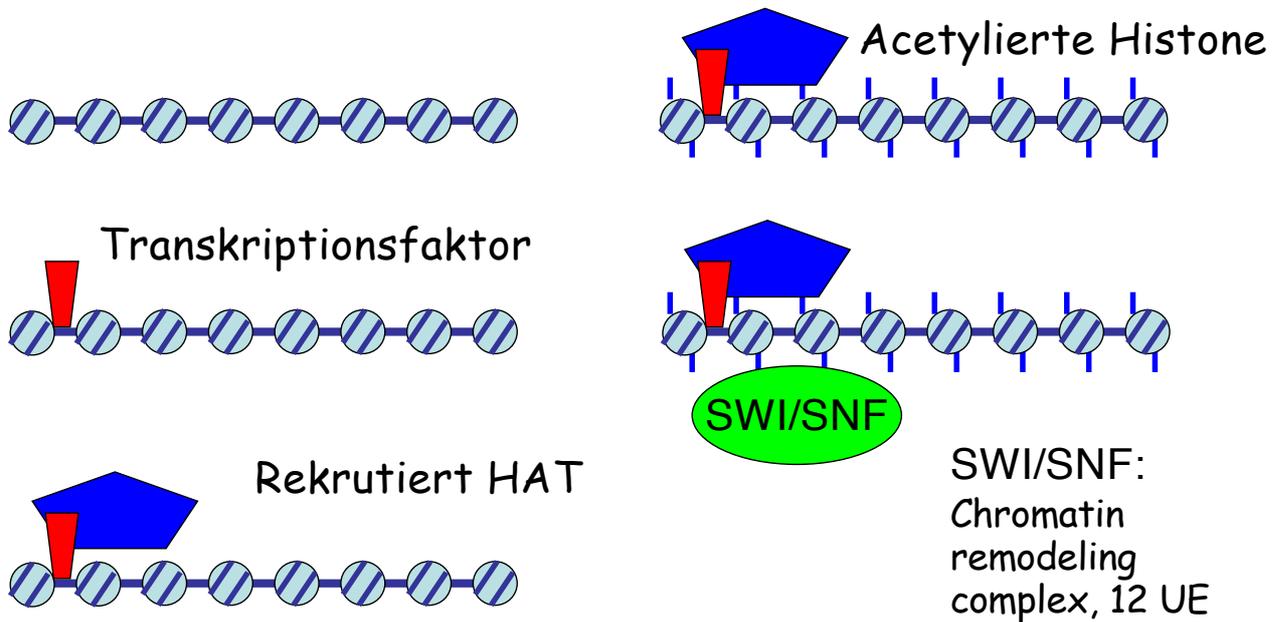
# Drei verschiedene Chromatin – assoziierte Proteine „Reader, Writer und Eraser“



# Fünf prinzipiell verschiedene Chromatinarten in Drosophila

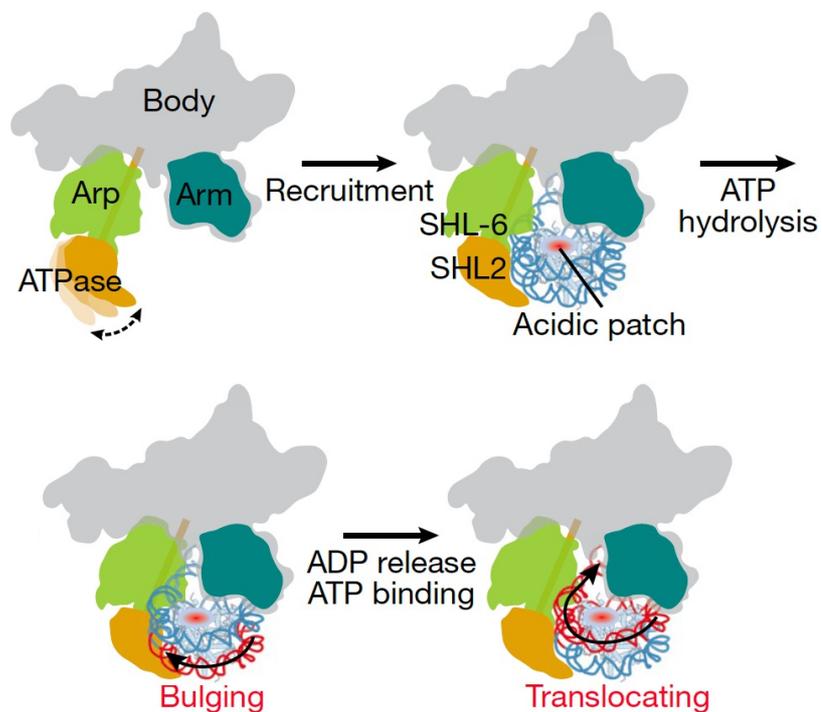


# Histon Modifikationen am Promotor

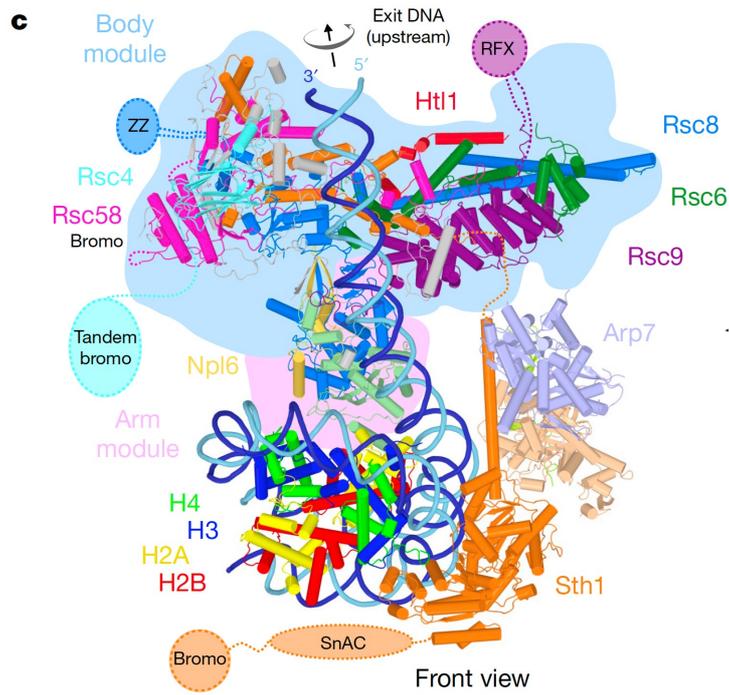


SWI/SNF (SWItch/Sucrose NonFermentable)

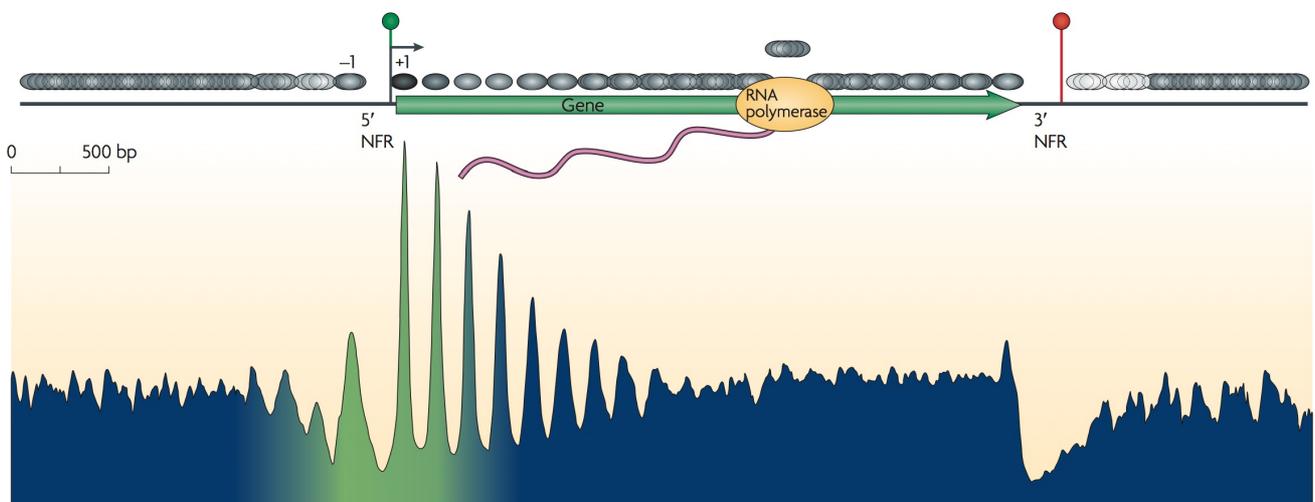
## Modell der SWI/SNF Funktion



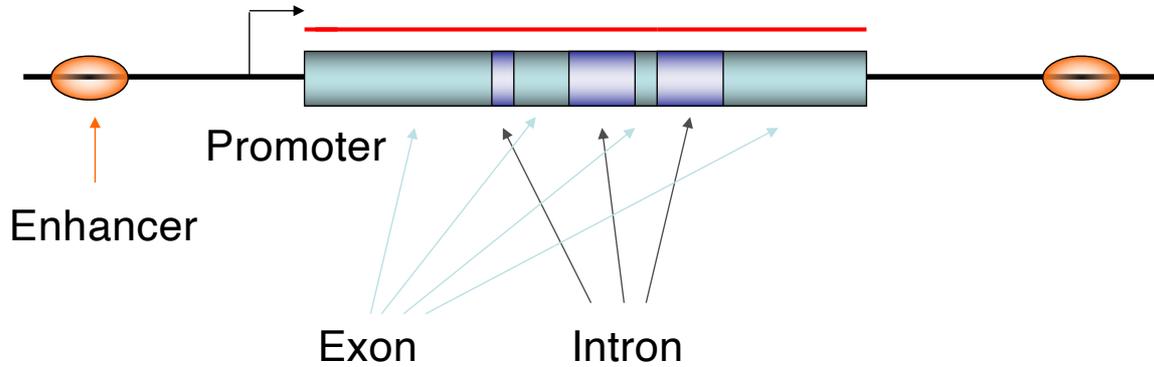
# Struktur des SWI/SNF Komplexes



# Positionierung der Nucleosomen ChIP-Seq



# Ein typisches Gen



Transkription

Initiation

Elongation

Termination

5' cap

splicing

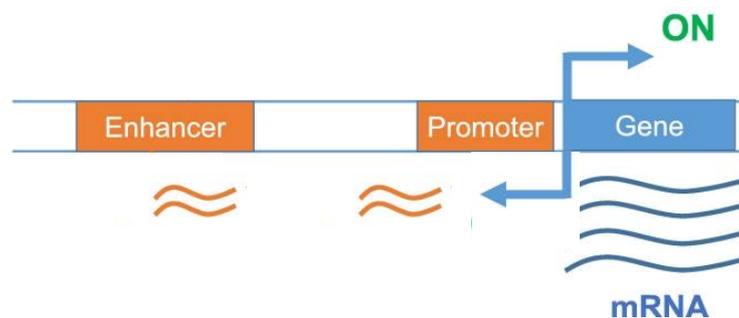
3' polyA

# Ein typisches Gen aber eRNA!

**A**

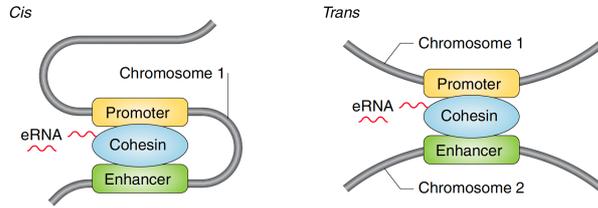


**B**

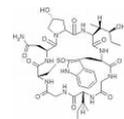


# Funktionen der eRNAs

**a** Stabilization of enhancer–promoter looping and establishment of chromatin accessibility



## RNA Polymerasen (Eukaryoten)



$\sigma\alpha$ -Amanitin

RNA Polymerase I	Im Nucleolus aktiv rRNA (28S-, 18S- und 5,8S)	
RNA Polymerase II	proteinkodierende Gene	++++
RNA Polymerase III	Gene für: 5S-rRNA, tRNAs und andere "kleine" RNAs	++

RNAP II ist ein großer Proteinkomplex aus 12 Untereinheiten.

**RNAP II kann den Promoter der Zielgene nicht erkennen!**

# Cofaktoren der RNA Polymerase II

General transcription factors

GTF

Bildung des Preinitiationskomplexes  
DNA, RNAP II und 5 GTFs

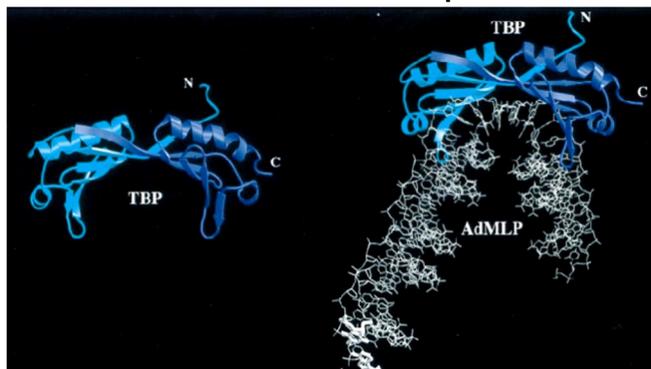
# Cofaktoren der RNA Polymerase II

General transcription factors

GTF

Bildung des Präinitiationskomplexes  
DNA, RNAP II und 5 GTFs

Start ist Bindung von TBP des TFIID Komplexes an die  
TATA Box.



DNA kann „geknickt“ werden.

# Cofaktoren der RNA Polymerase II

General transcription factors

GTF

Bildung des Preinitiationskomplexes  
DNA, RNAP II und 5 GTFs

Start ist Bindung von TBP des TFIID Komplexes an die TATA Box.

Rekrutierung von TFIIB

Unphosphorylierte RNAP II, TFIIF, TFIIE und TFIIH

## Aufbau der GTFs

TFII D = TBP plus 10 TBP-associated proteins (TAFs)

TFII B = 1 Protein

TFII F = Heterotetramer, 2 große (TFII Fa)  
und 2 kleine (TFII Fb) SU

TFII E = Heterotetramer ähnlich zu TFII F

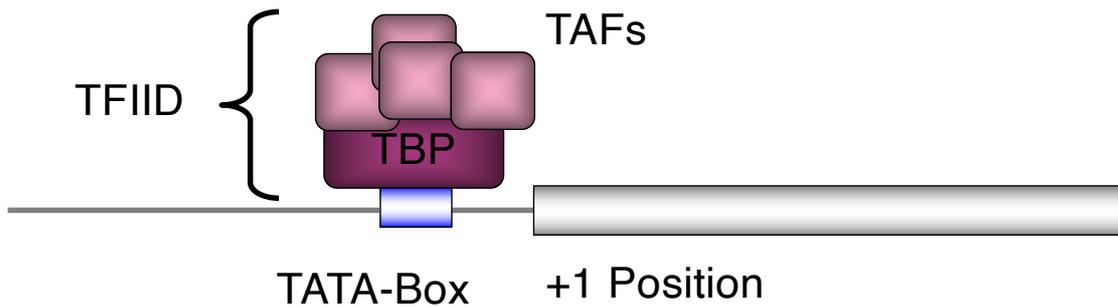
TFII H = größter GTF, 9 Untereinheiten,  
MW entspricht RNAP II  
Enzymatische Aktivität (2 Helikasen, 1 Kinase)

# Initiation der Transkription durch Polymerase II

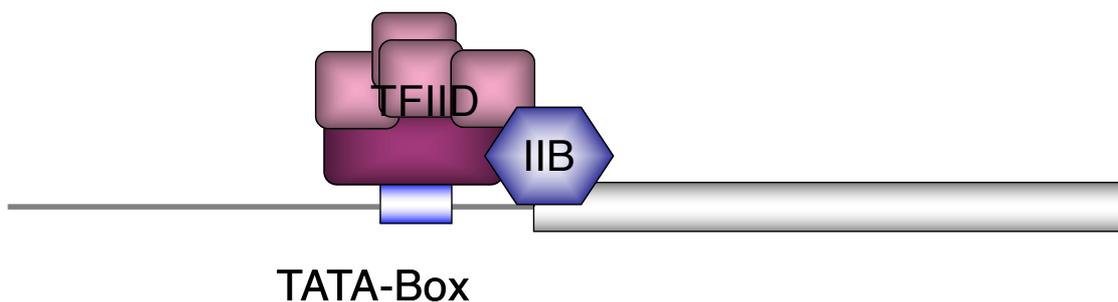
Zunächst wird schrittweise ein Initiationskomplex aufgebaut:

Das TATA-Bindeprotein (TBP) bindet an die TATA-Box

TFIID besteht aus TBP und den  
TBP-assoziierten Faktoren (TAFs)

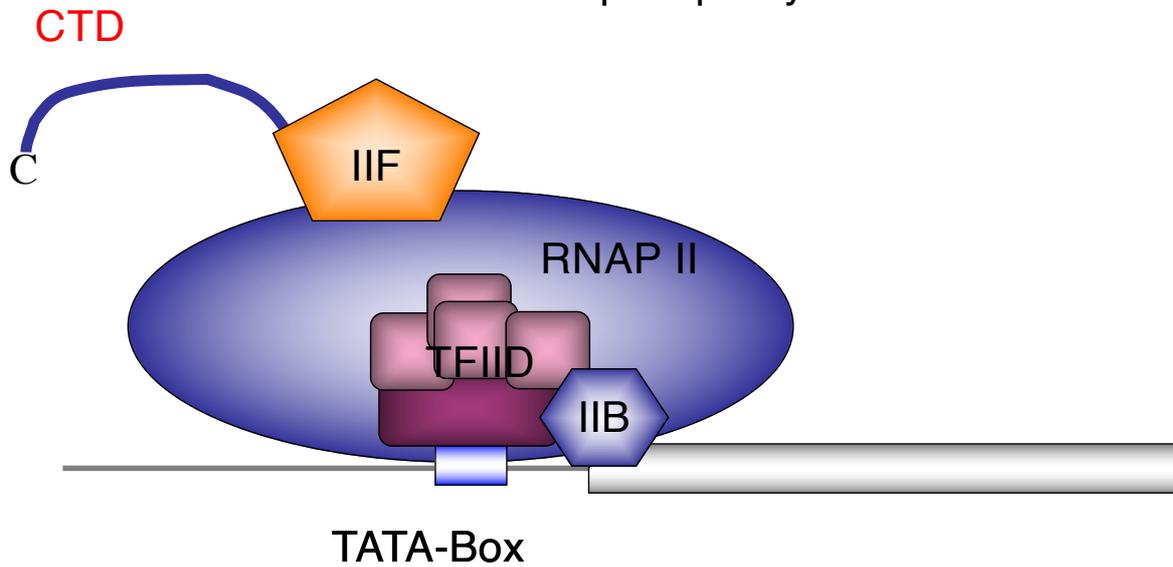


TFIIB kommt hinzu

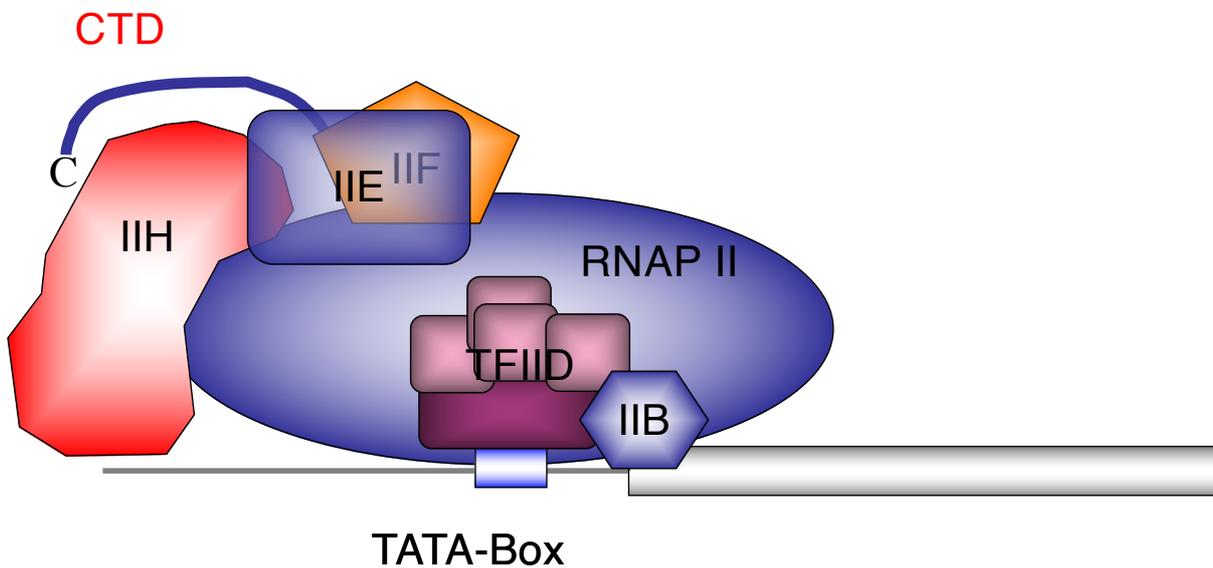


Assoziation weiterer TFIIIs:

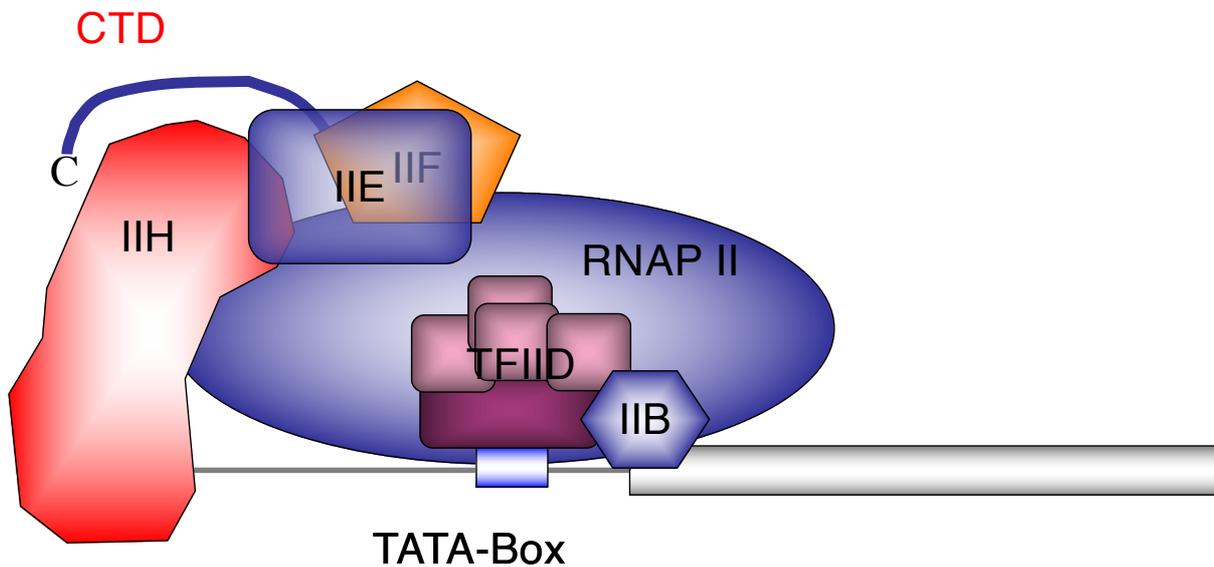
- TFIIF
  - TFIIF rekrutiert schließlich die RNAP II
- Der CTD ist nicht phosphoryliert



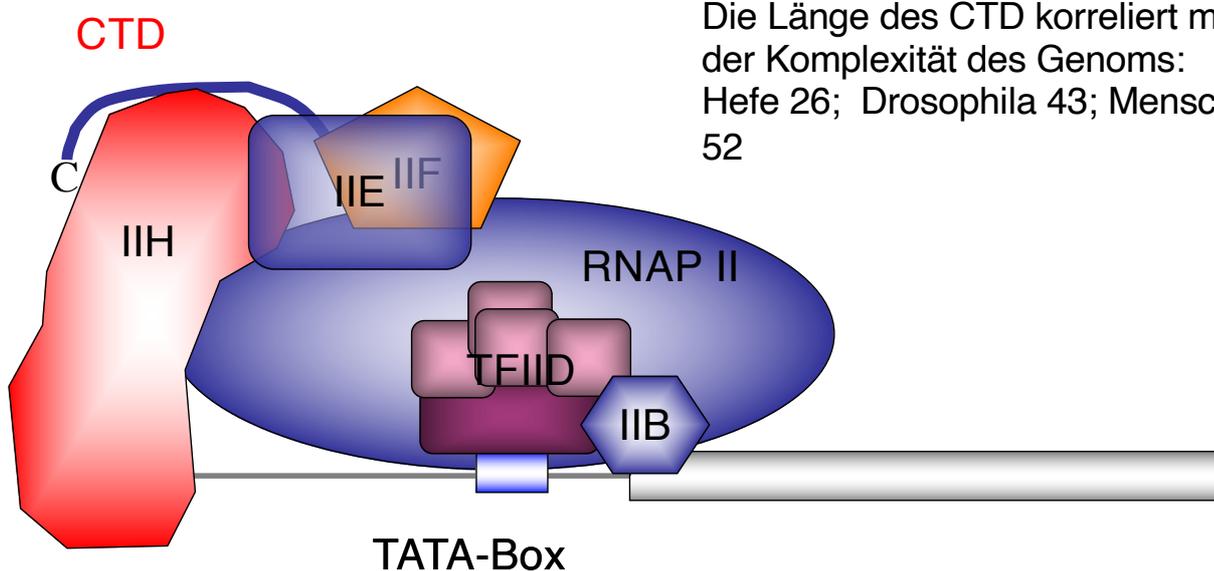
Zuletzt bindet ein Komplex aus TFIIIE und TFIIH



TFIIH hat DNA-Helicase Aktivität,  
die die DNA des Promotors entwindet.  
Es bildet sich ein offener Initiationskomplex

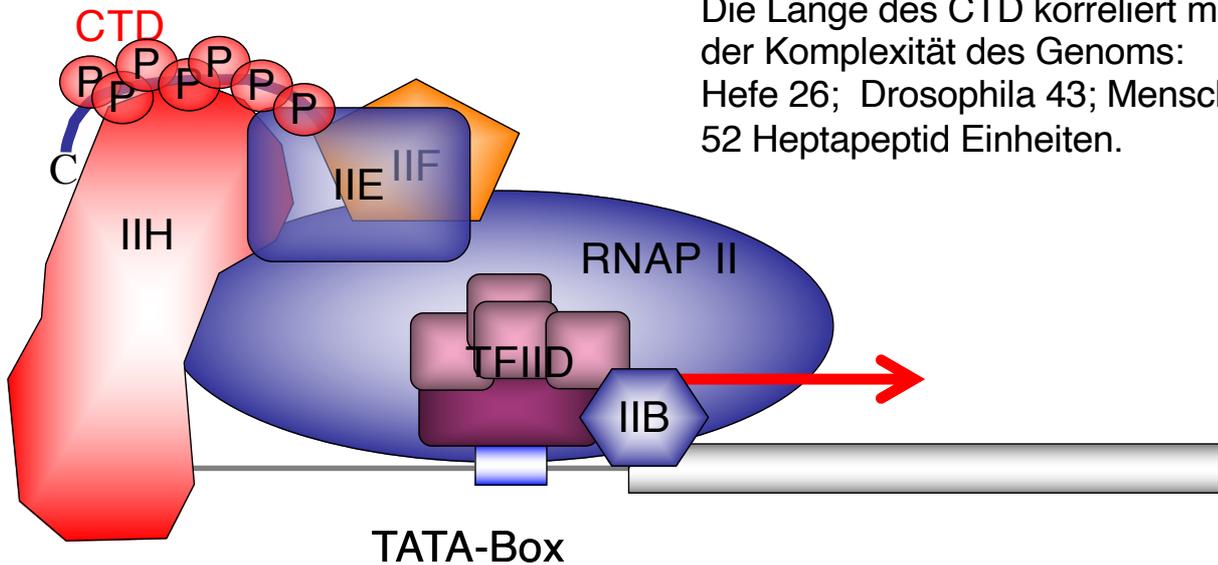


TFIIH hat eine Protein-Kinase Aktivität:  
Phosphorylierung des C-Terminus  
der RNA-Polymerase (CTD)

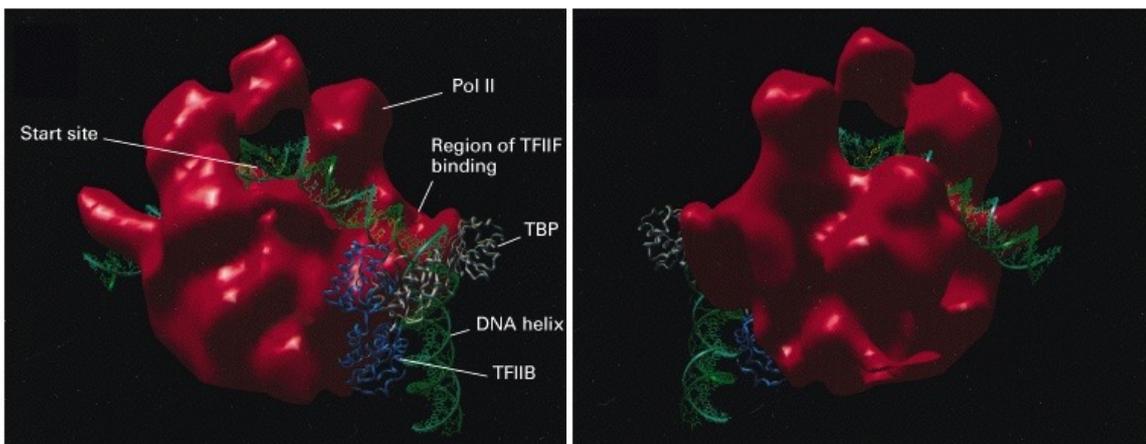


Die Länge des CTD korreliert mit  
der Komplexität des Genoms:  
Hefe 26; Drosophila 43; Mensch  
52

TFIIH hat eine Protein-Kinase Aktivität:  
Phosphorylierung des C-Terminus  
der RNA-Polymerase (CTD)



## Polymerase II Modell



**Nobel-Preise: (1959, 2006)**

**Kornberg Familie:**

Arthur Kornberg (1959)

DNA Polymerase

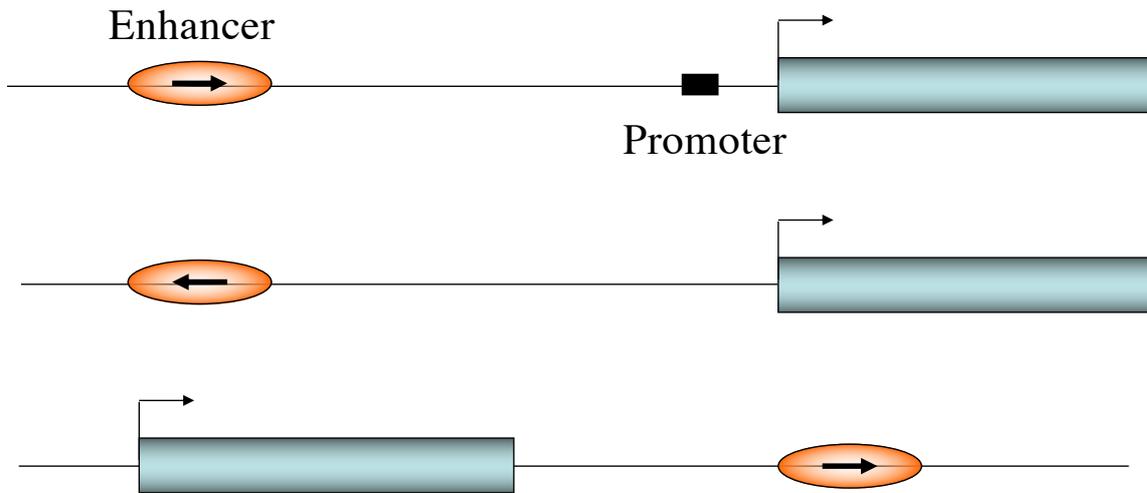
Roger Kornberg (2006)

RNA Polymerase II

Tom Kornberg: Entwicklungsbiologe

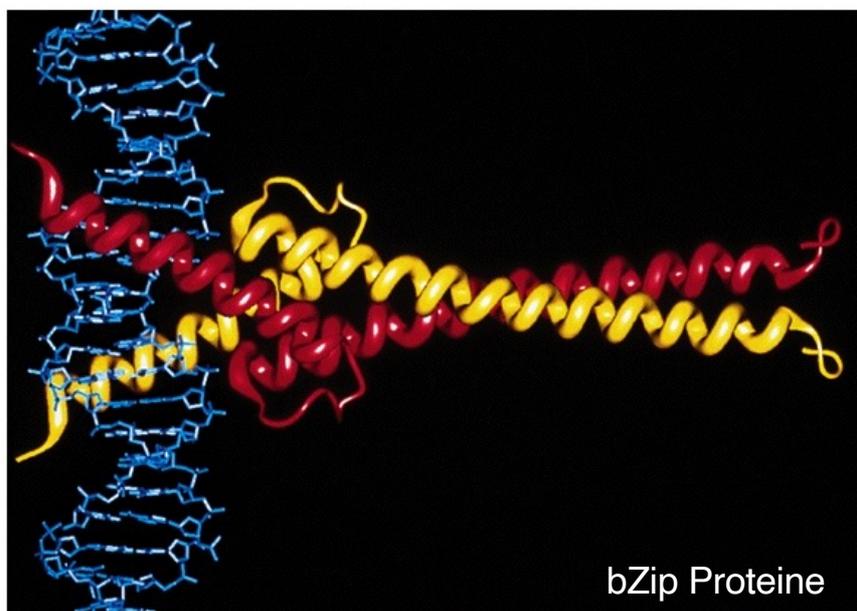
Ken Kornberg: Architekt

# Enhancer steuern die räumliche und zeitliche Expression von Genen

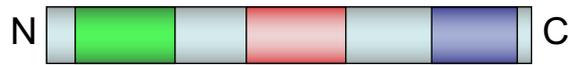


Enhancer stimulieren die Transkription von einem Promoter unabhängig von ihrer Position und Orientierung. Sie binden Transkriptionsfaktoren. **Silencer**

## Transkriptionsfaktoren



# Anatomie eines Transkriptionsfaktors



## DNA-Bindungsdomäne

bHLH; Zn-Finger; Homoedomäne  
ETS-Domäne

## Interaktionsdomäne

mit Polymerase (Aktivierung, Repression),  
Histon Modifikatoren

## Regulatorische Domäne

## Dimerisierungsdomäne

# Transkriptionsfaktoren

Reinigung der Transkriptionsfaktoren über Chromatographie (sequenzspezifische DNA-Affinitätschromatographie). 5% aller Proteine sind TFs!

Klassifizierung der Transkriptionsfaktoren erfolgt über ihre DNA bindende Domäne.

Man unterscheidet zwischen aktivierenden und reprimierenden TFs.

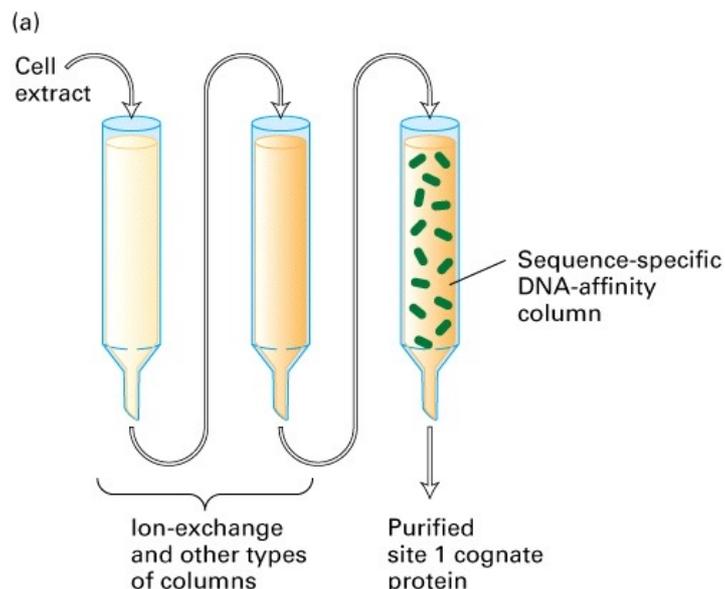
Repression ist in der Regel indirekt und erfolgt über eine Modulation des Chromatins -> HDACs

BTB/POZ Domäne, Engrailed Domäne, WRPW -> Groucho  
Krüppel associated box (KRAB).

# Beispielgruppen

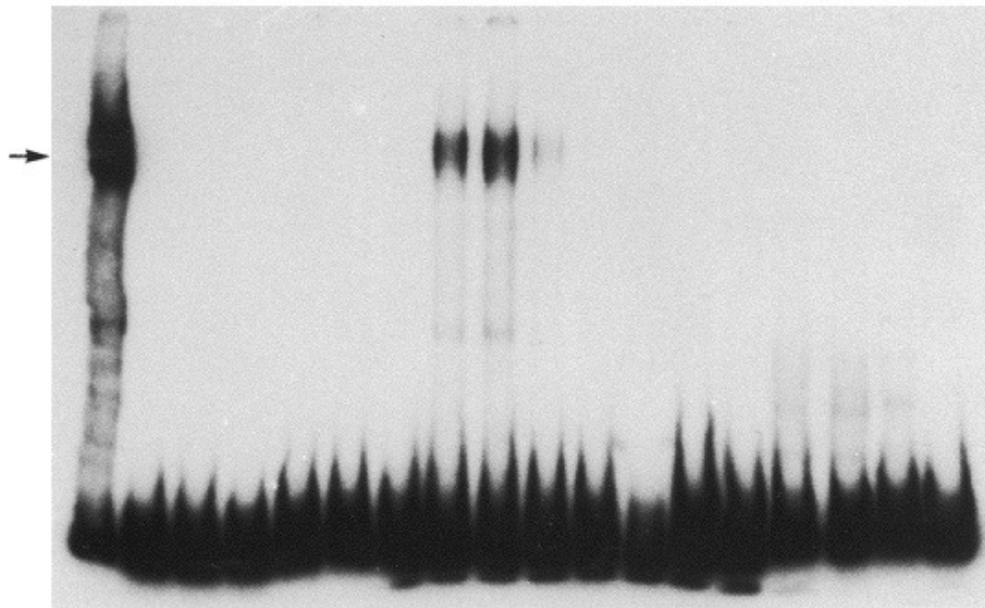
- **Homeodomänen** Proteine (Segmentierung) HTH
- **bHLH** Proteine (neurale Kompetenz, Spezifizierung)
- **ETS** Domänen Proteine (RTK-Signalkaskaden) winged Helix Proteine
- **Zink-Finger** Proteine 3 Untergruppen
  - C2H2 häufigster TF (ca.1000) Monomer;
  - C4 Zinkfinger 100 TFs z.B. (Hetero)Dimer Steroidrezeptoren
  - C6 Zinkfinger z.B. Gal4, Homdimer
- **STAT** (Signal transducer and activator of transcription) z.B. Interferon-Antwort
- **Leucin Zipper** Proteine (bZip)
- **Membran-gebundene TFs** (z.B. Notch).

## Säulenchromatographische Verfahren zur Reinigung von Transkriptionsfaktoren



# Wie finde ich die DNA-Bindungssequenz? Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) oder Band shift assay

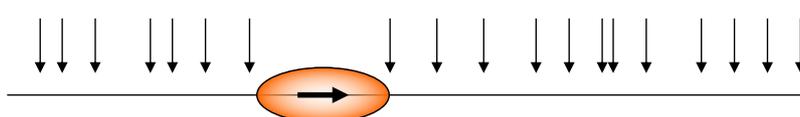
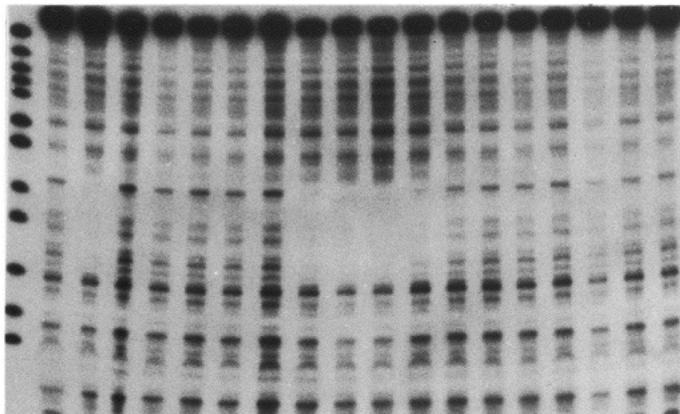
Fraction ON 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 14 16 18 20 22



# Wie finde ich die DNA-Bindungssequenz? Früher: Der „foot print“

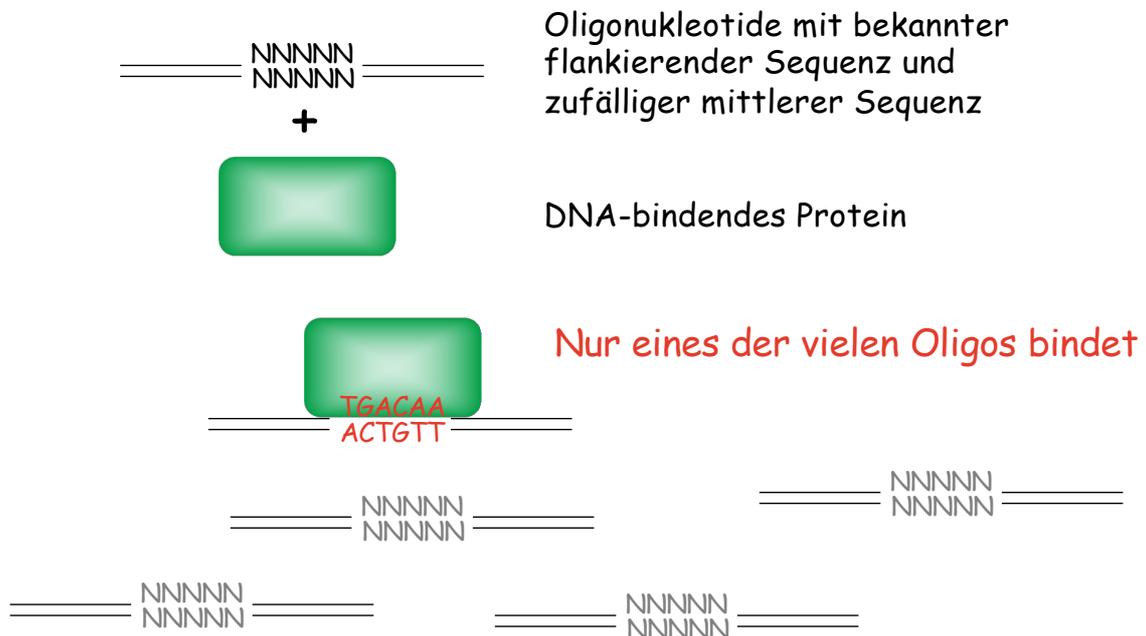
(b)

MNE O FT 1 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 18 20 22 Fraction

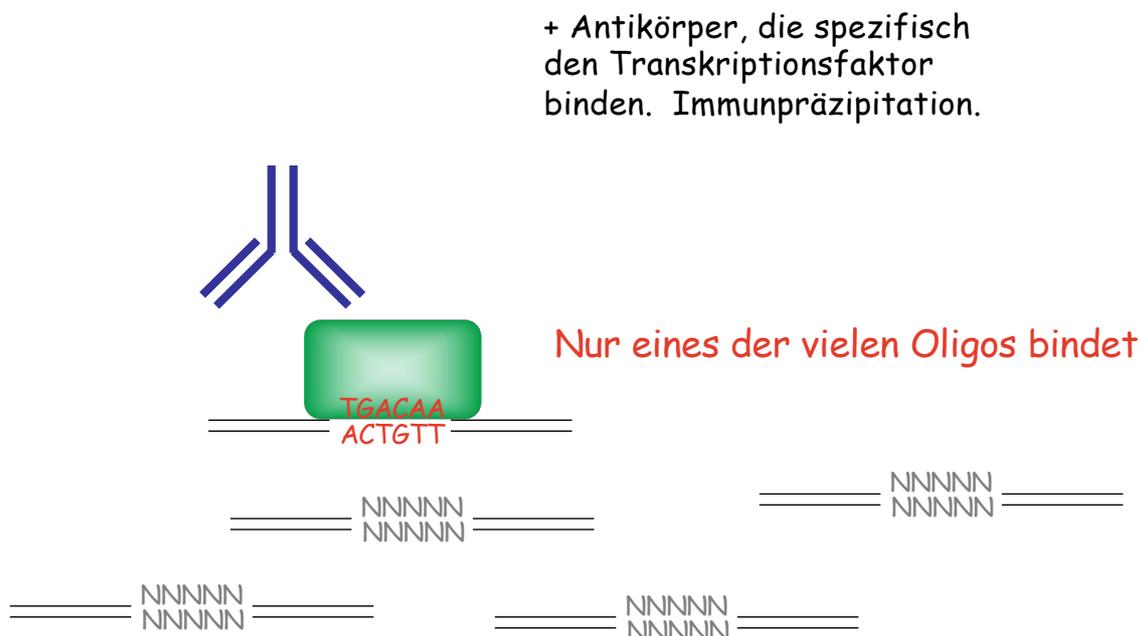


Mögliche  
DNAase  
Schnittstellen

# Wie finde ich die DNA-Bindungssequenz? PCR-select



# Wie finde ich die DNA-Bindungssequenz? PCR-select



# Wie finde ich die DNA-Bindungssequenz? PCR-select



PCR, um die Target Sequenzen zu amplifizieren.

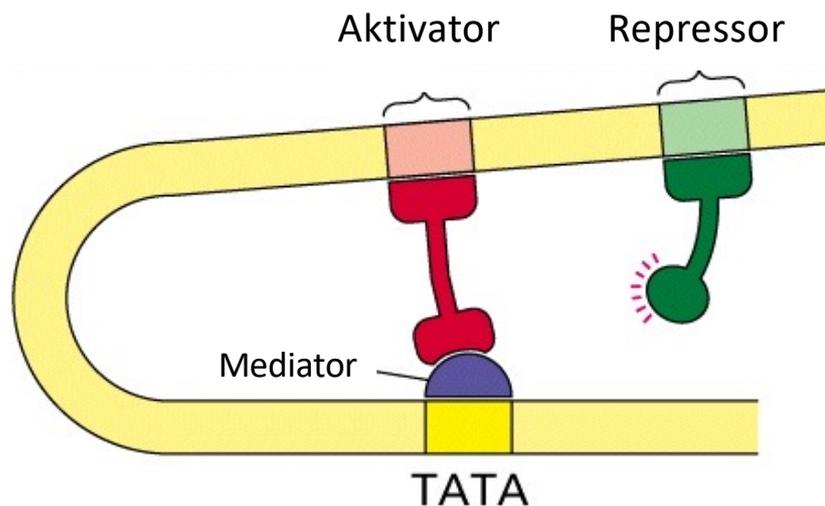
Klonieren der DNA Fragmente.

Sequenzanalyse.

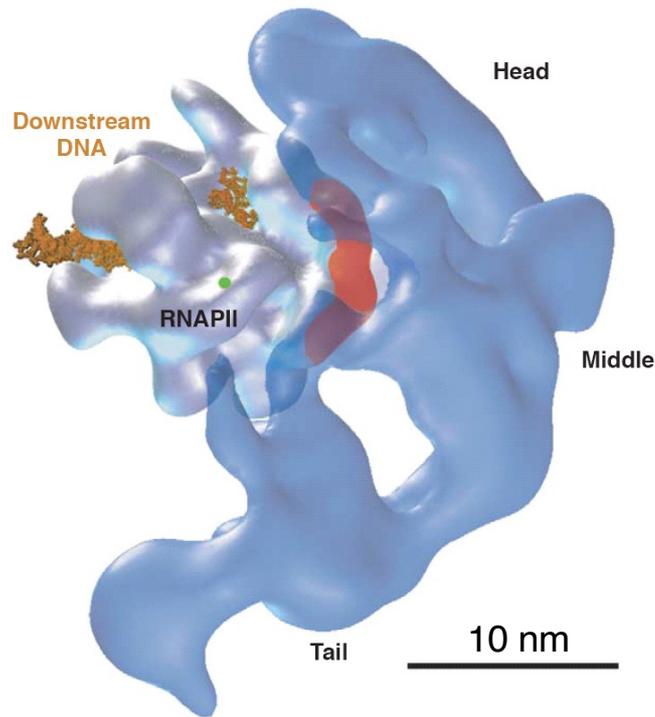
Zielsequenz!

## Modelle zur Wirkung von Transkriptionsfaktoren

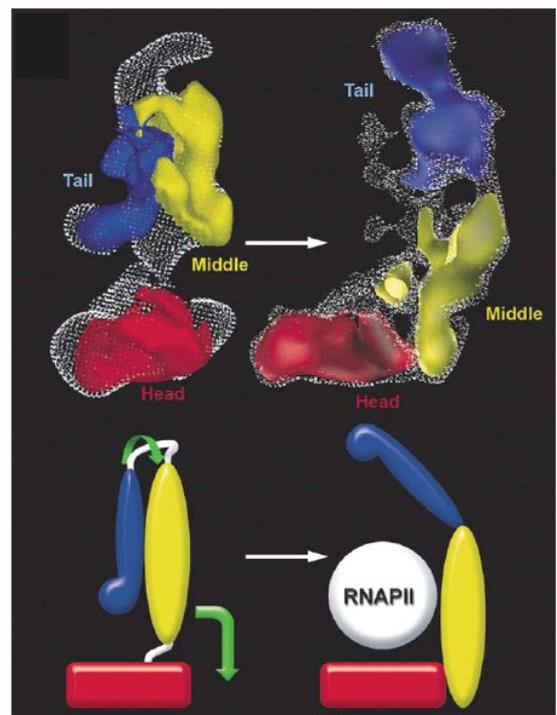
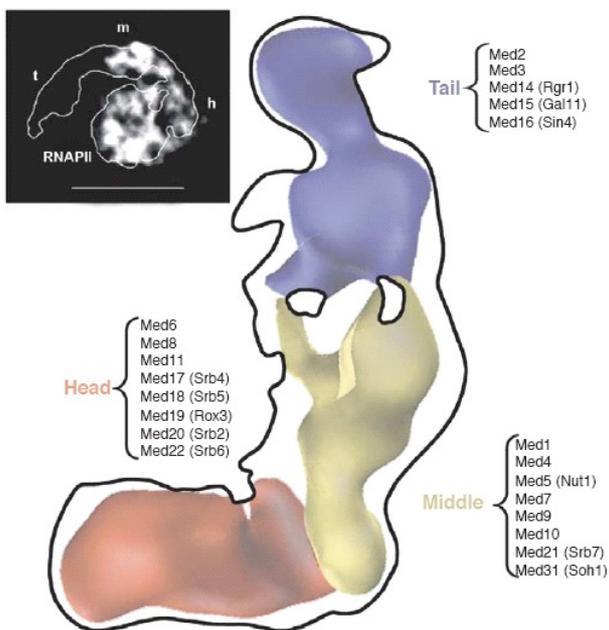
Die Interaktion mit dem Promotor erfolgt indirekt

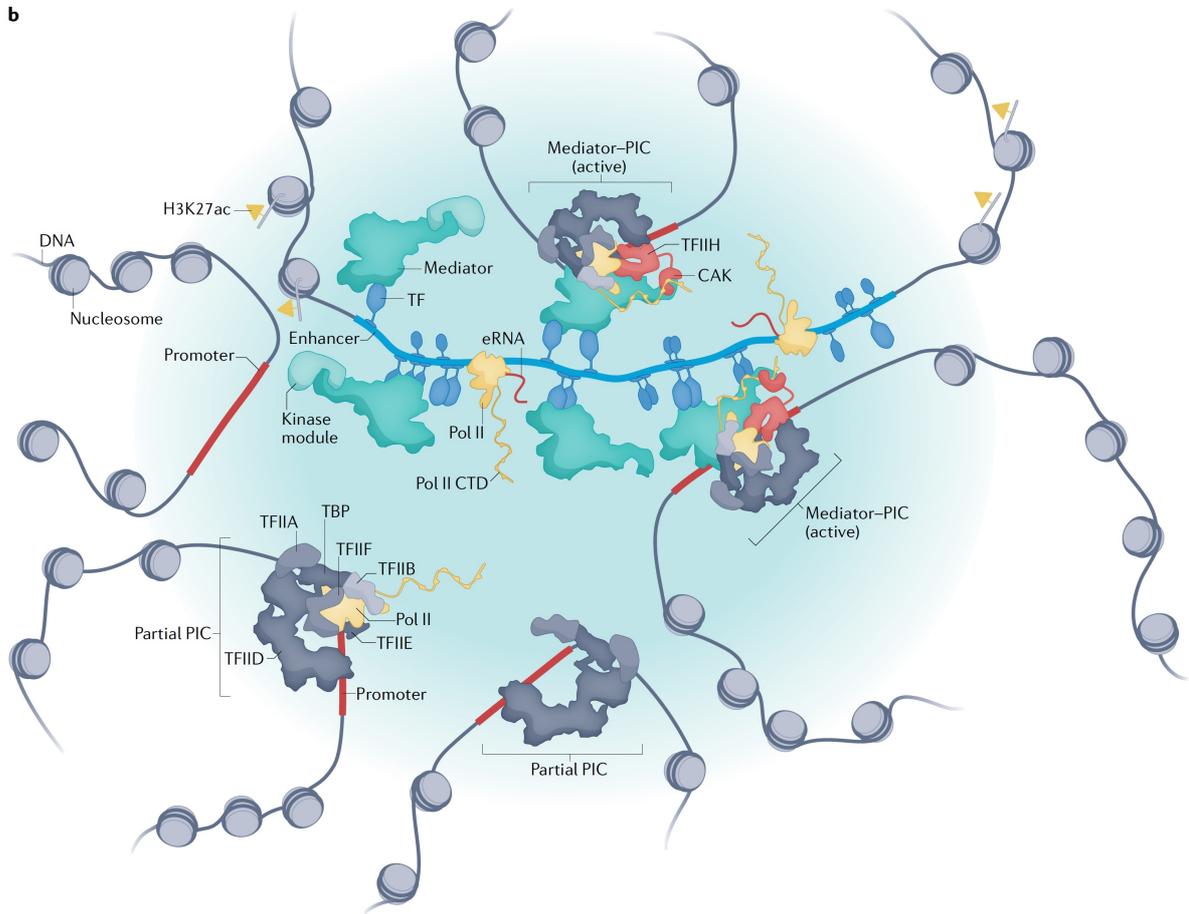


# Interaktion Mediator - RNA PII



# Der Mediator-Komplex (>30 UE)





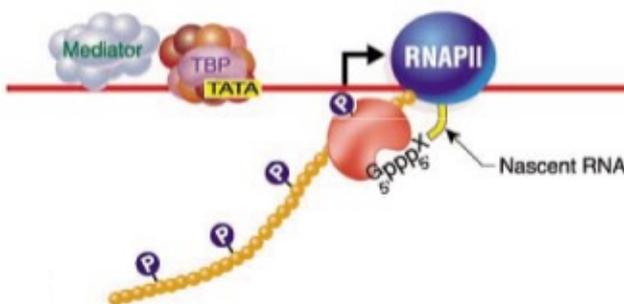
## Die C-terminale Domäne der Pol II koordiniert Transkription und Processing

**1**



Vor der Initiation der Transkription ist CTD nicht phosphoryliert und ist mit den Initiationskomplex assoziiert

**2**

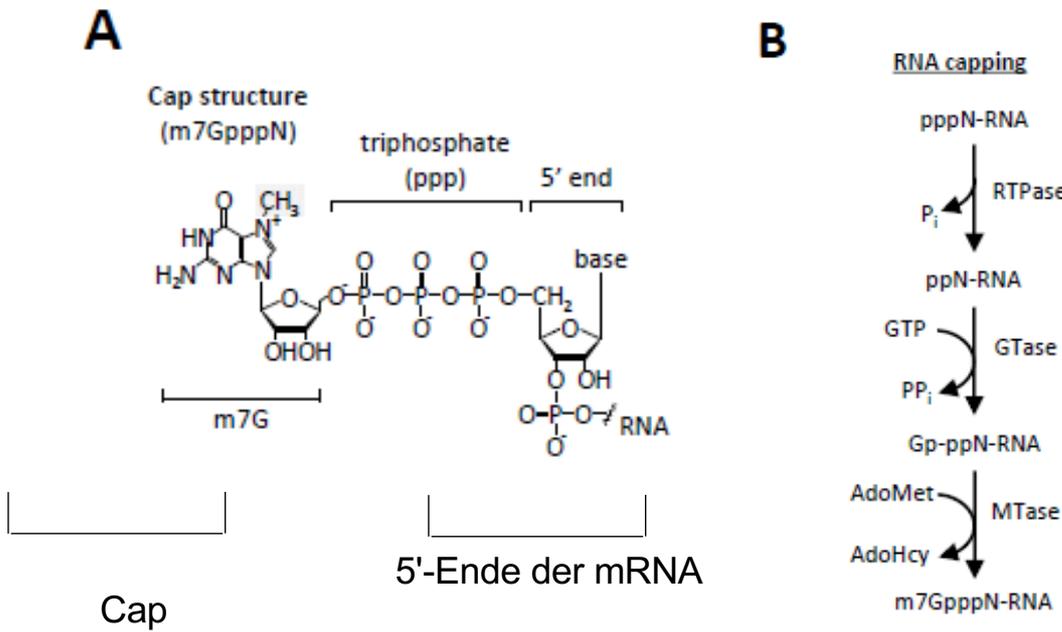


Die C-terminale Domäne der Pol II (CTD) trägt 52 Einheiten (Mensch) der Konsensussequenz Y S P T S P S die phosphoryliert wird.  
Promoter clearance, 5' Cap

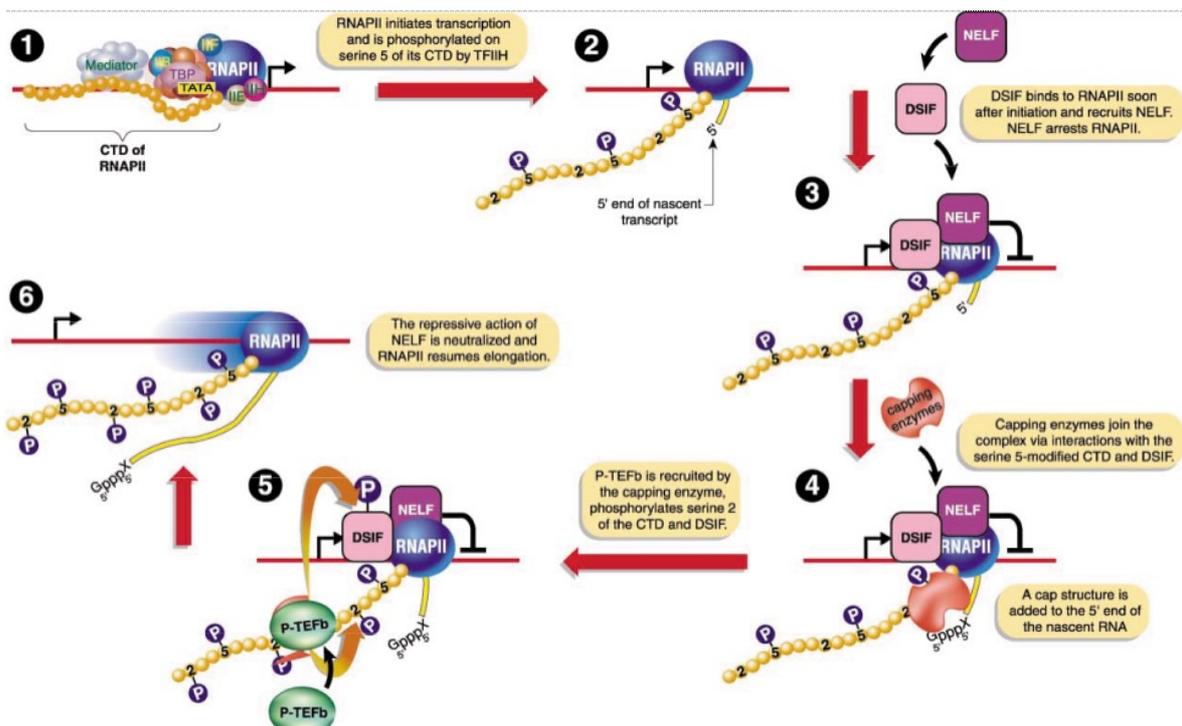
Processivität RNA Pol II: 50-90 Nukleotide / Sekunde

# Capping

Cap: 7-Methylguanosin über eine 5'-5'-Triphosphat-Brücke

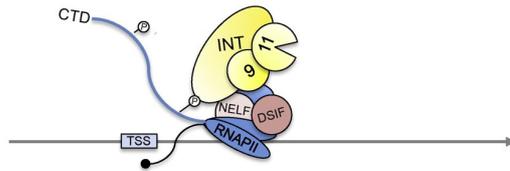


## Checkpoint Modell der Cap Bildung

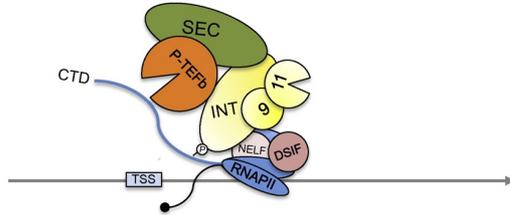


# Der Integrator Komplex reguliert Transkription und RNA Prozessierung

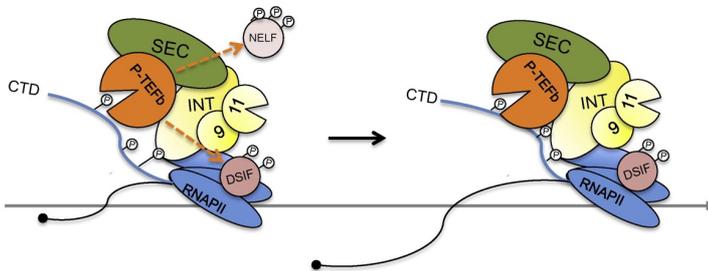
**X STOP**



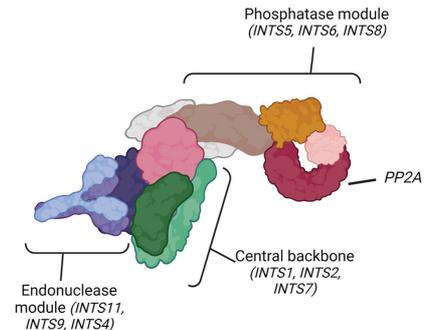
**— PAUSE**



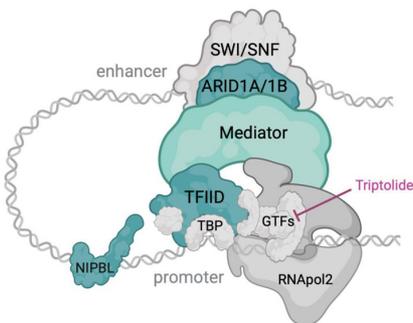
**✓ GO**



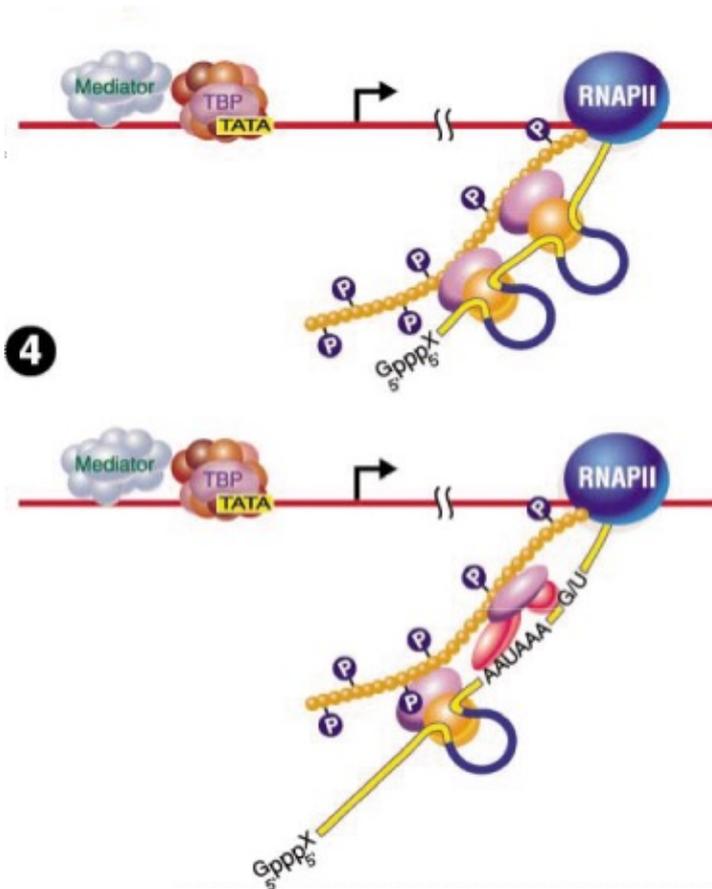
Mindestens 14 Untereinheiten



## Komplexität der Initiation der Transkription



initiating RNAPol2



Die phosphorylierte CTD rekrutiert die Spliceosomen

AGGU	A	AG	
------	---	----	--

und ist an der Termination der Transkription beteiligt. CstF cleavage stimulation factor F CPSF cleavage and polyadenylation specificity factor AAUAAA 10-30 nt, cleavage Poly-A-Polymerase PABP An die naszente RNA binden Transportproteine die den Export aus dem Kern regulieren.

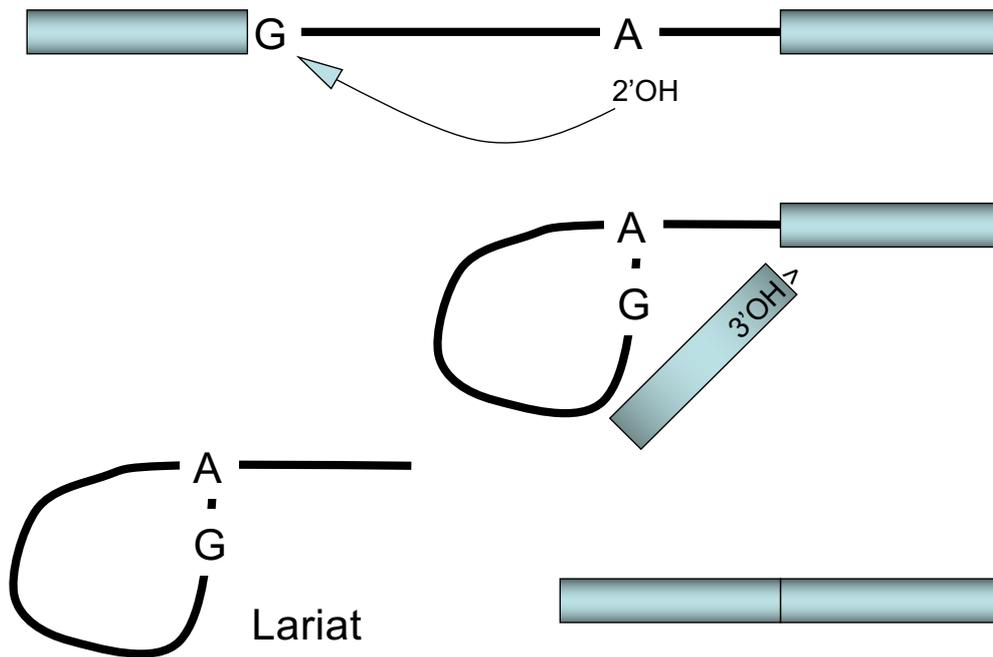
## Splicing

Introns = Relikte der RNA Welt; Ribozymaktivität

Selbstsplicende Introns -> Typ I Einbau eines zusätzlichen Guanin

-> Typ II Lariatbildung

# Selbstsplicing Typ II



Splicing, was brauchen wir?



GU/AG Regel konserviert von Hefe bis Mensch.

Ca. 1% der Introns AT/AC -> Dann anderes Spliceosome

# Splicing, was brauchen wir?

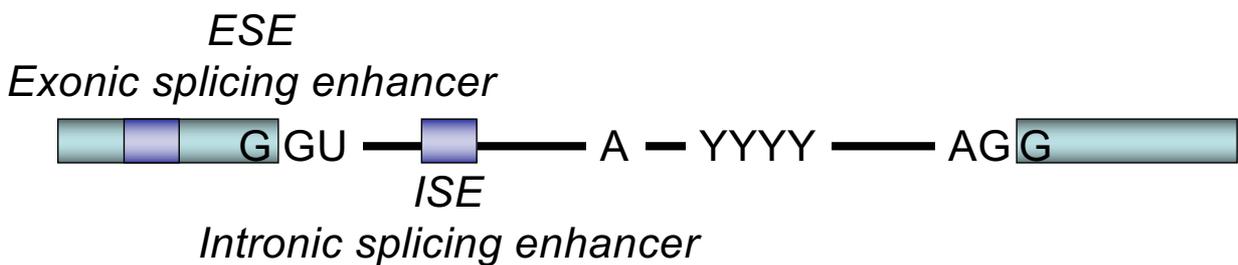


GU/AG Regel konserviert von Hefe bis Mensch.

Ca. 1% der Introns AT/AC -> Dann anderes Spliceosome

Branchpoint -> Lariat Bildung und Polypyrimidin Element (3')

# Splicing, was brauchen wir?



GU/AG Regel konserviert von Hefe bis Mensch.

Ca. 1% der Introns AT/AC -> Dann anderes Spliceosome

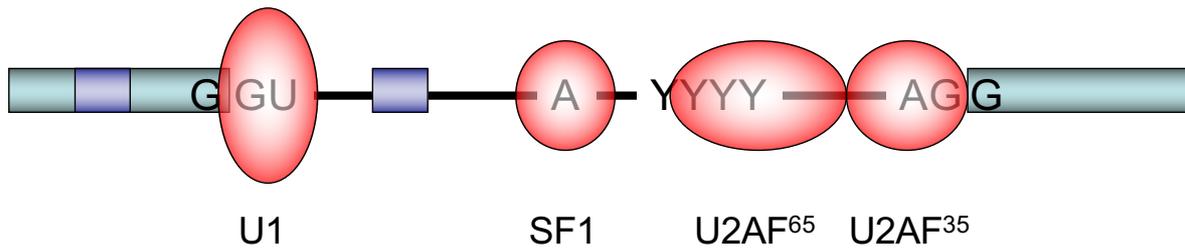
Branchpoint -> Lariat Bildung und Polypyrimidin Element (3')

ESE und ISE Elemente. **Exon definition** über ESE.

Introns oft wesentlich größer als Exons

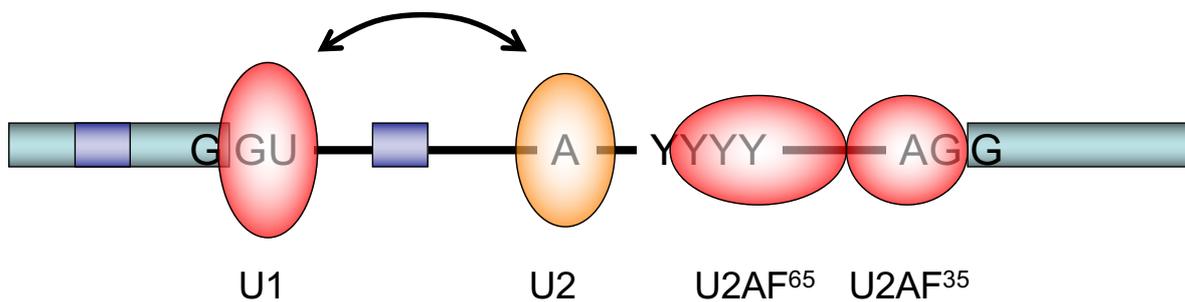
Inhibitorische Elemente: ESI und ISI

## Splicing, der E Complex



snRNA: U1

## Splicing, der A Complex



snRNA: U1 U2                      **B Complex: U5 U4/U6 ; hnRNP**

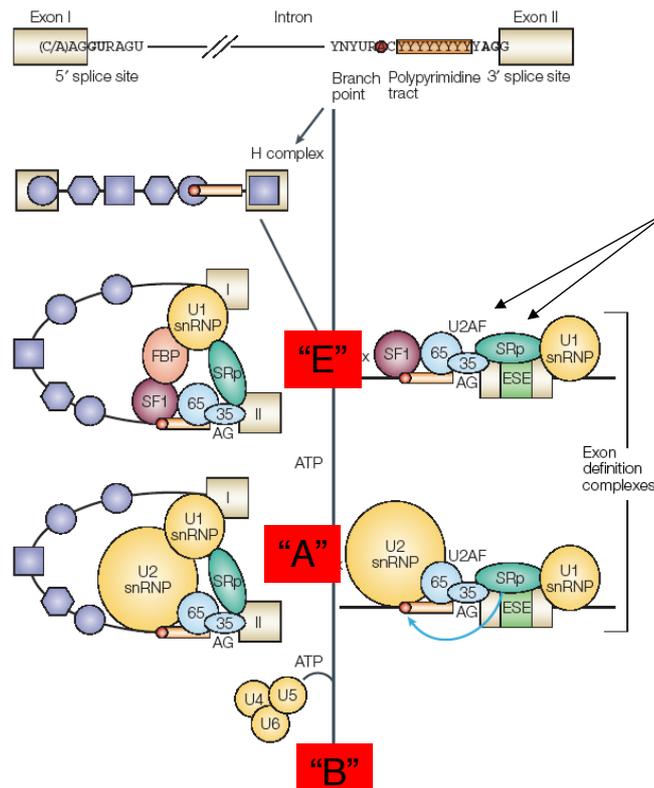
snRNP: "snurps" mit jeweils >10 Proteinen assoziiert  
U1-snRNP U2-snRNP usw.

Sm Proteine kommen in allen *snurps* vor.

Lupus erythematodes, Autoimmunerkrankung

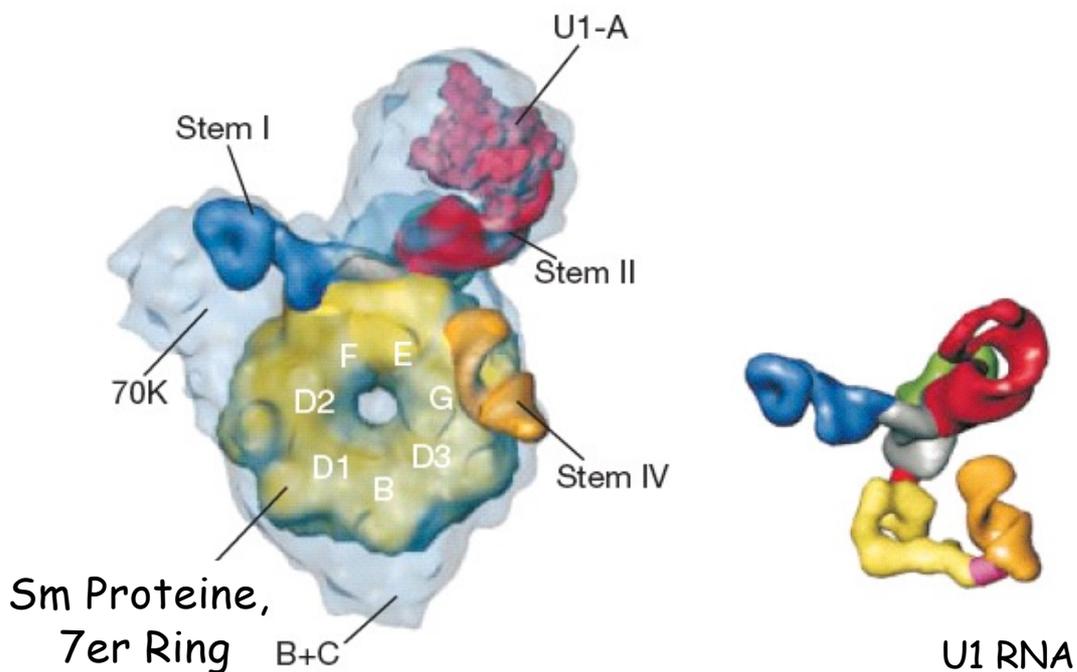


# Spliceosome Assembly geschieht über den Exon definition complex



SR Proteine binden am ESE und initiieren die Bildung eines Spliceosoms

## Aufbau der U1-snRNP



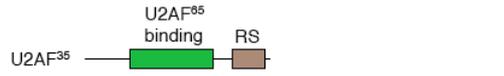
# Die SR-Proteine binden RNA und sind wichtige Splicing Co-Faktoren

## SR-family proteins



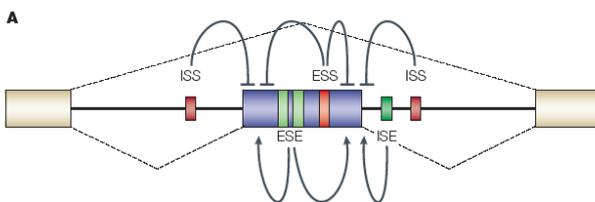
RRM = RNA recognition motif

## SR-related proteins



T/BS

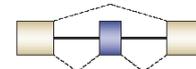
# Prinzipielle Möglichkeiten des alternativen Splicings



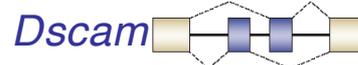
Erhöhung der Anzahl von Proteinformen, die von einem Gen generiert werden können.

Regulatorische Funktion.

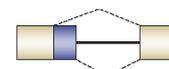
## Ba Cassette exons



## Bb Mutually exclusive exons



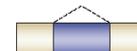
## Bc Competing 5' splice sites



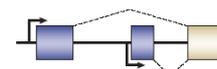
## Bd Competing 3' splice sites



## Be Retained intron

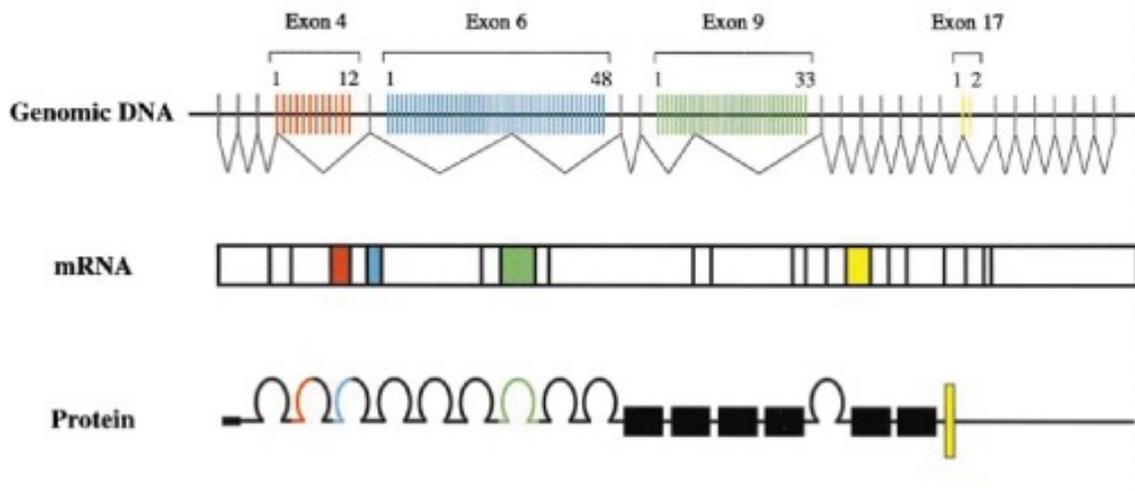


## Bf Multiple promoters

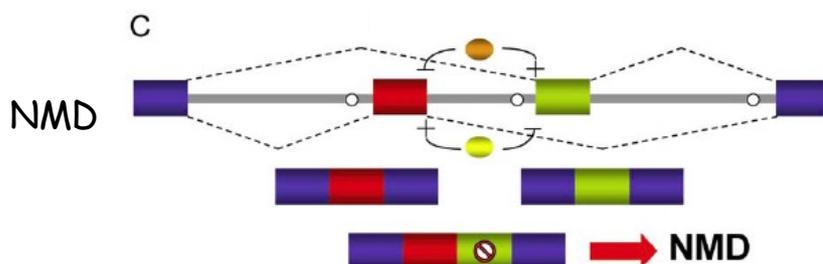
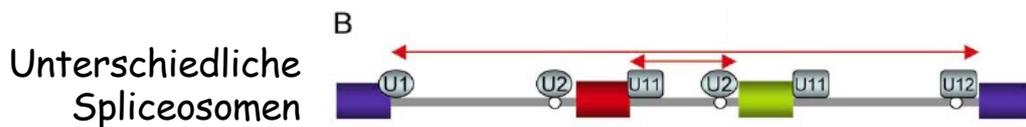
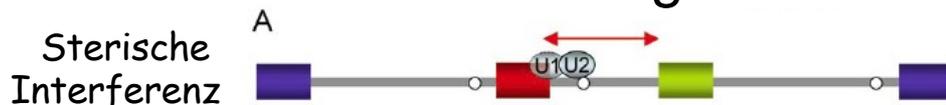


# Beispiel für Splicing I

**Dscam** Erhöhung der Anzahl von Proteintypen.  
Ein Gen > 38.000 Isoformen.

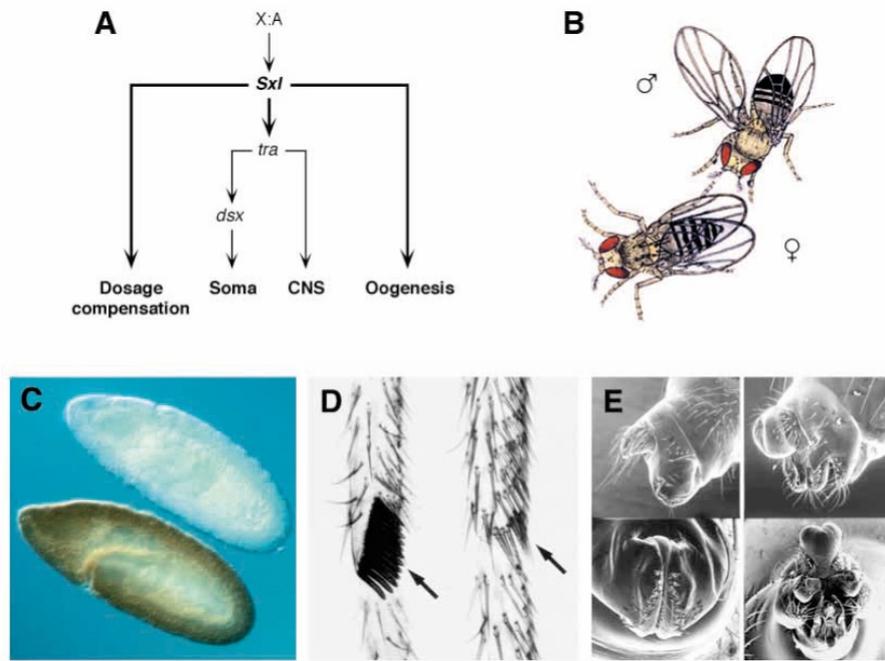


## Wie wird das alternative Splicing kontrolliert? Erklärungsmodelle



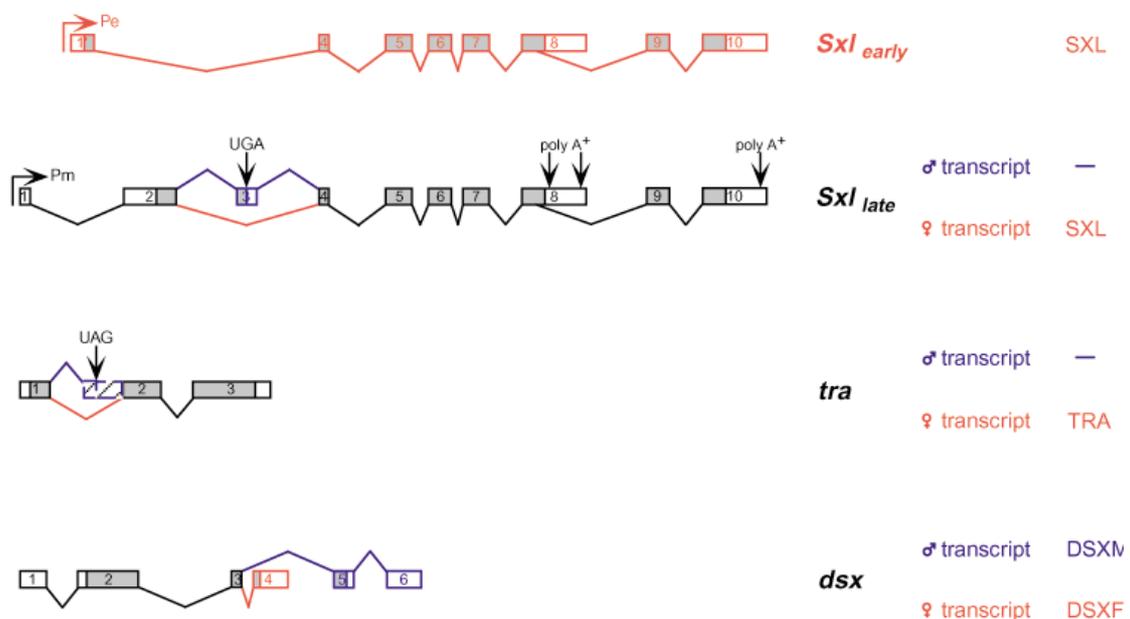
# Beispiel für Splicing II

**Sex lethal** Splicing als Regulatorische Funktion bei der Geschlechtsbestimmung von *Drosophila*

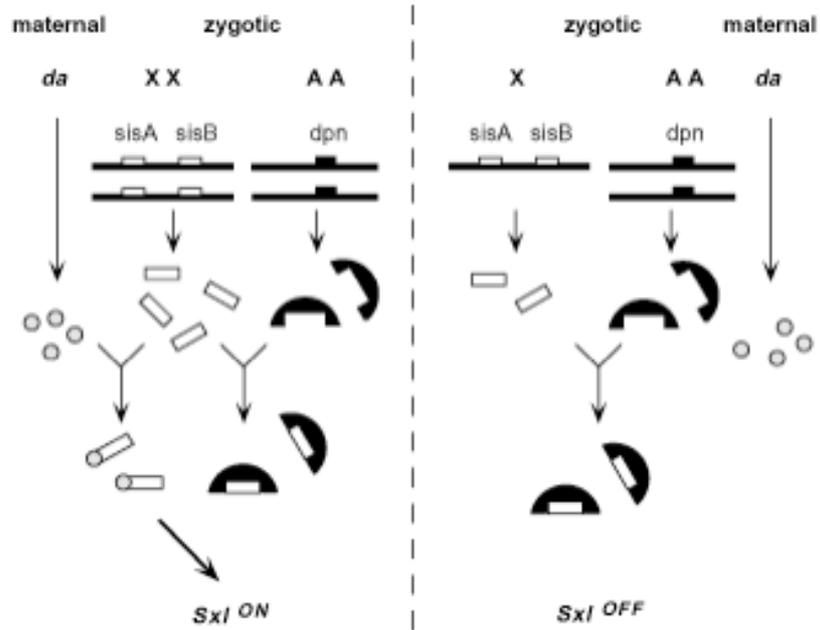


# Beispiel für Splicing II

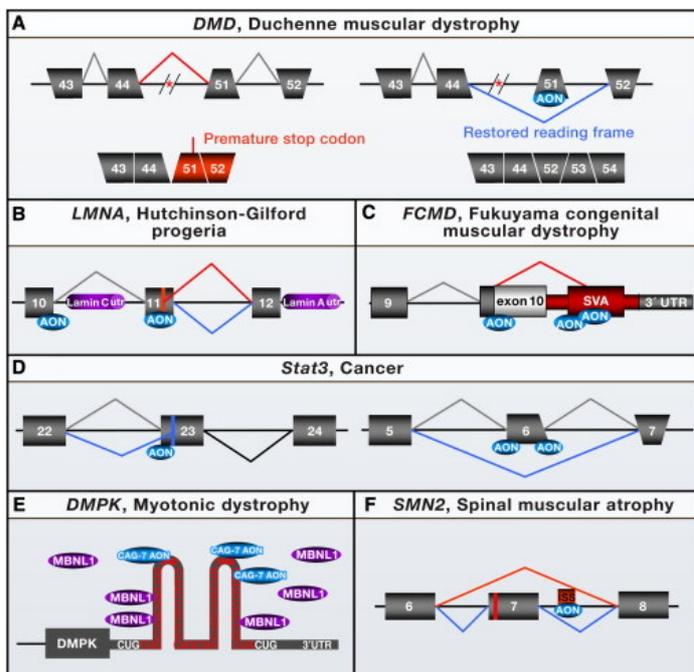
**Sex lethal** Splicing als Regulatorische Funktion bei der Geschlechtsbestimmung von *Drosophila*



## Sex lethal II Zählen der X-Chromosomen



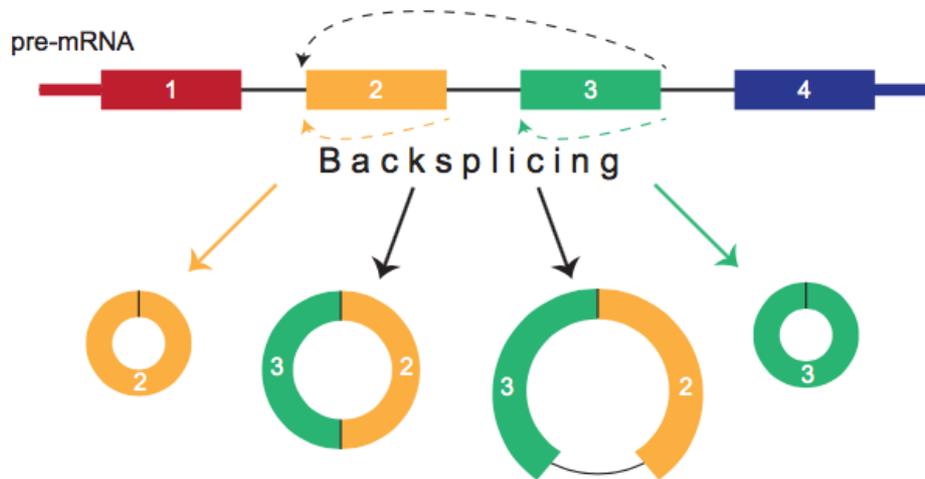
## Splicing und Krankheiten



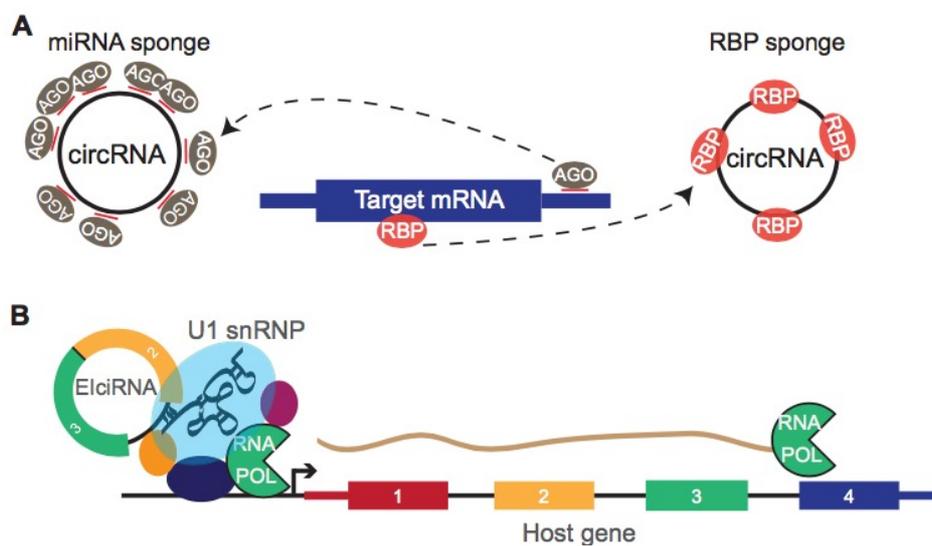
Quaking (Maus) KH-Protein, Splicing, Transport, Stabilität

-> Demyelinisierungsdefekt

# Splicing und circuläre RNA (circRNA)



## Funktionen der circRNA



# Formen der RNA Qualitätskontrolle

Polyadenylierung:

Translationseffizienz kann bis zu 1000fach unterschiedlich sein, dito gilt für Halbwertszeit.

Je länger desto stabiler...

Poly A bindende Proteine Unterschied Kern // Cytoplasma

Erkennung des Poly-A Schwanzes über die Struktur.

Poly-A bildet eine Einzelstrang A-Typ Helix.

Deadenylierung im Cytoplasma:

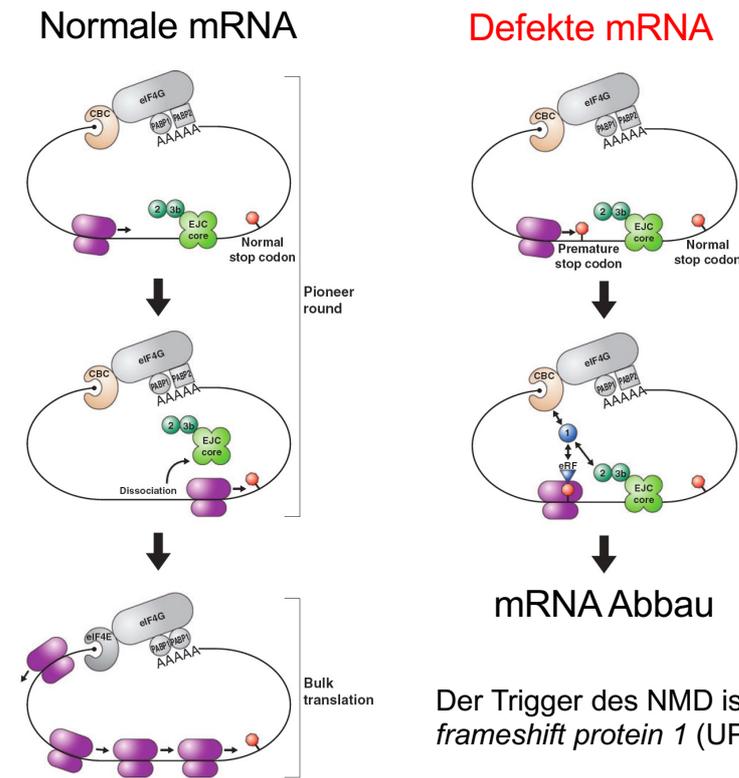
PAN2-PAN3 Komplex und CCR4-NOT Komplex

3'-5' Exonukleasen.

# Formen der RNA Qualitätskontrolle

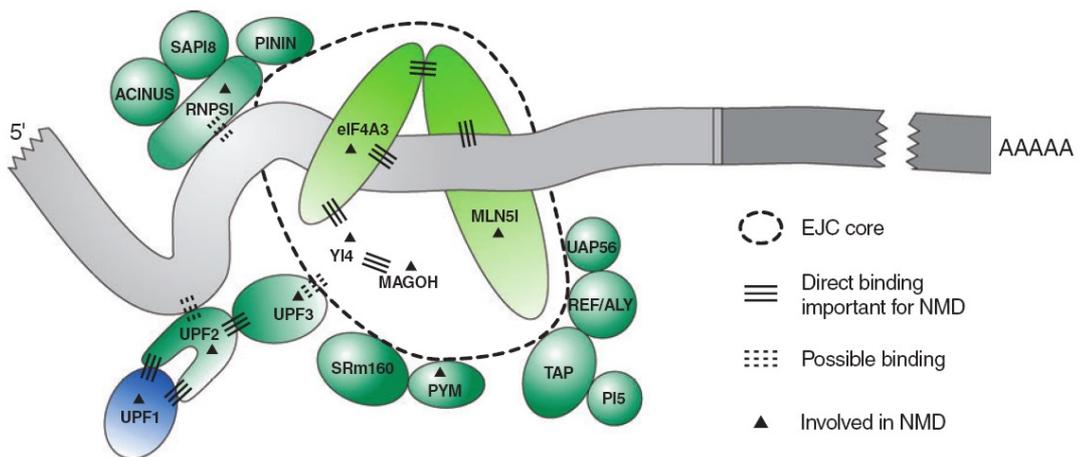
mRNA	NMD	Nonsense-mediated decay (zu frühe Termination der Translation; Rekrutierung von Upf Proteinen zum Terminationskomplex Decapping; 5'->3' Abbau; Endonuklease)
	NSD	Nonstop decay (Kein Stop Codon; Ski7p Rekrutierung; 3'->5' Abbau; Endonuklease)
	NGD	No-Go decay (Starke Translationsverzögerung; Rekrutierung von Hbs1p und Dom34p; Endonuklease; Exonuklease)
	REMD	Ribosome extension-mediated decay (Translation über normales Stop-Codon; Entfernung von 3' UTR bindenden Proteinen)
tRNA	RTD	rapid tRNA decay
rRNA	NRD	Non functional rRNA decay

# NMD: Mechanismus der *premature stop codon (PTC)* Erkennung bei Säugern



Der Trigger des NMD ist die Bindung des *up-frameshift protein 1 (UPF1)* an UPF-2.

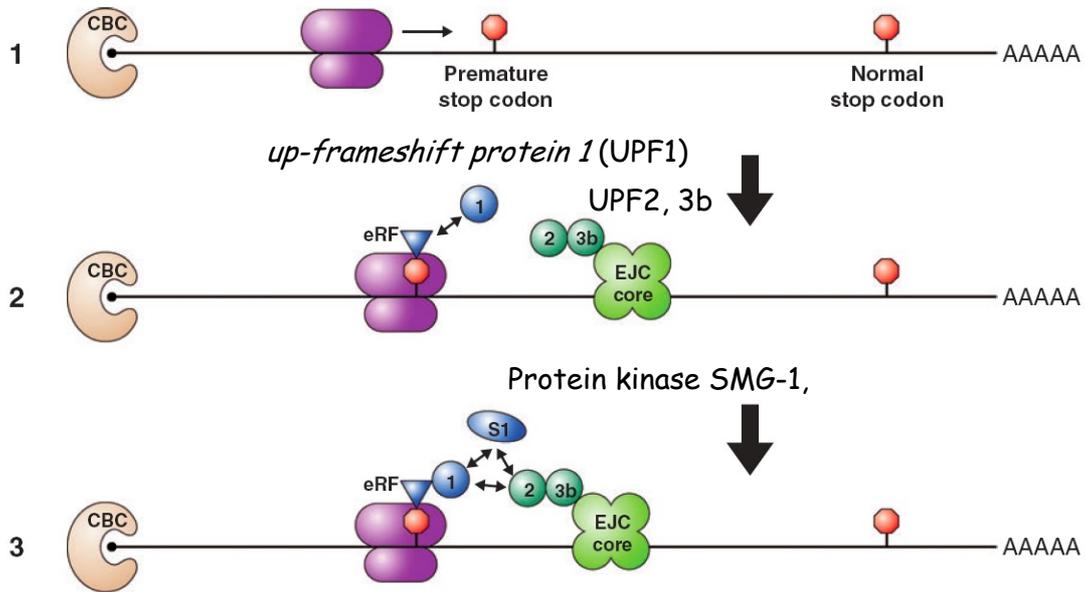
## Modell des *Exon-Junction* Komplexes (EJC)



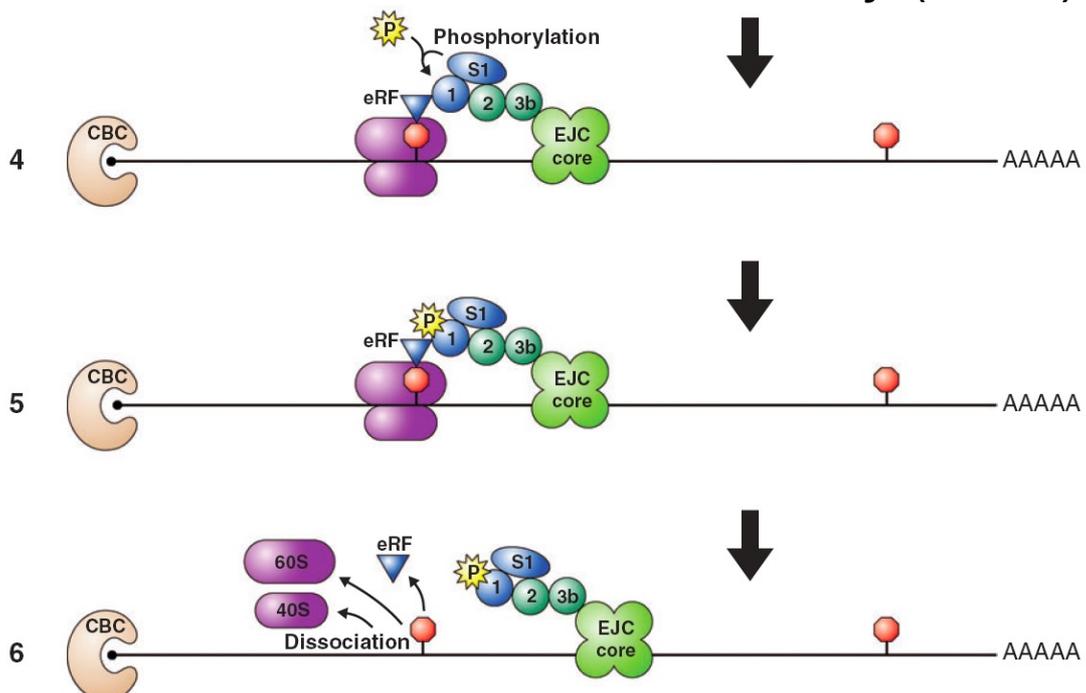
1. Funktion des EJC beim Transport der mRNA vom Kern in das Cytoplasma, 2. NMD, 3. Translationskontrolle

# Vorbereitung der mRNA für den Abbau nonsense mediated mRNA decay (NMD)

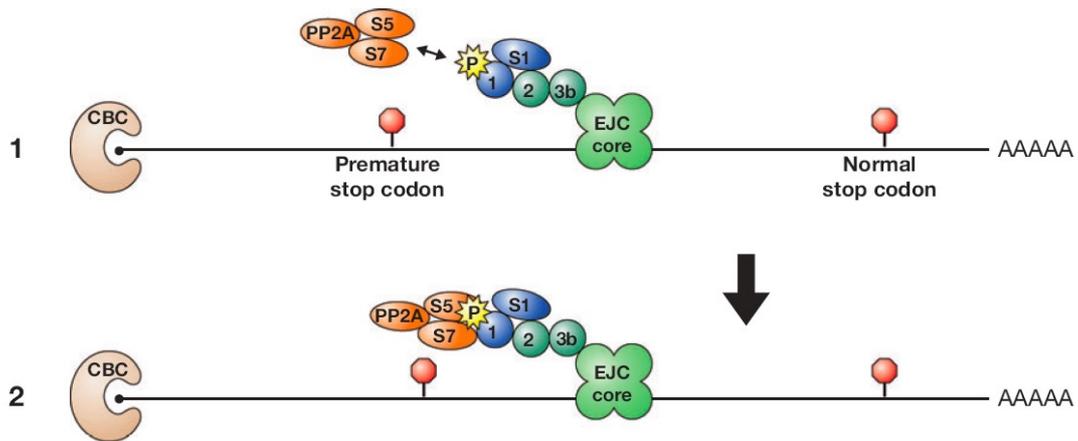
CBC: Cap-binding complex



# Vorbereitung der mRNA für den Abbau nonsense mediated mRNA decay (NMD)

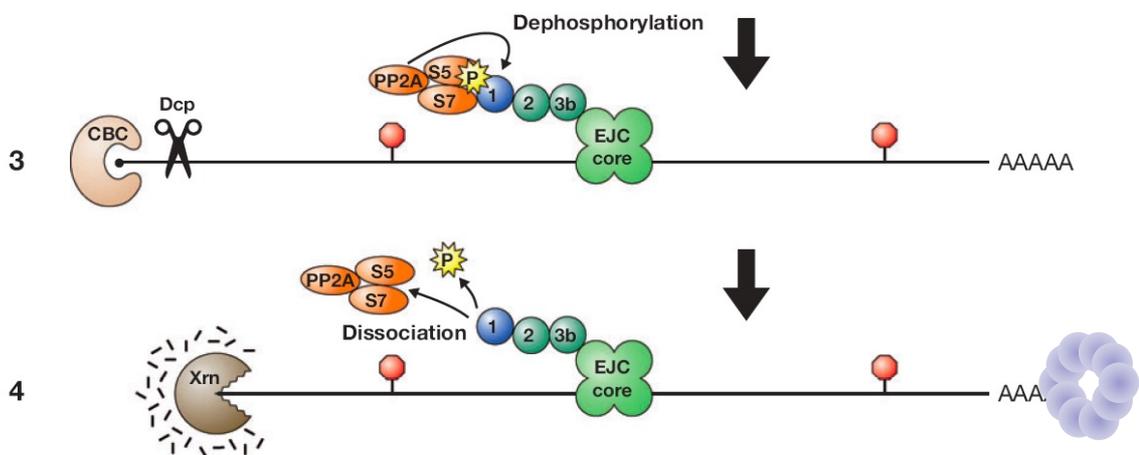


# Vorbereitung der mRNA für den Abbau nonsense mediated mRNA decay (NMD)



SMG5, 7  
PP2A: Protein phosphatase 2A

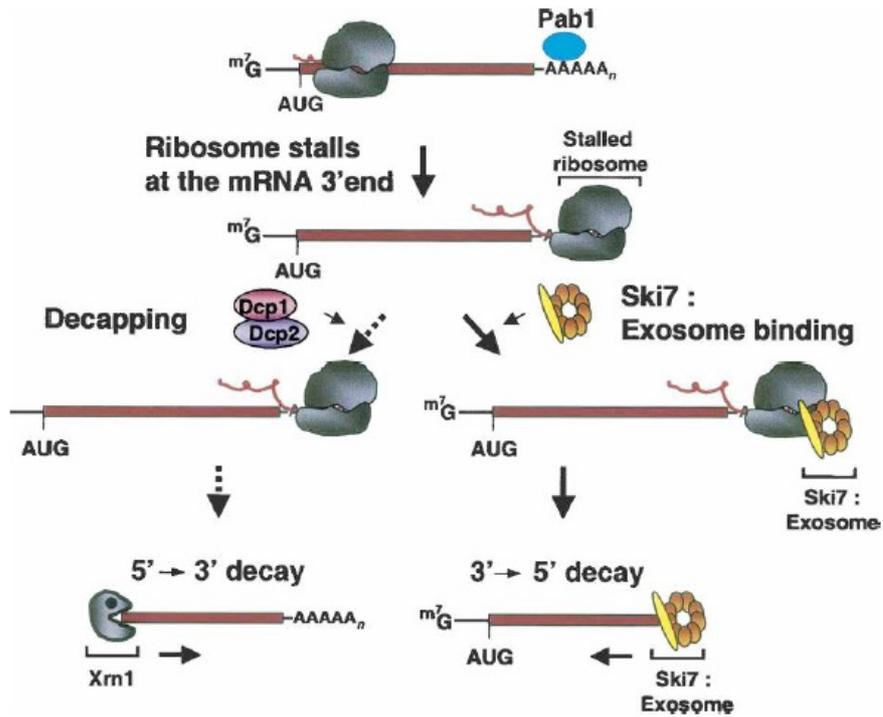
## NMD



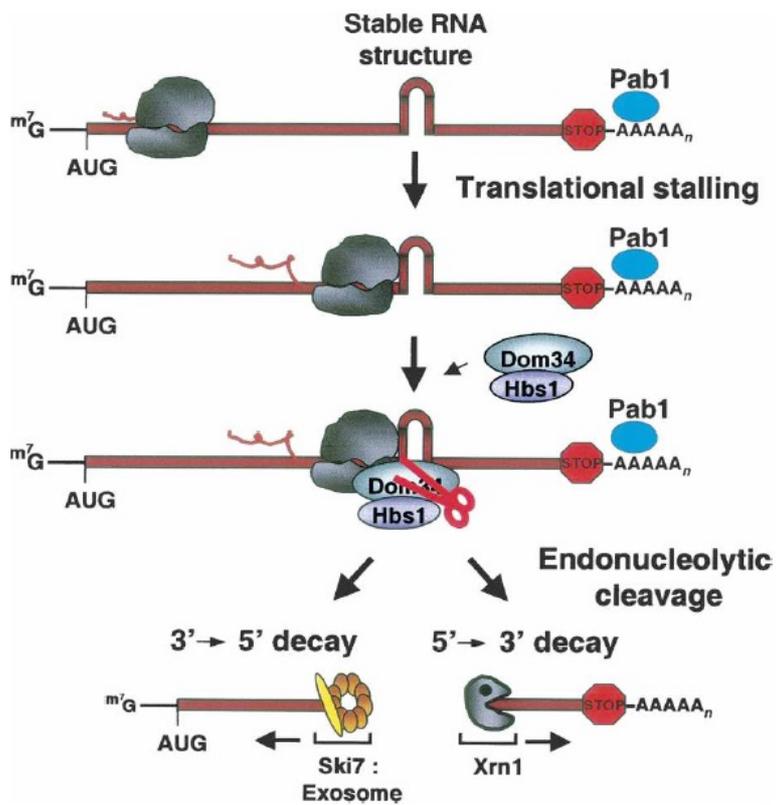
Exosome: 10 SU Komplex mit 3'->5' Exonuklease  
Aktivität. (Ski7)

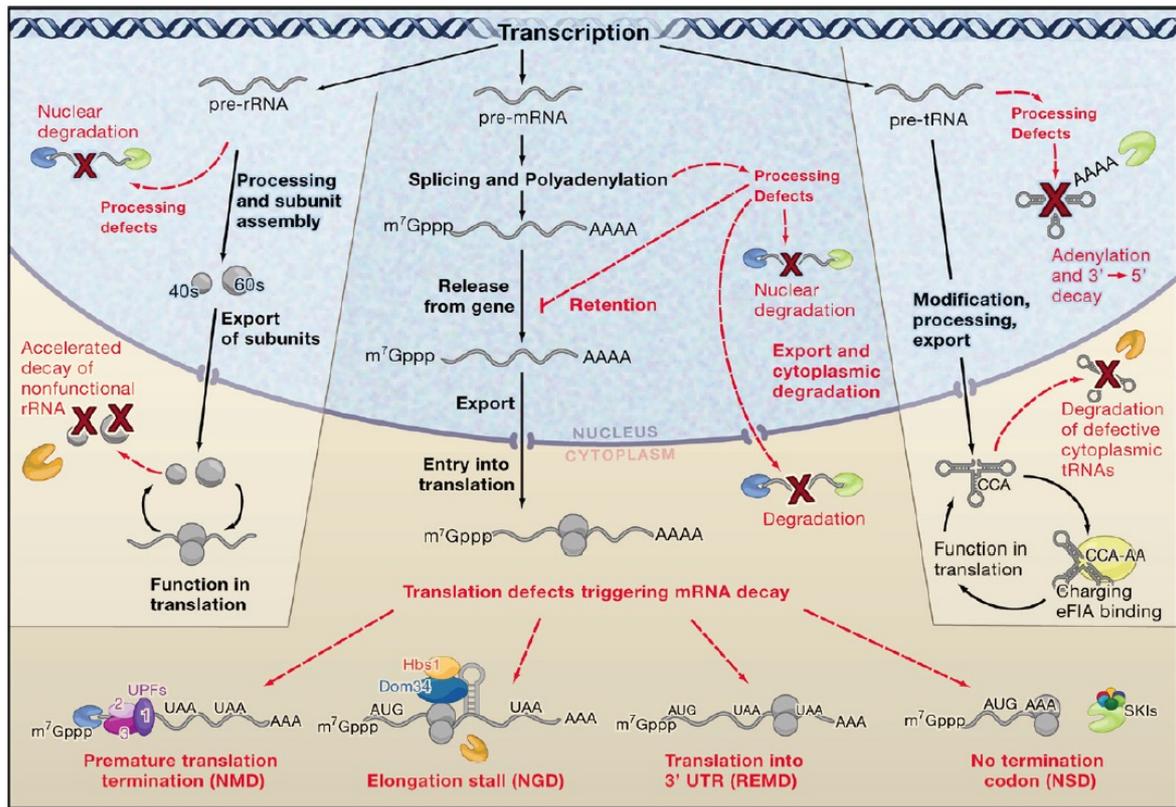
Xrn1p 5'->3' Exonuklease. Erfordert uncapped mRNAs

# NSD: Nonstop decay



# NGD: No-Go decay





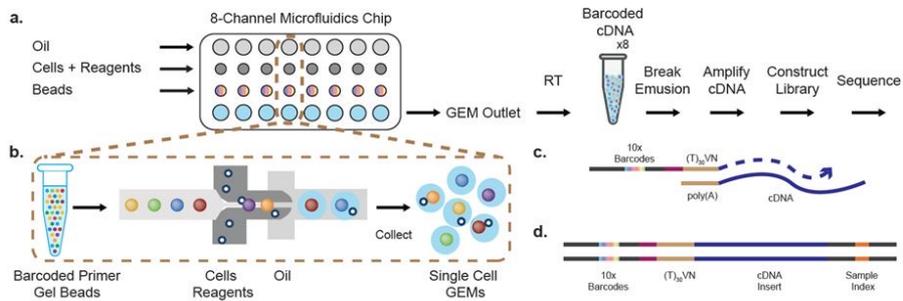
## RNA Verteilung

RNA wird zeitlich und räumlich spezifisch exprimiert

RNA wird spezifisch in der Zelle lokalisiert  
 -> Kompartimentierung

# Single cell RNA Sequenzierung

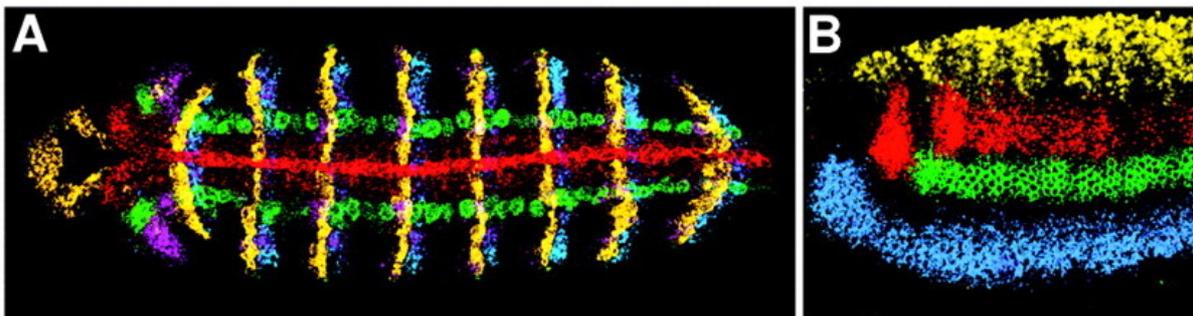
## 10X Genomics droplet-based protocol



- Encapsulates up to 48,000 cells in 10 minutes

## RNA Verteilung

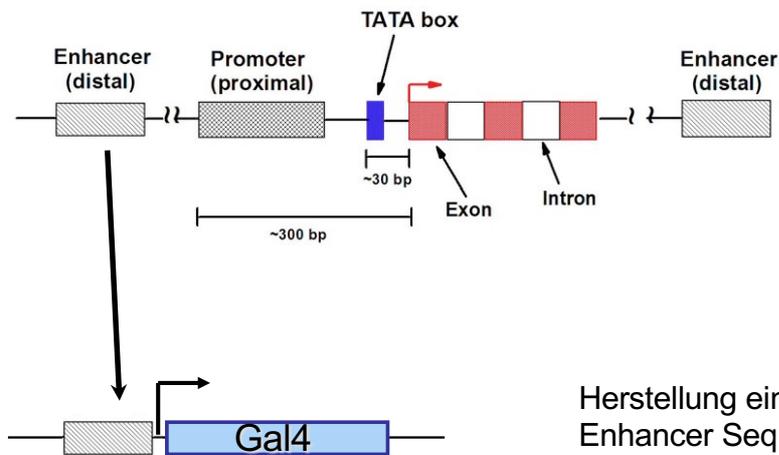
RNA wird zeitlich und räumlich spezifisch exprimiert



Fluoreszenz-markierte RNA Sonden von 4 Genen

-> in situ hybridisierung

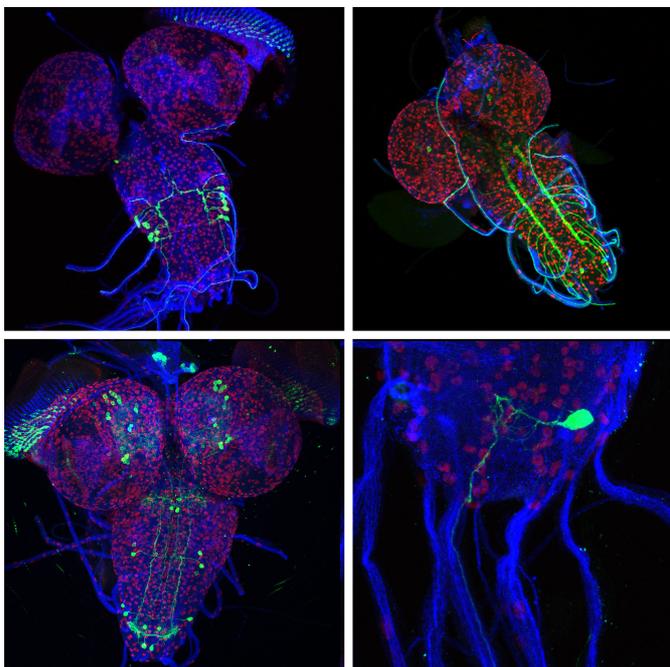
# Identifizierung von regulatorischen Sequenzen



- Struktur eines typischen Gens

Herstellung eines Transgens mit einer Enhancer Sequenz vor z.B. dem Gal4 Gen. Expression von UAS-gekoppelten Transgenen

# Identifizierung von regulatorischen Sequenzen

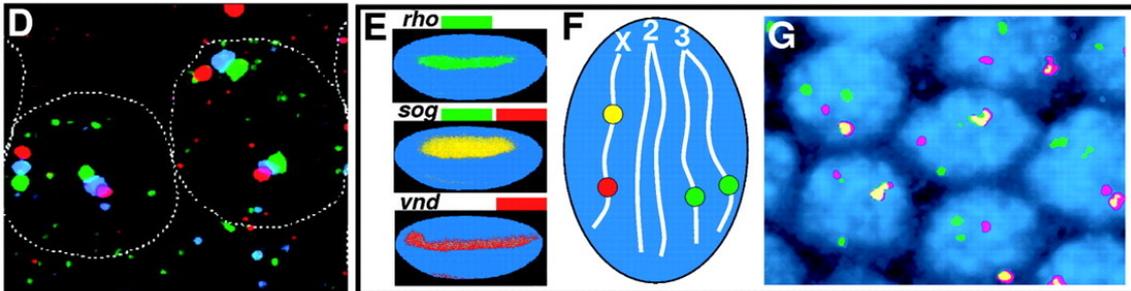


Ansteuerung einzelner Nervenzellen im Gehirn von Drosophila Larven.

Verhaltensanalyse!

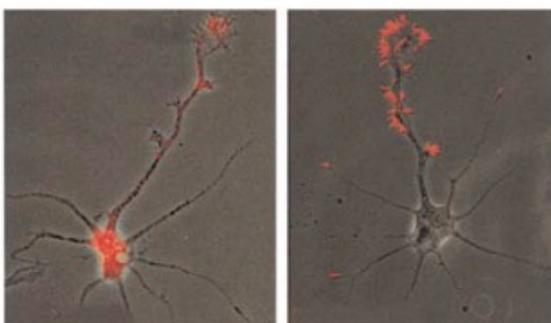
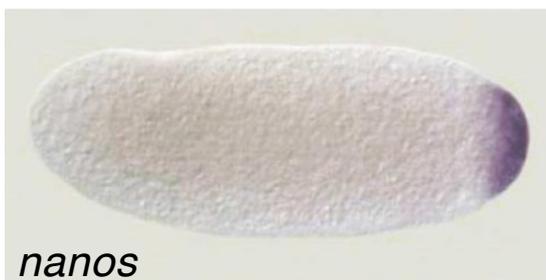
# RNA Verteilung

Nachweis von nascenten Transkripten im Zellkern

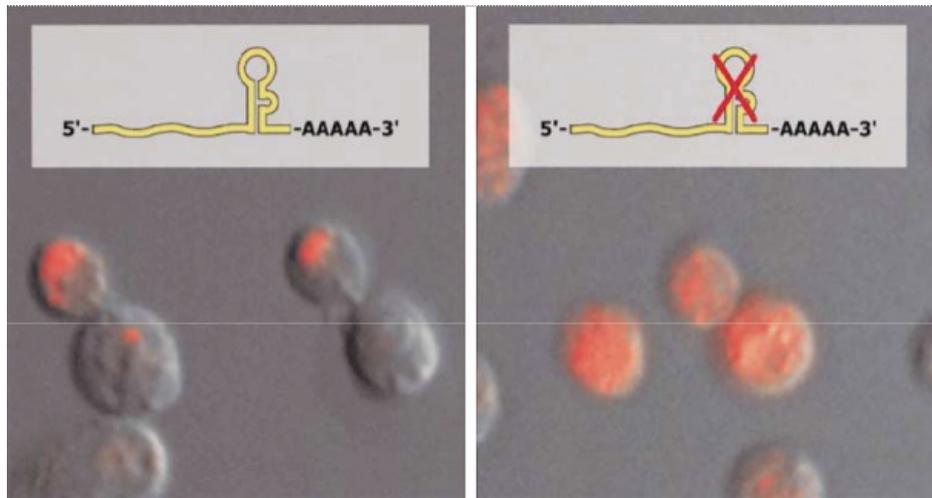


## Subzellulär lokalisierte RNA

RNA wird spezifisch in der Zelle lokalisiert  
-> Kompartimentierung, maternale Faktoren

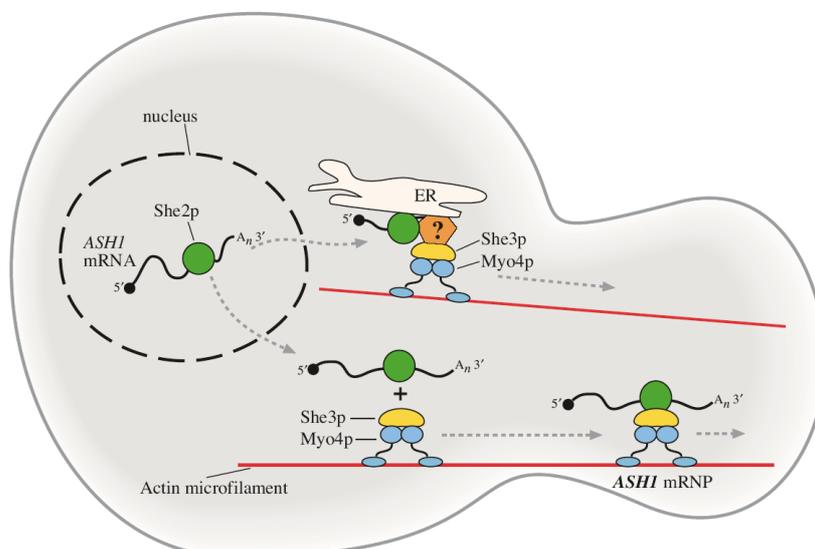


# Subzelluläre RNA Verteilung hängt von RNA-Sekundärstrukturen ab



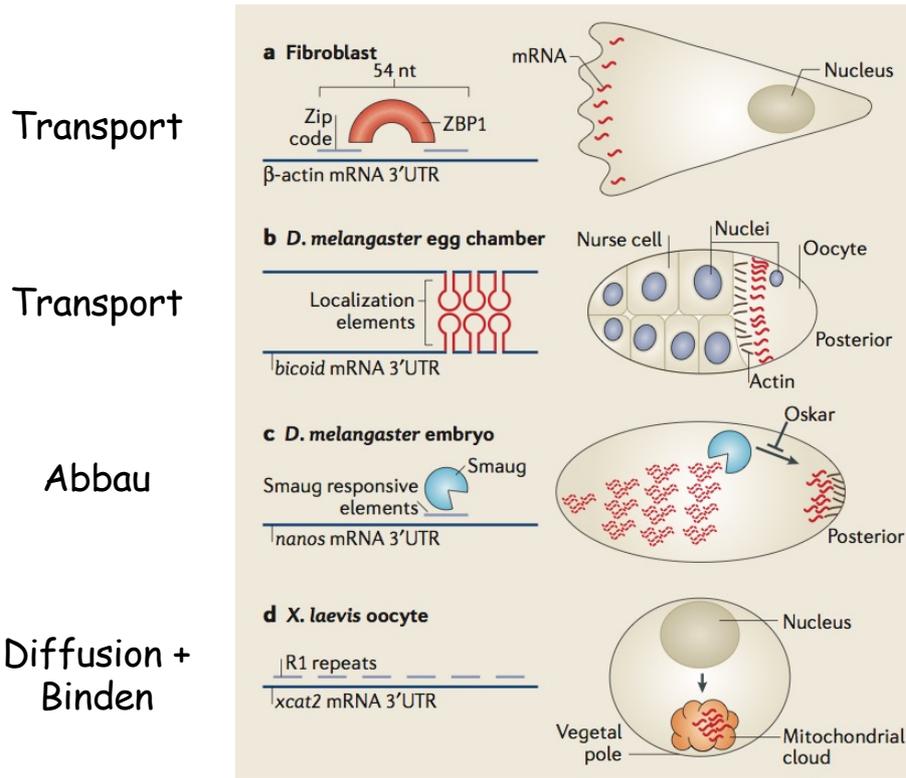
Ash1 mRNA

# Subzelluläre RNA Verteilung hängt von RNA-Sekundärstrukturen ab

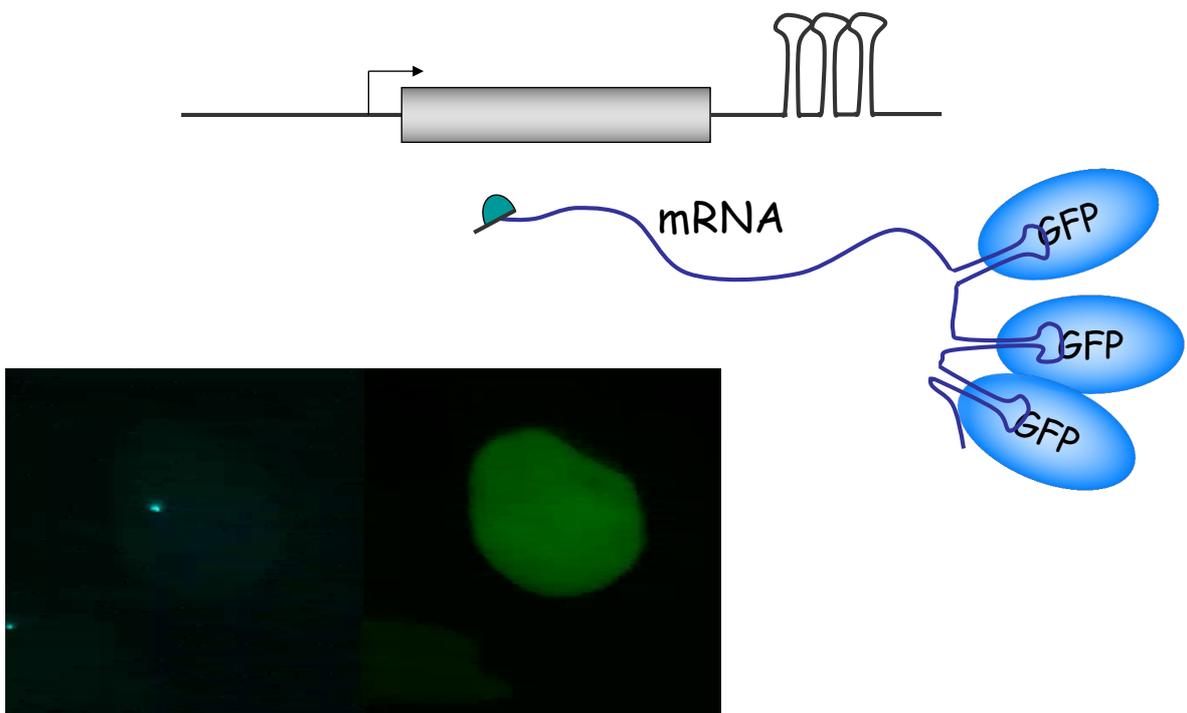


Ash1 mRNA. Transport entlang von Aktin, Typ IV Myosin

# Cis-Elemente steuern mRNA Lokalisation

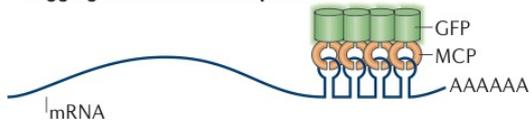


## Kann man Transkription sehen? MS2

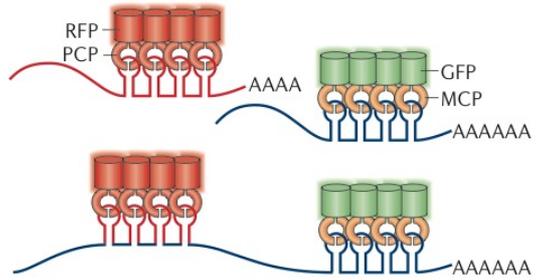


# Möglichkeiten der MS2 Technologie

**a** Single-mRNA-molecule imaging by tagging with fluorescent proteins



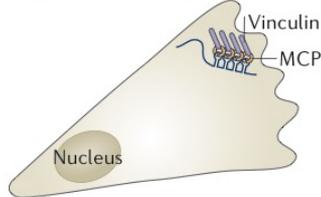
**b** Dual-colour labelling



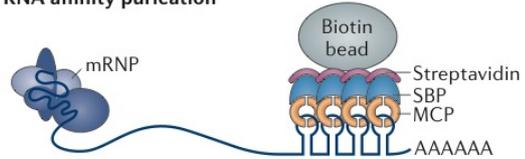
**c** 'Background-free' imaging



**d** Tethering an mRNA to a specific cellular location



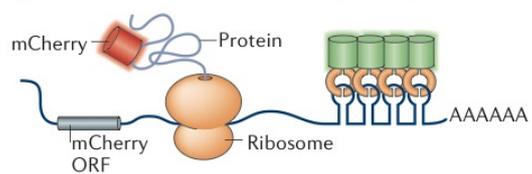
**e** RNA affinity purification



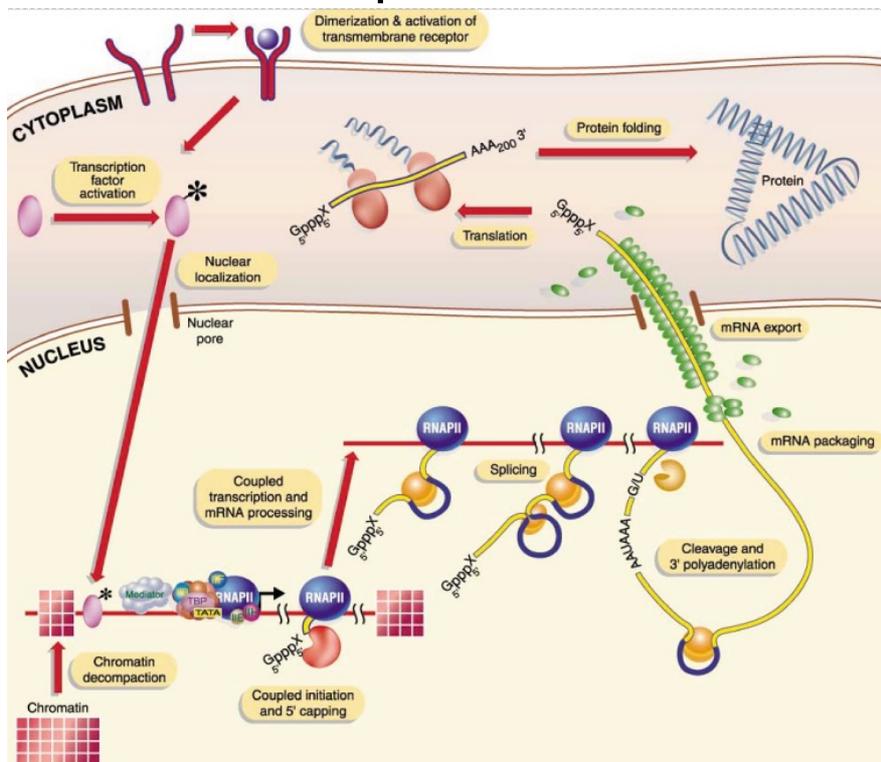
**f** Tethering a protein to the mRNA



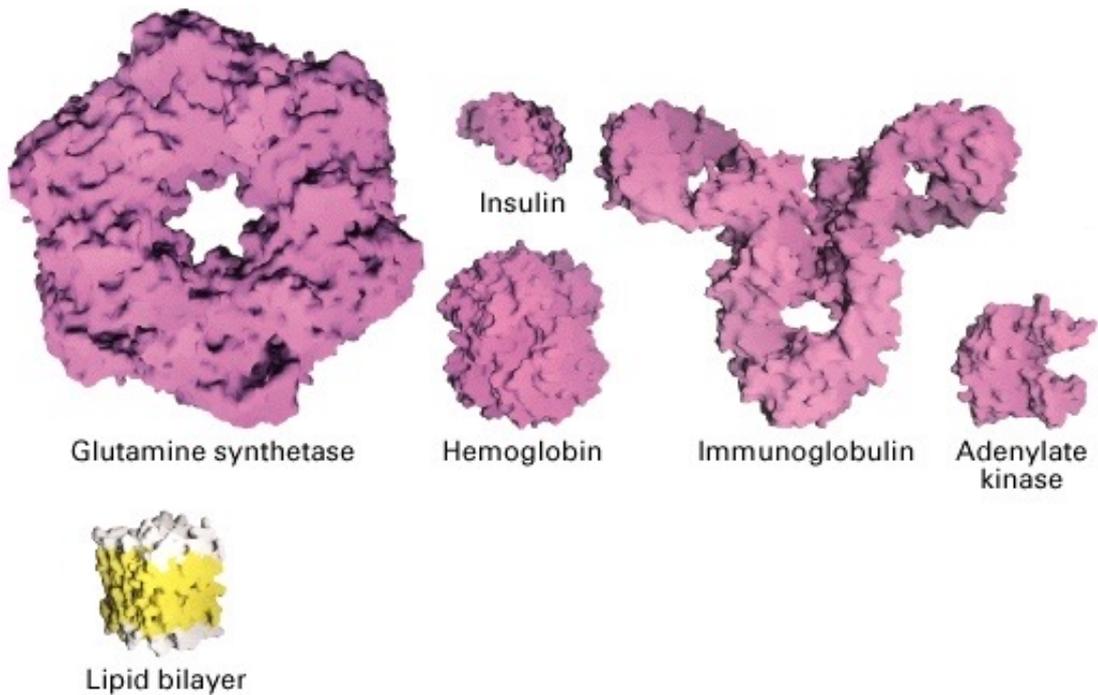
**g** Localization of an mRNA and its protein product



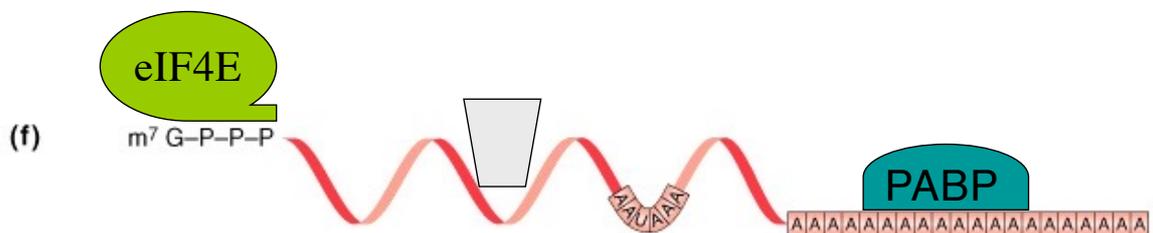
# Möglichkeiten der Regulation der Gen Expression



DNA   Proteine



## RNA bindende Proteine regulieren die Translation



Poly A Binding Protein

Die Translation kann auf mehreren Ebenen reguliert werden:

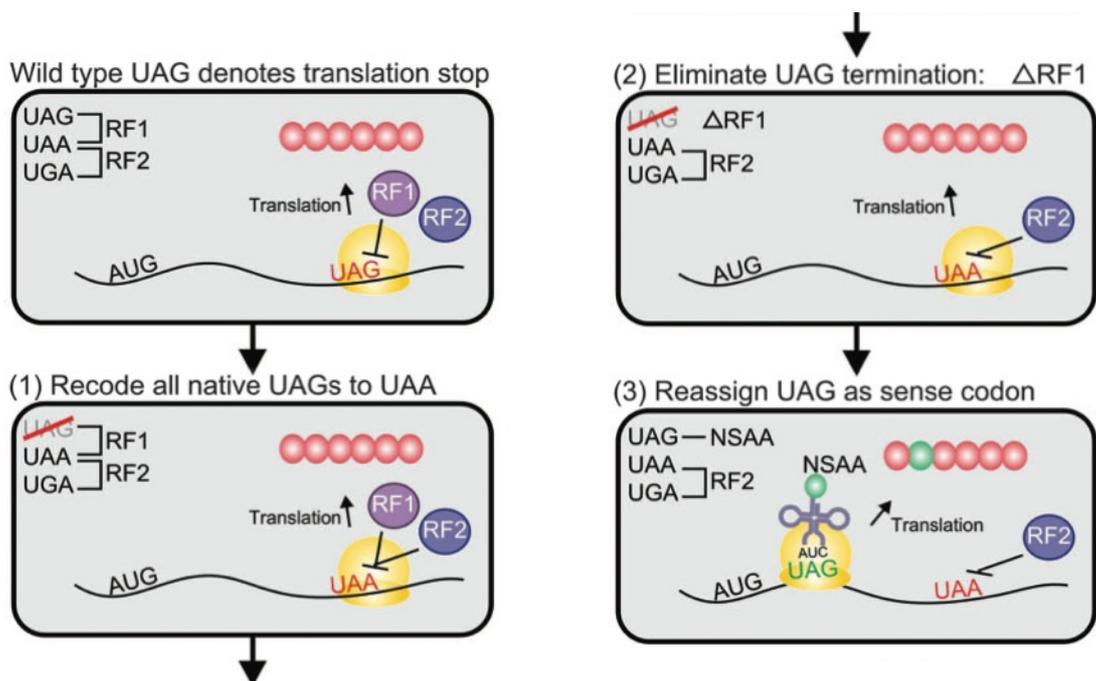
- RNA Stabilität
- Initiation
- Elongation

# Der genetische Code ist universell

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Codon	Universal Code	Unusual Code	Occurrence*
UGA	Stop	Trp	<i>Mycoplasma</i> , <i>Spiroplasma</i> , mitochondria of many species
CUG	Leu	Thr	Mitochondria in yeasts
UAA, UAG	Stop	Gln	<i>Acetabularia</i> , <i>Tetrahymena</i> , <i>Paramecium</i> , etc.
UGA	Stop	Cys	<i>Euplotes</i>

## Genome engineering



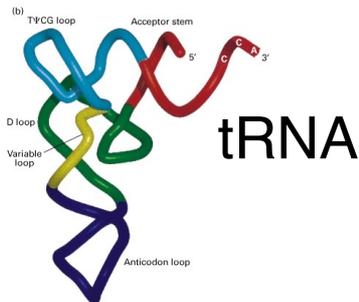
# Das AUG bestimmt den Leserahmen = ORF



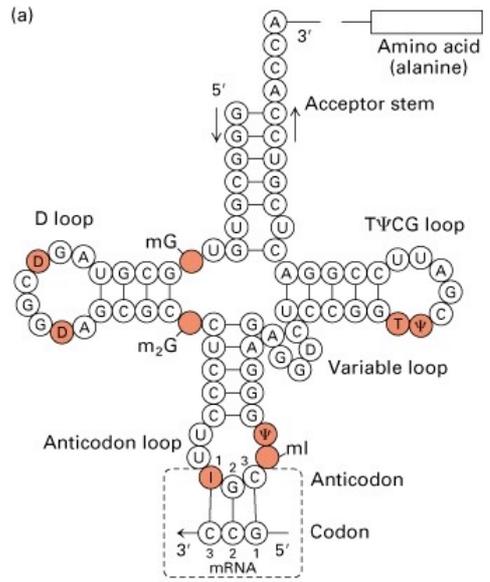
ACGGACCCAUGUACCCC CGCAGCUGCA

Met Tyr Pro Arg Ser Cys

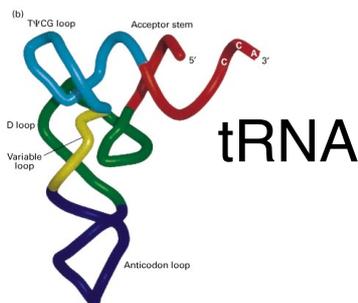
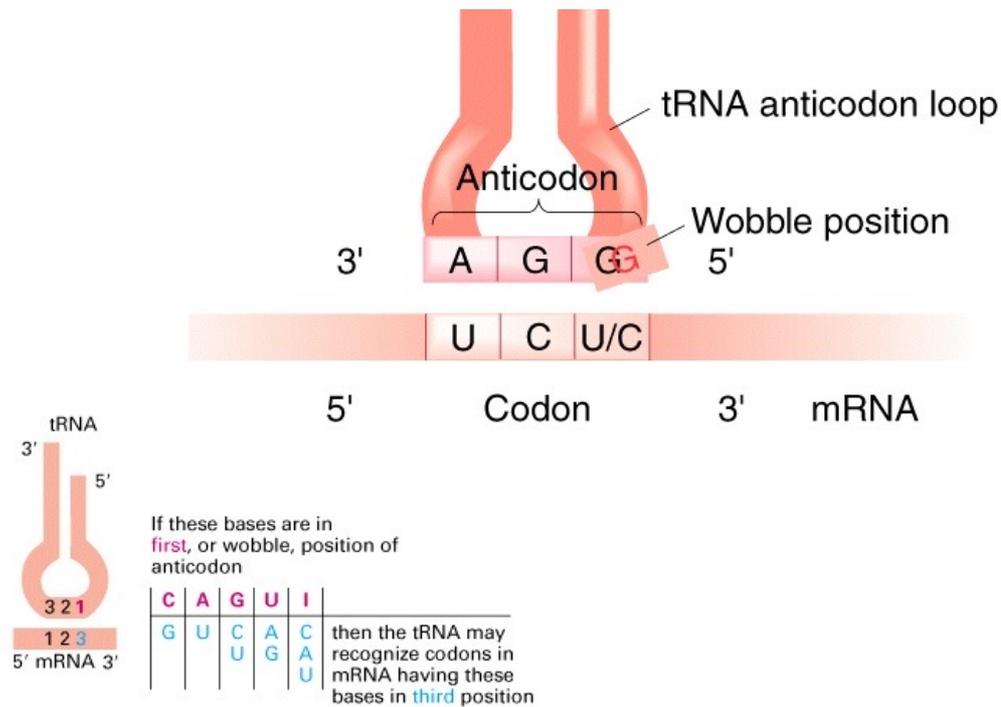
First letter	Second letter				Third letter	
	U	C	A	G		
U	UUU } Phe	UCU } UAU } UGU } UCA } UUA } UAA } UAG } UGA } UGG } UGC } UGA } UGG } UCA } UUA } UAA } UAG } UGA } UGG } UGC } UGA } UGG }	UCC } Ser	UAC } Tyr	UCC } Cys	U C A G
	UUA } Leu	UCA } UAG } UGA } UGG } UCA } UUA } UAA } UAG } UGA } UGG } UGC } UGA } UGG }	UCG } Stop	UAA } Stop	UUA } Trp	U C A G
	UUG } Leu	UCG } Stop	UAG } Stop	UGA } Stop	UGG } Trp	U C A G
C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U C A G	
	CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	U C A G	
	CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	U C A G	
A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U C C A G	
	AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser	U C C A G	
	AUA } Met	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg	U C C A G	
G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U C C A G	
	GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	U C C A G	
	GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	U C C A G	



Es gibt 20 Aminosäuren.  
 Es gibt 64 ( $4^3$ ) Codons.  
 Prokaryoten haben 30-40 verschiedene tRNAs  
 Eukaryoten haben 50-100 verschiedene tRNAs.  
 Jede tRNA wird vielfach modifiziert.  
 Am 3' Ende wird eine CCA Sequenz angehängt (nicht Genom-kodiert!).

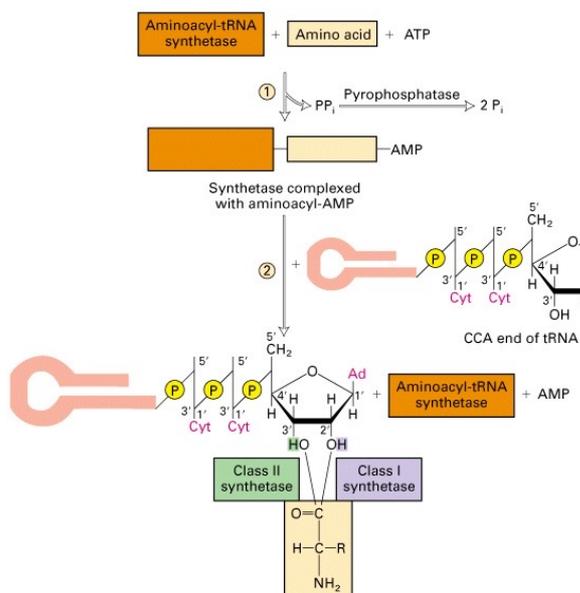


# Eine tRNA kann mehrere Codons auf der mRNA erkennen



Jede tRNA wird von einer spezifischen Aminoacyl-tRNA-Synthetase erkannt.

Nach Beladung erkennt die tRNA ein spezifisches Codon -> aber Wobble-Position!



# Ribosomen

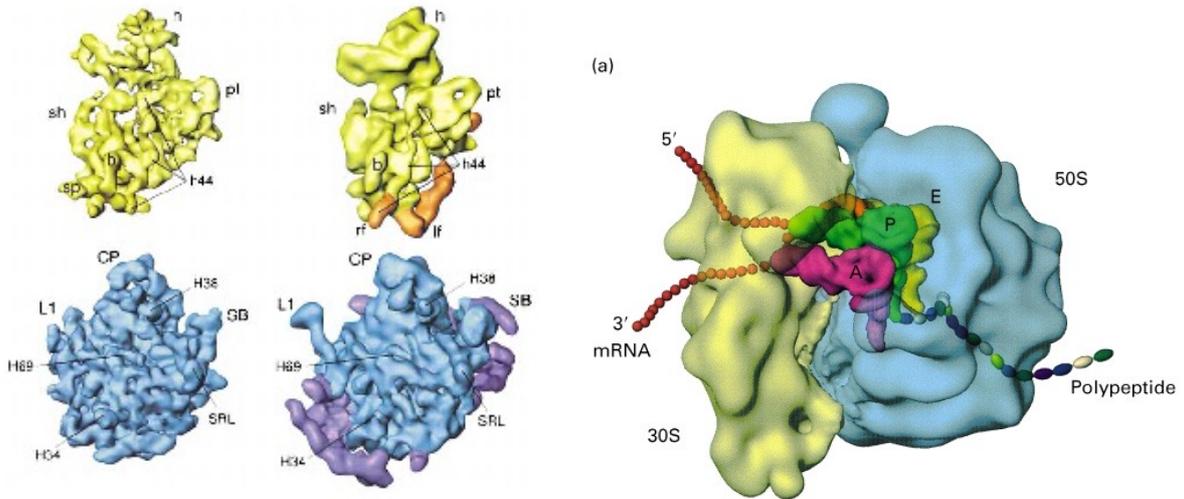
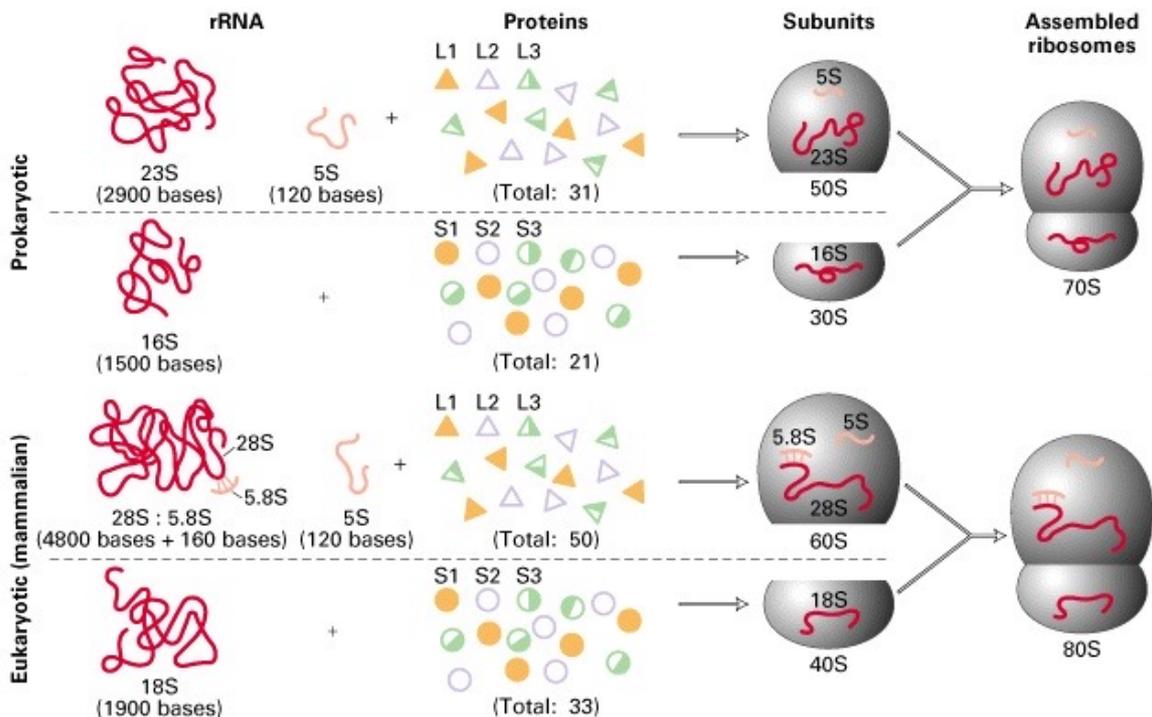


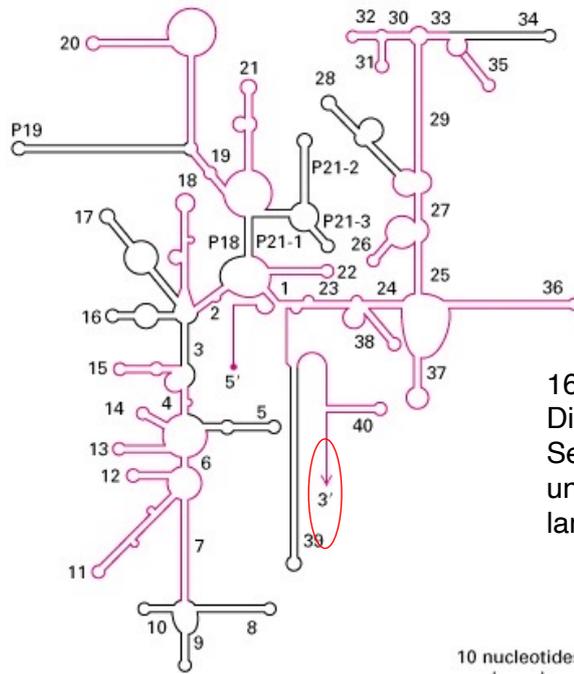
Figure 1. Comparison of EM Density for rRNA from *E. coli* and *S. cerevisiae* Ribosomes

Prokaryoten 30S und 50S -> 70S  
 Eukaryoten 40S und 60S -> 80S

# Ribosomenaufbau

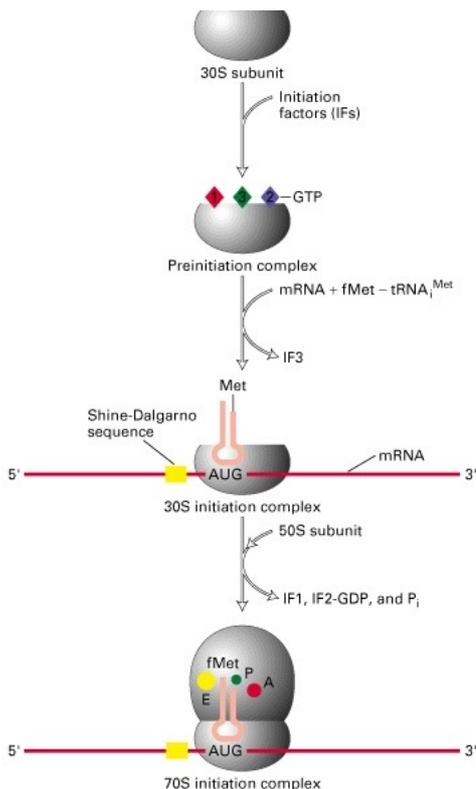


# Ribosomale RNAs weisen ausgeprägte Sekundärstrukturen auf



16S rRNA (Prokaryoten)  
Die Shine-Dalgarno Sequenz liegt an 3' Ende und ist 6-8 Nukleotide lang.

## Initiation der Proteinsynthese bei Prokaryoten



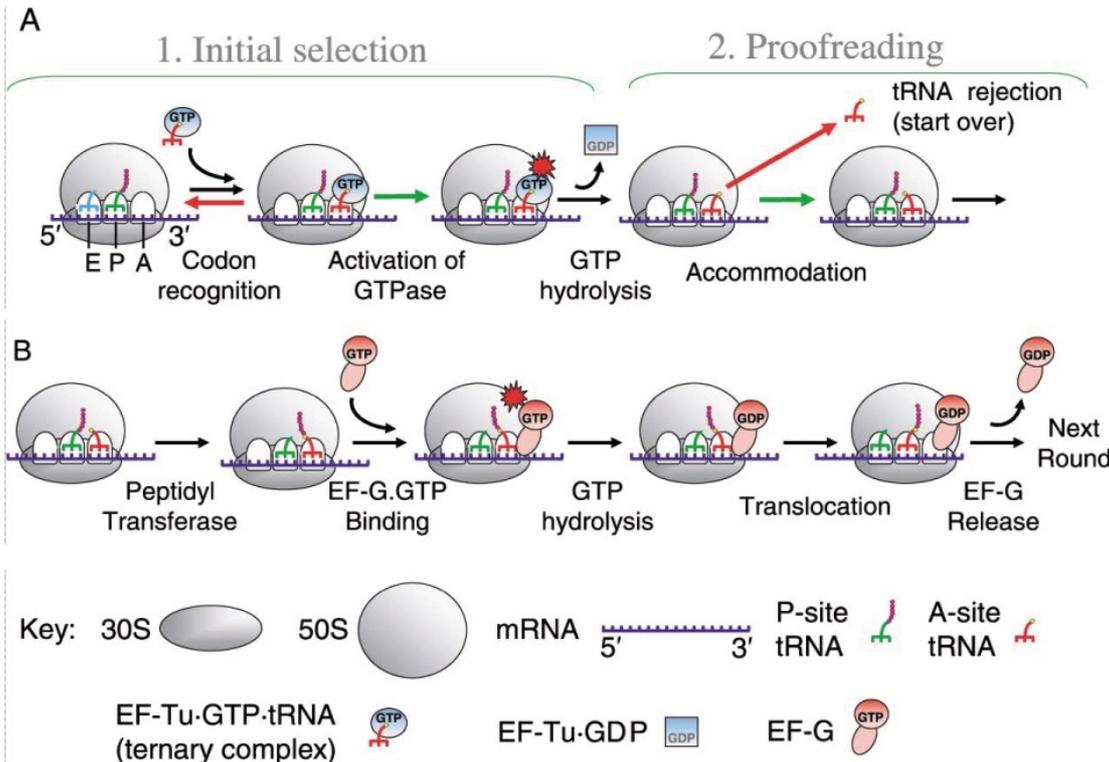
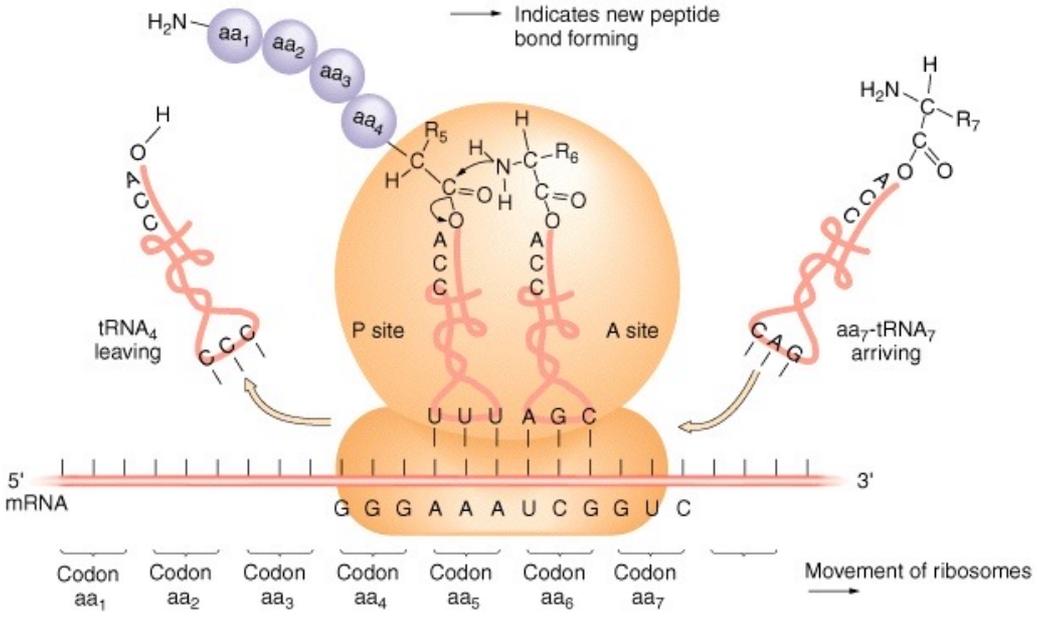
Drei Initiationsfaktoren binden an die 30S Untereinheit.

Die Formyl-Met tRNA bindet in Abhängigkeit von der Shine-Dalgarno Sequenz der 16S RNA.

Hydrolyse eines an IF2 gebundenen GTP führt zur Bildung des 70S Initiationskomplexes.

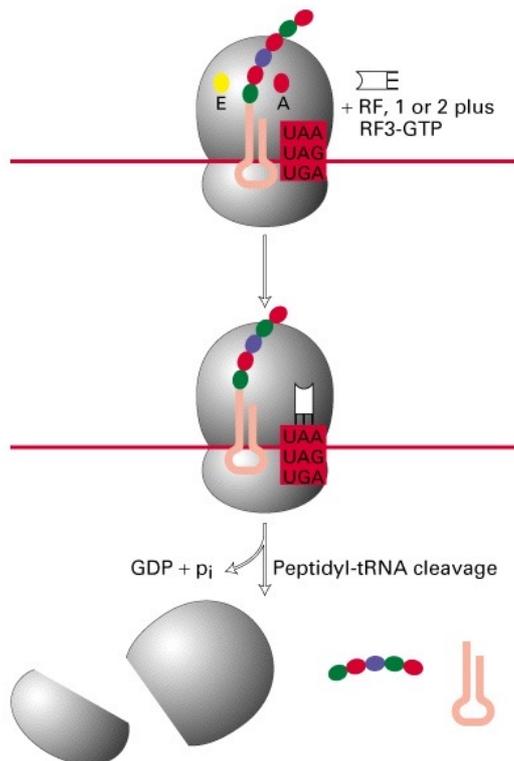
A-Stelle: Bindung der Aminoacyl tRNA  
P-Stelle: Peptidyl-transferase  
E-Stelle: Exit

# Elongationsphase



Fehlerhäufigkeit bei der Translation:  $1/10^4$  ca. 8-10 As/sec

# Termination der Translation



Terminationsfaktoren, auch release factors (RF) genannt, erkennen die Stopp-Codone

RF1 -> UAG

RF2 -> UGA UAA wird von beiden erkannt. Molekulare Mimikry

Die anschließende Bindung von RF3-GTP führt zur Kettenfreisetzung und nach GTP-Hydrolyse zum Zerfall des Ribosoms

# Initiation der Translation in Eukaryoten

Die Translationseffizienz wird bestimmt über:

die Cap-Struktur am 5' Ende der mRNA,

über Sekundärstrukturen am 5' Ende,

über kurze **uORFs**,

das PolyA bindende Protein,

RNAs (miRNA) und

über Initiationsfaktoren.

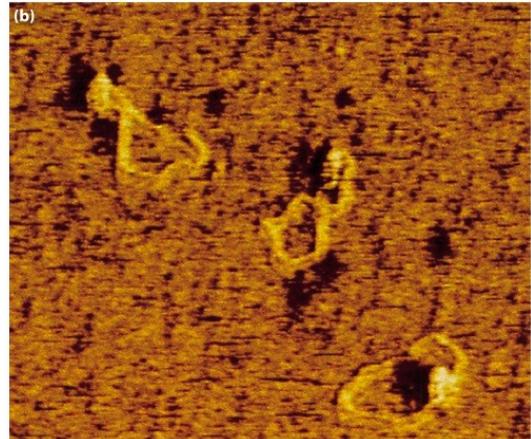
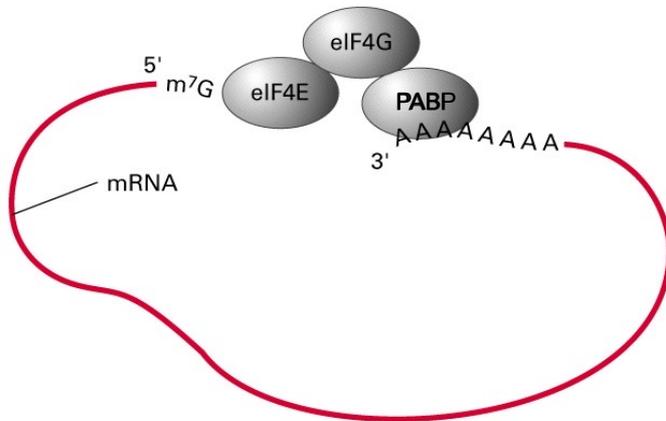
Table 1. Translation Initiation Factors

Eukaryotic Factor	Prokaryotic Factor	Archaeal Factor	Function
eIF1	IF3 <sup>a</sup>	a-eIF1	Fidelity of AUG codon recognition
eIF1A	IF1	a-eIF1A	Facilitate Met-tRNA <sup>Met</sup> binding to small subunit
eIF2		a-eIF2	Bind Met-tRNA <sup>Met</sup> to 40S subunit; GTPase
eIF2B			Guanine-nucleotide exchange factor for eIF2
eIF3			Promote Met-tRNA <sup>Met</sup> and mRNA binding to 40S subunit
eIF4A		a-eIF4A	DEAD-box helicase
eIF4B			Promote eIF4A activity
eIF4E			m <sup>7</sup> GpppX cap binding protein
eIF4F			Cap binding complex of eIFs 4A, 4E, and 4G
eIF4G			Adaptor protein interacts with many other factors
eIF4H			Similar to eIF4B
eIF5			AUG recognition and promote eIF2 GTPase activity
eIF5B	IF2	a-eIF5B	Subunit joining; in prokaryotes Met-tRNA <sup>Met</sup> binding

<sup>a</sup>The proposed grouping of eIF1 and IF3 is based on their common function to insure accurate Met-tRNA<sup>Met</sup> and AUG codon selection, and structural similarity of eIF1 (Fletcher et al., 1999) to the C-terminal domain of IF3 (Biou et al., 1995).

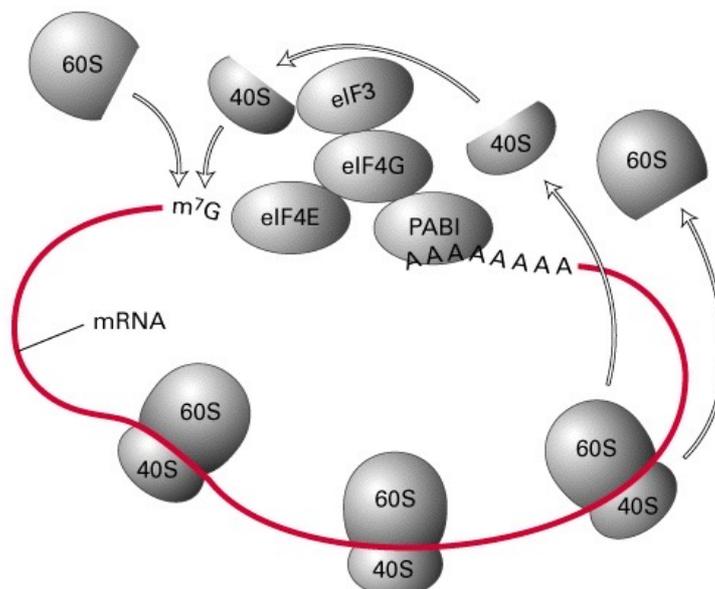
eIF3 = 5-11 Untereinheiten

# Warum hat das PolyA bindenden Protein einen Einfluß auf die Translation?

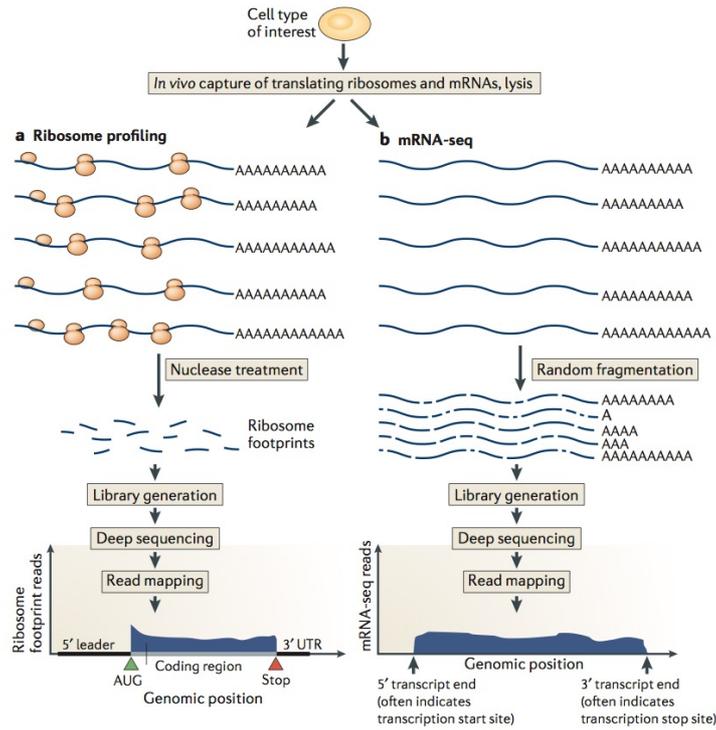


Qualitätskontrolle: Zirkularisierung der mRNA 1996  
erstmalig beschrieben

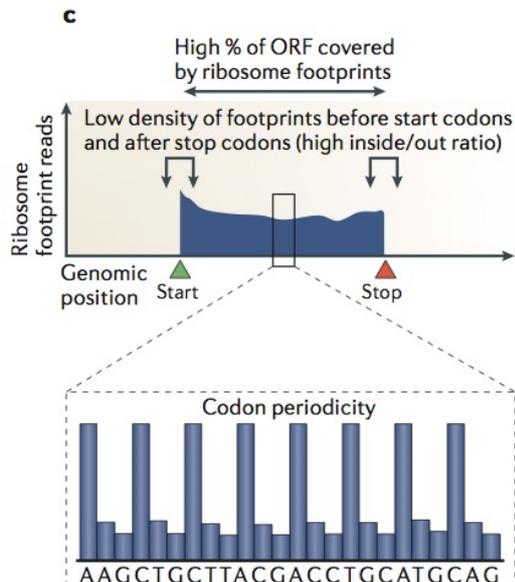
Initiation und Termination sind räumlich  
benachbart



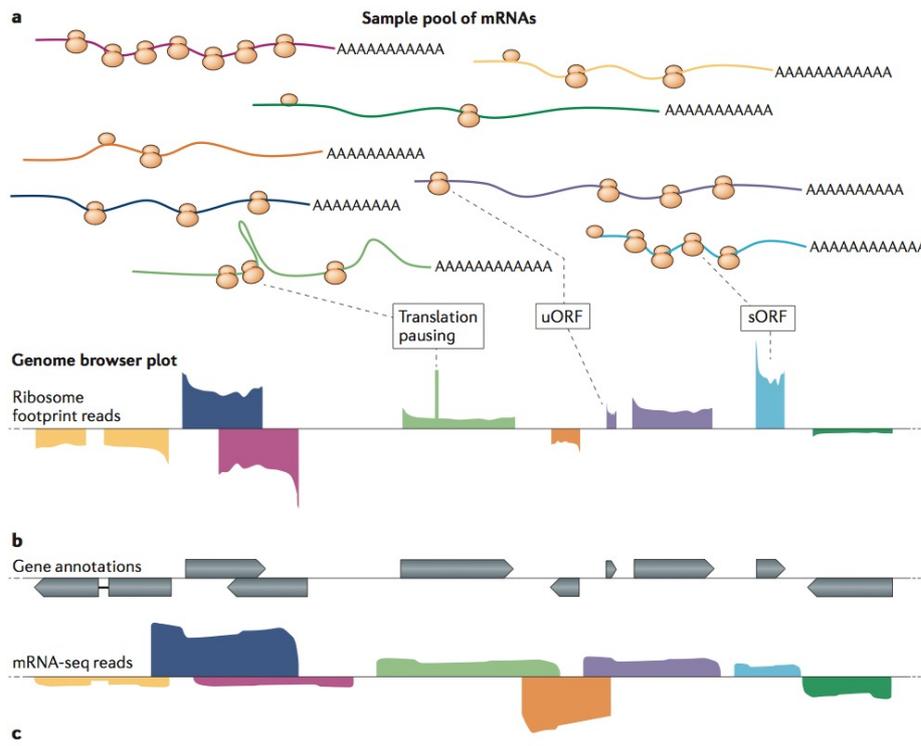
# Ribosome profiling



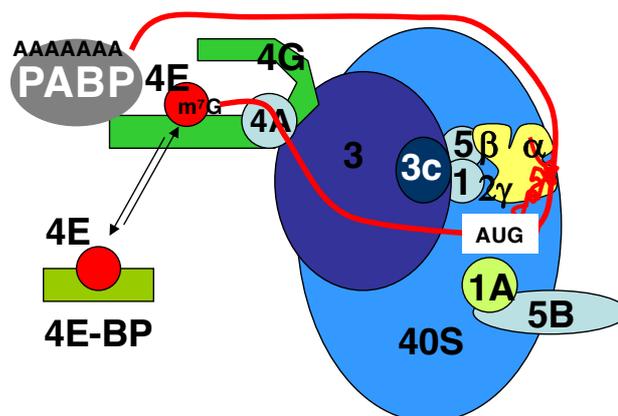
# Ribosome profiling



# Ribosome profiling



## Kontrolle der Initiation

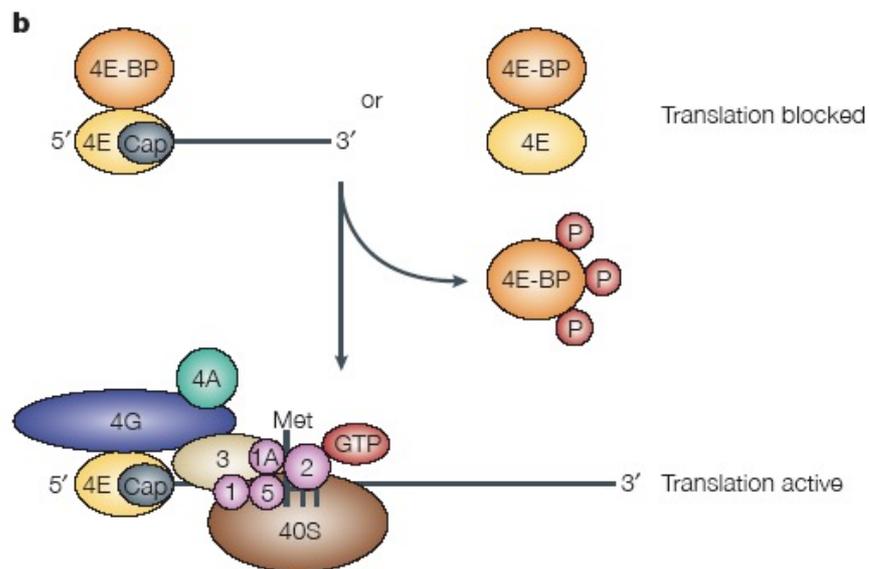


Cap-mRNA + eIF4E rekrutiert eIF4G und dann eIF4A(Helikase Aktivität).  
eIF4G ist ein Adapter Protein das eine Interaktion mit dem PolyA Bindungsprotein  
und dem eIF3 vermittelt.

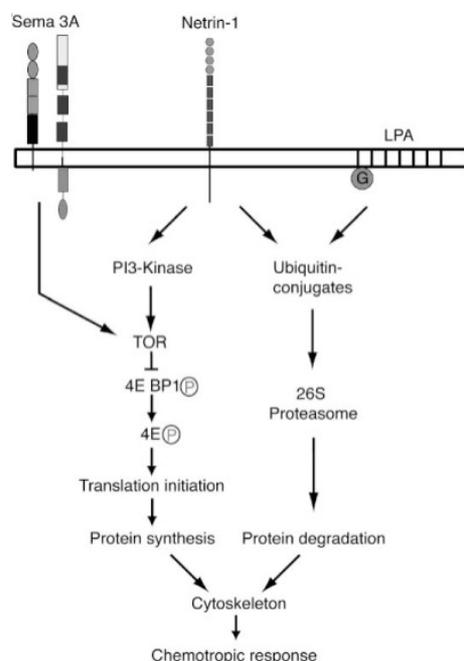
4E-BP bindet **eIF4E**.

**eIF2** reguliert die Initiation der Translation.

# Regulation der Translationsinitiation über das eIF4E Bindungsprotein 4E-BP

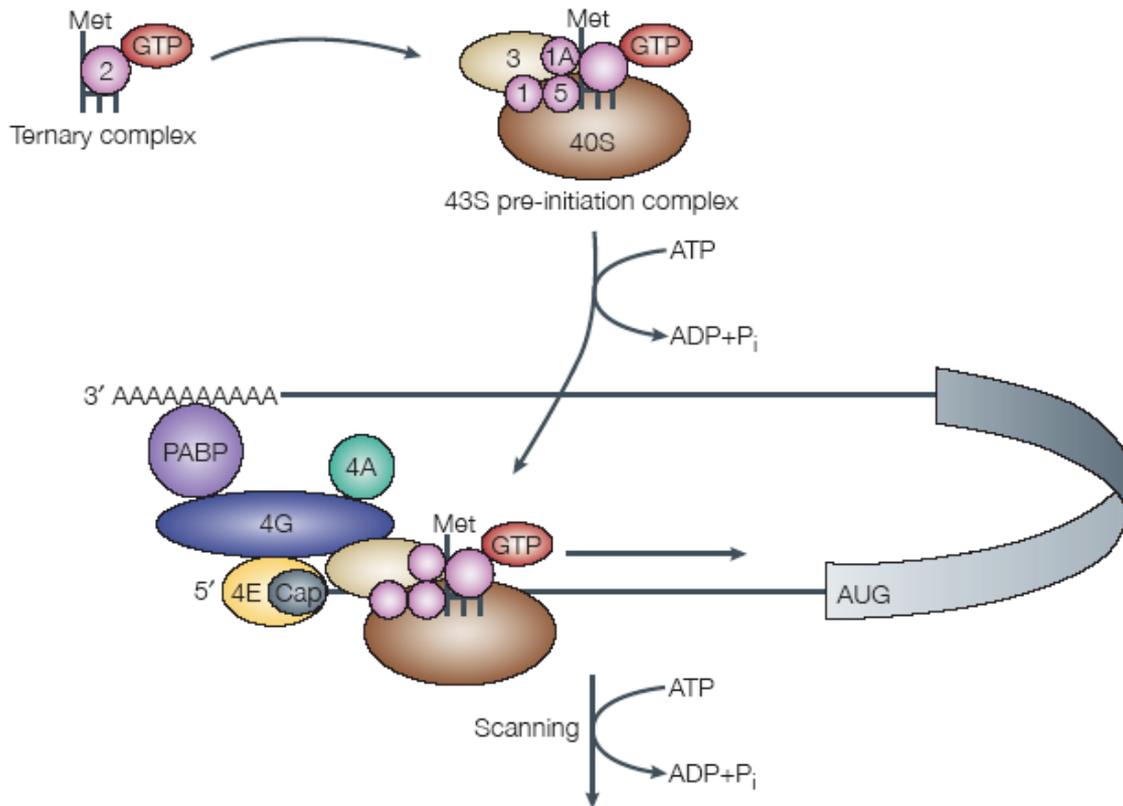


## Lokale Translationskontrolle in der Synapse durch 4E-BP

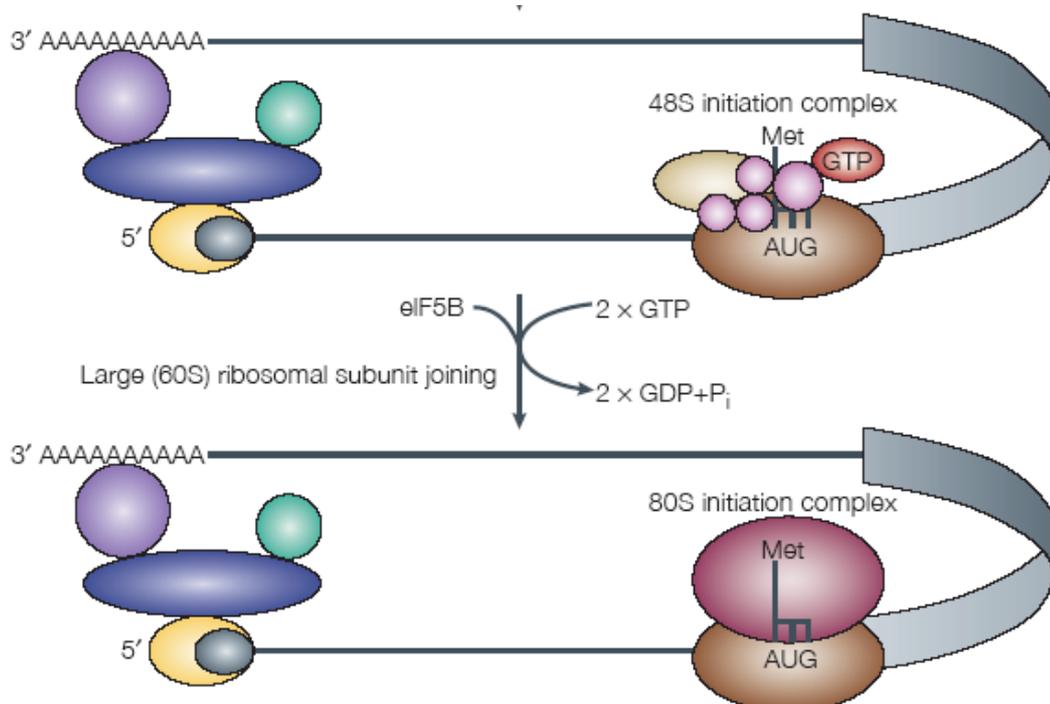


Lokale Translation im Wachstumskegel oder in der Synapse  
-> Plastizität.

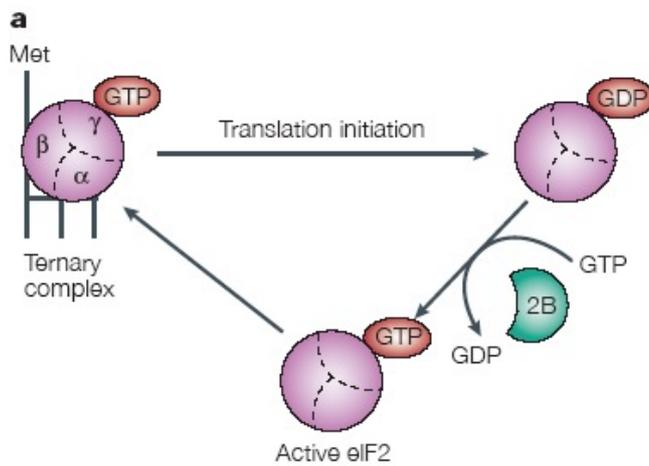
# 5'-Cap abhängige Initiation der Translation



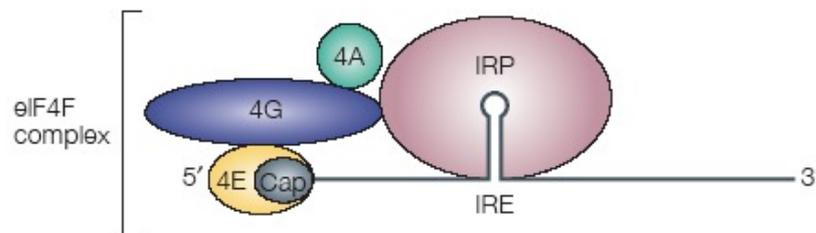
# 5'-Cap abhängige Initiation der Translation



# Globale Kontrolle der Translation -> eIF2 Phosphorylierung



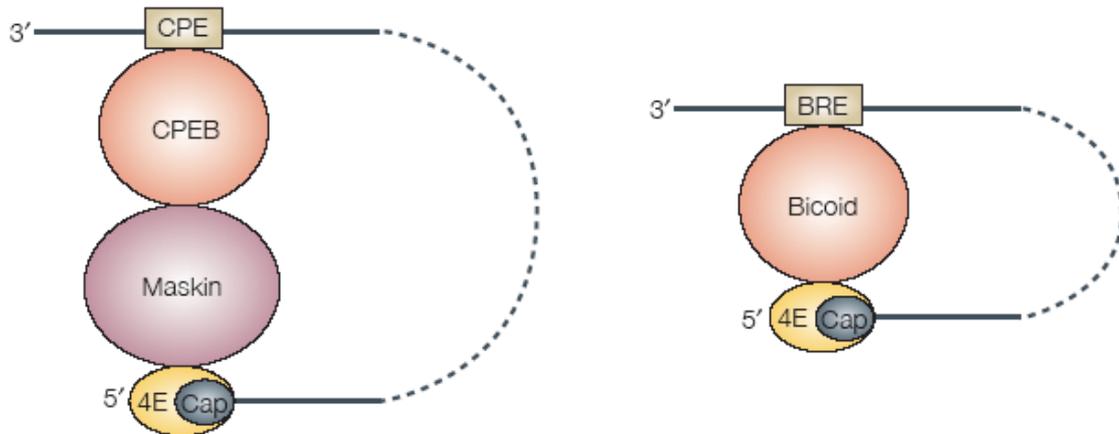
## RNA spezifische Translationskontrolle



### Eisen-abhängige Translation

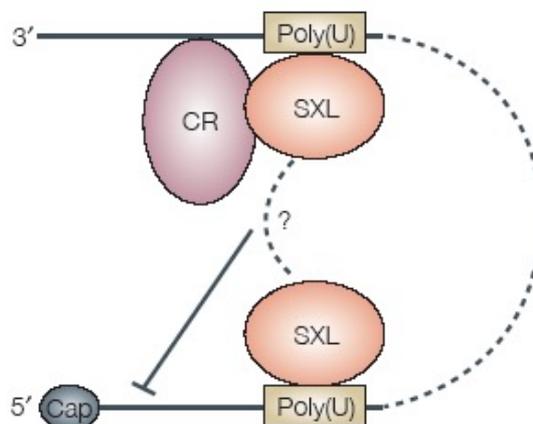
Das *Iron Regulatory Protein* bindet an das *Iron Responsive Element* und verhindert die Bildung des Prä-Initiationskomplexes.

# RNA spezifische Translationskontrolle



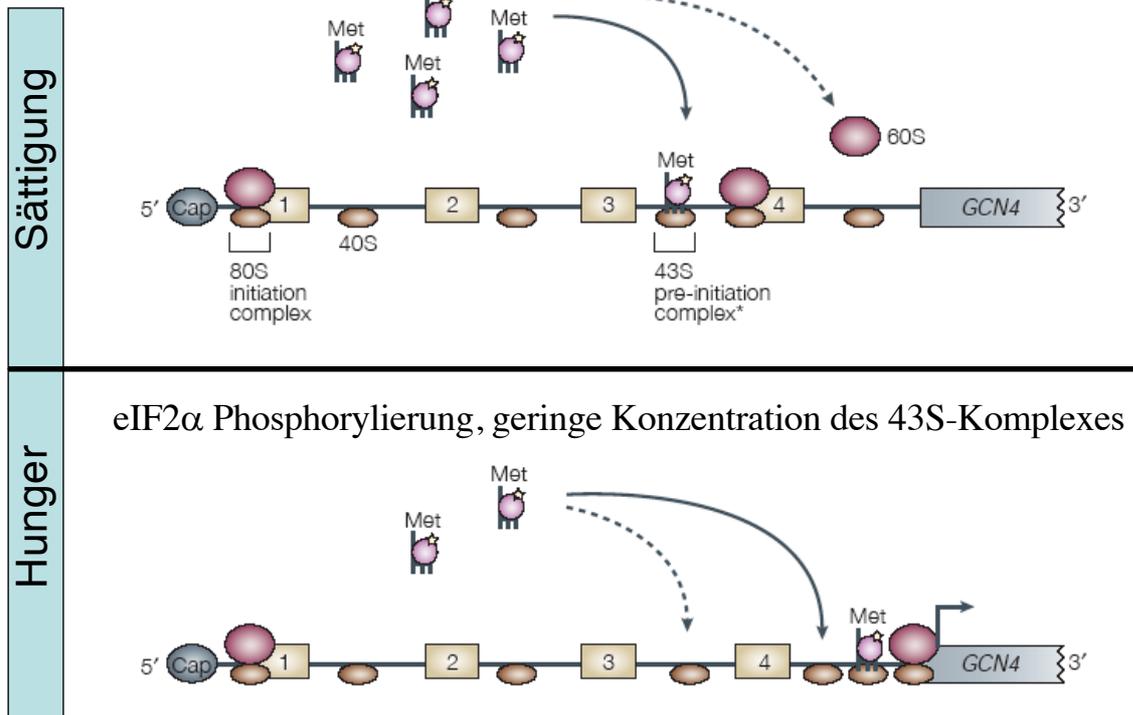
Interferenz der Ausbildung des eIF4E-Komplexes. Duale Rolle von Bicoid als Transkriptionsfaktor und Translationsregulator.  
CPE: cytoplasmic polyadenylation element; BRE: Bicoid response element.

# RNA spezifische Translationskontrolle

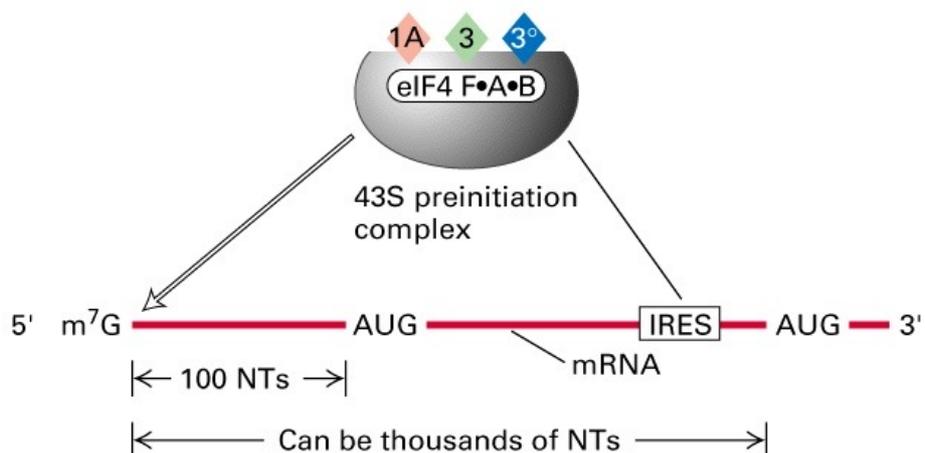


Sex lethal als Translationsinhibitor, 5' - Cap-unabhängig  
Suppression der *msl*/mRNA Translation bei der Dosiskompensation

# Kontrolle der Aminosäuresynthese in der Hefe durch upstream ORFs (uORFs) in der GCN4 mRNA

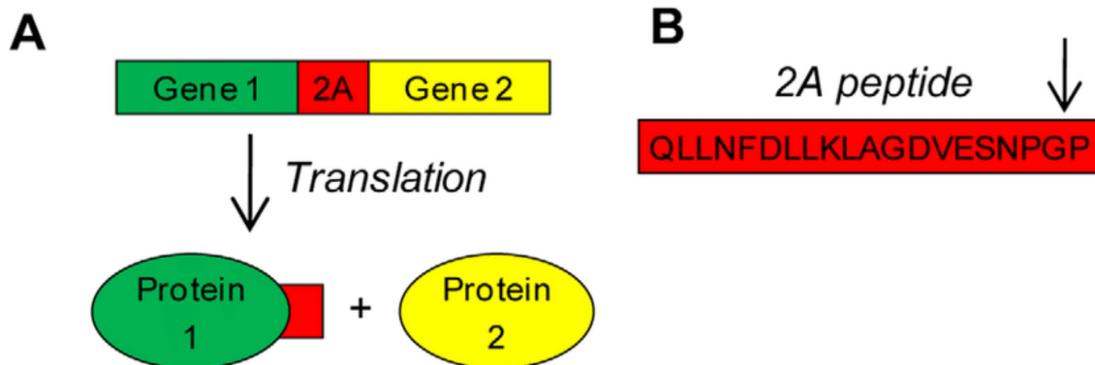


Die Initiation der Translation erfolgt am Cap oder an einer IRES Sequenz

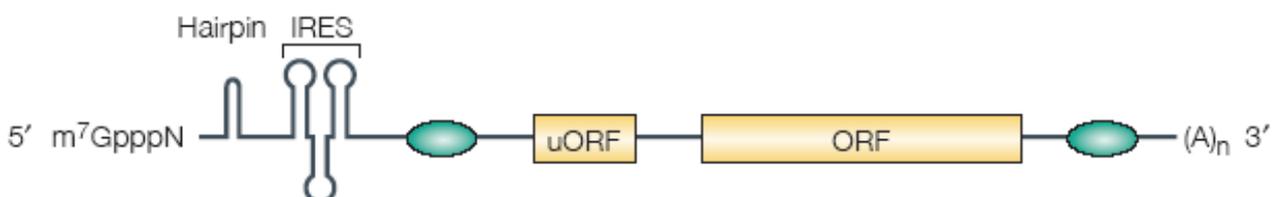


# CO-Translation von zwei Proteinen durch „selbstschneidende“ Peptide

„self-cleaving“ 2A Peptide sind 18–22 Aminosäuren lange virale Oligopeptide. Die „Proteinspaltung“ wird durch ribosomal skipping der Peptidbindung zwischen Prolin (P) und Glycin (G) am C-Terminus des 2A-Peptids ausgelöst. Der Buchstabe vor dem 2A bezeichnet den Virus. Häufig wird die T2A Sequenz verwendet (*Thosea asigna* Virus).



Zusammenfassung: Wie beeinflusst die mRNA die Translation?



# Proteine rekrutieren den RNAi Apparat

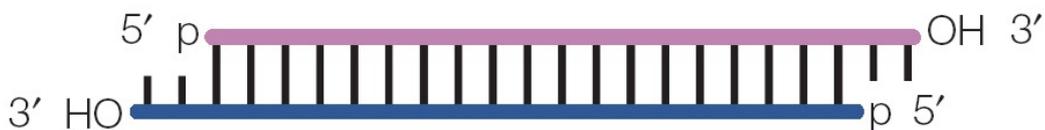
Das Fragile X-Syndrom Protein bindet an die 3' Region von vielen RNAs und unterdrückt die Translationseffizienz.

Lokale Translationskontrolle in der Synapse!

Rekrutierung des RNAi Apparates

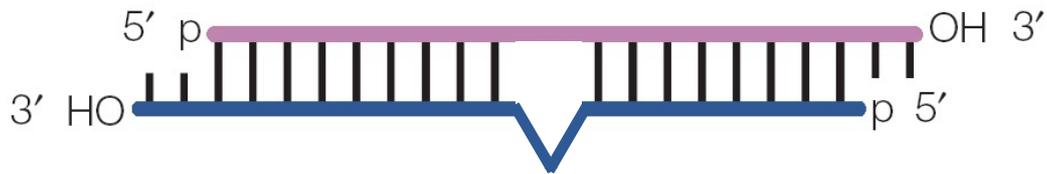
**-> RNA interferenz**

## small interfering RNA (siRNA)



- Doppelstrang RNA perfekte Paarung
- 21-23 bp lang
- 3' OH Terminus mit 2 Nukleotiden Überhang
- RNA induced gene silencing complex (RISC)

## micro RNA (miRNA)



- Doppelstrang RNA imperfekte Paarung
- 21-23 bp lang
- 3 ' OH Terminus mit 2 Nukleotiden Überhang
- Post translational gene silencing PTGS
- Translational gene silencing TGS

## RNA Interferenz (RNAi)

80er Jahre, Co-suppression, jetzt: miRNA, siRNA und piRNA

1993 *C. elegans* kleine komplementäre RNAs bei der Genregulation: *lin-4* reguliert *lin-14* (*miRNA*)

1998 Fire & Mello dsRNA vermittelt *gene silencing*

1999 RNAi wird über kleine RNAs vermittelt (*siRNA*)

2000 RNAi wird über 21/23 bp große RNAs vermittelt  
3' Überhang -> RNAase III Aktivität

RNAase III; Dicer, Drosha dsRBD Doppelstrang RNA  
Bindungsdomäne

Effektor-Complex: RISC (RNA-induced silencing complex)

Slicer = Argonaute RNAase H

2006 Nobel Preis an A. Fire und G. Mello

# Cosuppression

## Beispiel Petunien



Wildtyp



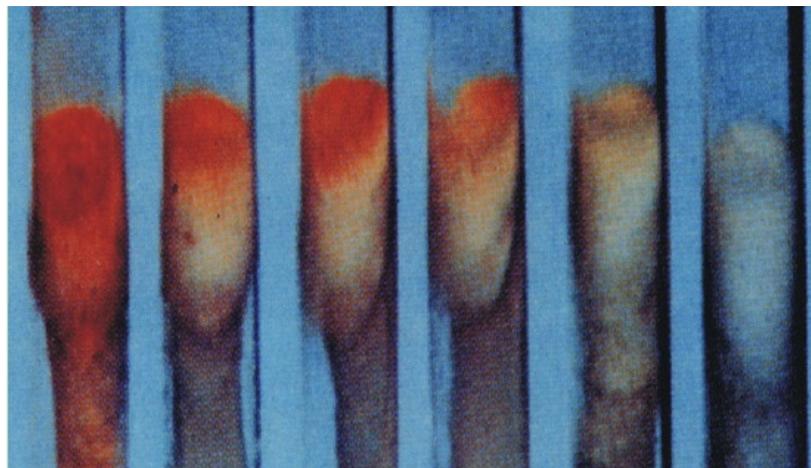
Transgene Pflanze

## Chalkonsynthase

**Cosuppression** = Zusätzlich eingebrachtes Gen wird unterdrückt und gleichzeitig alle homologen Gene im Organismus.

# Quelling

entdeckt bei *Neurospora crassa*

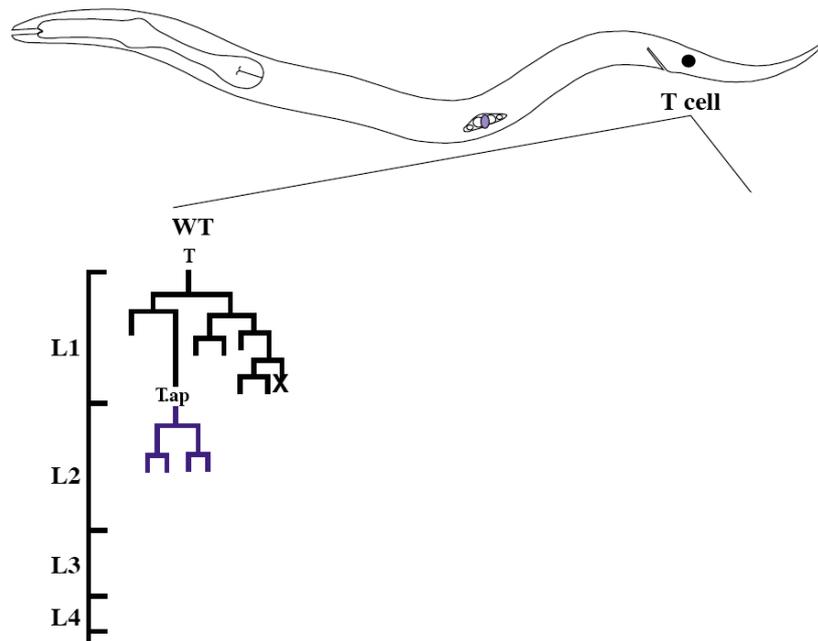


wt

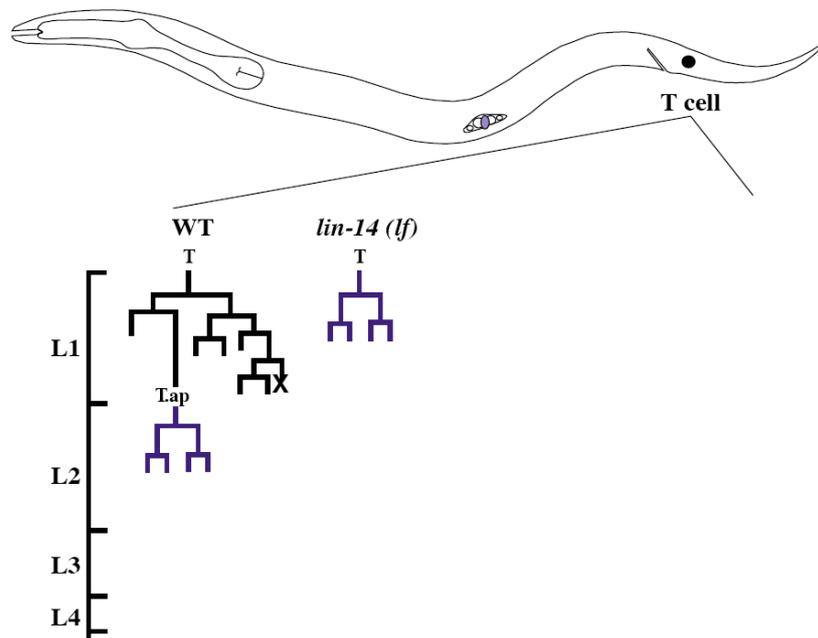
Mutantenstämme

Gleiches Phänomen wie bei der Cosuppression

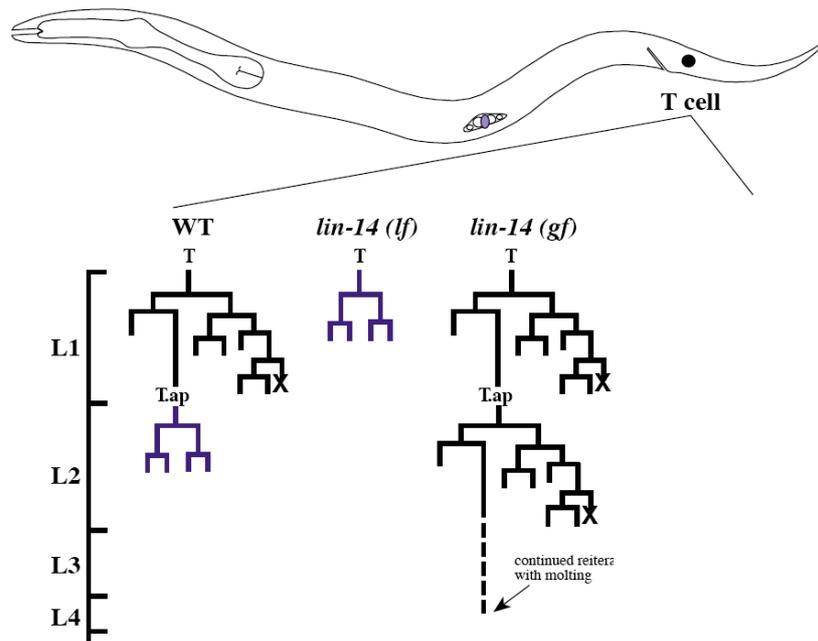
# Der Phänotyp von *lin-4* und *lin-14* Mutationen



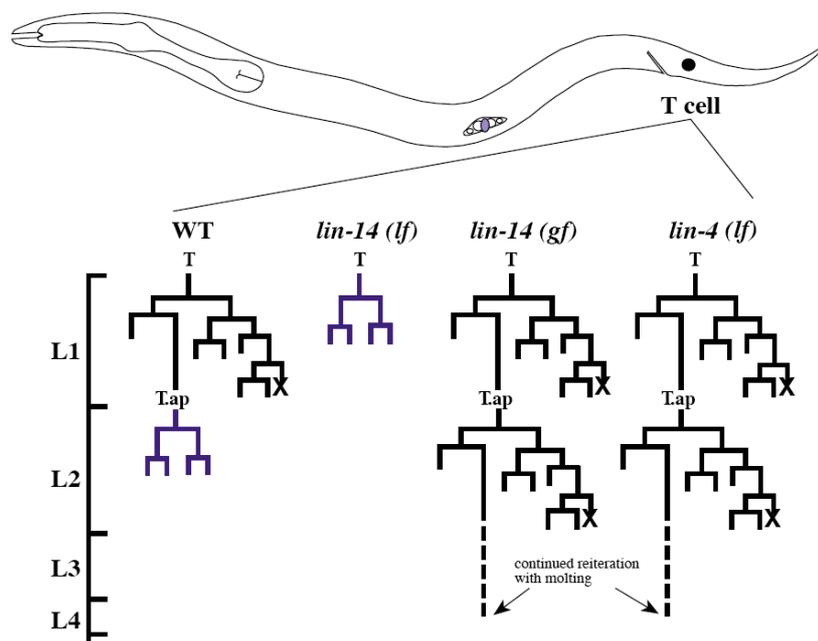
# Der Phänotyp von *lin-4* und *lin-14* Mutationen



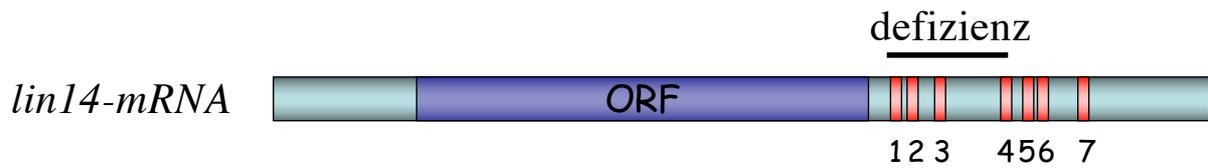
# Der Phänotyp von *lin-4* und *lin-14* Mutationen



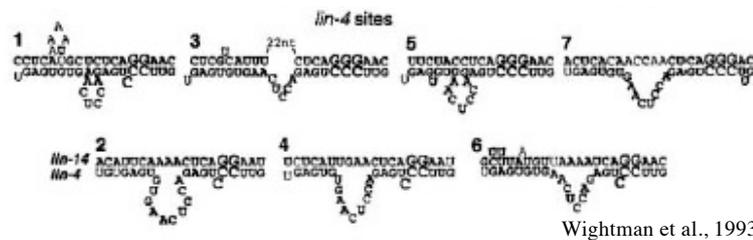
# Der Phänotyp von *lin-4* und *lin-14* Mutationen



# lin4 reguliert lin14

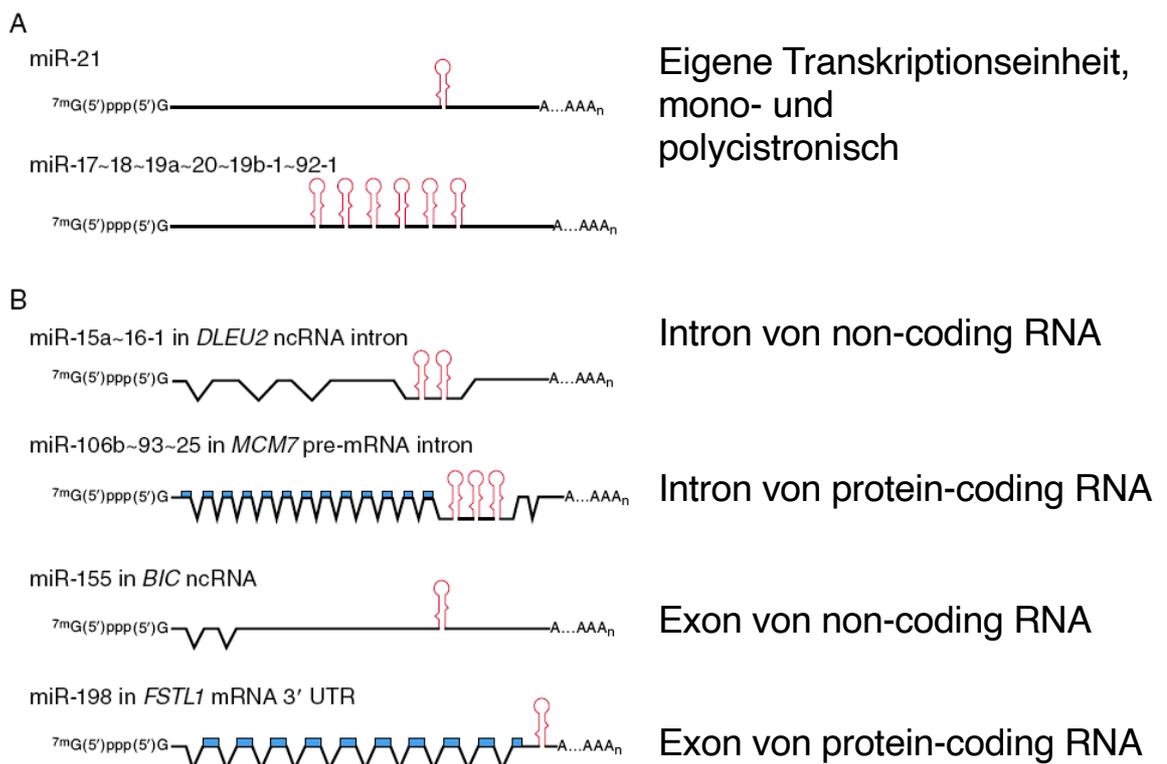


Die lin4 RNA kann die *lin14* mRNA im 3' UTR binden und die Translation regulieren.

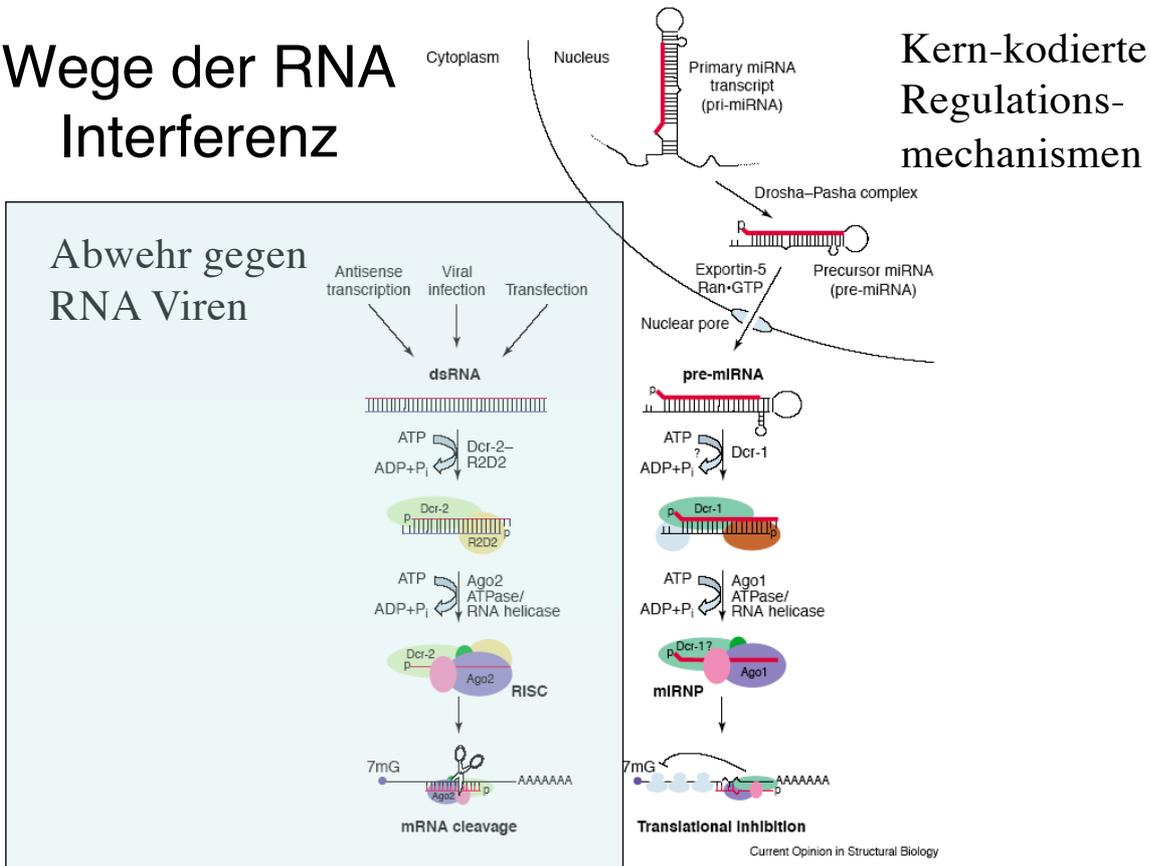


Heute etwa viele 1000 miRNAs bekannt (beim Mensch ca. 1000).

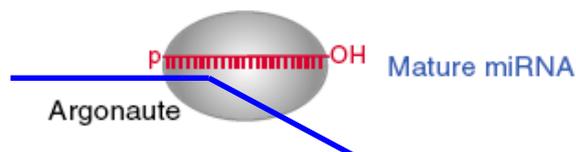
## Heterogener Ursprung der miRNAs



# Wege der RNA Interferenz



## Der miRNA Regulationsweg

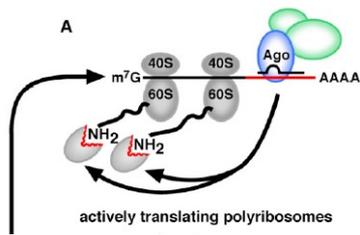


Ziel-RNA Erkennung erfordert die 5' Region (Nukelotide 6-8) = *seed region*

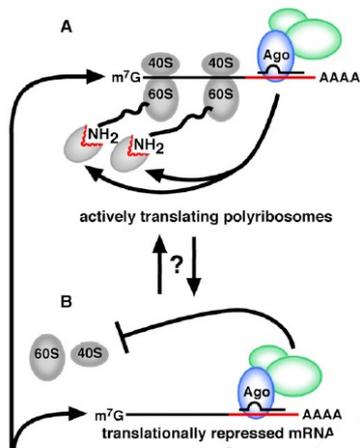
d.h. Regulation einer sehr großen Zahl Gene durch miRNA!!

Ohne intensive Basenpaarung -> Block der Translation.

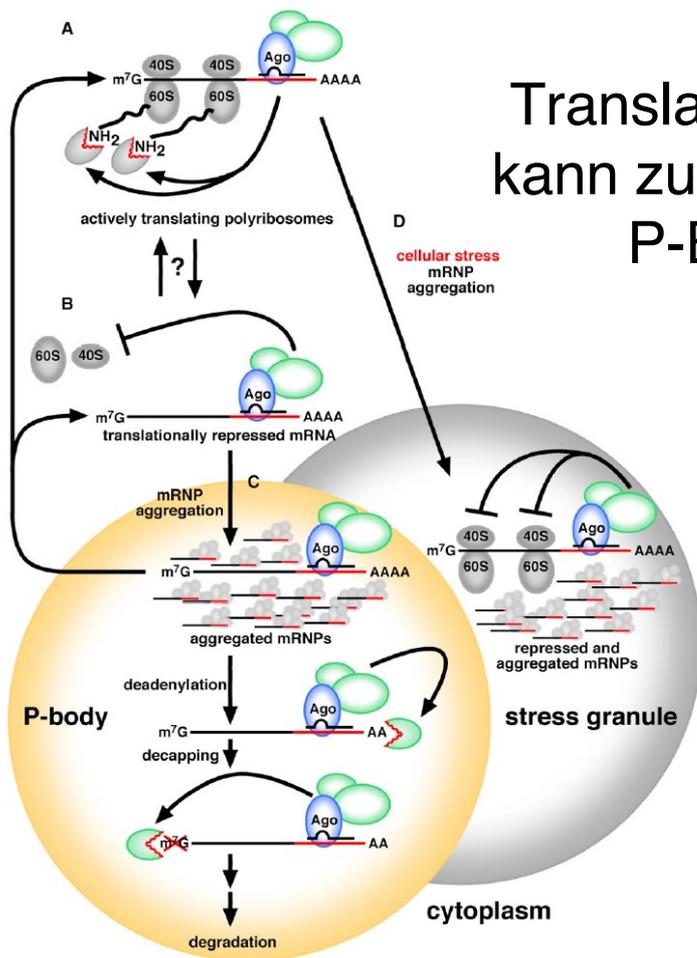
Aber Degradation in *P-Bodies*



Translationale Hemmung  
kann zum mRNA Abbau in  
P-Bodies führen

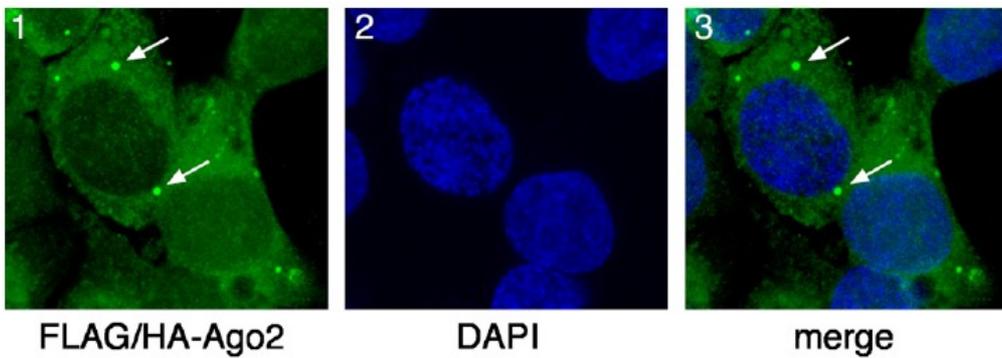


Translationale Hemmung  
kann zum mRNA Abbau in  
P-Bodies führen

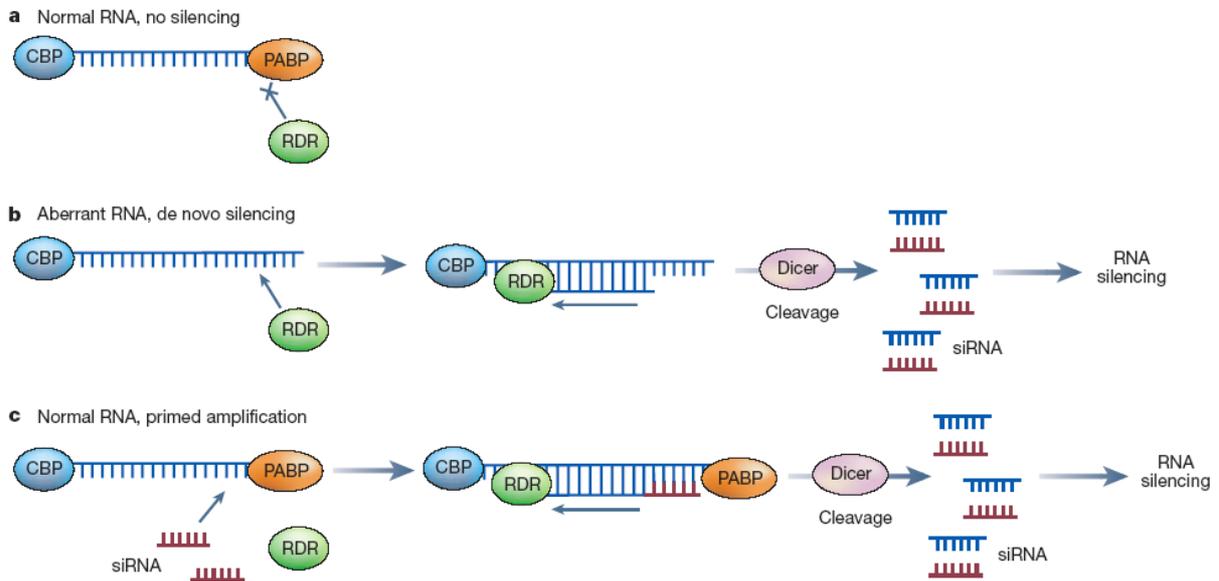


Translationale Hemmung kann zum mRNA Abbau in P-Bodies führen

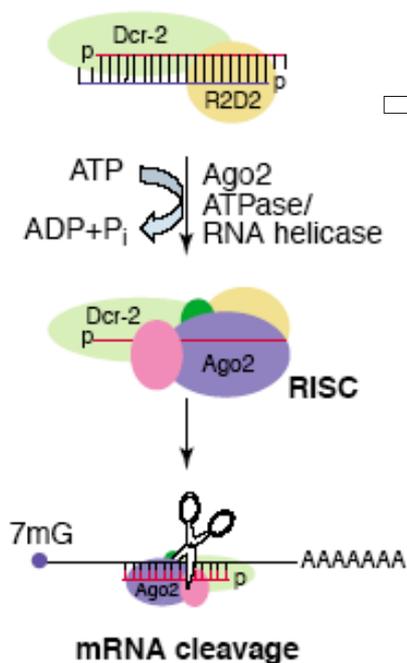
## P-Bodies



# RNA dependent RNA-Poylmerase (RDR)



## siRNA-Mechanismus



### Dicer



PAZ (Piwi Argonaute Zwiller) Domäne, bindet 3' Ende der RNA

### Argonaute



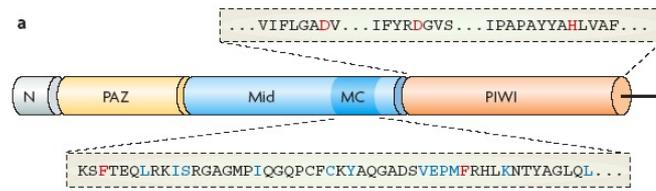
PIWI Domäne bindet 5' Ende  
 ähnlich zu RNase H, schneidet  
 DNA/RNA Duplex  
 Drosophila: 5 Gene  
 Mensch: 8 Gene  
 C. elegans: 27 Gene

# Strukturelle Eigenschaften der Argonaute Proteine

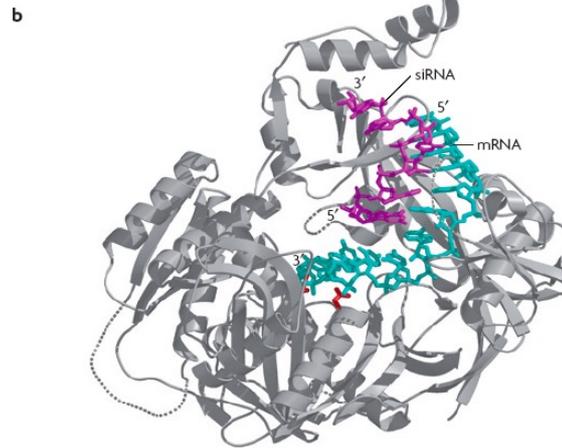
PAZ Domäne: bindet 3' Ende der ssRNA

PIWI Domäne: Katalytisch aktiv.

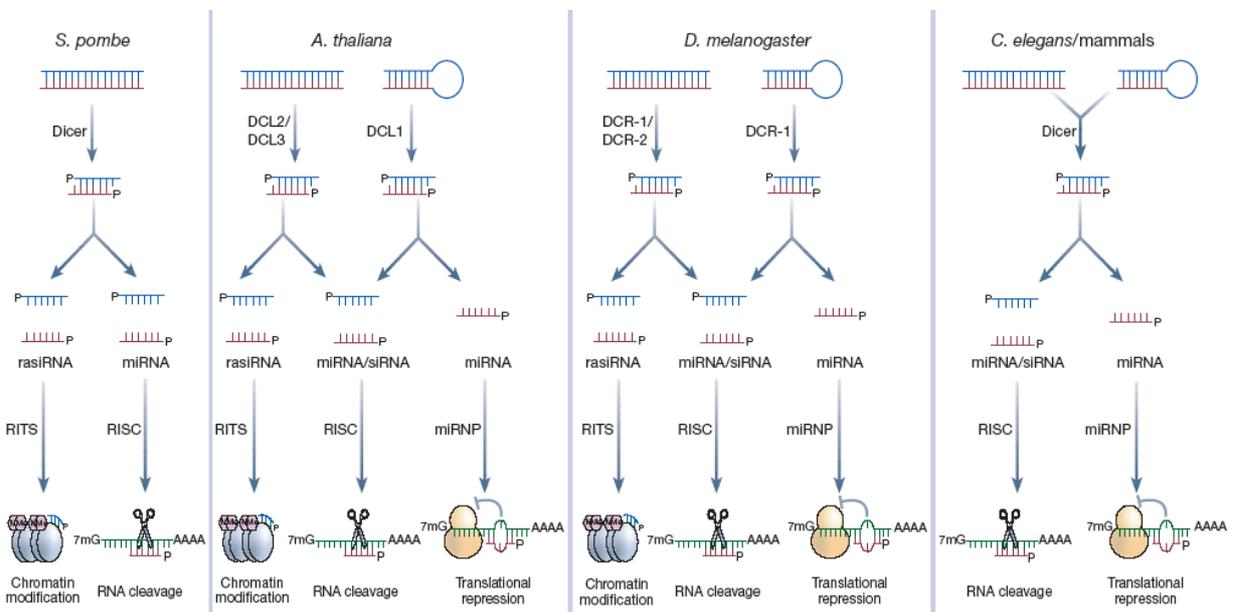
MID Domäne: eIF4E Homologie, Regulation der Translation



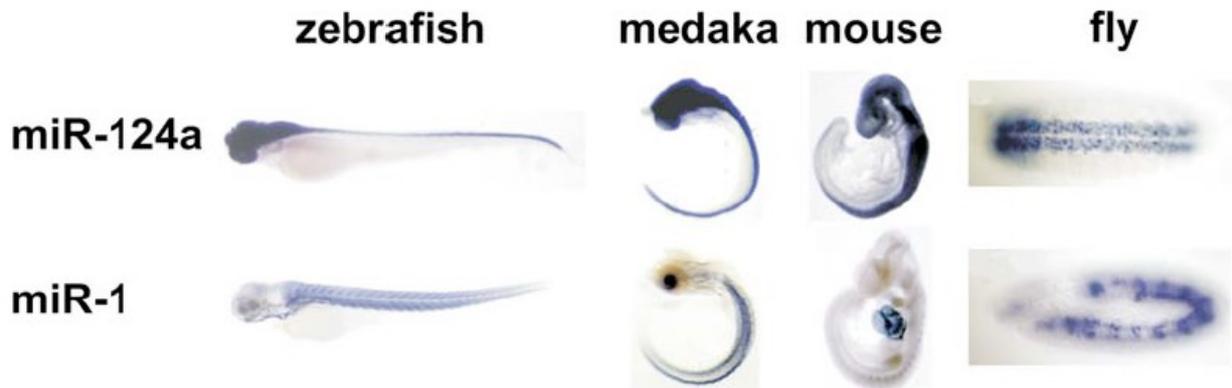
Blau: Cap-binding Domäne, konservierte Aminosäuren zu eIF4E



## RNAi Wege in unterschiedlichen Organismen



# RNAi Gene sind konserviert



## Wie kann man die RNAi-Antwort induzieren

**a** siRNA



**b** long dsRNA



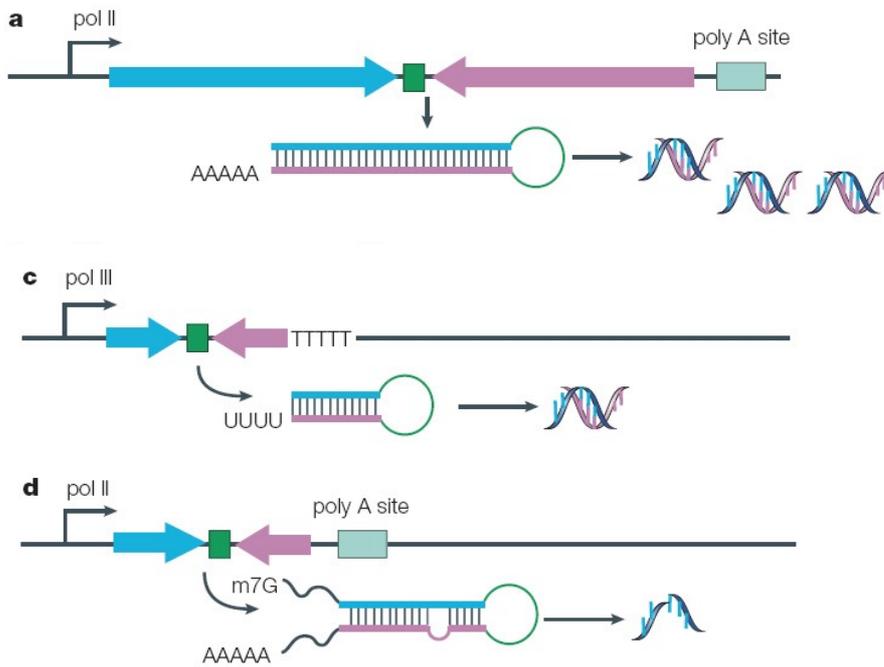
**c** siRNA-based hairpin RNA



**d** miRNA-based hairpin RNA

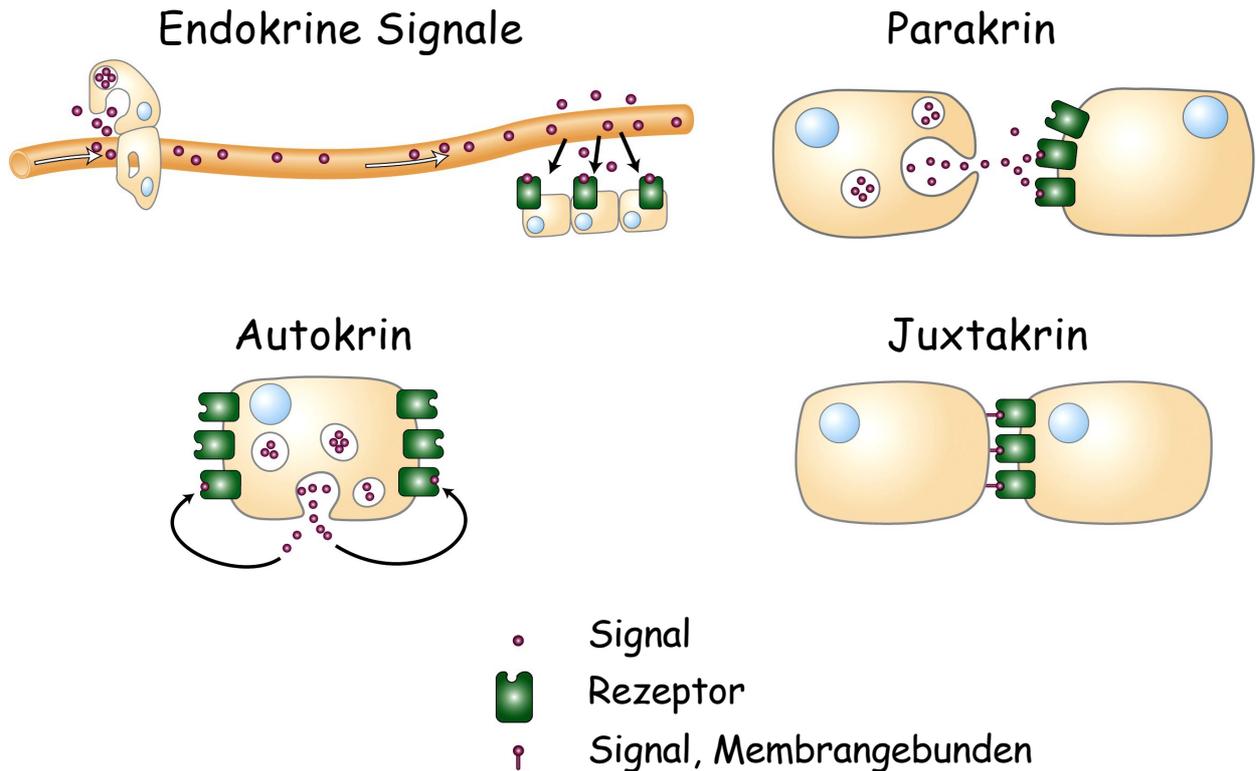


# Wie kann man die RNAi-Antwort induzieren



Frohe Weihnachten und bleiben Sie  
gesund

# Signaltransduktion



# Signaltransduktion

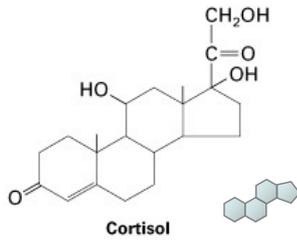
Wie kann eine Zelle äußere Einflüsse wahrnehmen und in eine Änderung der Aktivität umsetzen?

Lokale Wirkung -> second messenger ( $\text{Ca}^{2+}$ ; cAMP; cGMP)

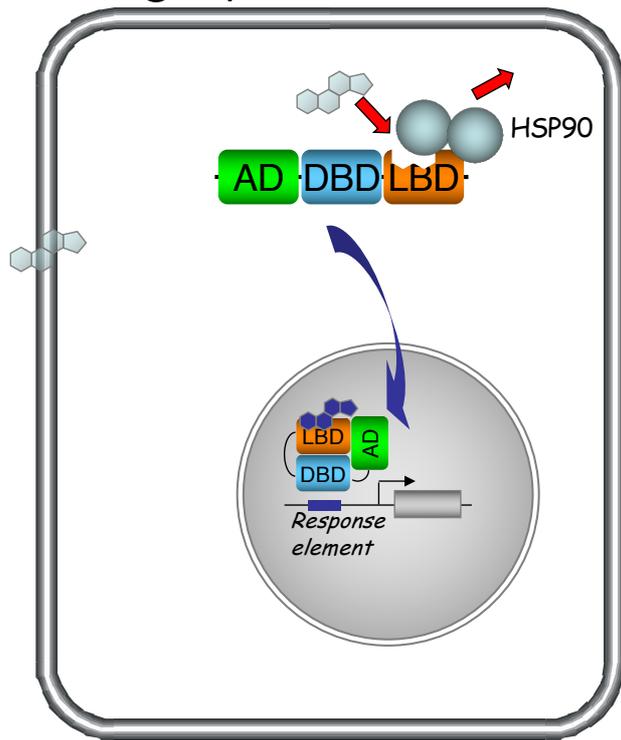
Wirkung auf den Zellkern -> Regulation der Transkription

- Hormon-Rezeptoren
- Notch (Membrangebundene TF)
- EGF-Signalweg
- TGF $\beta$ -Signalweg
- Wnt-Signalweg
- Hh-Signalweg
- JAK/STAT-Signalweg
- Trimere G-Proteine

# Steroide und ihre Rezeptoren (C4 Zn-Finger)

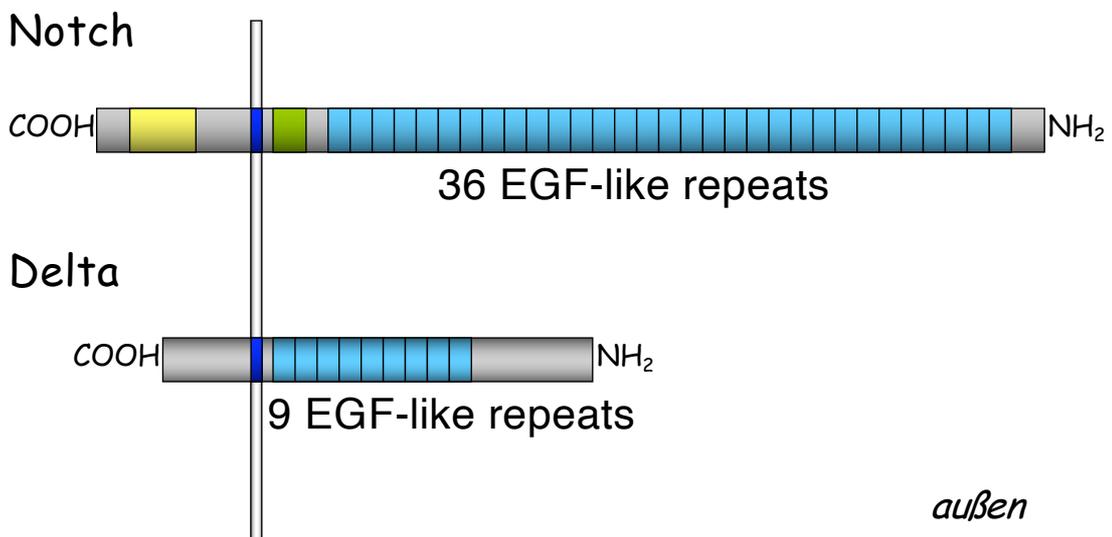


Typ II  
 Bindung des Liganden im  
 Cytoplasma, Verdrängung  
 von HSP90, Dimerisierung  
 Typ I  
 Bindung im Zellkern



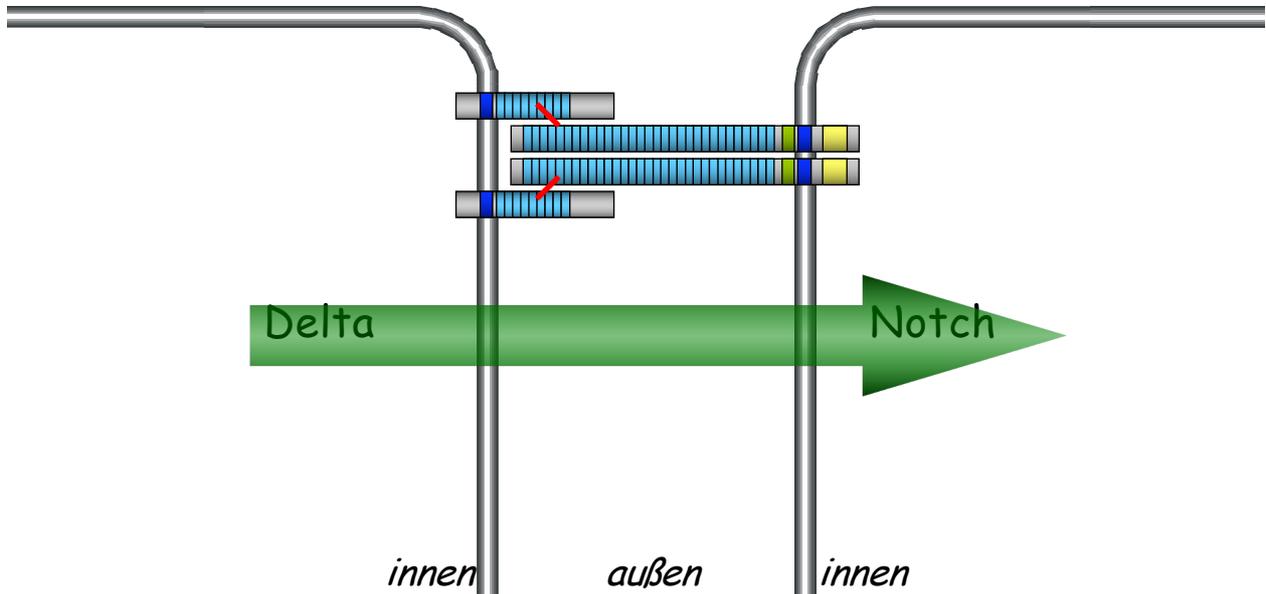
## Der Notch-Signalweg

Delta und Notch kodieren Transmembranproteine, die als Signal (Delta) bzw. als Rezeptor (Notch) dienen.



# Der Notch-Signalweg

Delta wirkt nicht Zellautonom auf den Notch-Rezeptor



## Notch Signaltransduktion

### *Drosophila* Notch Protein



Hier erfolgt die  
Liganden Bindung.

Verhindern Rezeptor-  
aktivierung in der  
Abwesenheit von  
Ligand.

Bindung von  
Su(H)/CSL.

36 EGF-Domänen

3 LNR Domänen

TM-Domäne

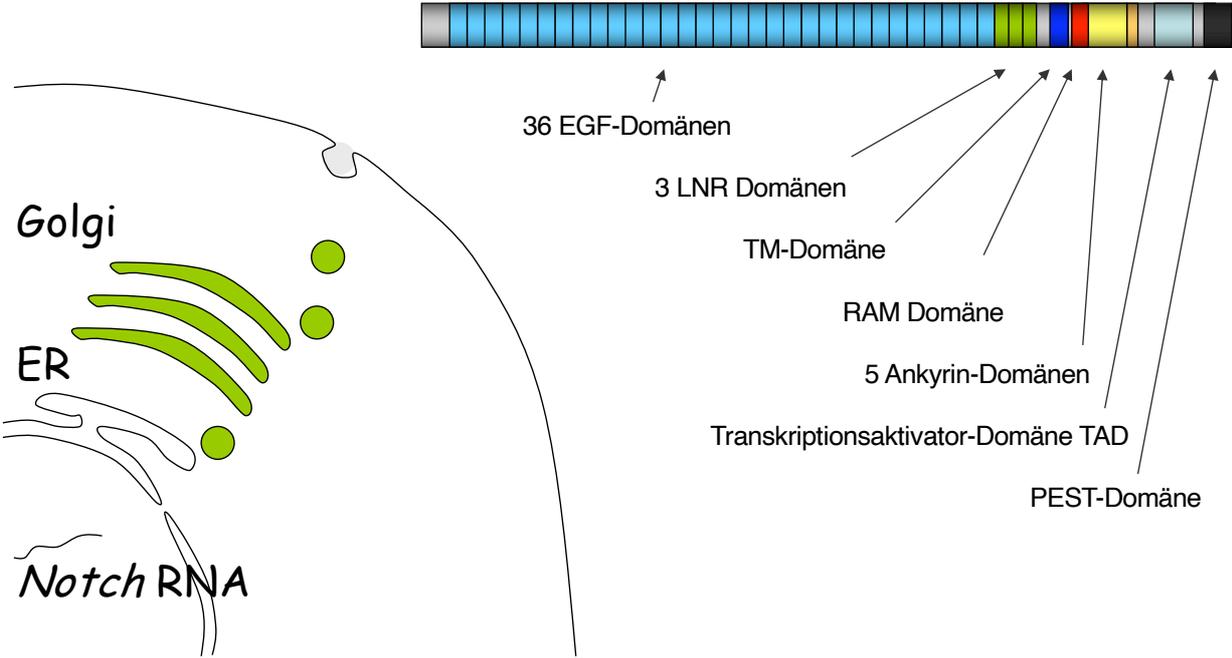
RAM Domäne

5 Ankyrin-Domänen

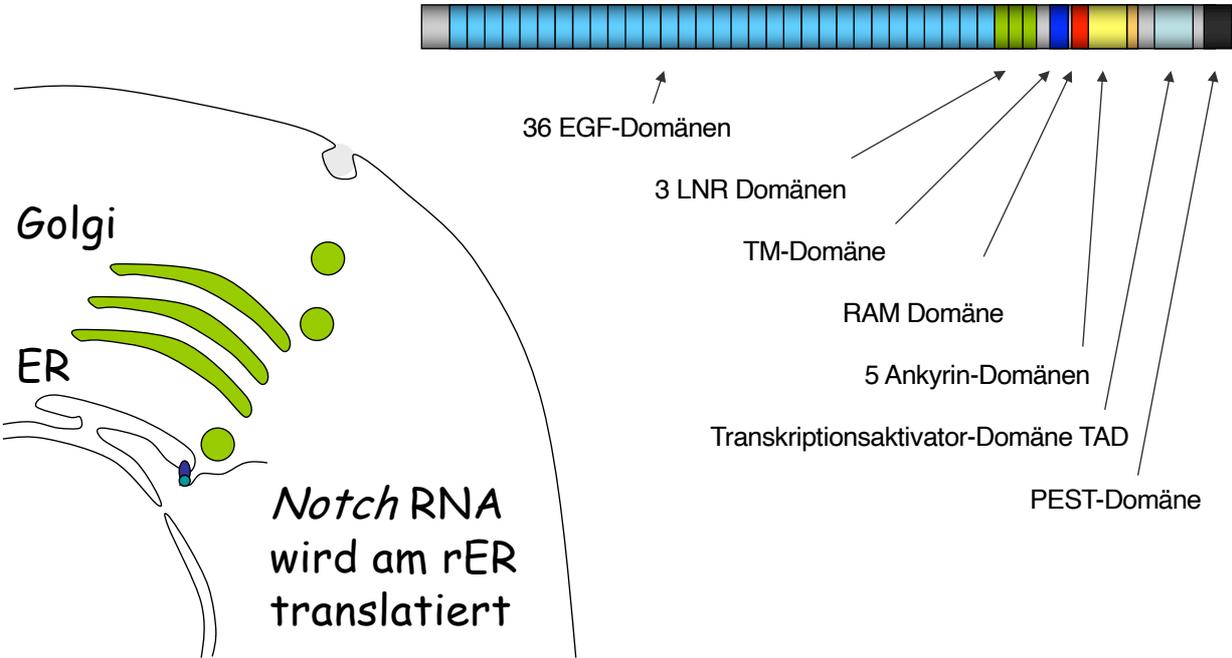
Transkriptionsaktivator-Domäne TAD

PEST-Domäne

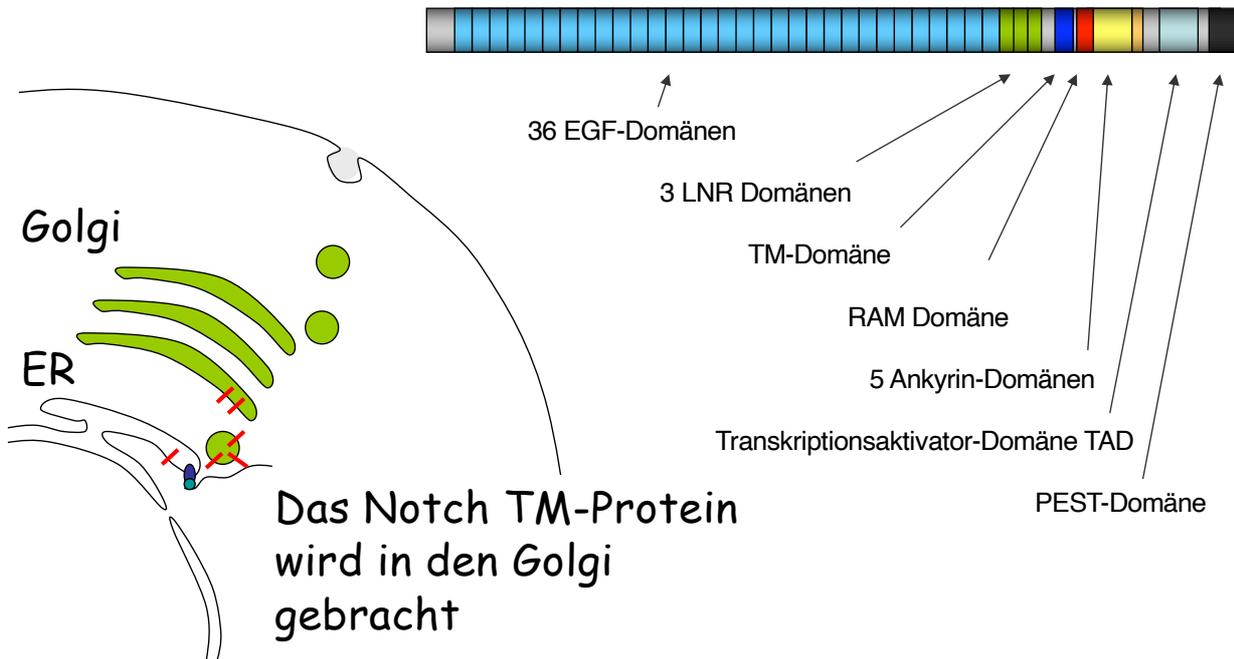
# Notch Signaltransduktion



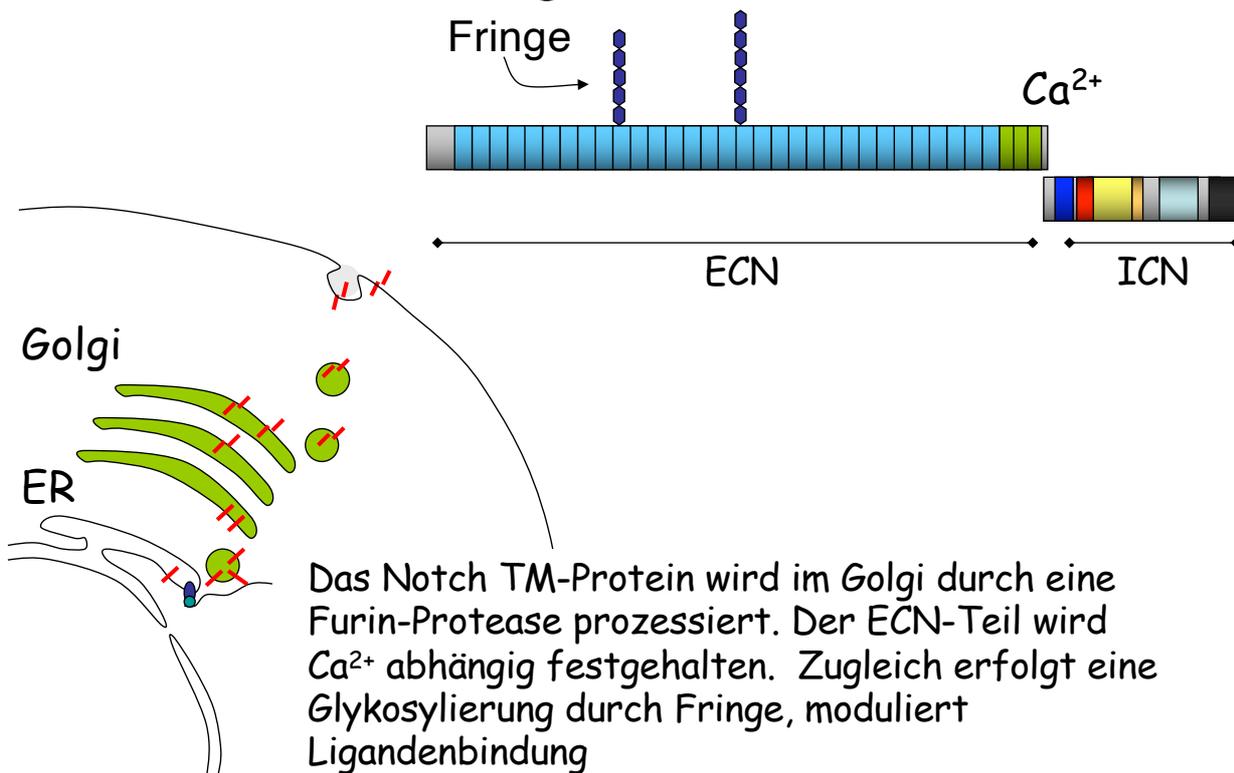
# Notch Signaltransduktion



# Notch Signaltransduktion

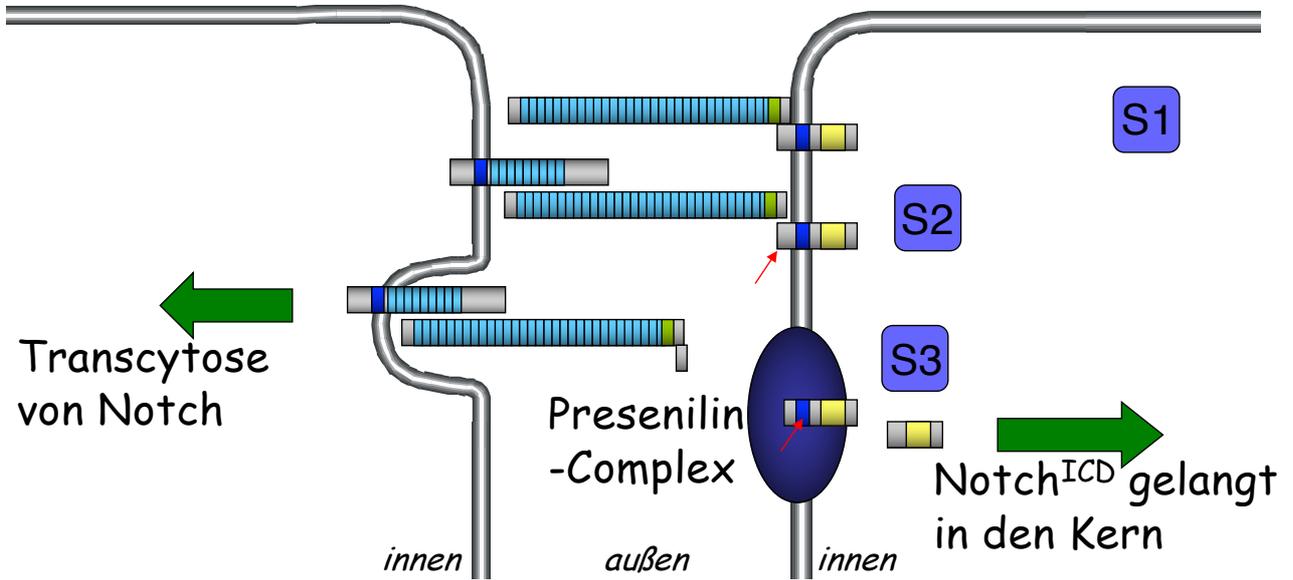


# Notch Signaltransduktion

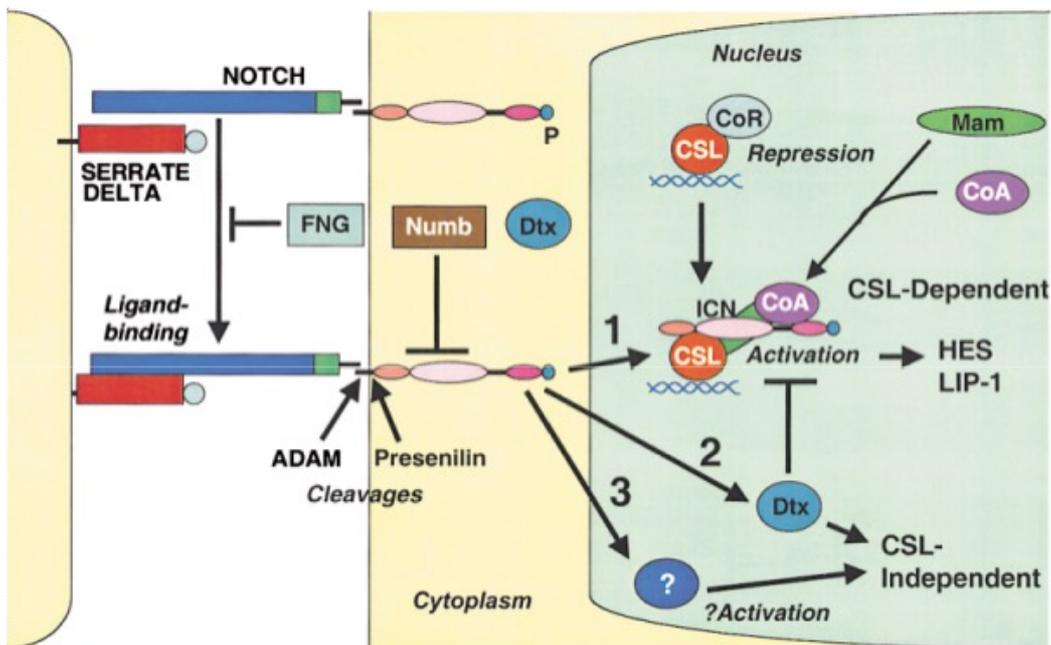


# Der Notch-Signalweg

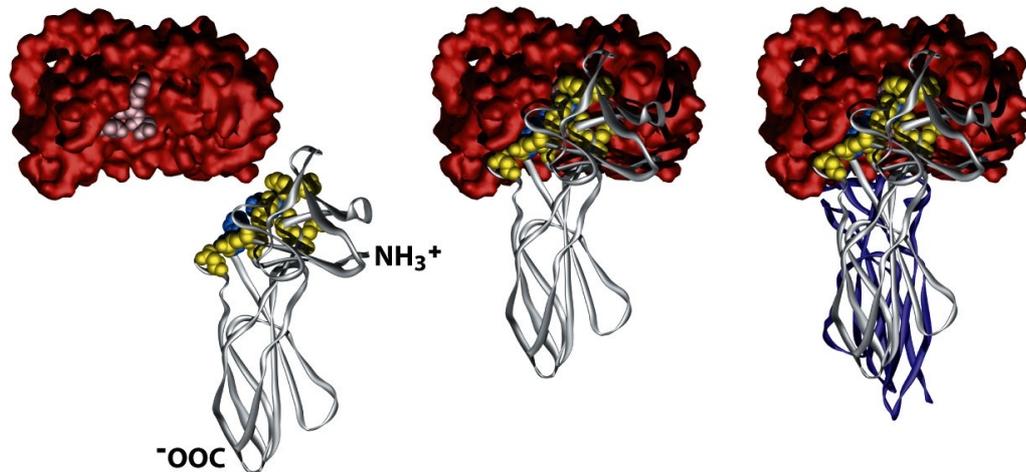
- 1) Notch wird im Golgi gespalten. S1
- 2) Notch bindet Delta oder Serrate Liganden (DSL)  
Es kommt zur Spaltung. S2
- 3) Anschließend wird Notch in der Membran durch Presenilin gespalten. Cofactor ist Nicastrin. S3



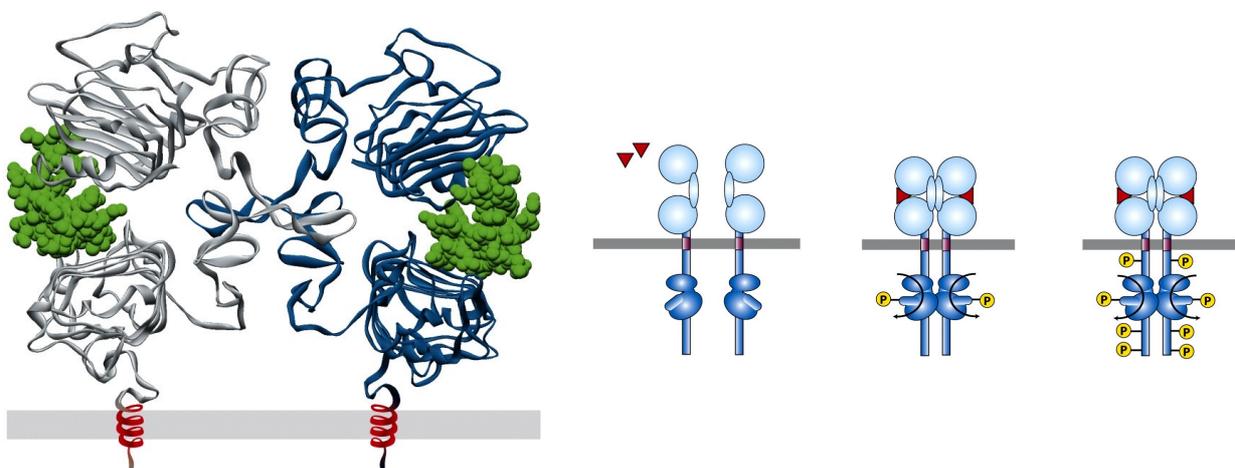
# Notch Signaltransduktion



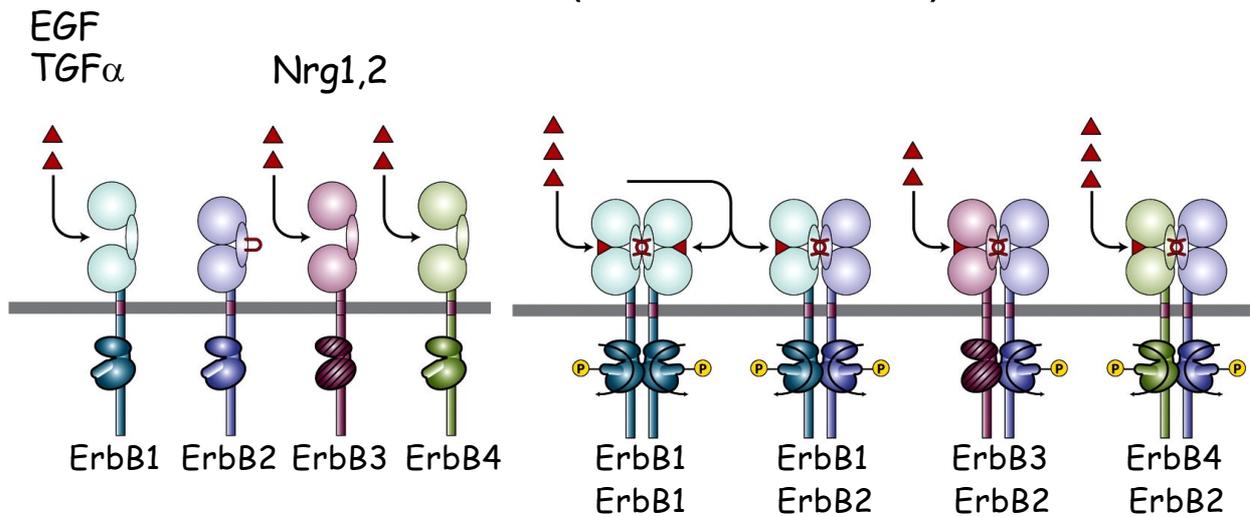
Rezeptor-Ligand Interaktionen sind  
extrem spezifisch



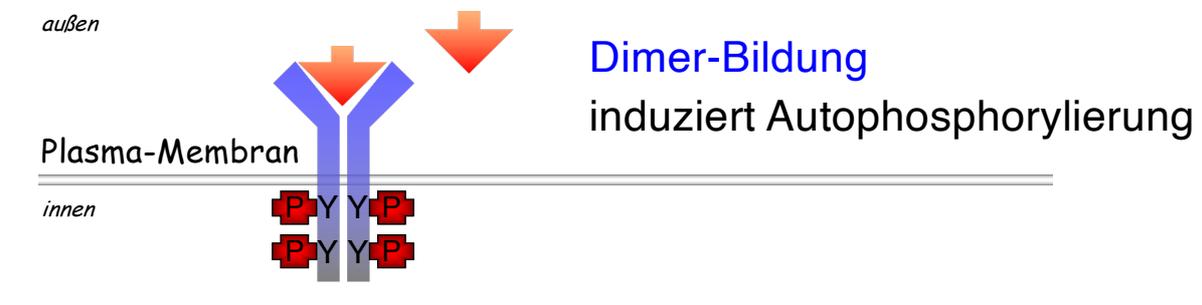
Bindung von EGF führt zur  
Rezeptordimerisierung und zur  
Autophosphorylierung (Tyrosin!)



# 4 verschiedene EGF-Rezeptoren beim Menschen (ErbB1-ErbB4)



## Aktivierung des EGF-Rezeptors = Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK)

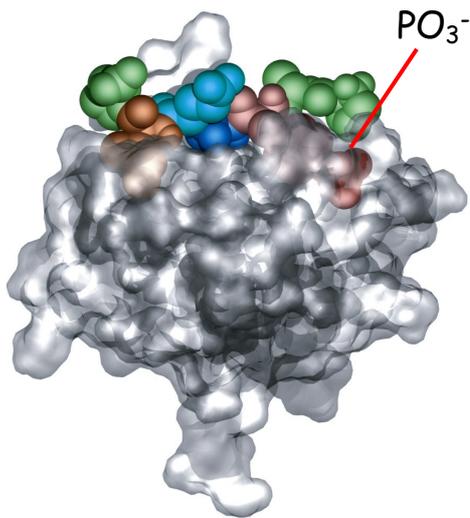


Src, SH3 SH2 SH1  
eine cytoplasmatische-Tyrosin-Kinase

 SH2-Domänen binden Phosphotyrosin

 SH3-Domänen binden Prolinreiche Sequenzen

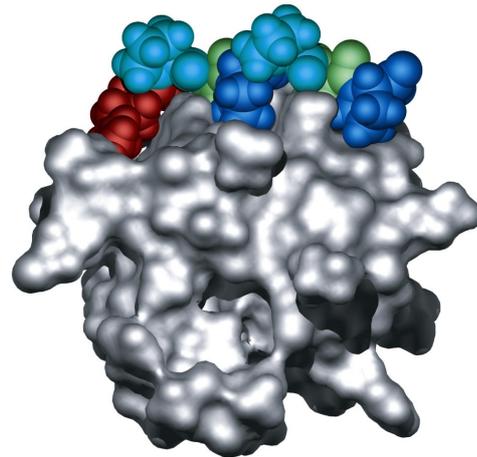
## SH2 Domäne



Phospho-Tyrosin Bindung

Es gibt auch eine PTB-Domain  
(Phospho-Tyrosin Bindung)

## SH3 Domäne



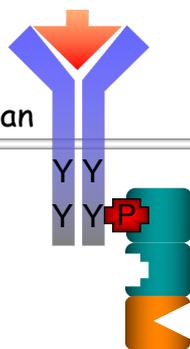
PXXP Interaktion.  
Spezifische Protein-  
Protein Interaktion

## Weiterleitung des Signals

*außen*

Plasma-Membran

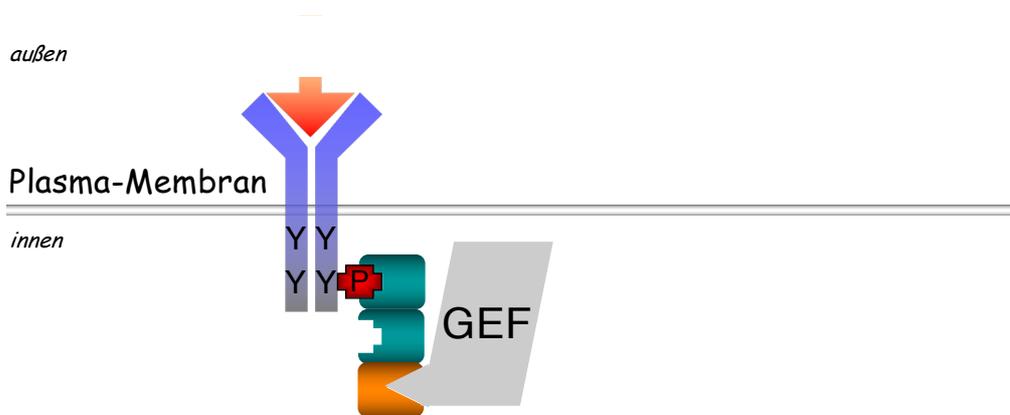
*innen*



Das (SH2-SH2-SH3) Protein  
Drk/Grb koppelt aktivierte RTKs an  
weitere Proteine.

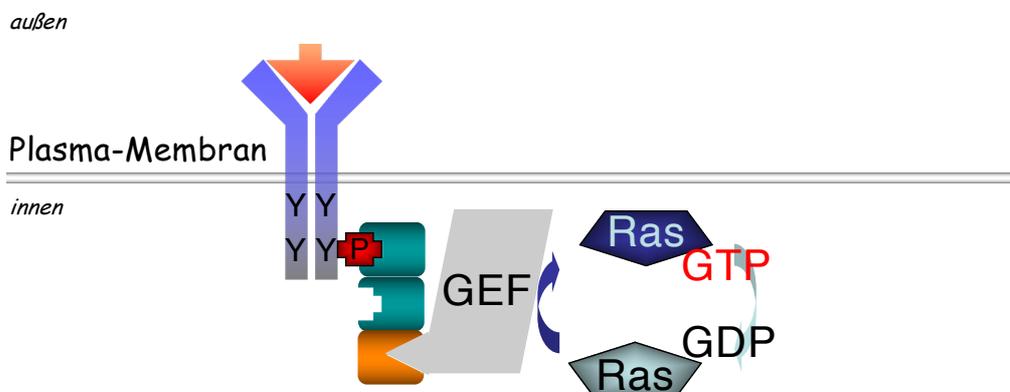
Problem: Spezifität!

# Weiterleitung des Signals



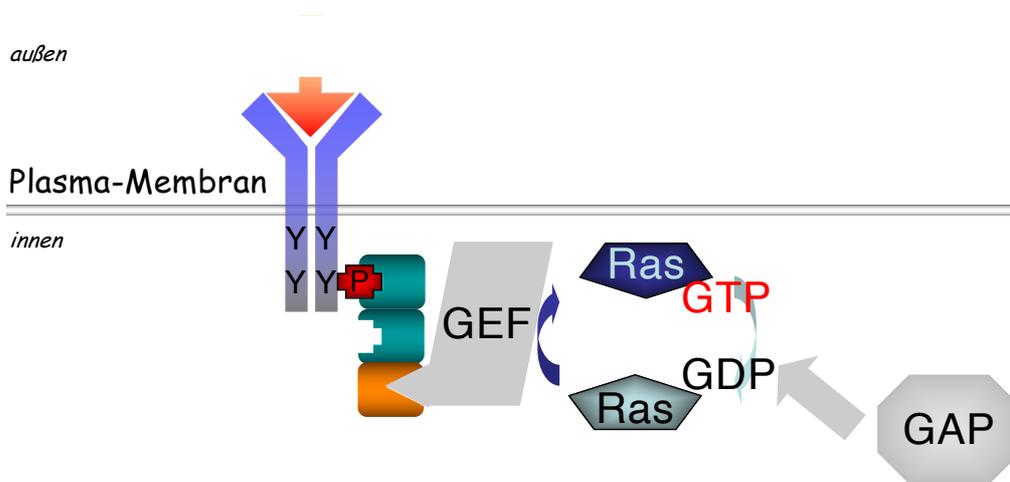
Ein GEF (Guanine exchange factor) aktiviert kleine G-Proteine. Für EGFR heißt es SOS (Son of Sevenless)

# Weiterleitung des Signals



Ein GEF (Guanine exchange factor) aktiviert kleine G-Proteine. Für EGFR heißt es SOS (Son of Sevenless)

# Weiterleitung des Signals



Ein GAP (GTPase activating protein) inaktiviert Ras.

# Weiterleitung des Signals



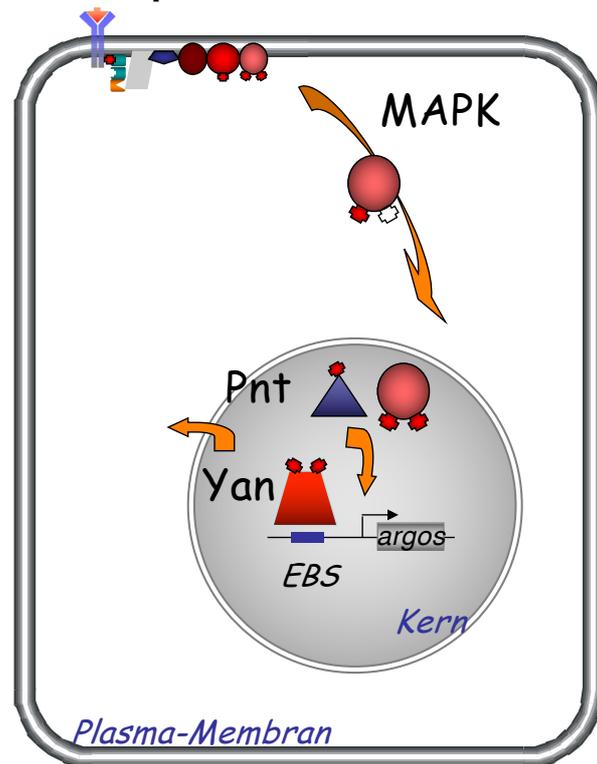
Ras aktiviert die MAP-Kinase Kaskade.  
Serin/Threonin (S/T) Kinasen.

Signalverstärkung

## Die MAPK gelangt in den Zellkern und phosphoryliert Transkriptionsfaktoren

Die aktivierte MAPK gelangt in der Kern und phosphoryliert die ETS-Domänen Transkriptionsfaktoren:

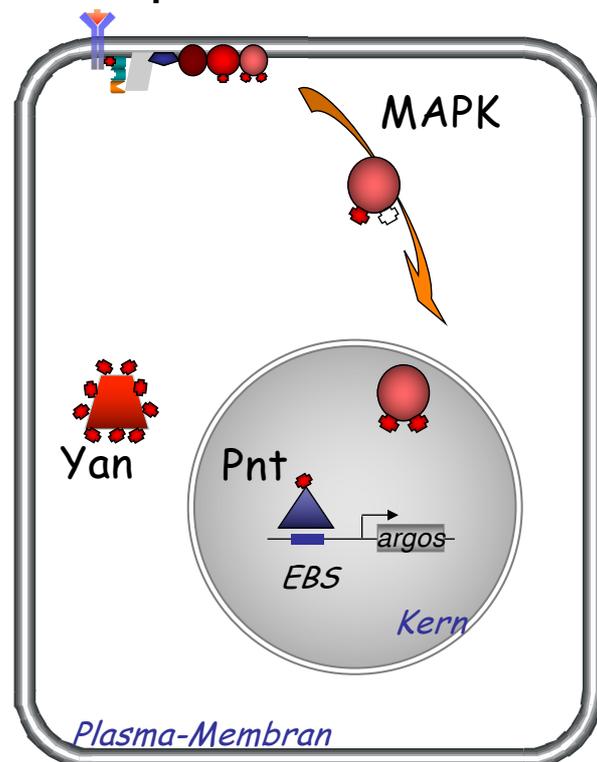
**Yan** = Repressor  
**Pnt** = Aktivator



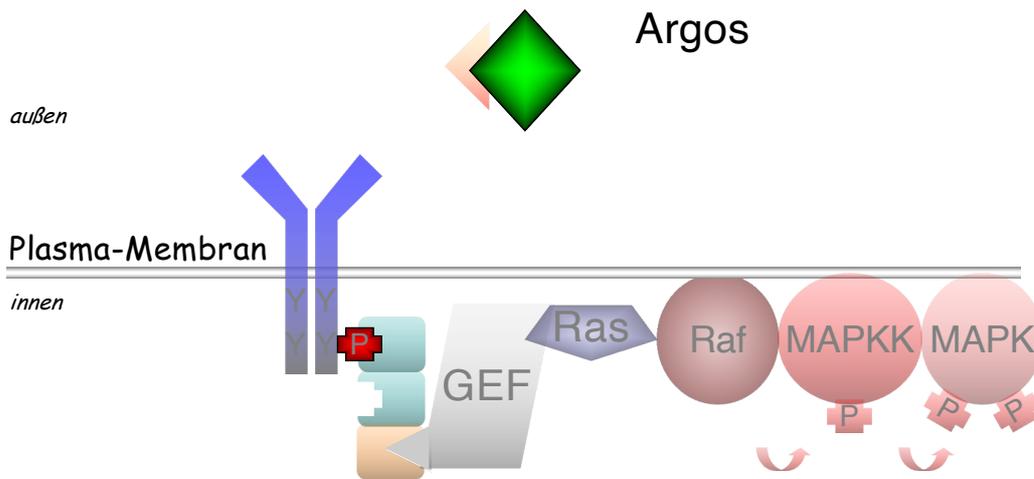
## Die MAPK gelangt in den Zellkern und phosphoryliert Transkriptionsfaktoren

**Yan** wird sehr stark phosphoryliert und verliert die DNA Bindungsfähigkeit, kommt ins Cytoplasma und wird degradiert.

**Pnt** wird einmal phosphoryliert und hierdurch aktiviert.

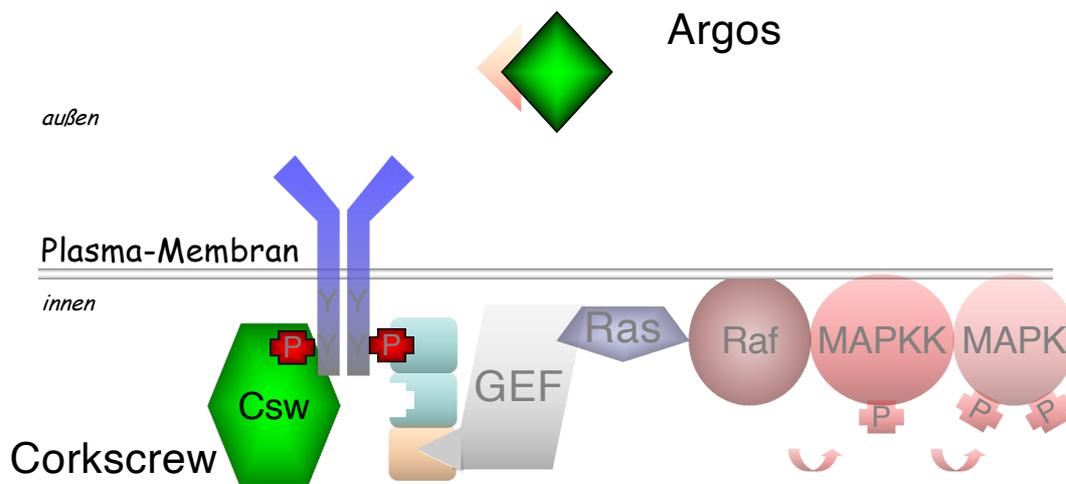


# Termination des Signals



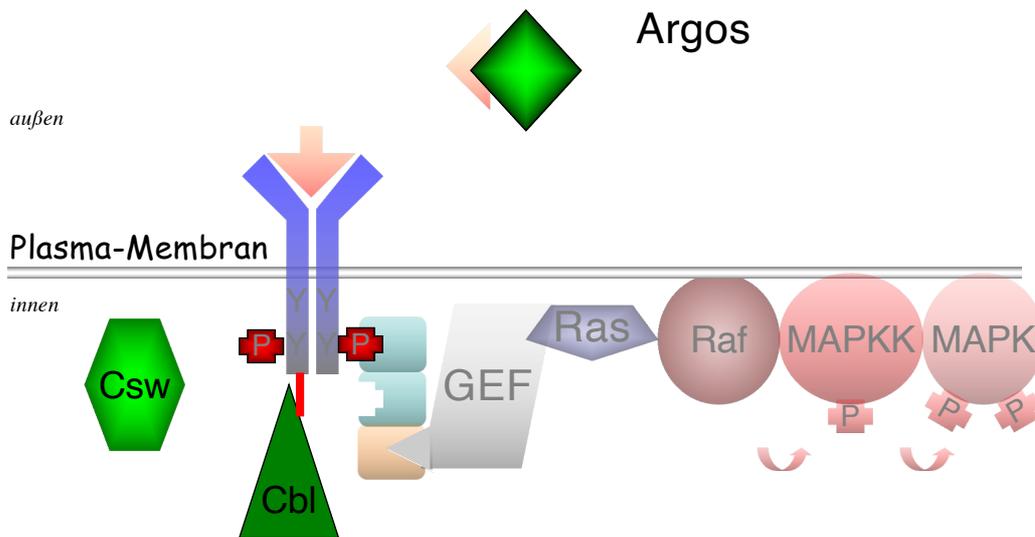
Argos konkuriert mit Spitz um Rezeptoraktivierung  
Zielgen von Pnt. Signalkaskade inaktiviert sich selbst!

# Termination des Signals



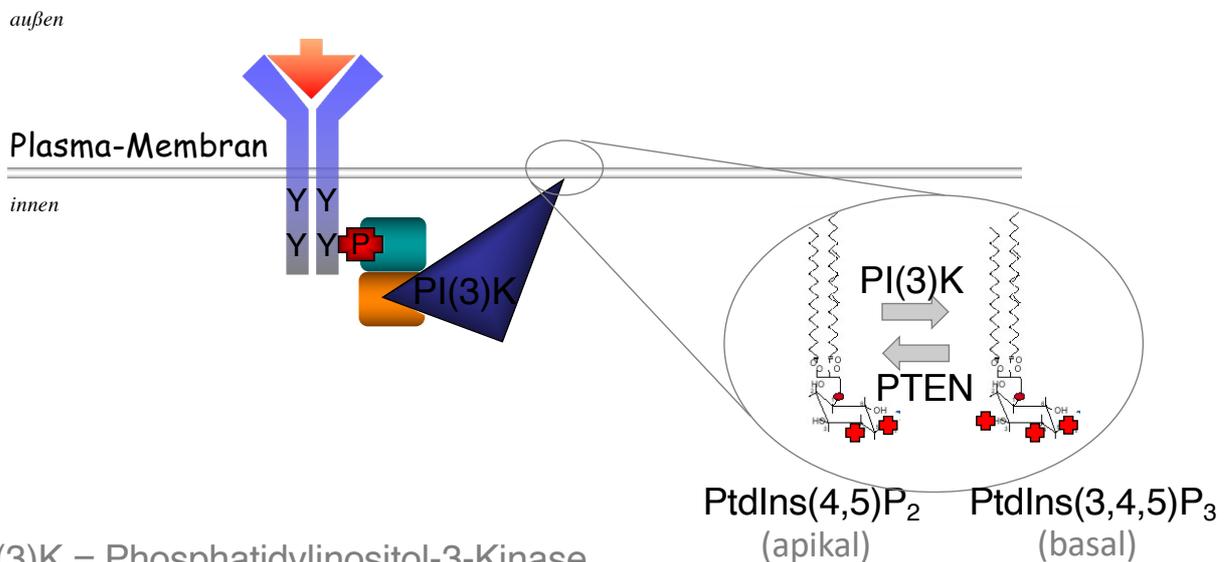
Corkscrew ist eine Tyrosinphosphatase.  
Dephosphoryliert RTKs.

# Termination des Signals



Cbl ist eine E3 Ubiquitin-Ligase. Mono-Ubiquitinierung von Rezeptoren führt zur Endozytose.

# Komplexe Signalketten

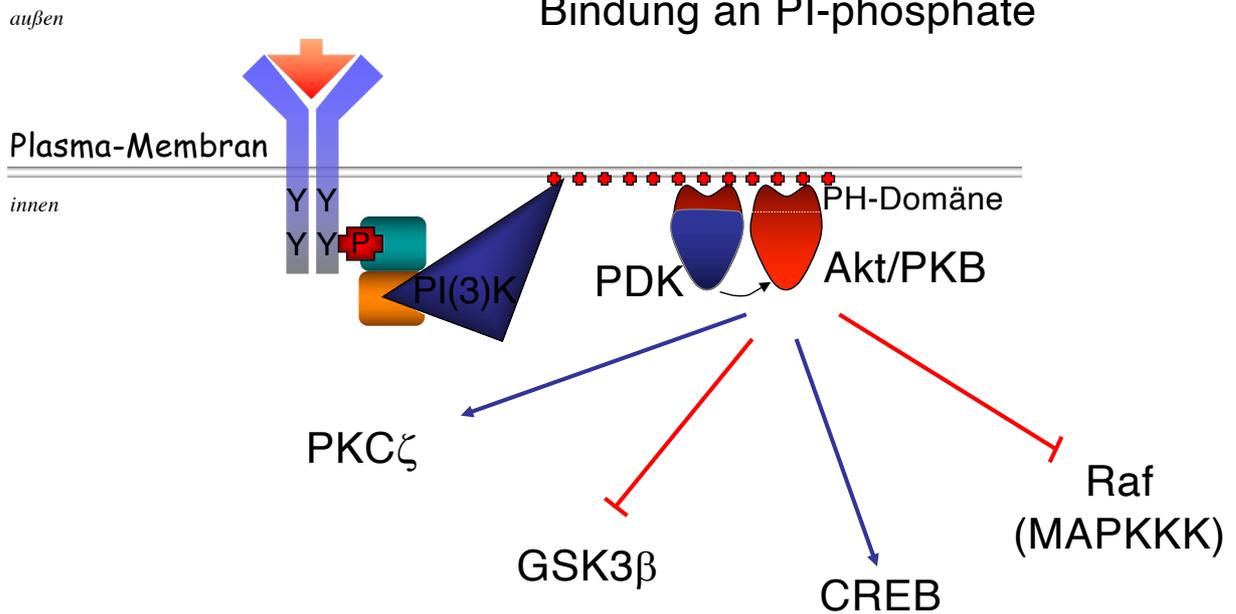


PI(3)K = Phosphatidylinositol-3-Kinase

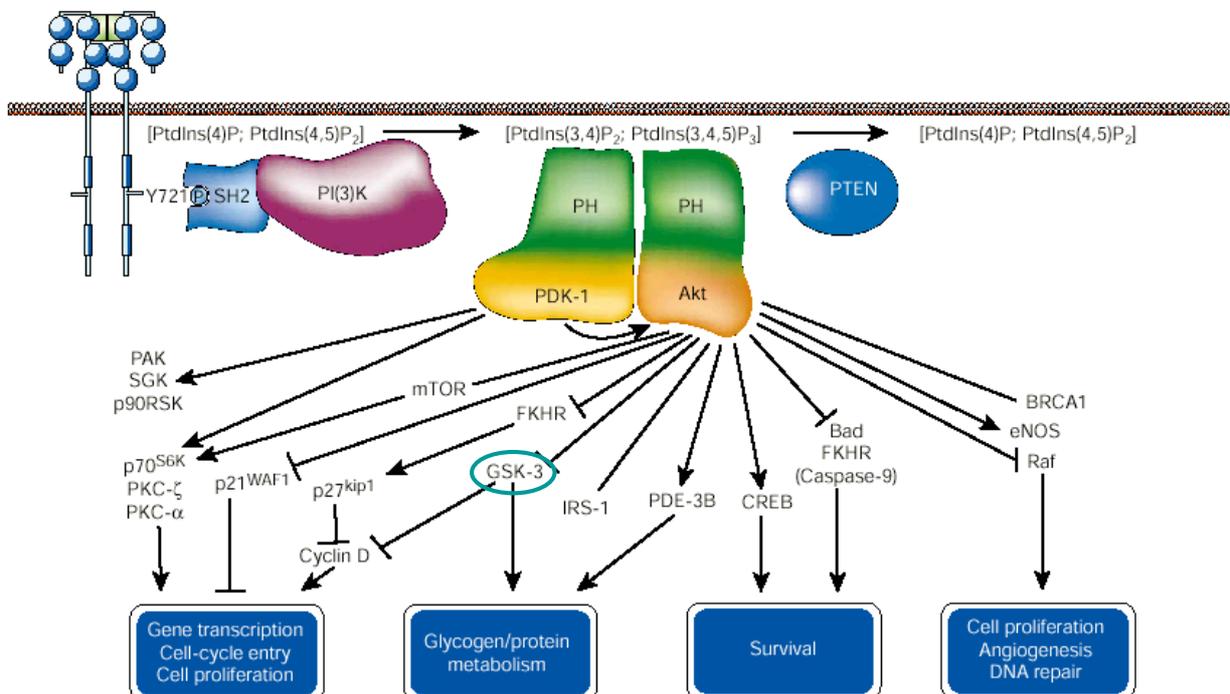
PTEN = Phosphatase and Tensin homolog

# Komplexe Signalketten

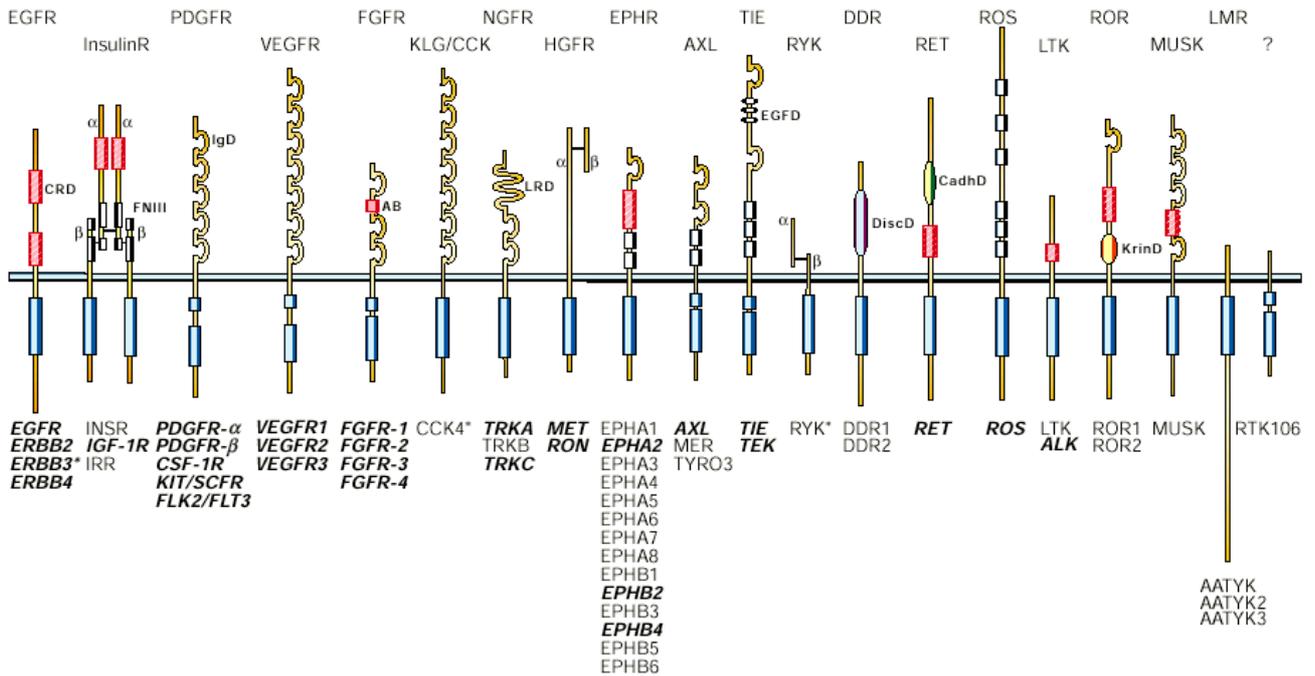
Die Pleckstrin Homologie (PH) - Domäne vermittelt eine spezifische Bindung an PI-phosphate



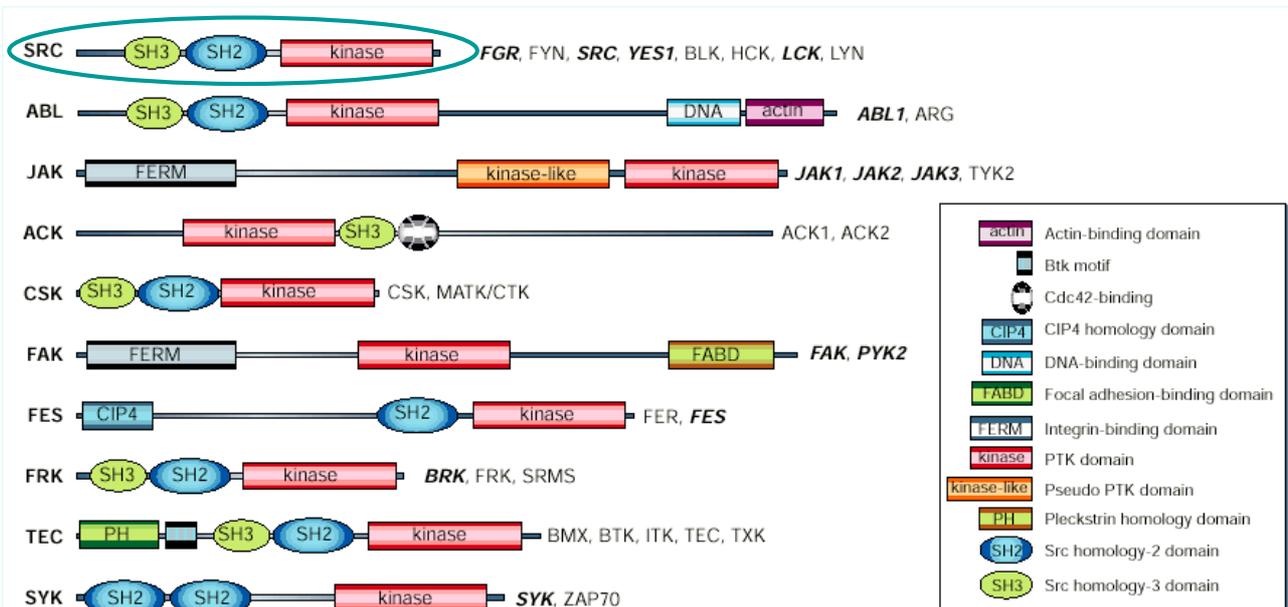
# Komplexe Signalwege



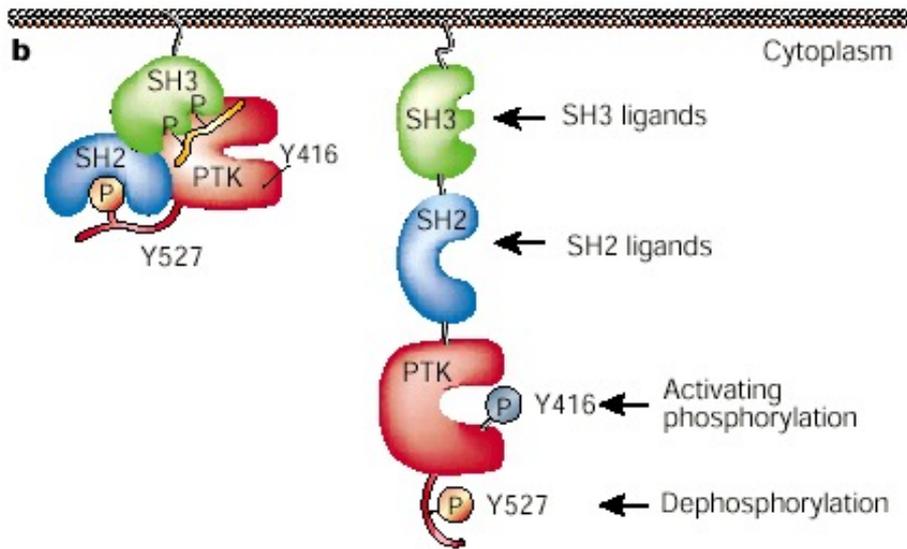
# Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTKs) des Menschen



## Cytoplasmatische Tyrosinkinassen

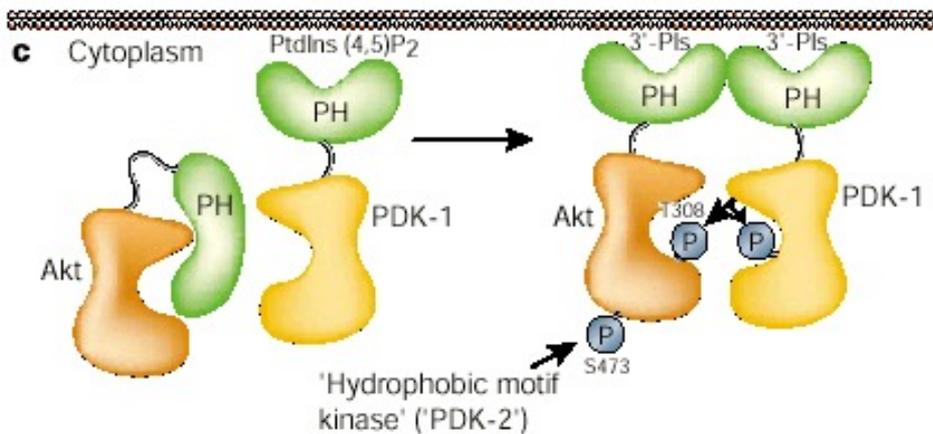


# Src - Aktivierung



SH = Src Homology

# Akt - Aktivierung



PH = Pleckstrin Homology

# JAK/STAT Signalweg

(JAK = Janus Kinasen;

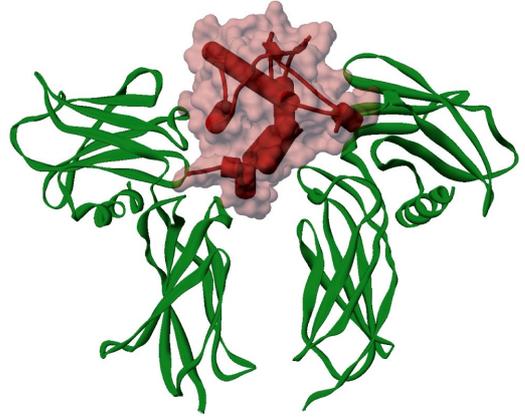
STAT = Signal Transduction and Activation of Transkription)



Wildtyp

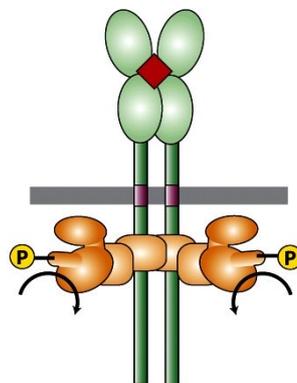
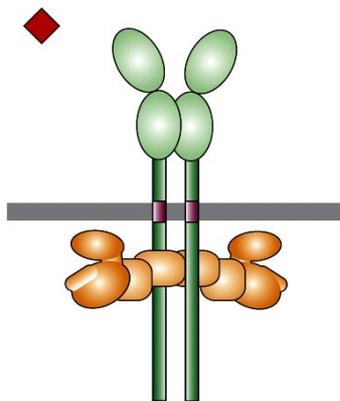


Epo-R <sup>-/-</sup>

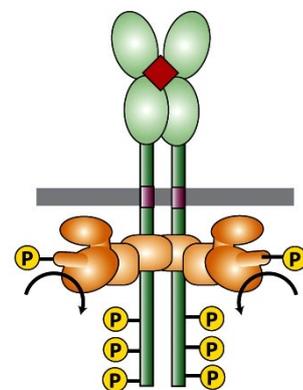


Erythropoietin (Epo), Bindung an den Epo-Rezeptor

Die Aktivierung eines Zytokin-Rezeptors erfolgt über Rezeptorassoziierte JAK Kinasen

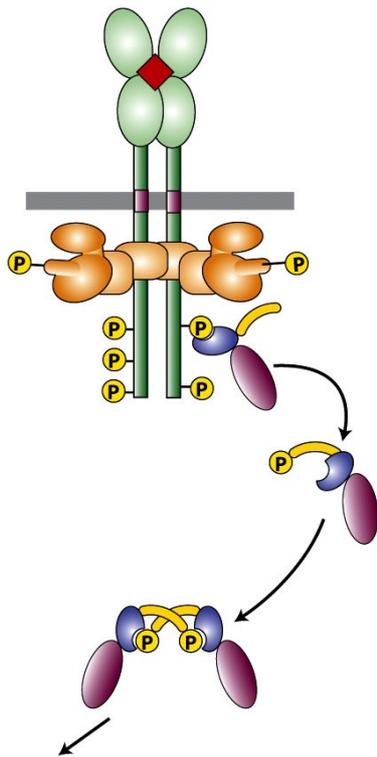


Nach Ligandenbindung JAK phosphorylierung



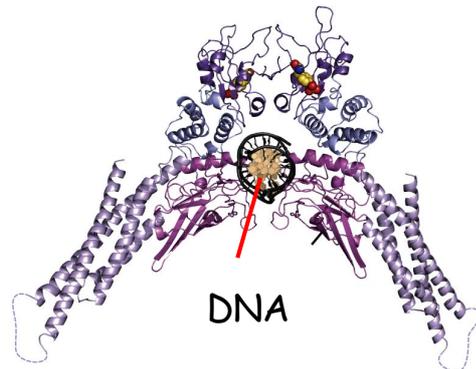
Zusätzliche Phosphotyrosine sind Docking-Stationen für STAT Transkriptionsfaktoren

# JAK/STAT Signalweg

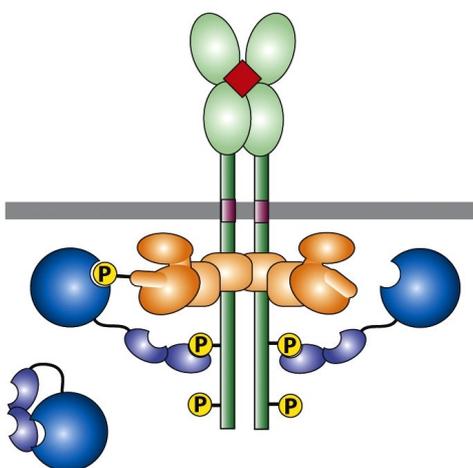


STAT bindet über eine SH2 Domäne, wird von JAK phosphoryliert und ist nach Dimerisierung als TF aktiv.

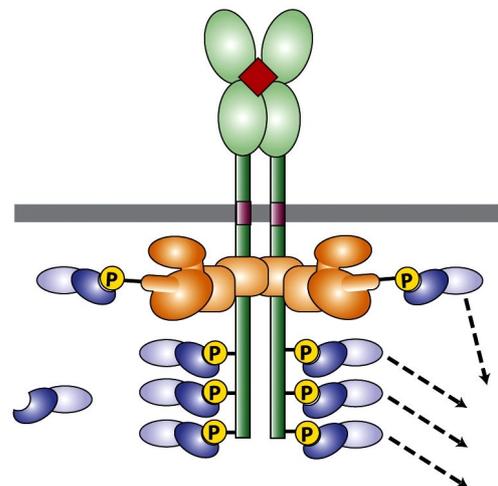
STAT



# Inaktivierung des JAK/STAT Signalwegs

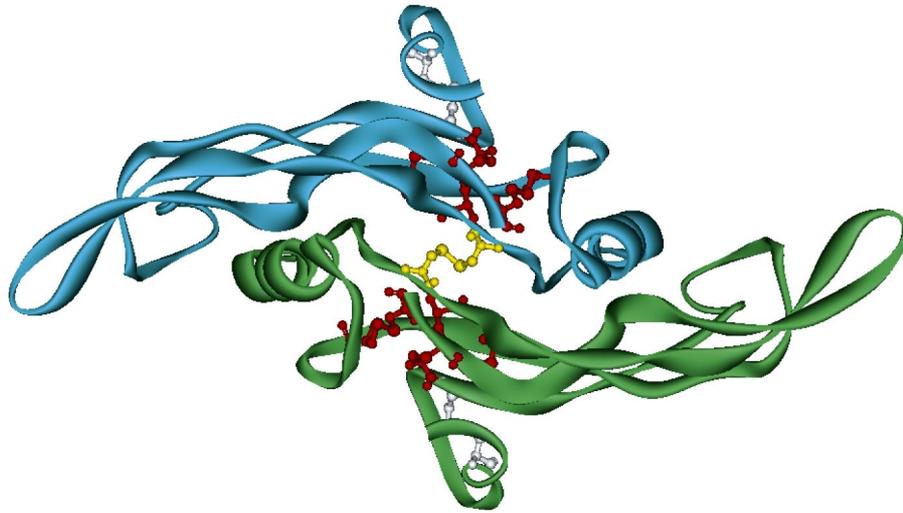


SHP1 Phosphatase



Rekrutierung einer E3 Ubiquitin Ligase

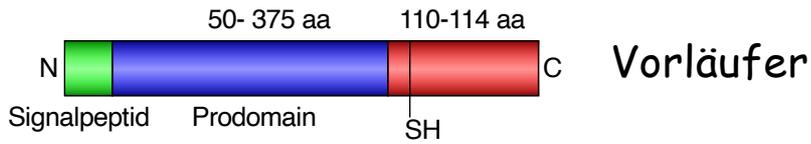
## Reifes dimeres TGF $\beta$



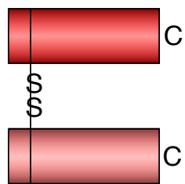
## Konservierte Raumstruktur des TGF $\beta$



# Proteolytische Reifung von TGFβ

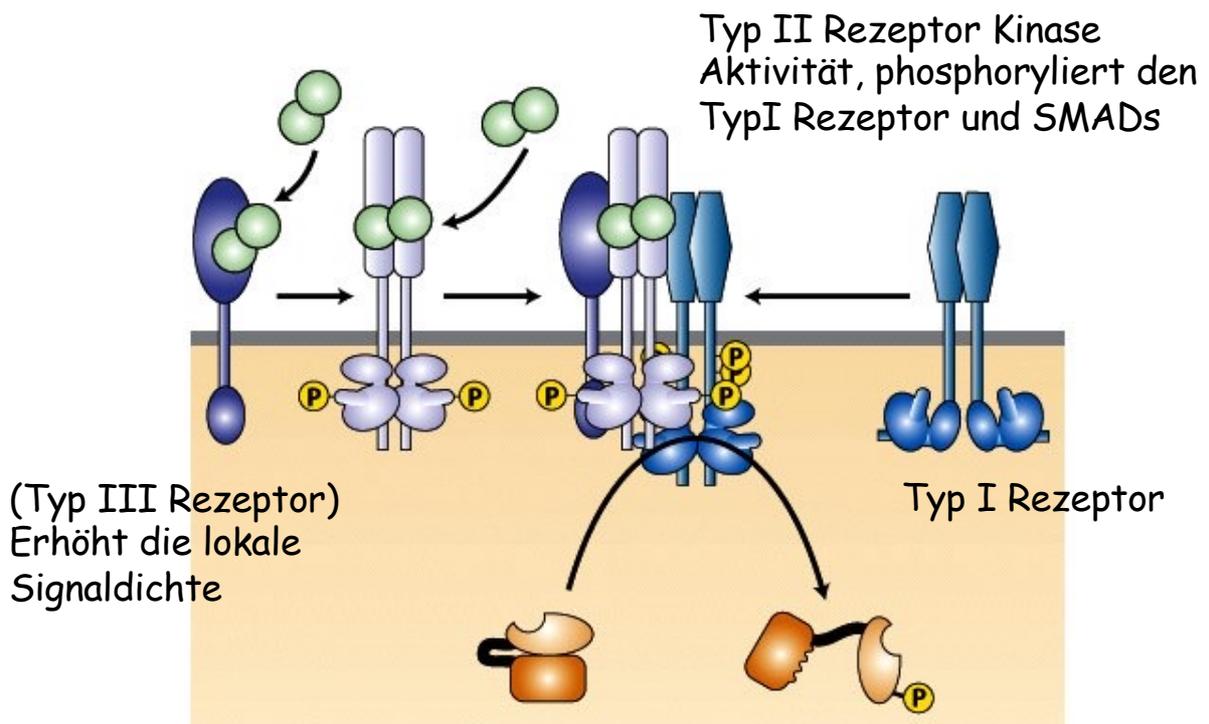


Monomer

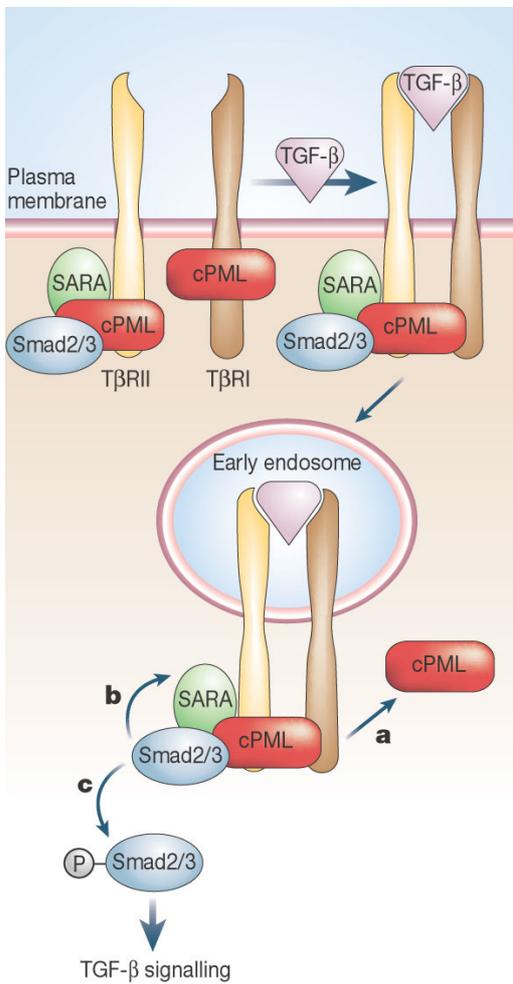


Dimer  
(Homo- oder  
Heterodimer!)

## TGFβ (BMP4) Signalweg



Signaltransduktion und Endosomen! SARA



## TGF $\beta$ (BMP4) Signalweg

Die Signaltransduktion wird zusätzlich über die zelluläre Kompartimentierung reguliert.

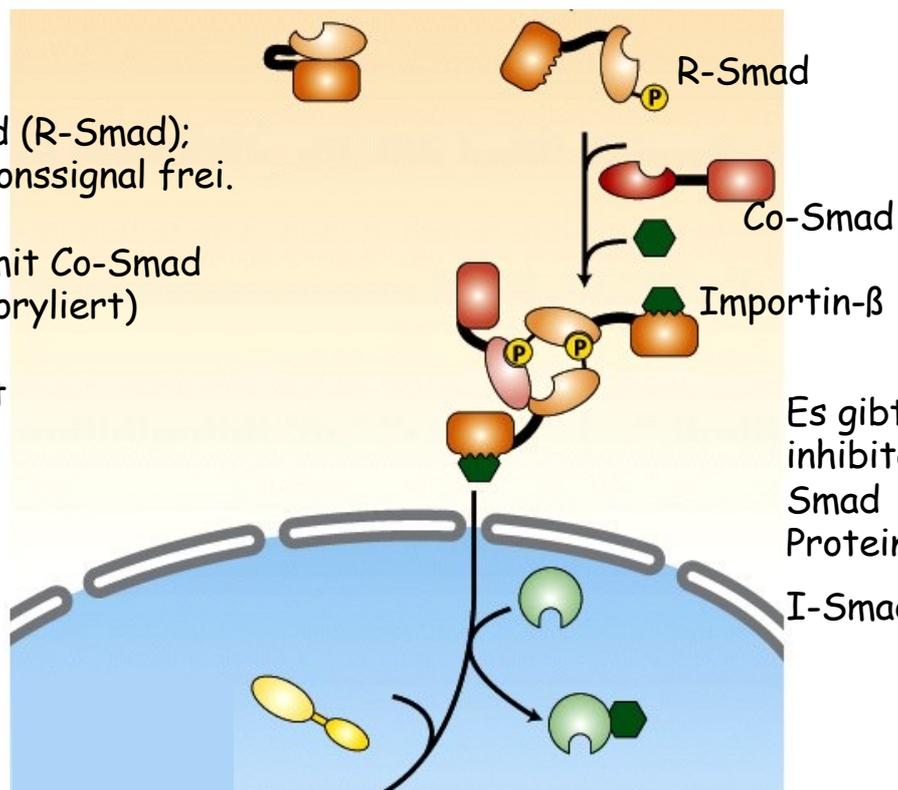
SARA (Smad anchor for receptor activation)

## TGF $\beta$ (BMP4) Signalweg

Phospho-Smad (R-Smad);  
Kernlokalisations-signal frei.

Interaktion mit Co-Smad  
(nicht phosphoryliert)

Kerntransport

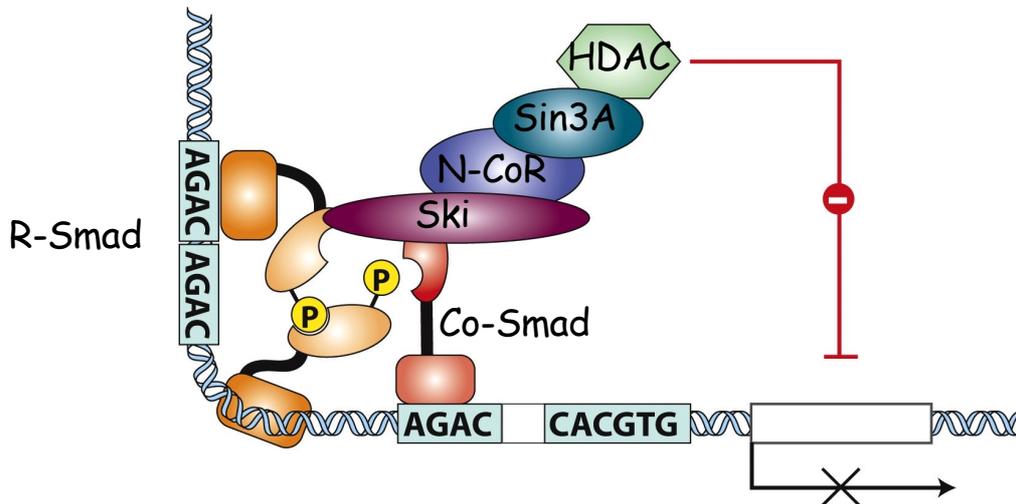


Es gibt auch inhibitorische Smad Proteine:

I-Smad

# TGFβ (BMP4) Signalweg

Im Kern bindet der Smad-Komplex  
Sequenzspezifisch und rekrutiert die  
Histondeacetylase HDAC.



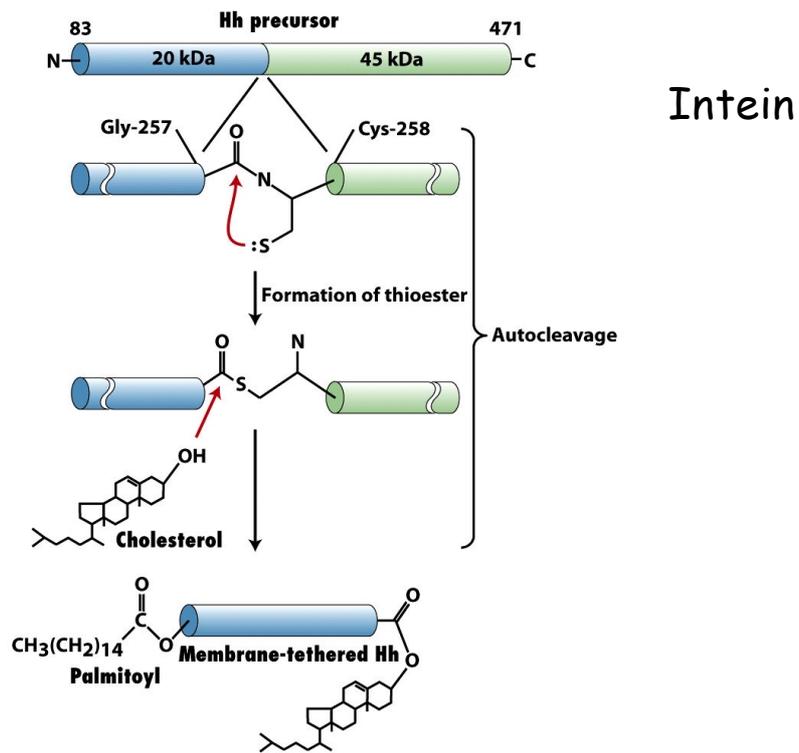
# Hedgehog-Signaling



Hedgehog (hh)

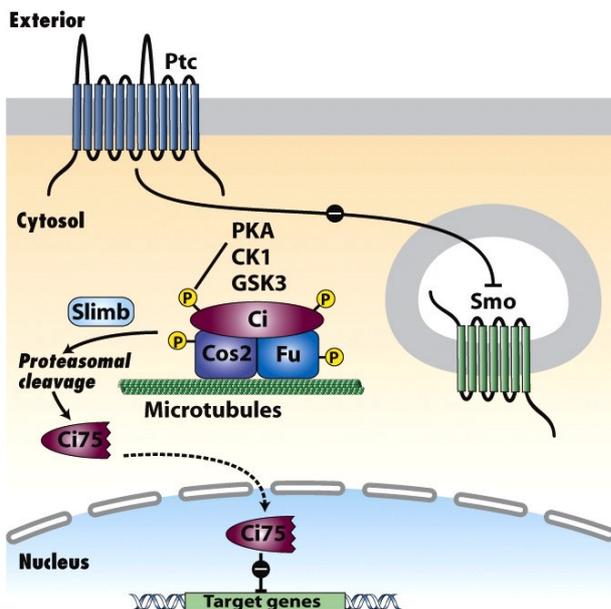
Sonic hedgehog (shh)  
Desert hedgehog (dhh)  
Indian hedgehog (ihh)

# Prozessierung und Lipid-Modifikation von Hedgehog

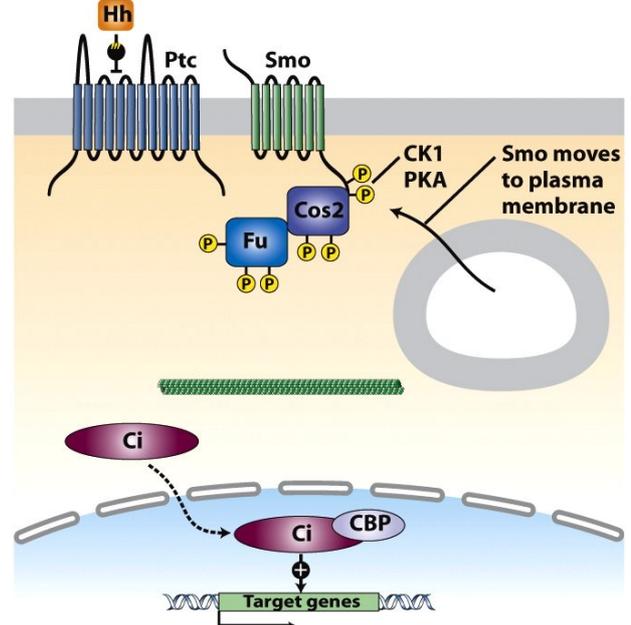


## Hedgehog Signaltransduktion

(a) - Hh

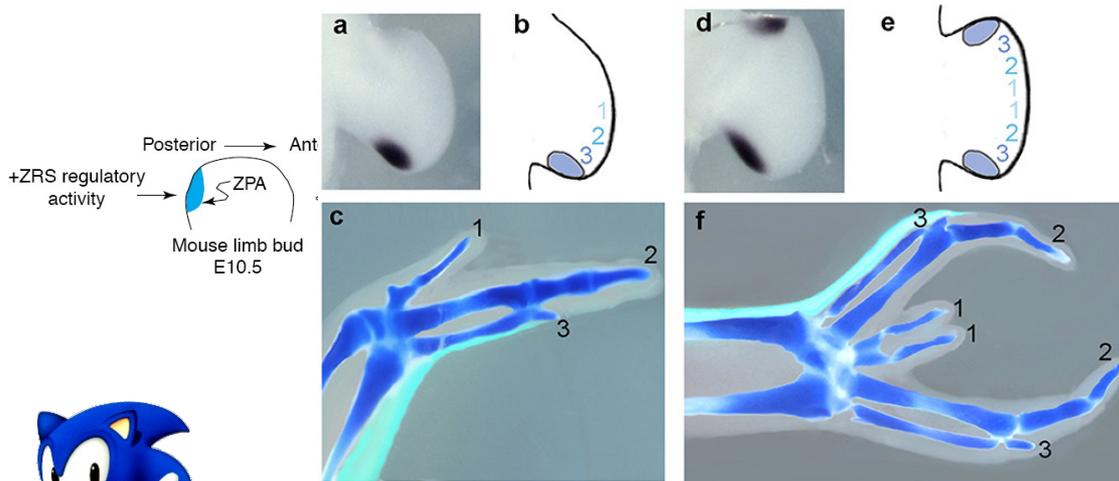


(b) + Hh

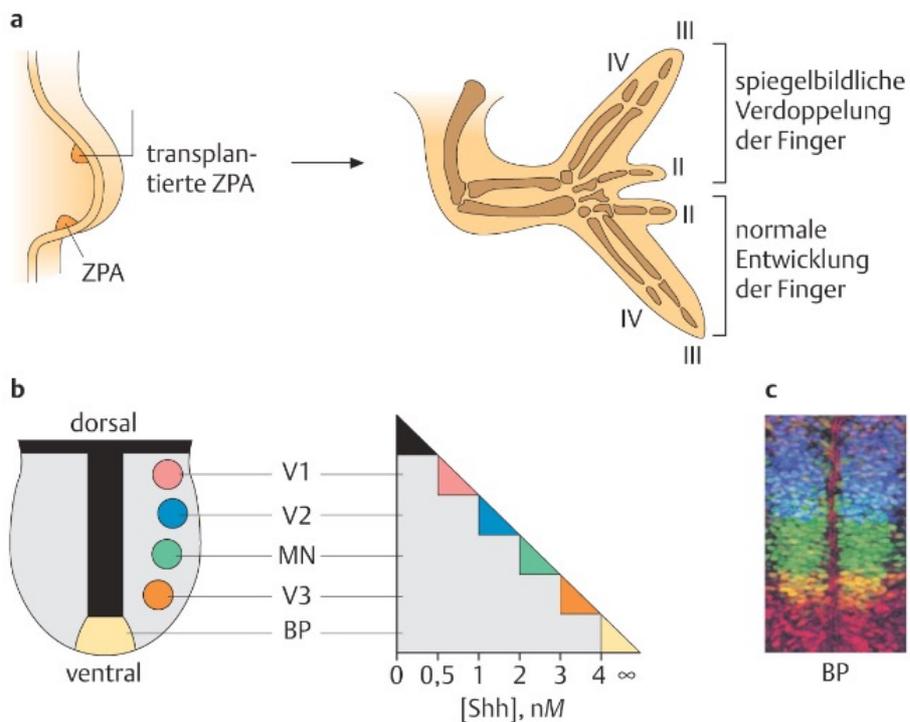


Hh  $\rightarrow$  ptc  $\rightarrow$  smo  $\rightarrow$  PKA  $\rightarrow$  Ci

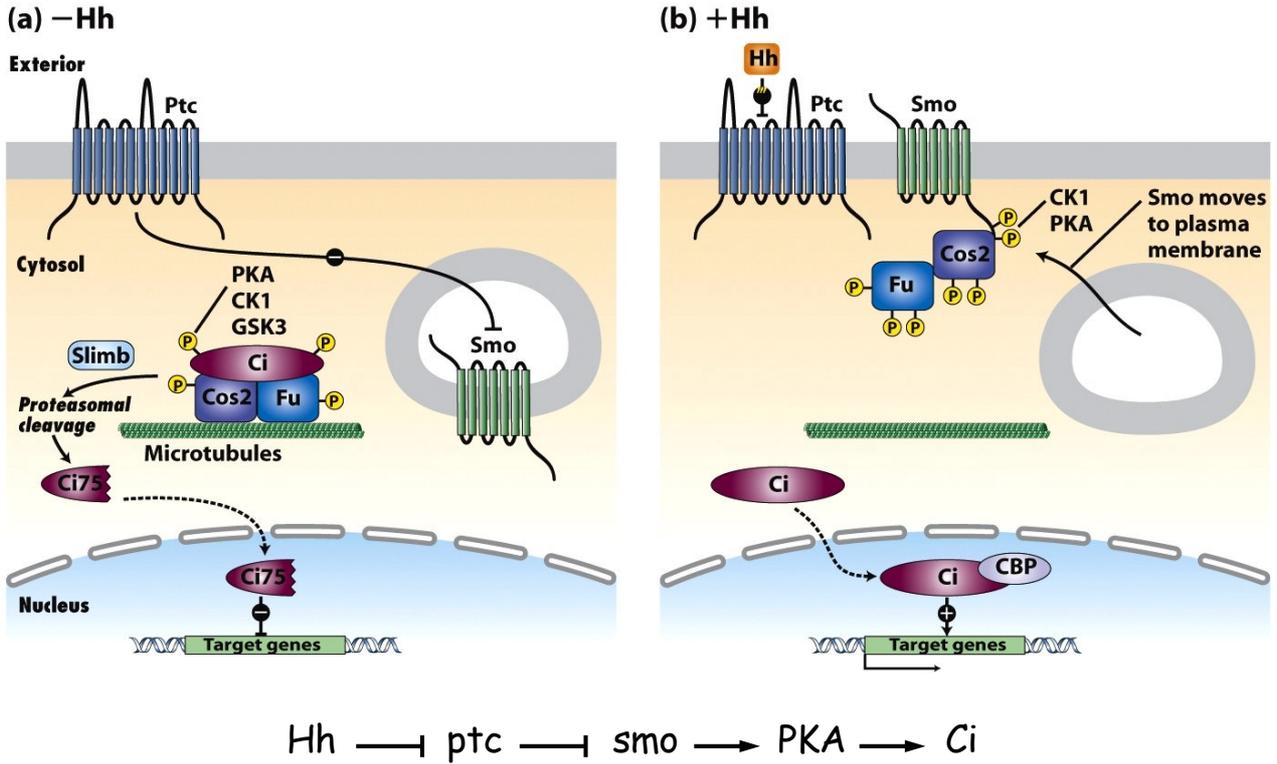
# Defekte in der Shh Signalkaskade, Shh ist ein Morphogen



## Morphogen-Gradienten



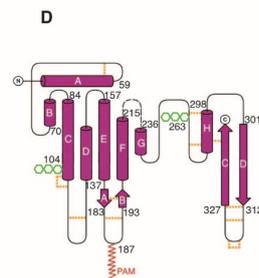
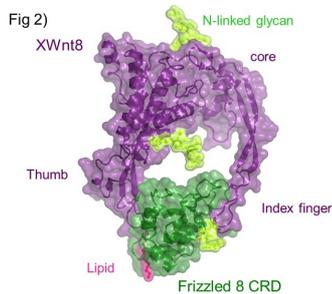
# Hedgehog Signaltransduktion



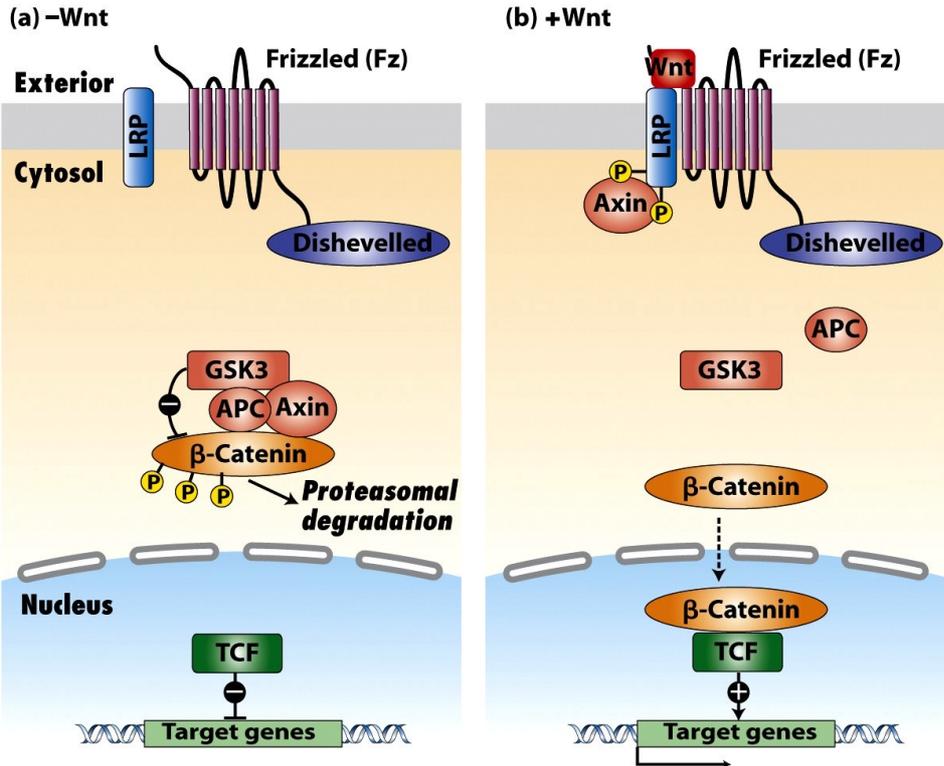
# Kanonische wnt Signaltransduktion

Wnt: Synthetischer Name aus **w**ingless und **I**nt.  
 Konserviertes, sezerniertes Signalmolekül.  
 22 konservierte Cysteinreste.

Drei verschiedene wnt Signalwege:  
 Canonical wnt signaling  
 PCP signaling (Planar cell polarity)  
 Ca<sup>2+</sup> signaling



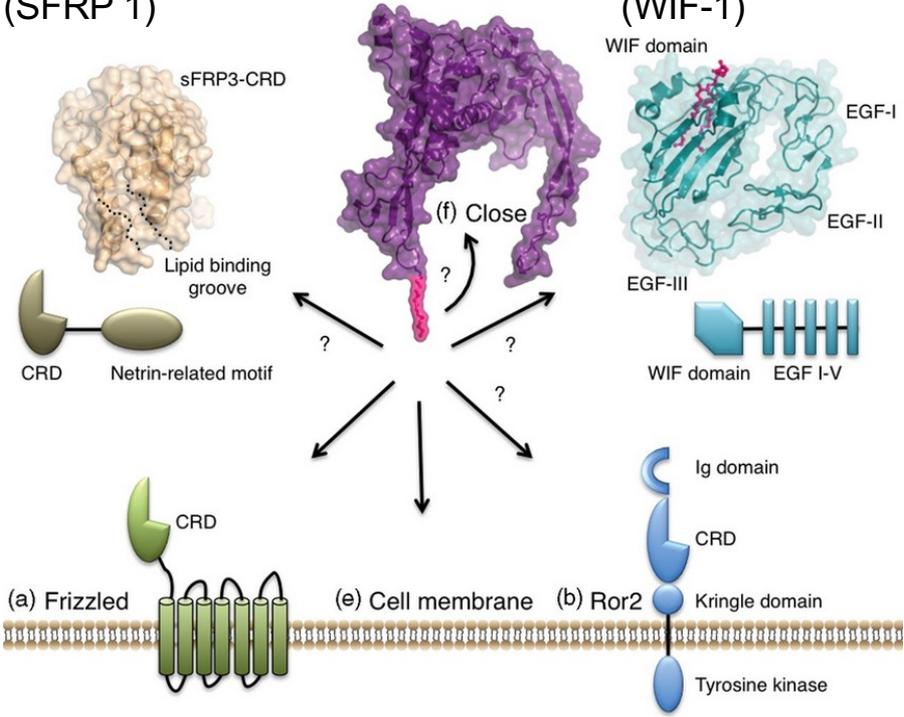
# Kanonische wnt Signaltransduktion



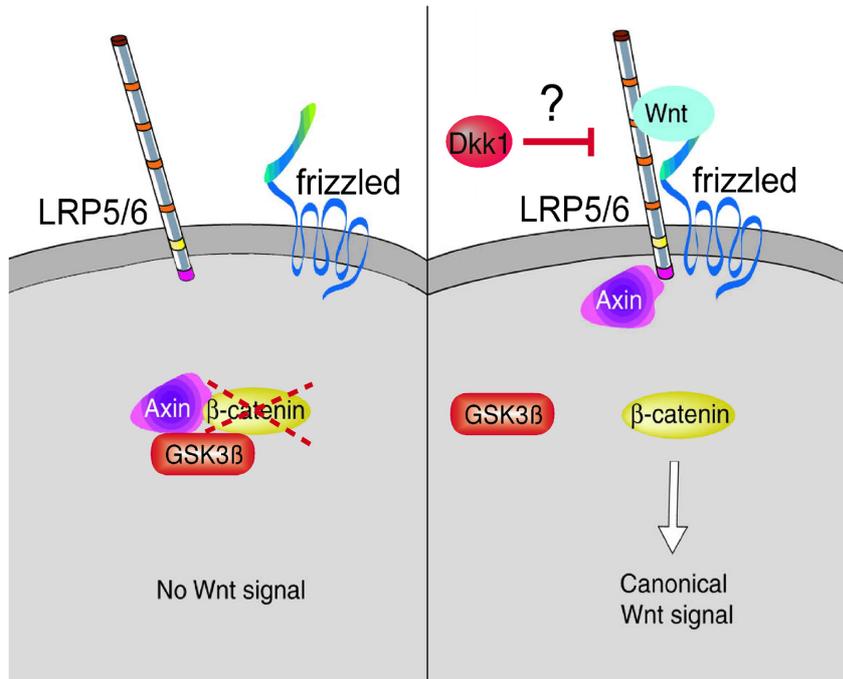
# Kanonische wnt Signaltransduktion

Secreted frizzled-related protein 1 (SFRP 1)

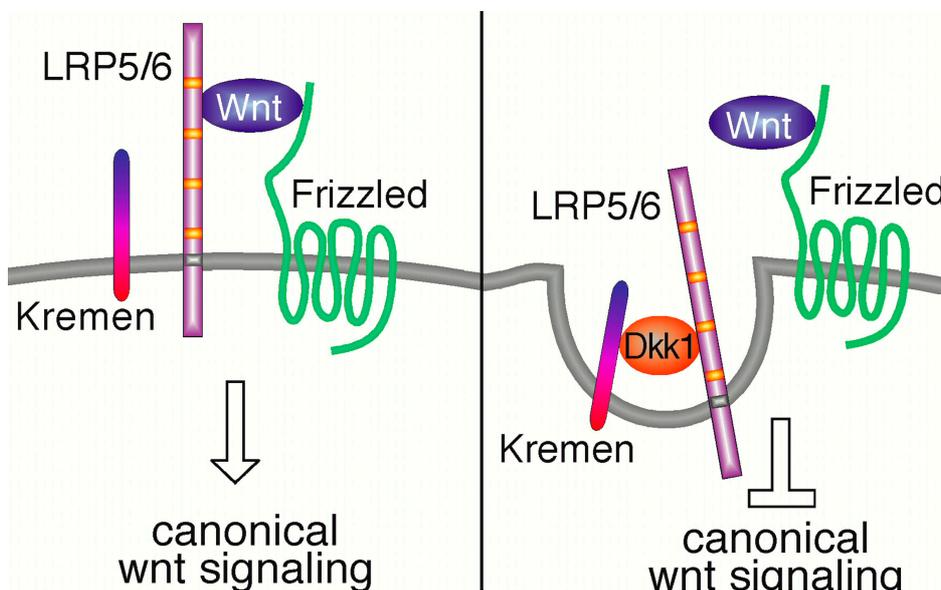
Wnt inhibitory factor-1 (WIF-1)



# Der Wingless/Wnt Rezeptor benötigt einen Co-Rezeptor

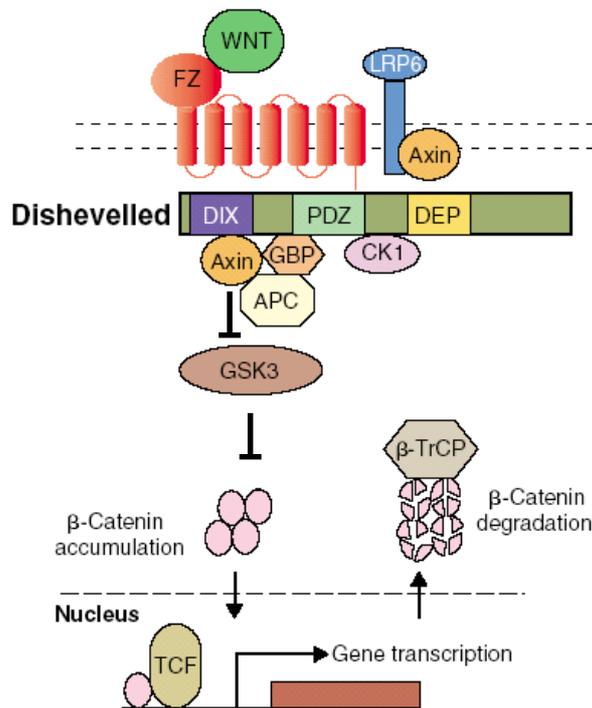


# Dickkopf hemmt die Wnt Signaltransduktion über Kremen



**Kremen ist Vertebraten-spezifisch!**

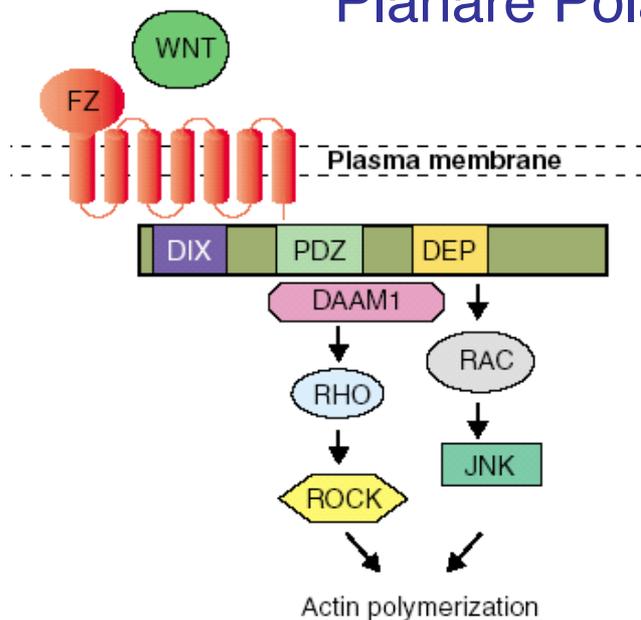
## Der "kanonische" wnt Signalweg



**DIX:**  
Dishevelled, Axin  
**PDZ:**  
PSD-95, DLG, ZO1  
**DEP:**  
Dishevelled, EGL-10, Pleckstrin

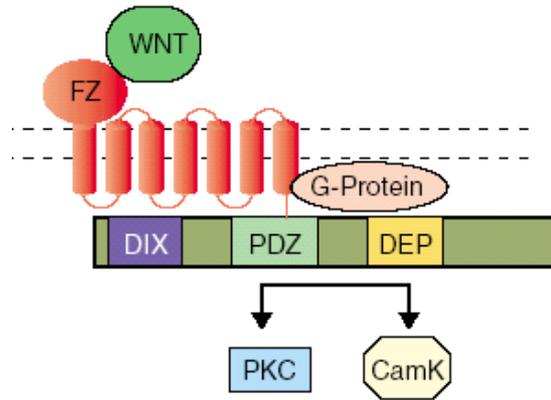
Canonical  
wnt signaling  
pathway.

## Der "nicht kanonische" wnt Signalweg Planare Polarität



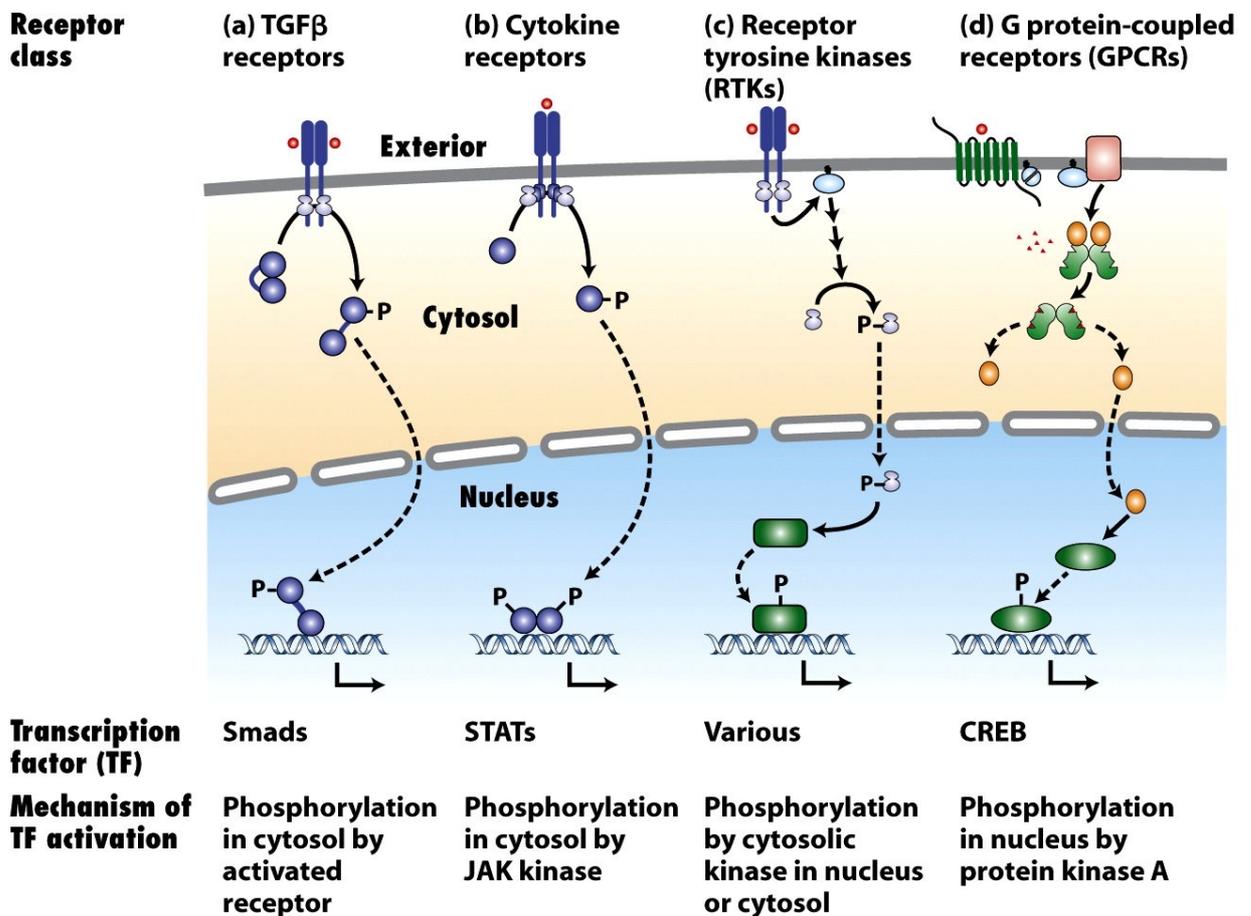
**DIX:**  
Dishevelled, Axin  
**PDZ:**  
PSD-95, DLG, ZO1  
**DEP:**  
Dishevelled, EGL-10, Pleckstrin

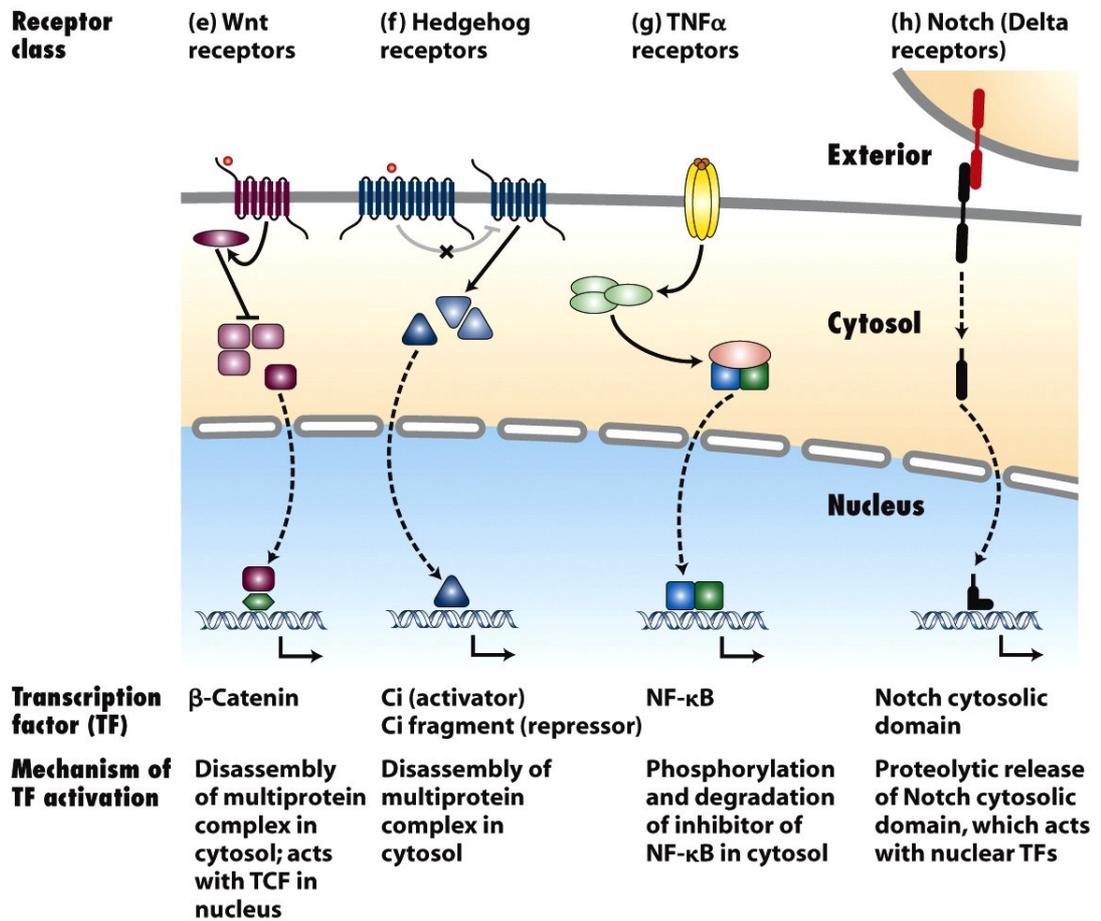
# Der Ca<sup>2+</sup> wnt Signalweg



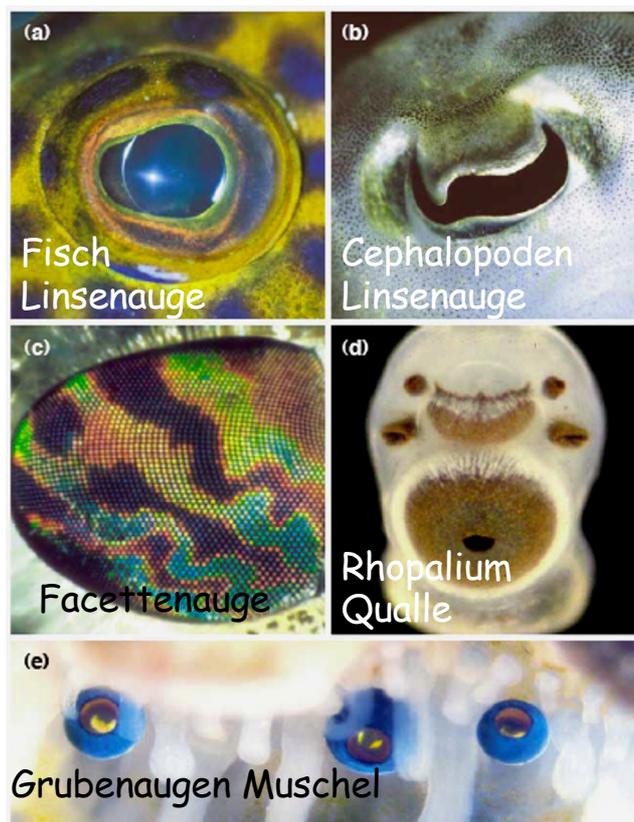
**DIX:**  
Dishevelled, Axin  
**PDZ:**  
PSD-95, DLG, ZO1  
**DEP:**  
Dishevelled, EGL-10, Pleckstrin

Ca<sup>2+</sup> pathway.

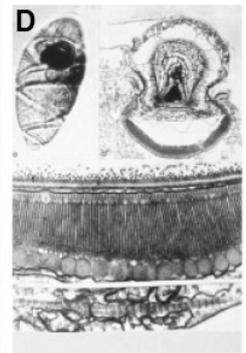
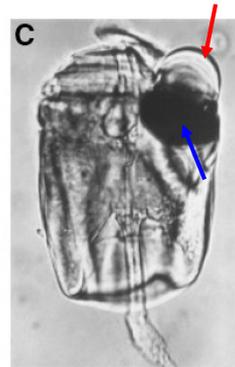
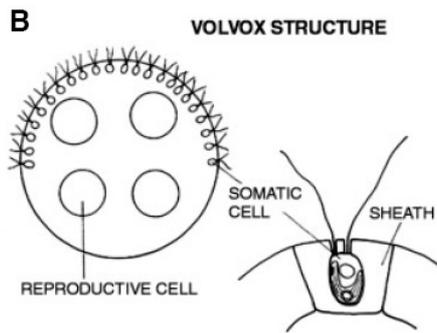
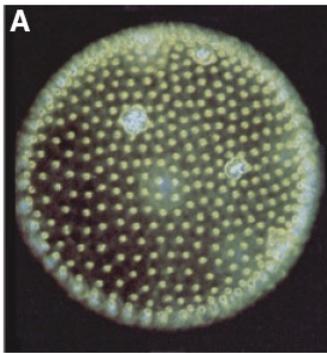




Augen werden in allen Tierstammen gebildet



# Augen-Organellen



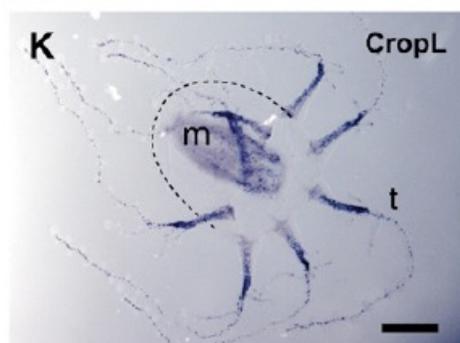
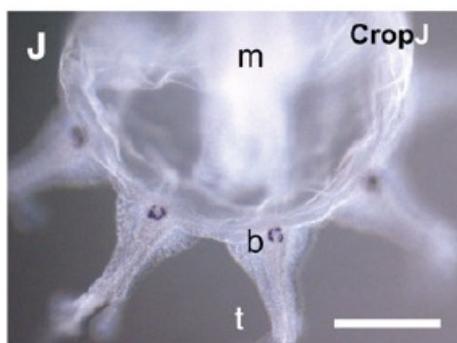
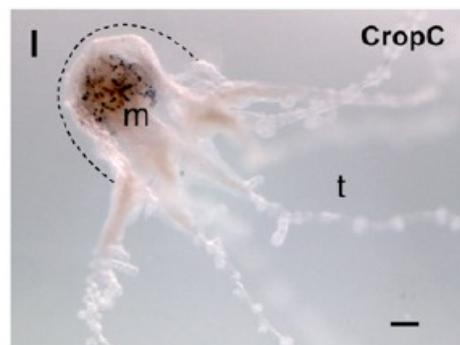
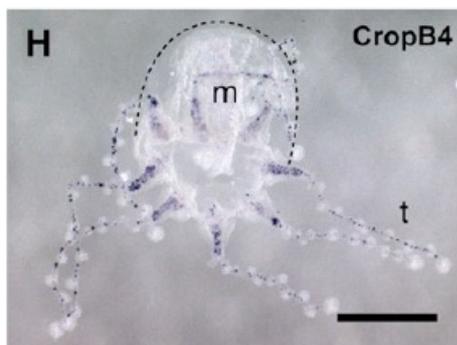
Volvox->  
Ocellus im Chloroplast

Dinoflagellaten

Linse, Pigmentbecher,  
Rhabdomere

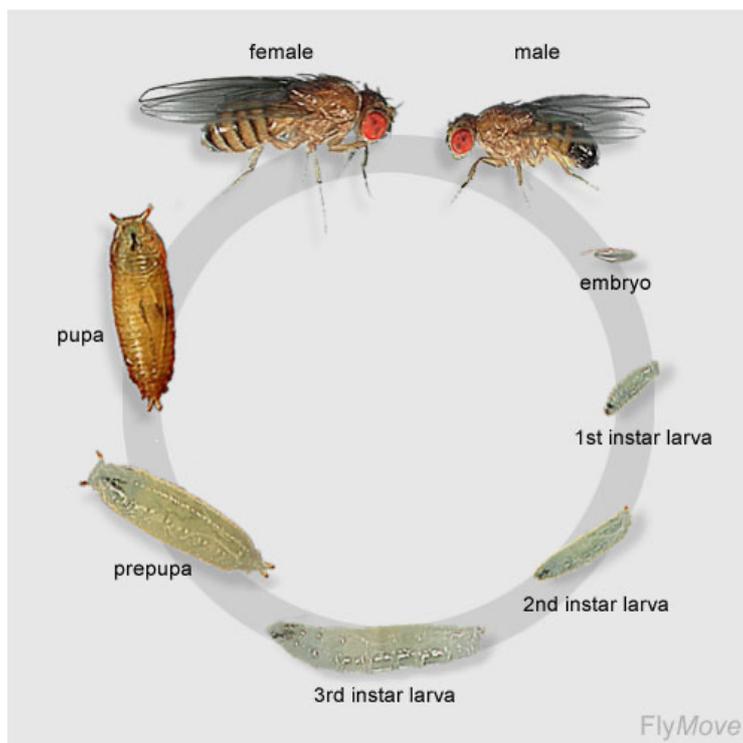
Rhodopsin als Lichtsensor !

## Expression von Quallen Opsin Genen (*in situ*)

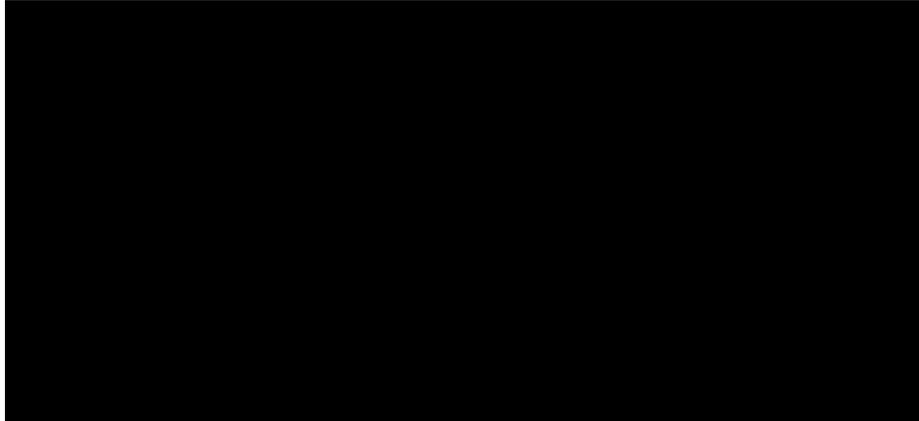




## Der Lebenszyklus von Drosophila



# Wie entsteht ein Embryo?



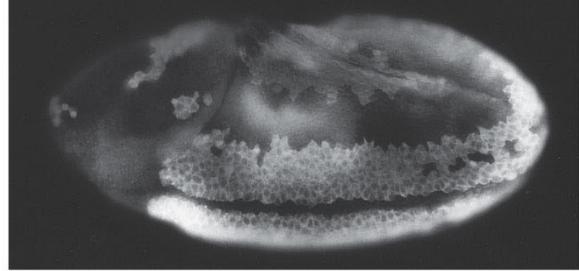
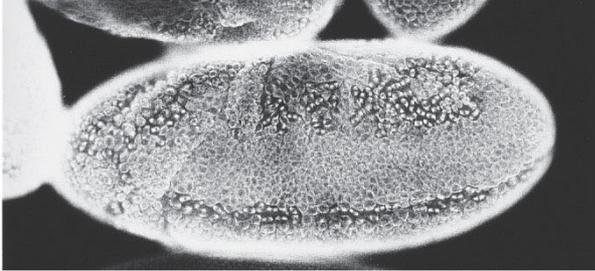
Man muss die Strukturen die man untersucht sichtbar machen können.

## 14 synchrone Kernteilungen

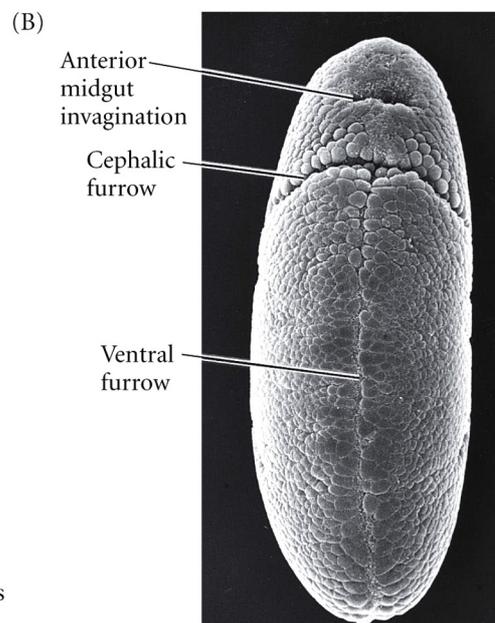
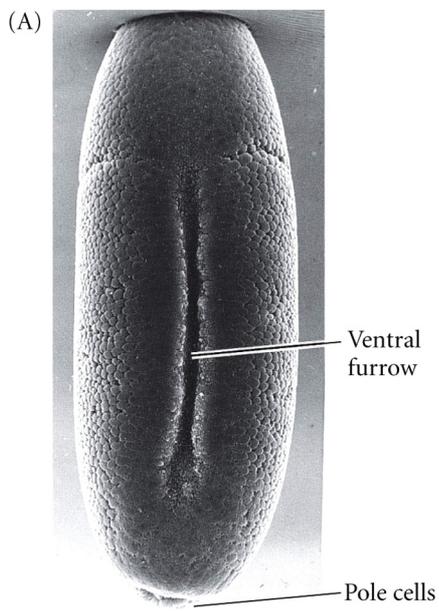


Kernfärbungen

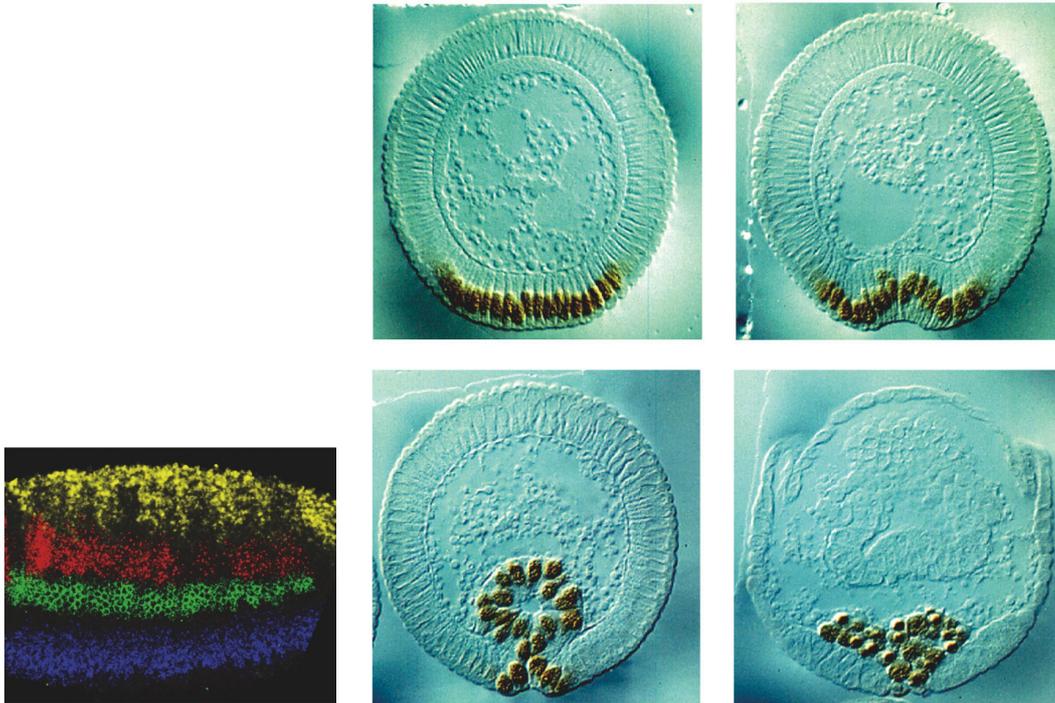
Zellteilung nicht mehr synchron aber  
während der Entwicklung gibt es  
mitotische Domänen



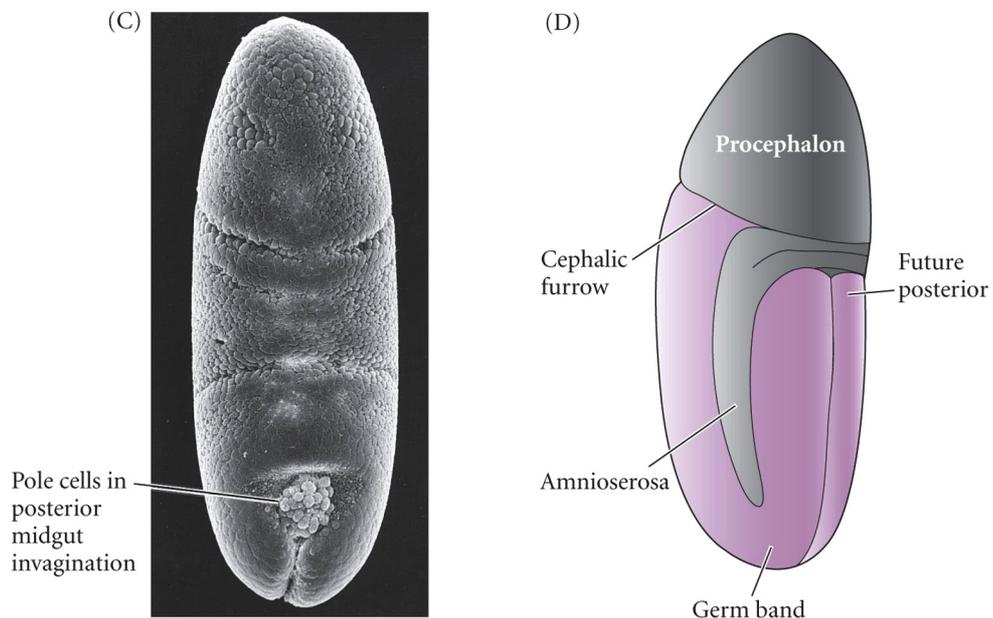
## Gastrulation



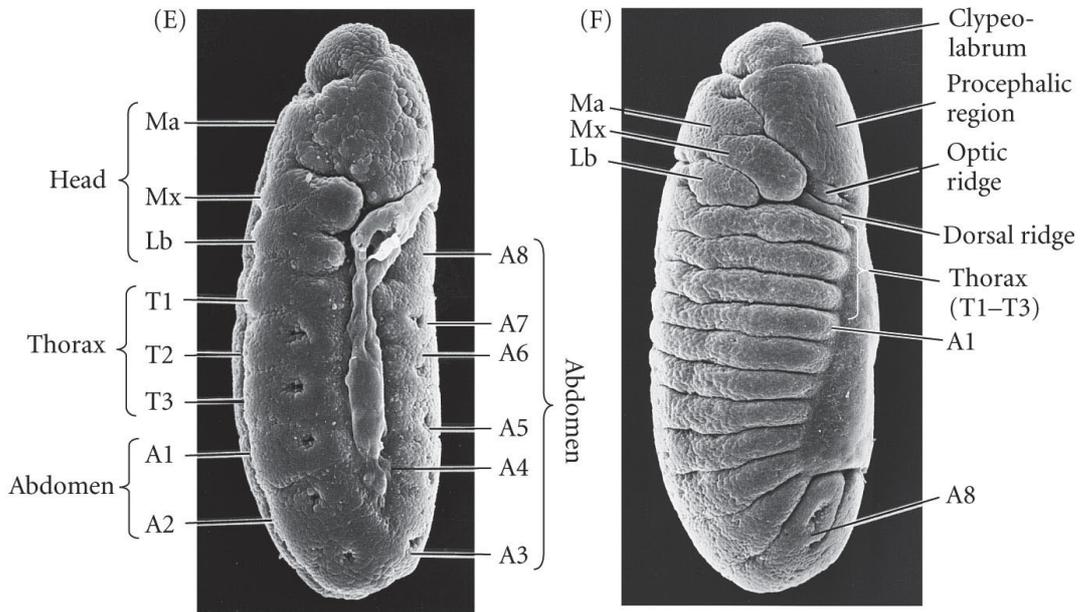
# Gastrulation



# Ausstreckung des Keimstreifs



# Segmentaler Aufbau des Embryos



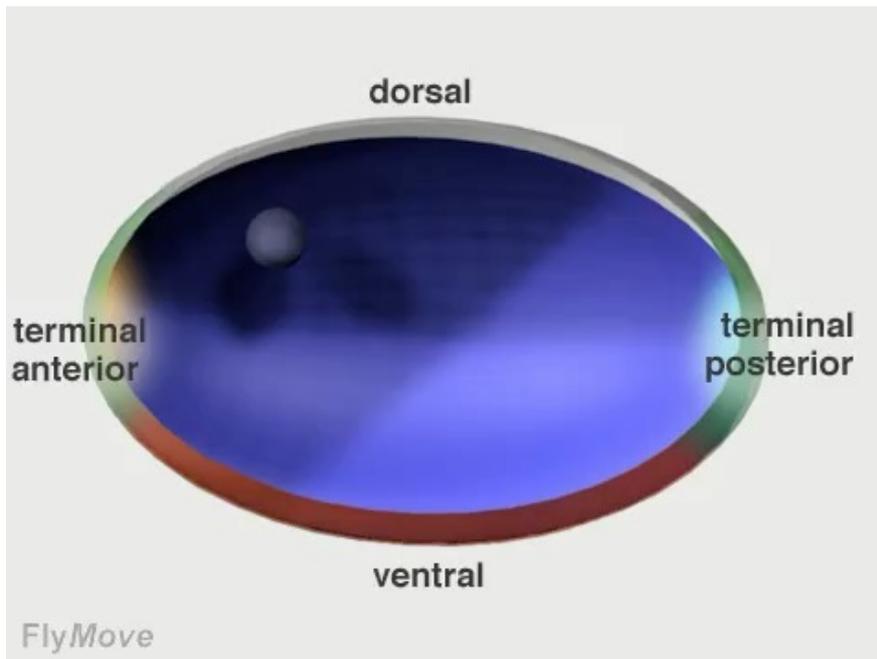
Nach 24 Stunden schlüpft eine L1 Larve



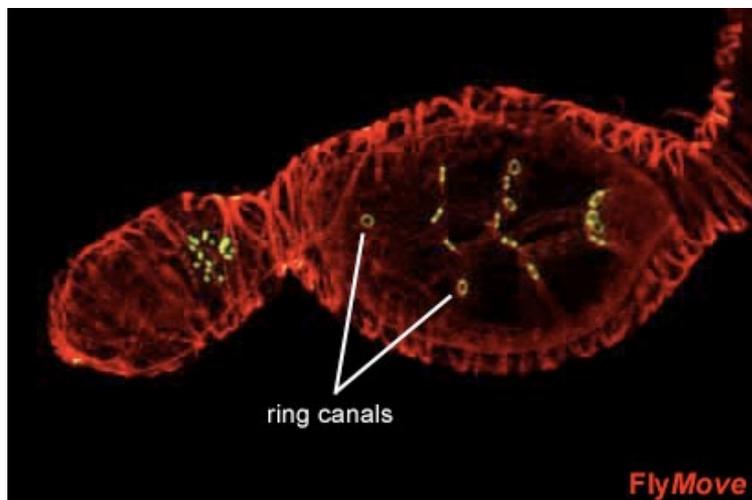
Kopf

ventral

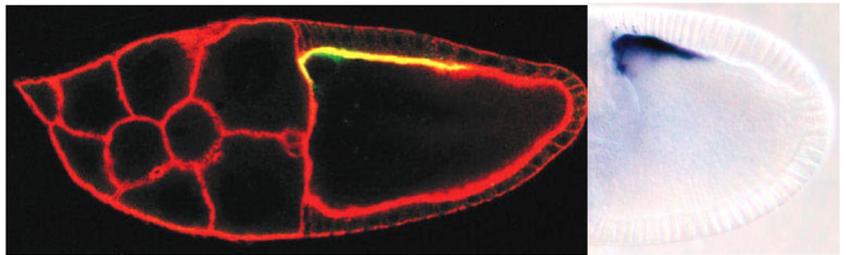
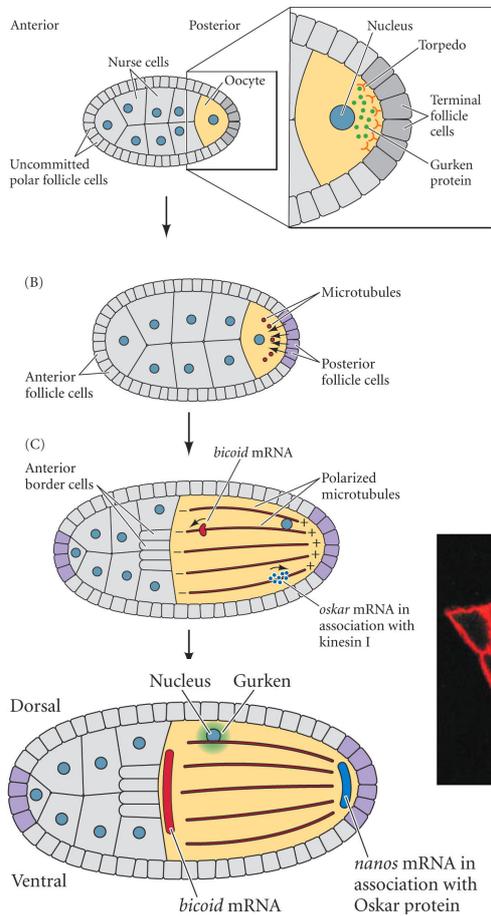
# Drosophila Oogenese



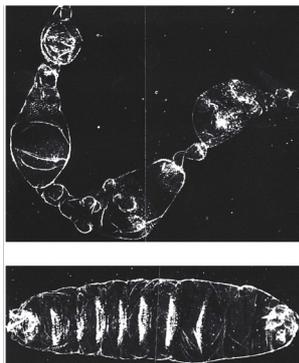
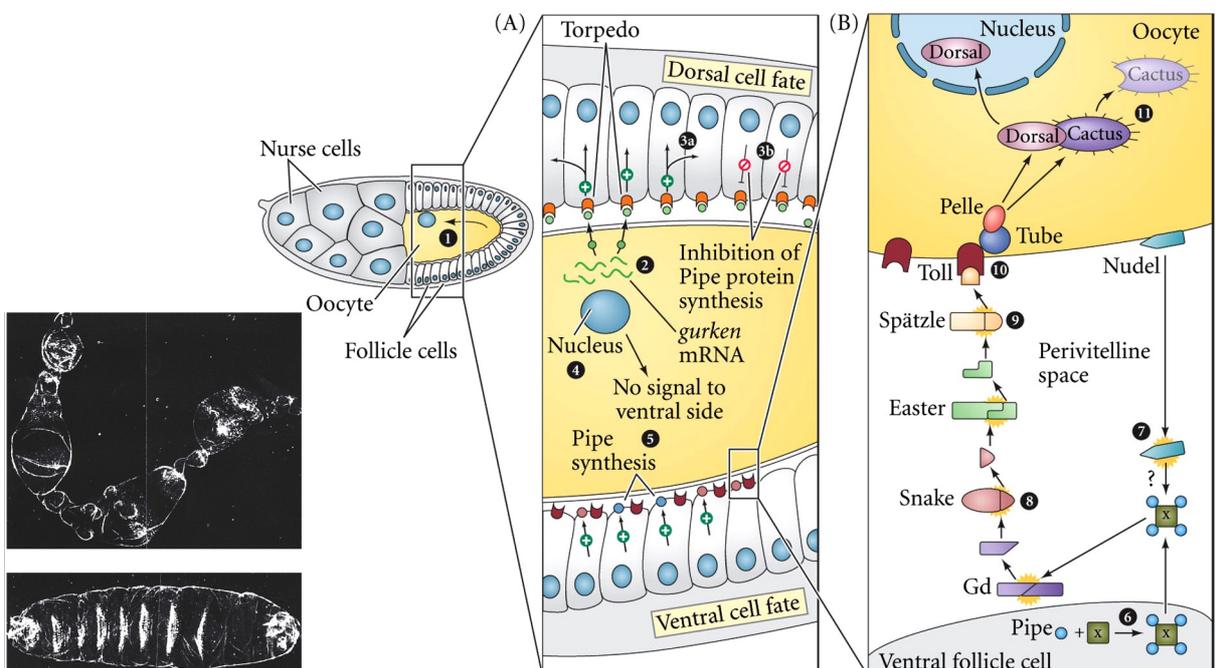
# Ringkanäle



# Etablierung der Polarität der Einzelle



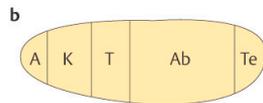
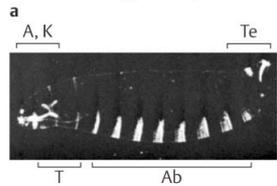
# Die Toll-Signalkaskade kontrolliert die Ventralisierung



# Maternal Effekt Mutationen



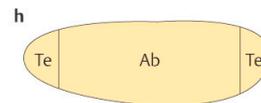
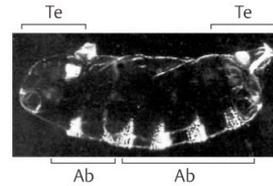
Nachkommen vom Wildtyp



*bicoid*  
~~*bicoid*~~

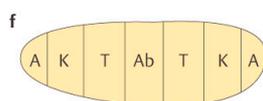
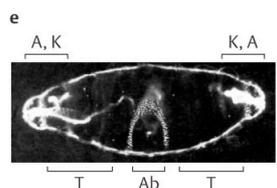
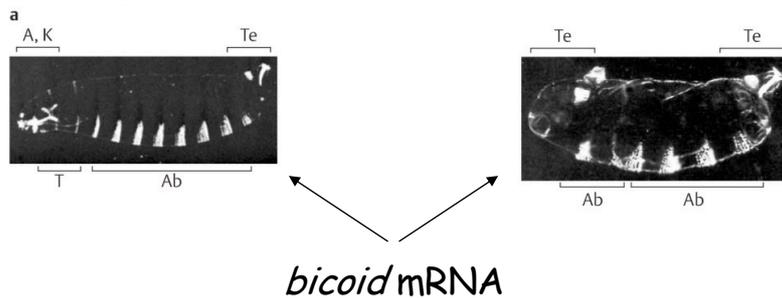


Nachkommen einer (2n) *bicoid* Mutter

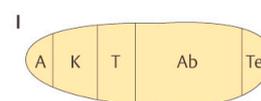
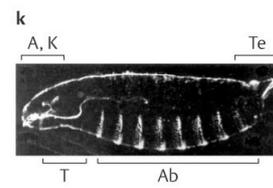


Kein Kopf

## Rettung des mutanten Phänotyps Bicoid ist ein Morphogen

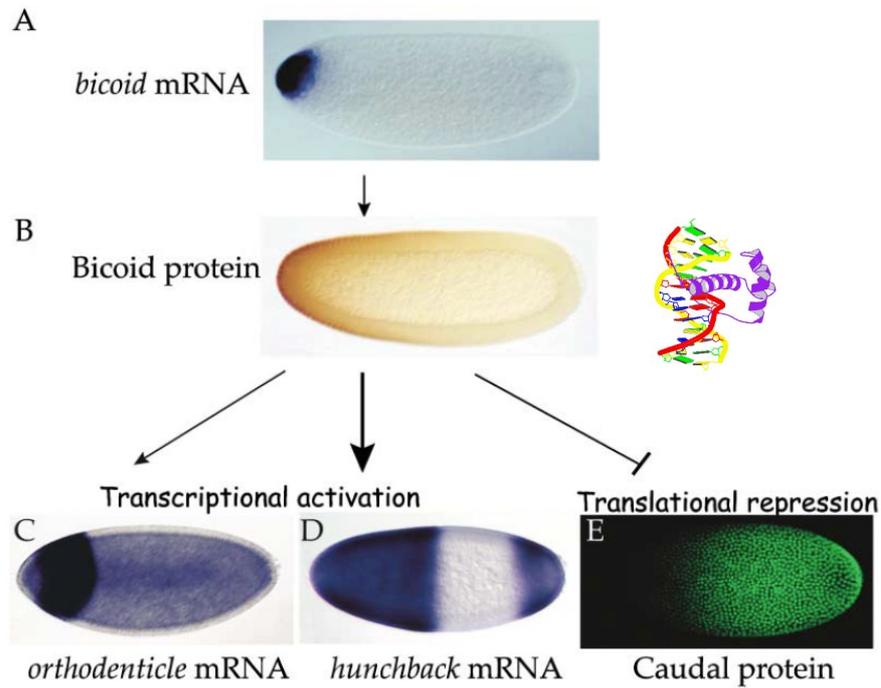


Bicoid ist **hinreichend** für die Bildung der Kopfstrukturen

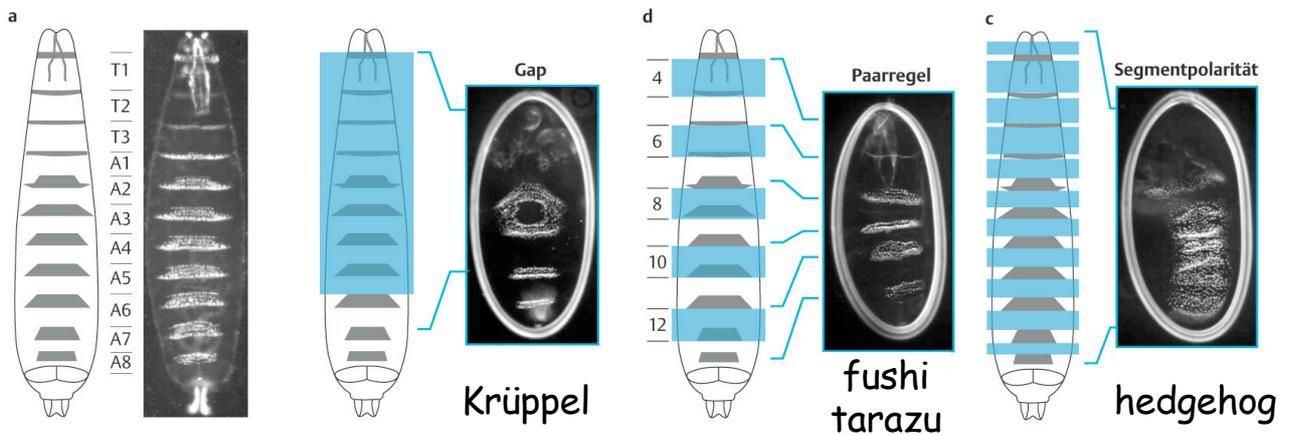


Bicoid ist **notwendig** für die Bildung der Kopfstrukturen

# Bicoid ist ein Morphogen mit vielen Funktionen



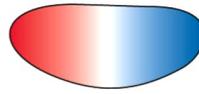
# Mutante Phänotypen erklären die Entwicklungsprinzipien



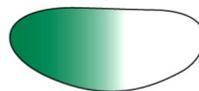
# Genetische Kaskaden die die Entwicklung steuern

Maternale  
Genfunktionen

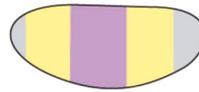
Cytoplasmic polarity



Hunchback  
protein gradient



Gap genes



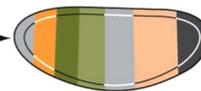
Pair-rule genes



Segment polarity  
genes

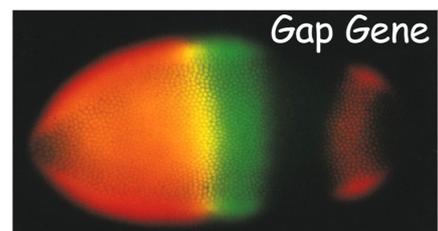
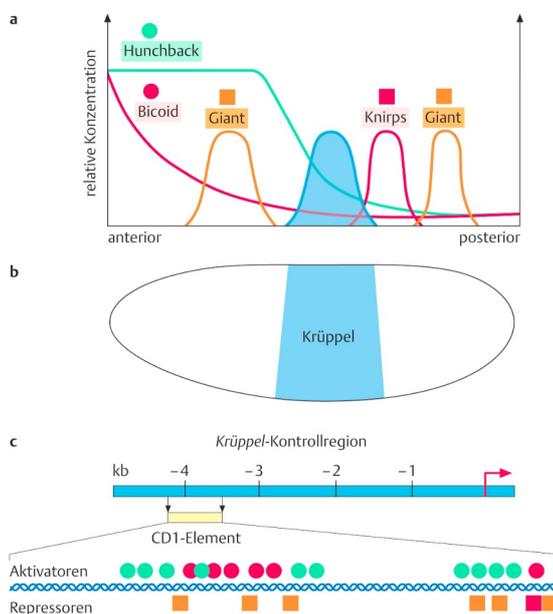


Homeotic  
genes

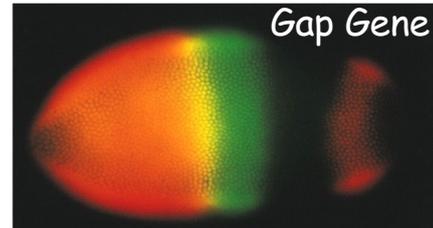
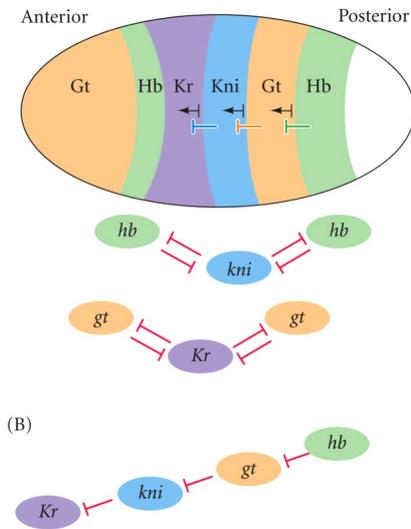


Zygotische  
Genfunktionen

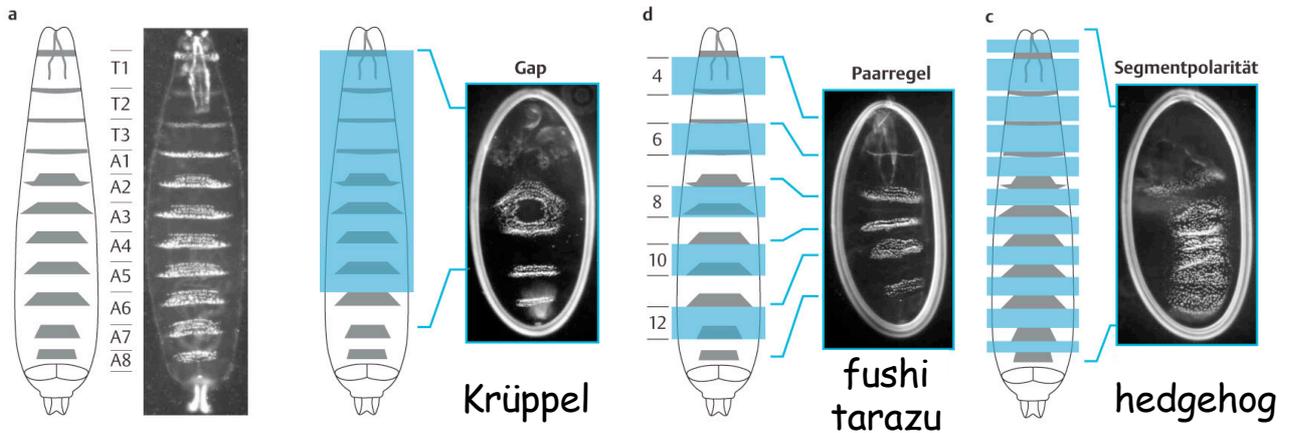
## Regulation der Expression der Gap Gene



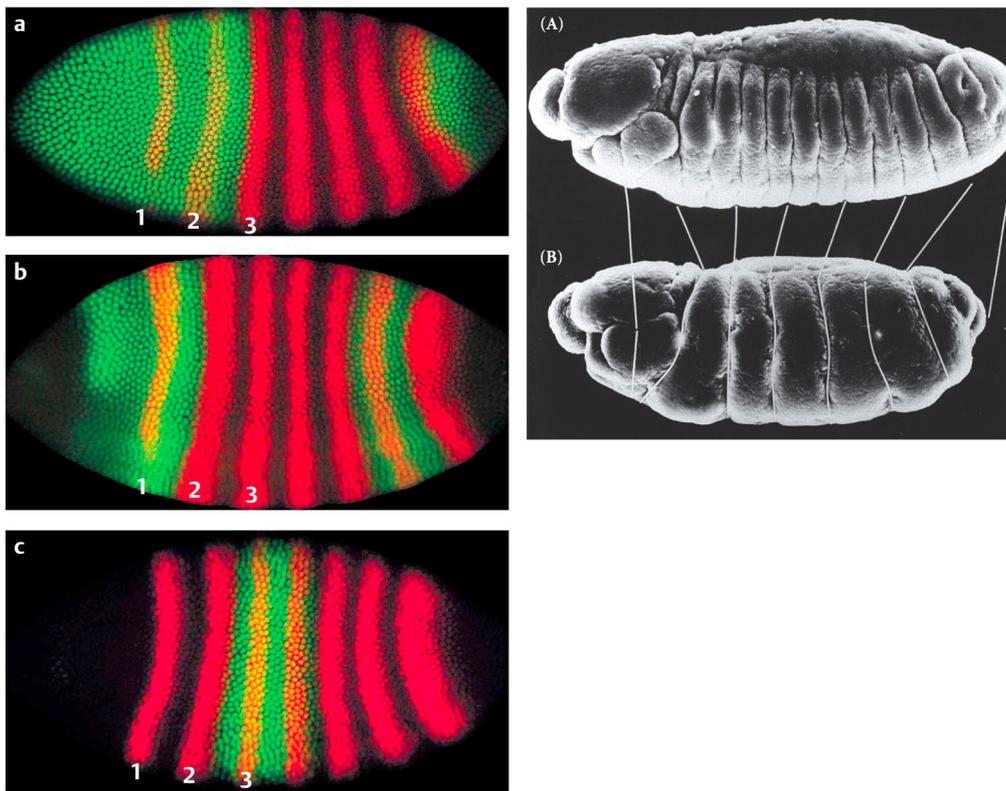
# Wechselseitige Inhibition der Gap Gene



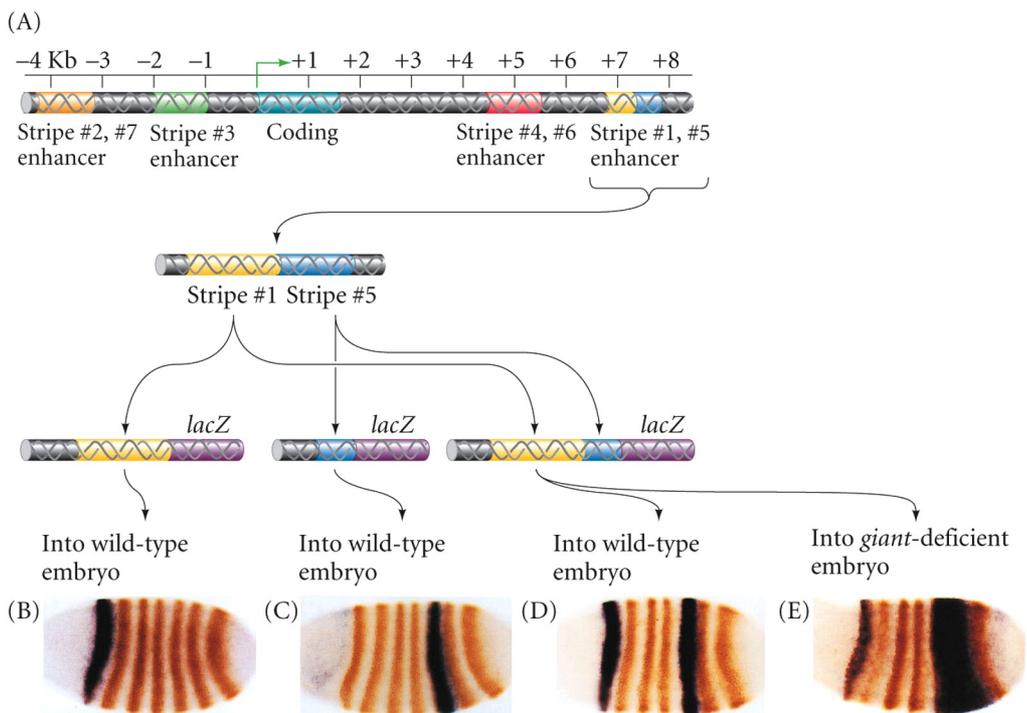
## Mutante Phänotypen erklären die Entwicklungsprinzipien



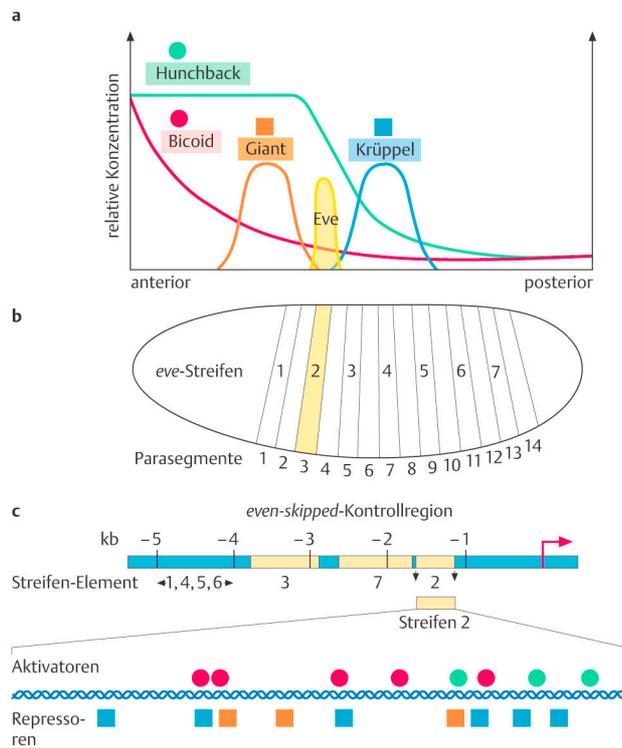
# Gap Gene aktivieren die Paarregelgene



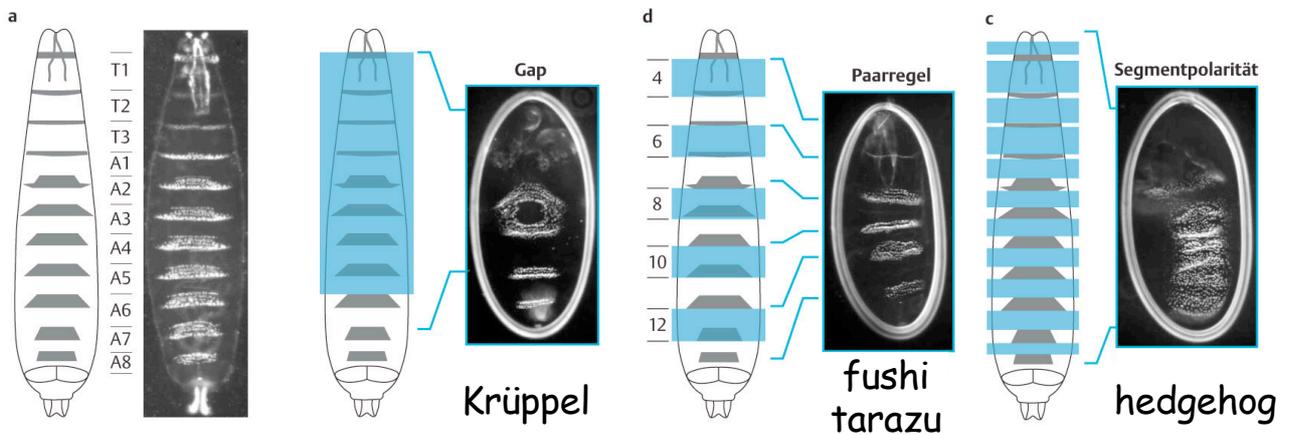
# Modulare Kontrolle der Genexpression

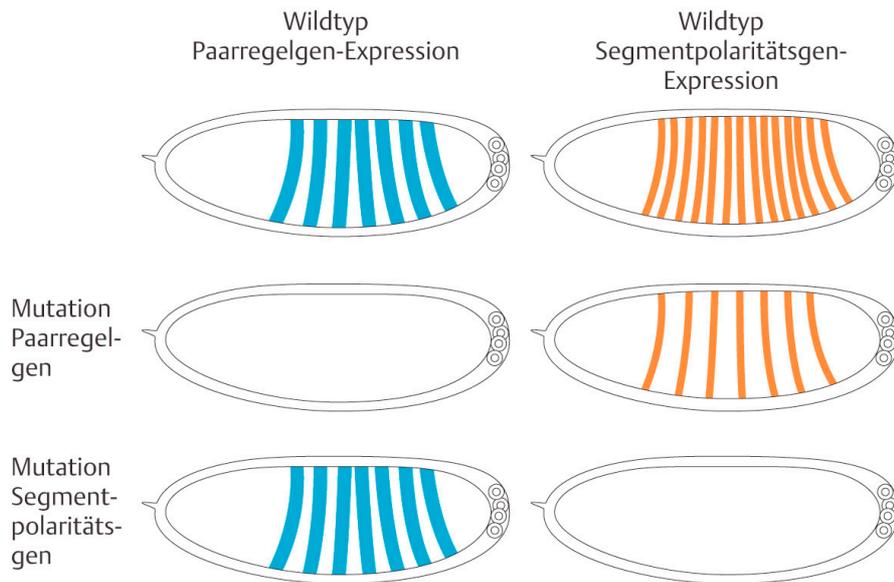


# Regulation der Paarregelgene

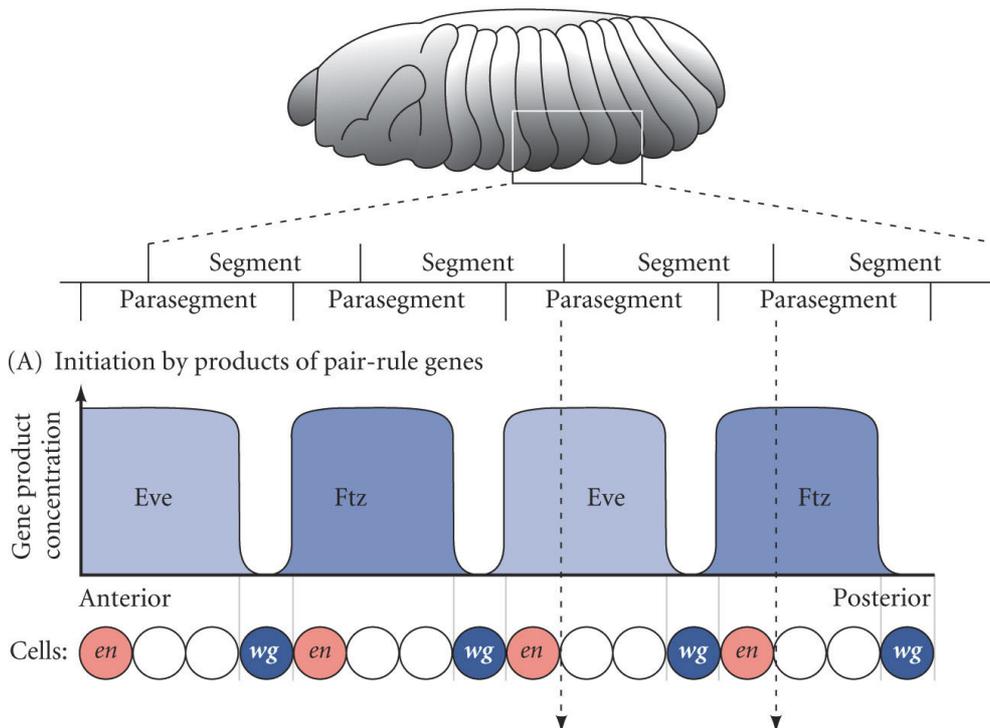


## Mutante Phänotypen erklären die Entwicklungsprinzipien

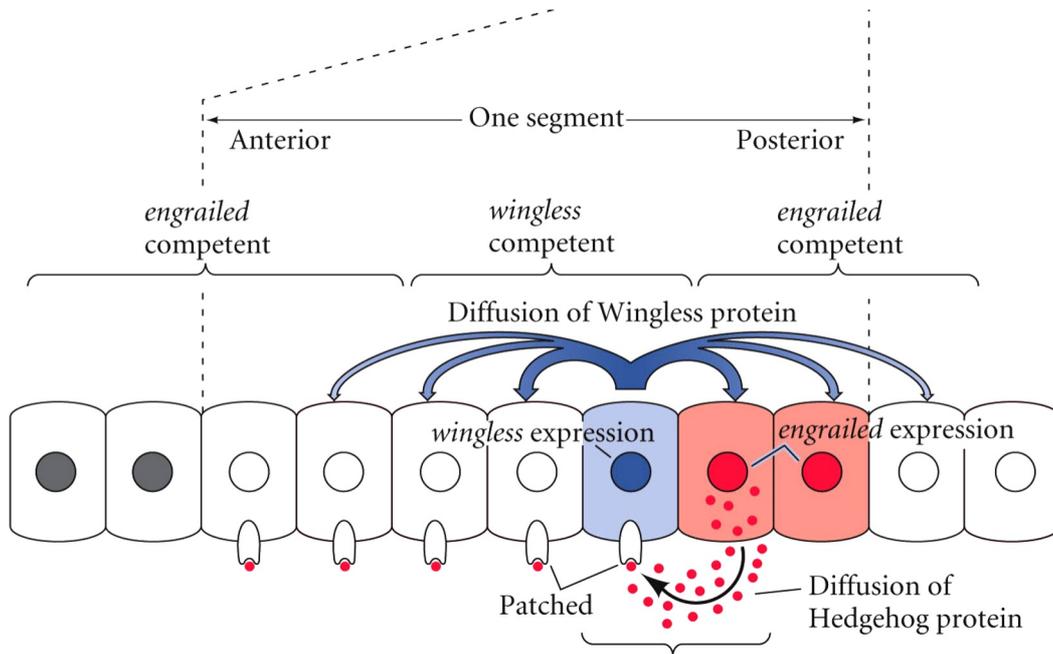




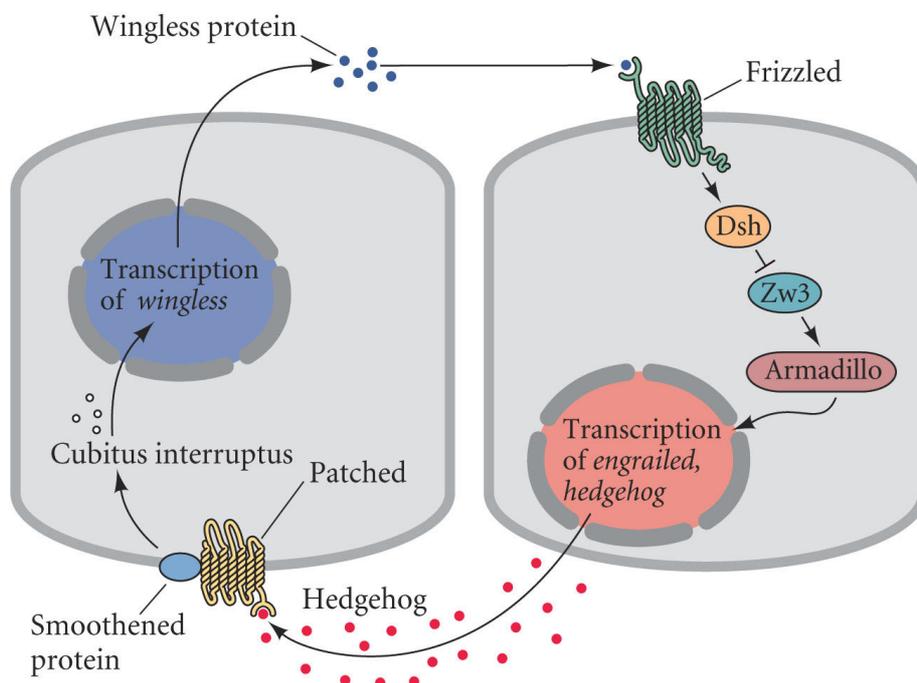
Wingless -> engrailed -> hedgehog

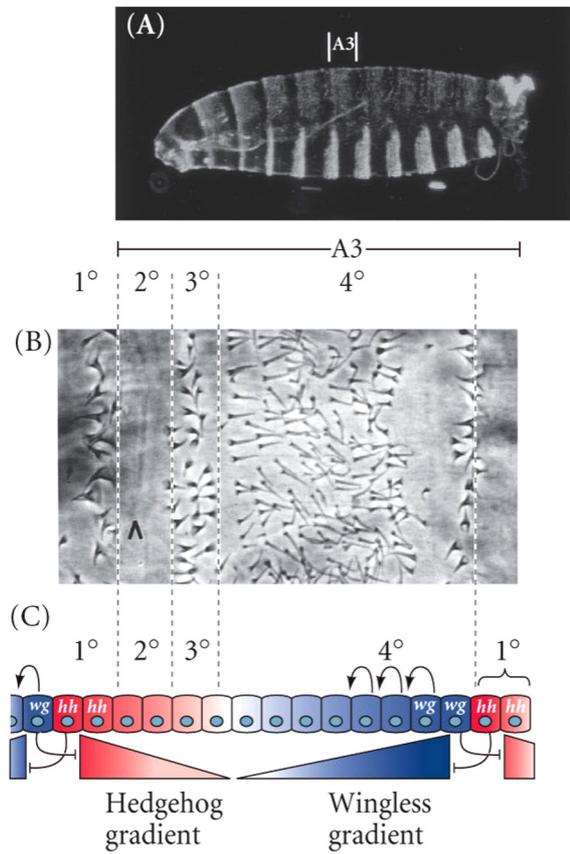


# Wingless -> engrailed -> hedgehog

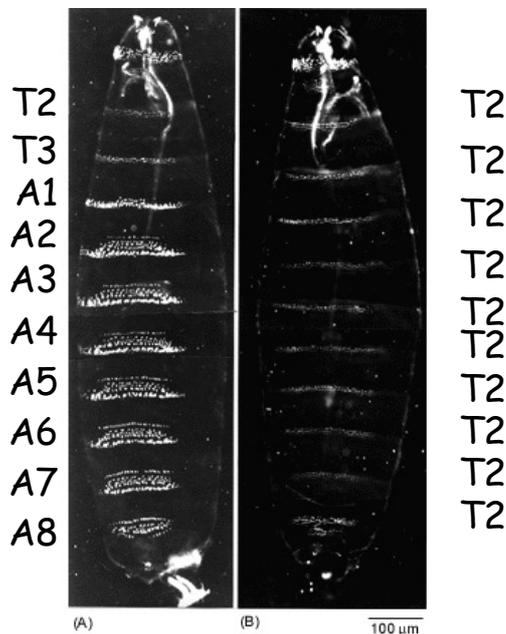


# Wingless -> engrailed -> hedgehog

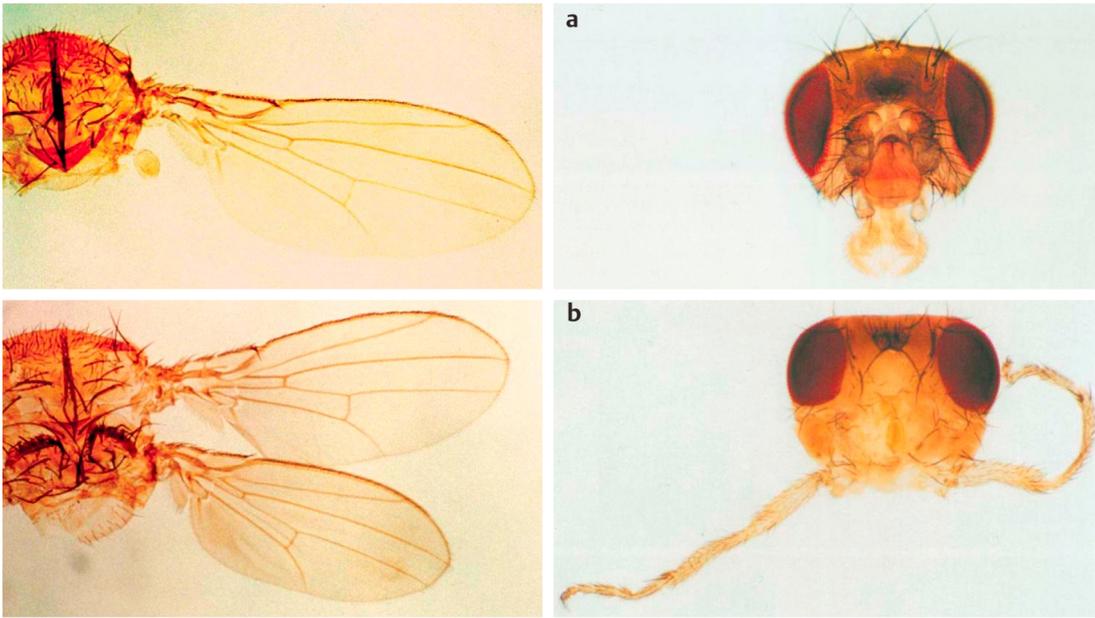




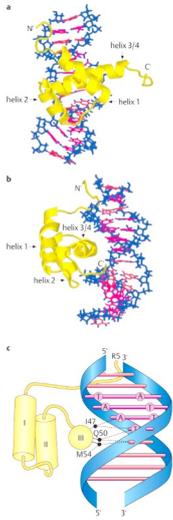
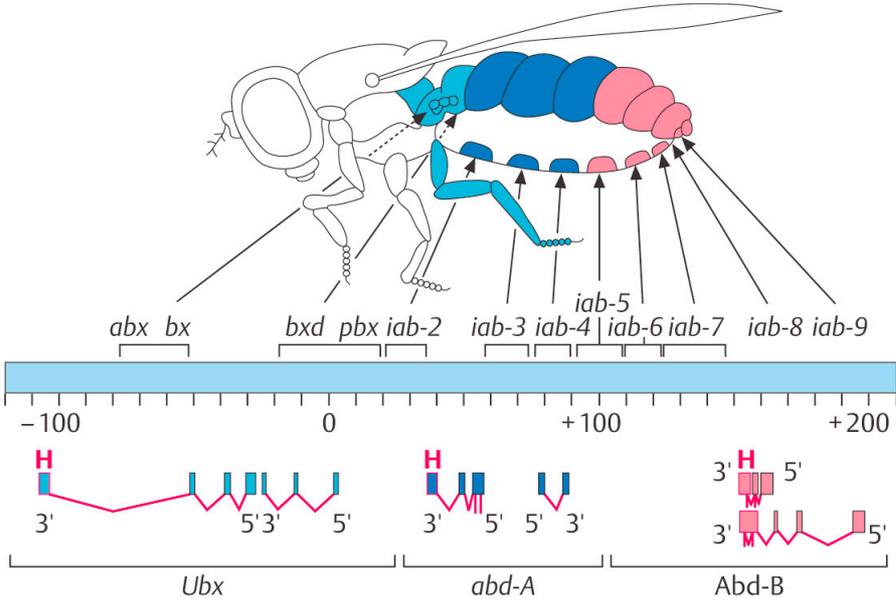
## Mutante Phänotypen erklären die Entwicklungsprinzipien



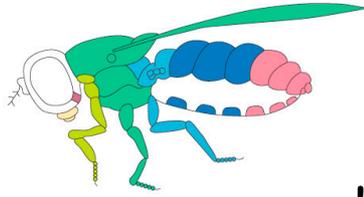
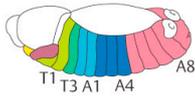
# Homeotische Mutationen



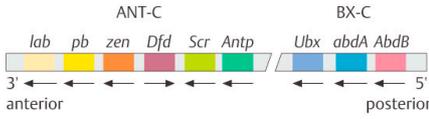
# Homeotische Mutationen



*Drosophila* HOM-C



# Evolutionäre Konservierung des HOX Clusters



*Hox a* (Chromosom 6)



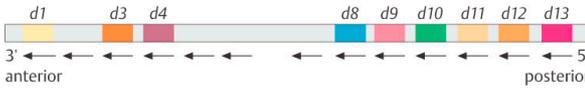
*Hox b* (Chromosom 11)



*Hox c* (Chromosom 15)



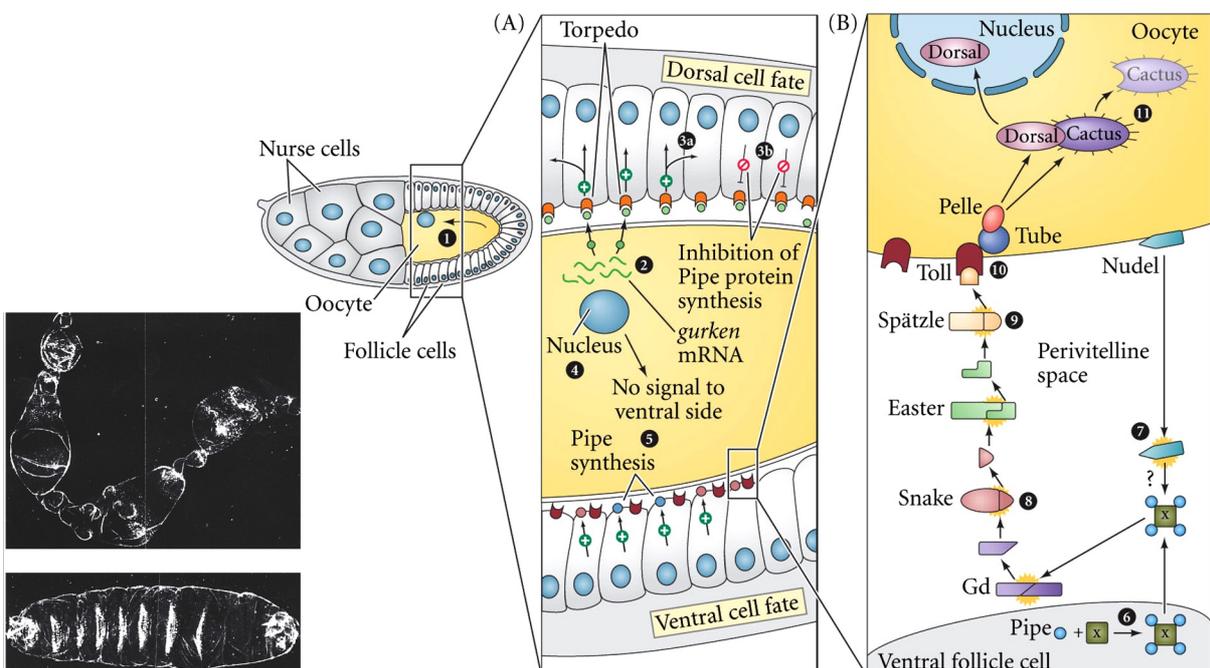
*Hox d* (Chromosom 2)



Maus Hox



# Die Toll-Signalkaskade kontrolliert die Ventralisierung

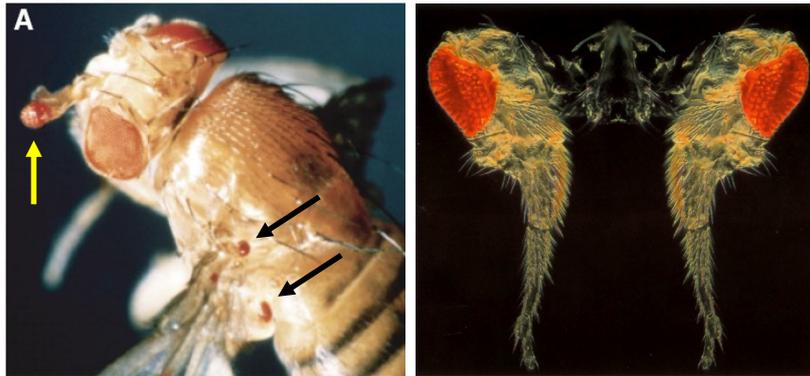
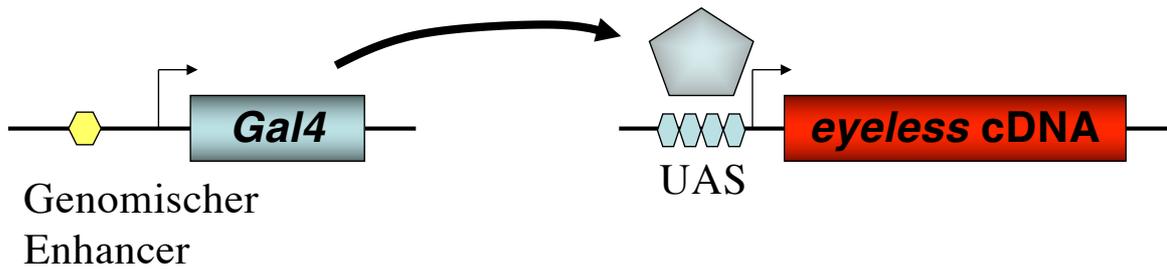


Bei Drosophila hängt die Entwicklung des (Komplex)auges von wenigen Genen ab

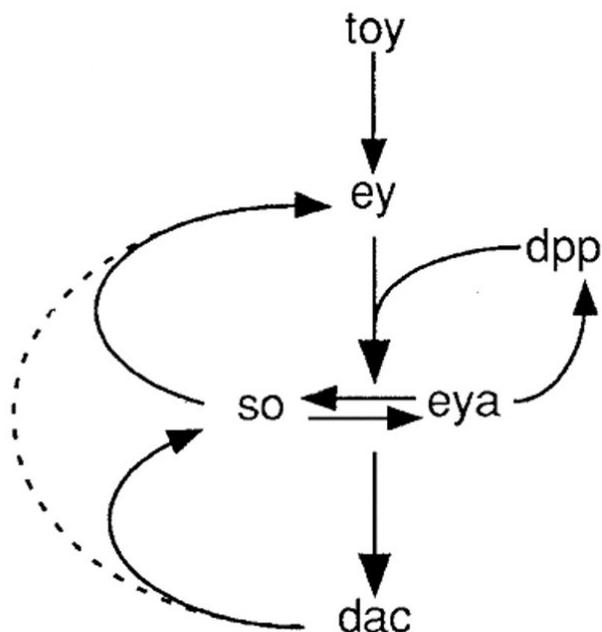


*eyeless (pax6)*  
*twin of eyeless*  
*sine oculis*  
*eyes absent*  
*eye gone*

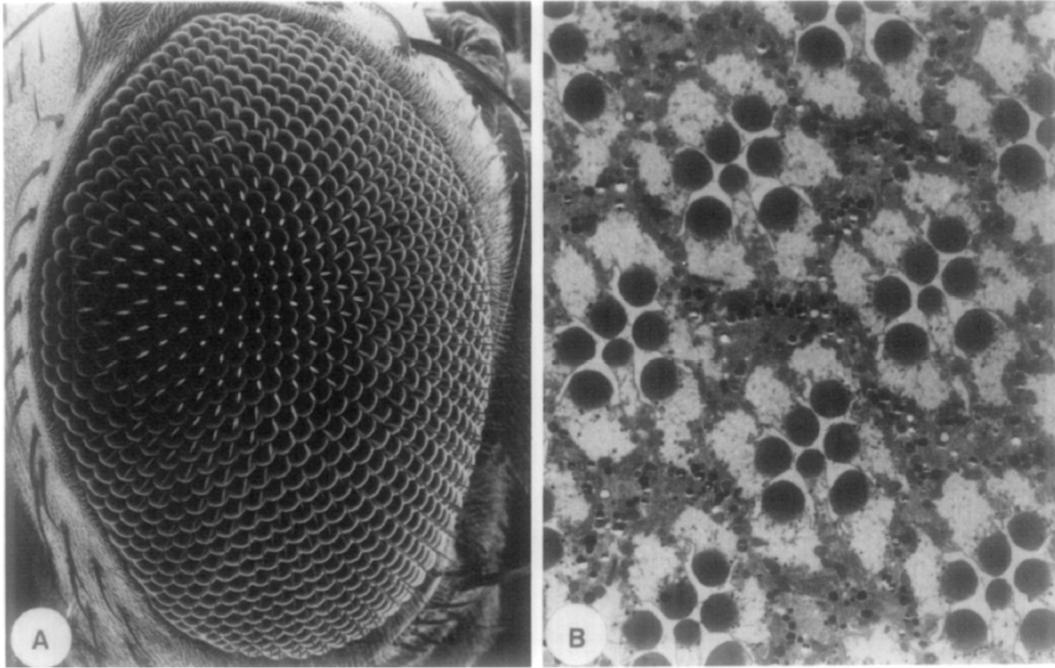
# Die ektopische Expression von *eyeless* induziert die Augenentwicklung



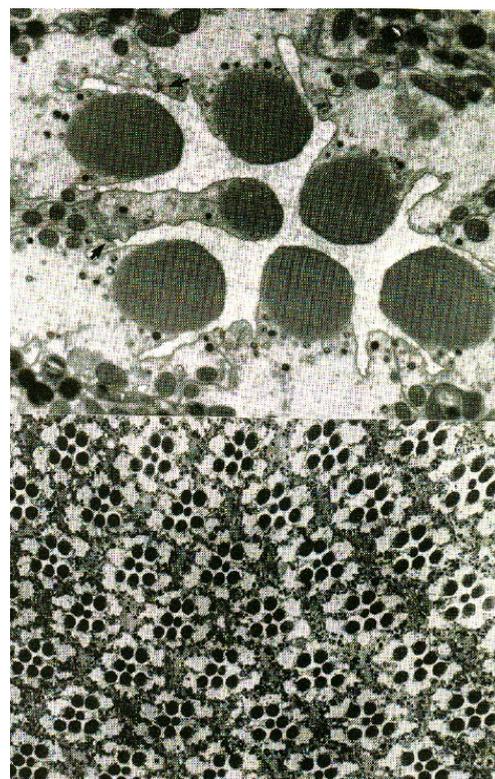
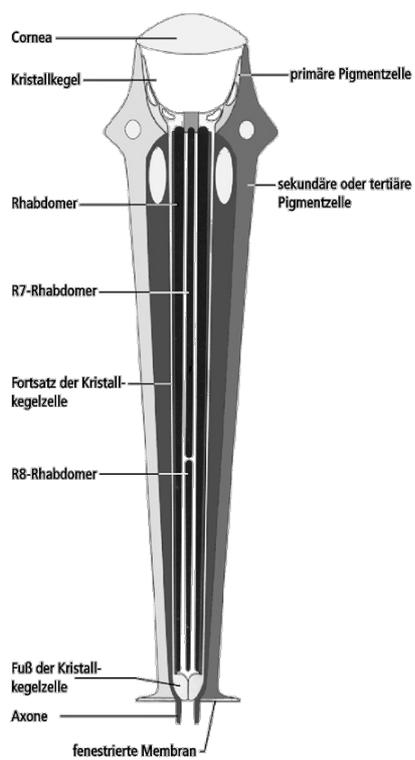
## Genetische Kontrolle der Augenentwicklung bei *Drosophila*



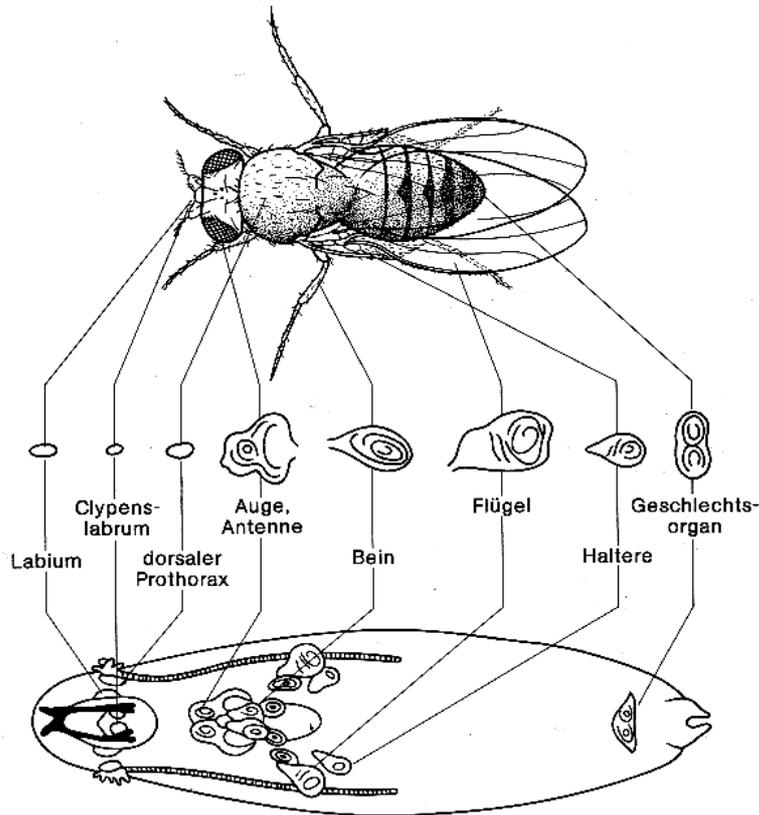
# Das *Drosophila* Komplexauge



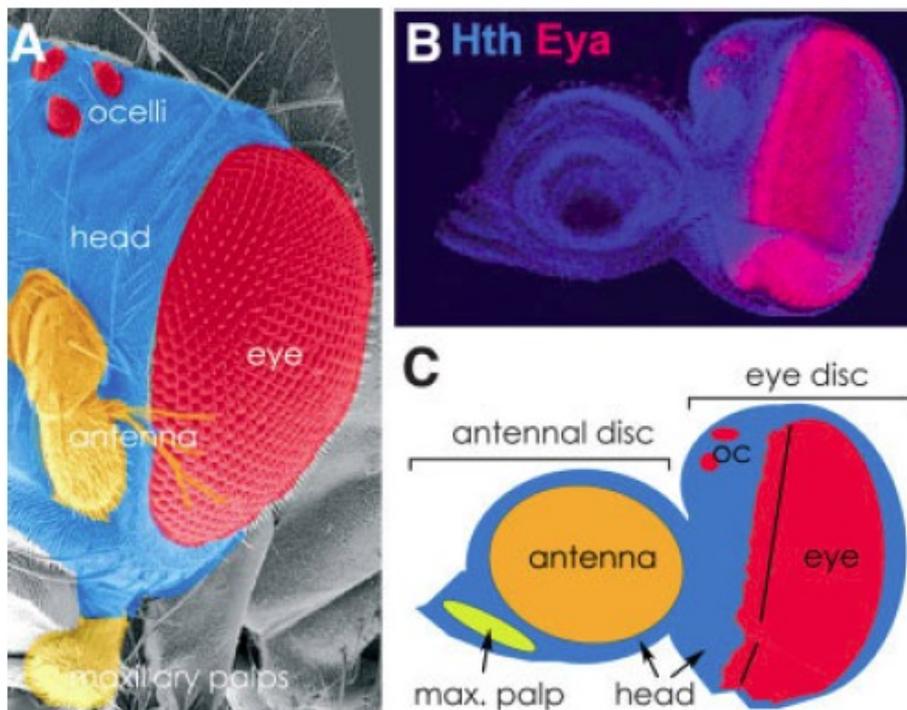
## Ommatidienaufbau



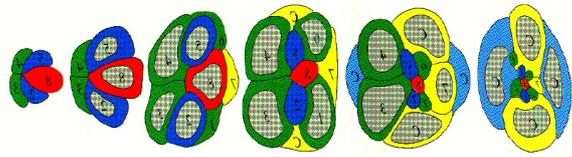
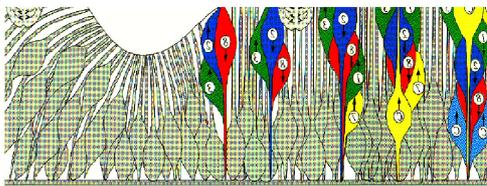
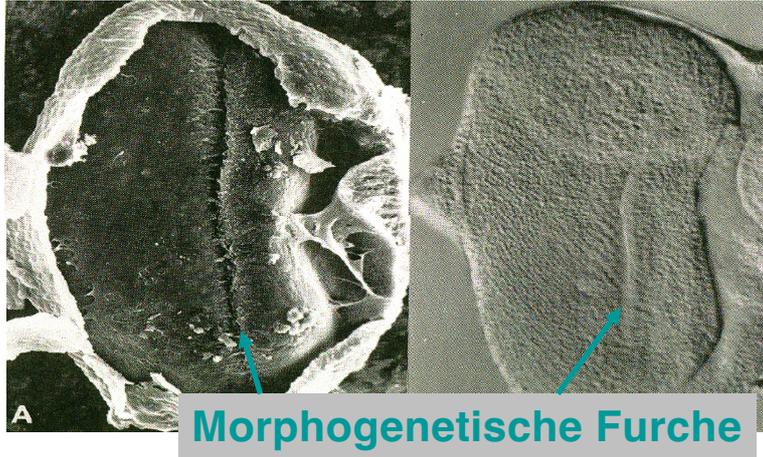
# *Drosophila* Entwicklung



Das Auge und die Kutikula des Kopfes entwickeln sich aus der Augenimaginalscheibe

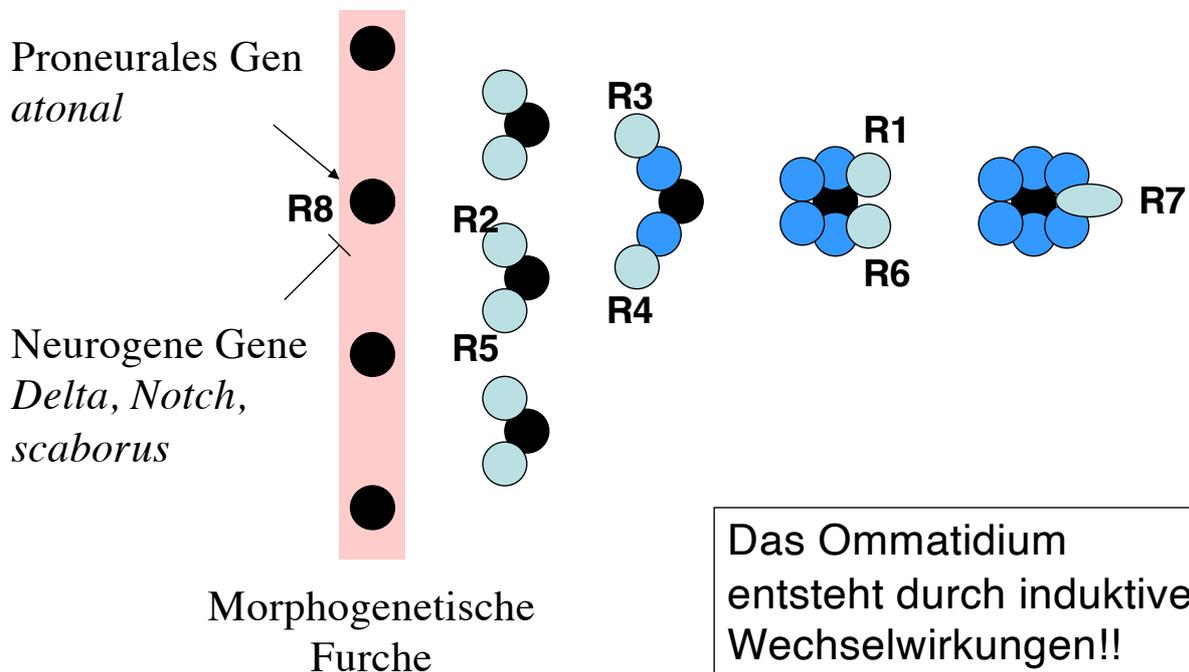


# Das *Drosophila* Komplexauge

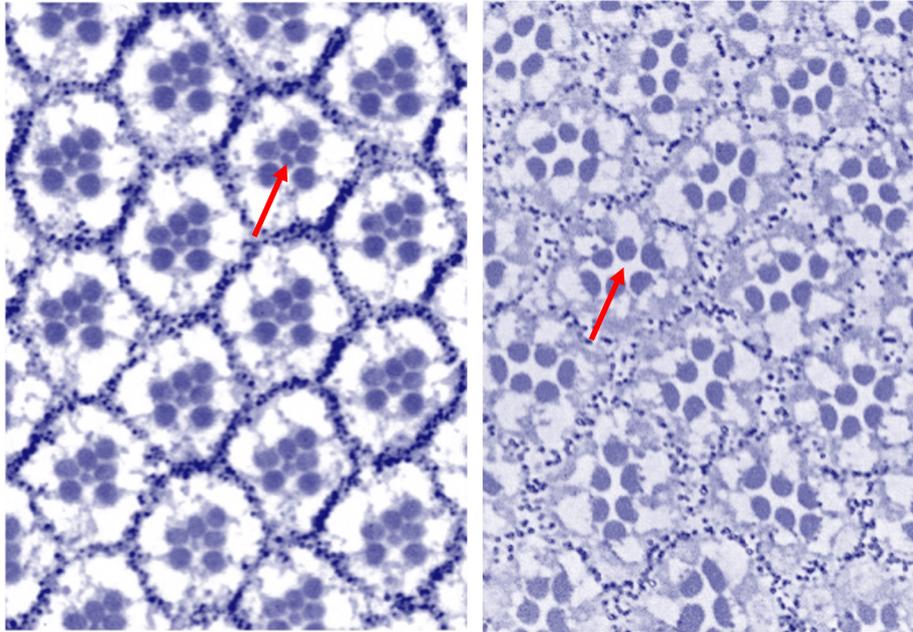


R8 +R2,5 +R3,4 +R1,6 +R7 +Cone cells

Photorezeptorzellen entwickeln sich sequentiell  
(R8 zuerst)



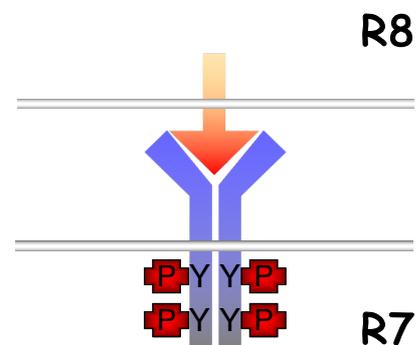
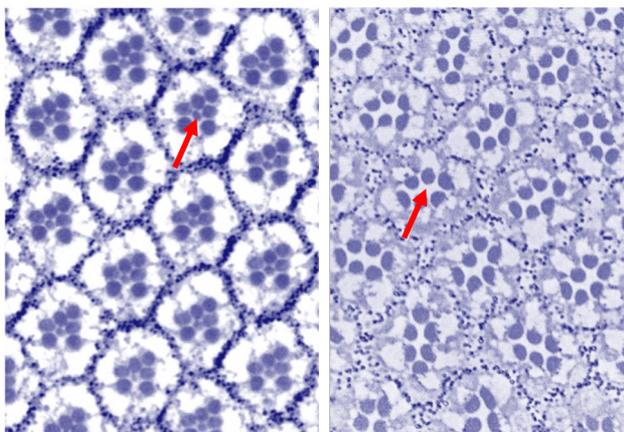
# Das Gen *sevenless* betrifft die Bildung der R7 Zelle



Wildtyp  
R7-Zelle

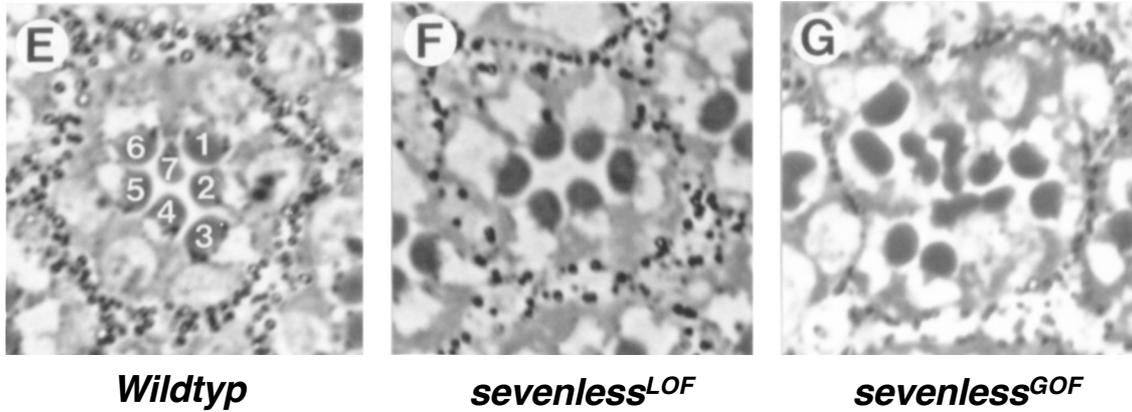
*sevenless*<sup>LOF</sup>  
Keine R7-Zelle

Die Aktivität der Sevenless Rezeptortyrosin Kinase kontrolliert die Bildung der R7 Zelle

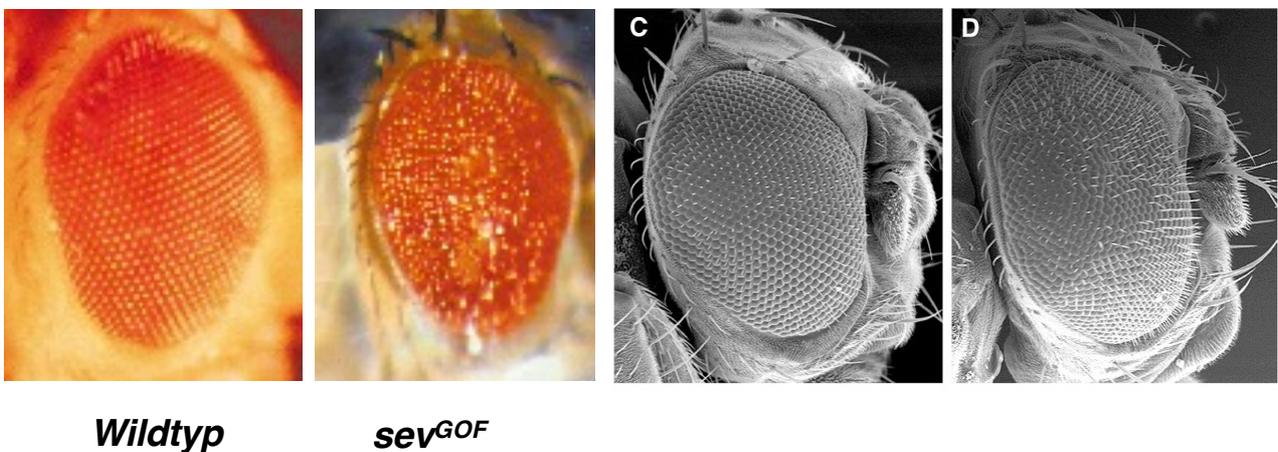


RTK Signaltransduktion

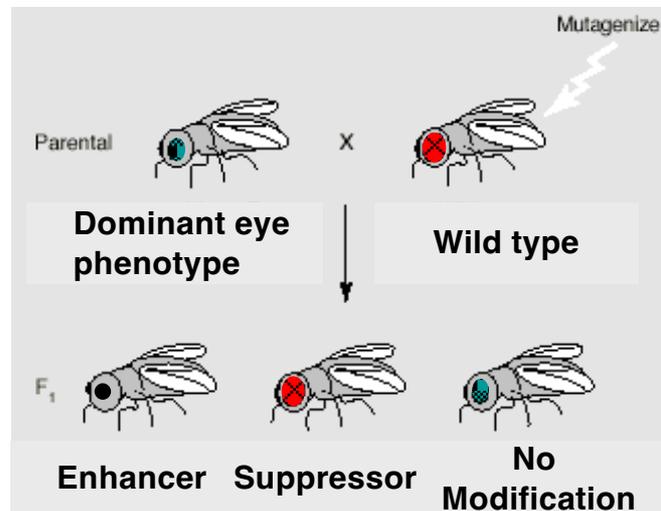
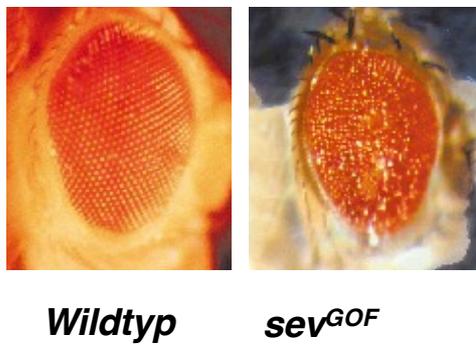
## Die Aktivierung von Sevenless führt zur Bildung von zusätzlichen R7-Zellen



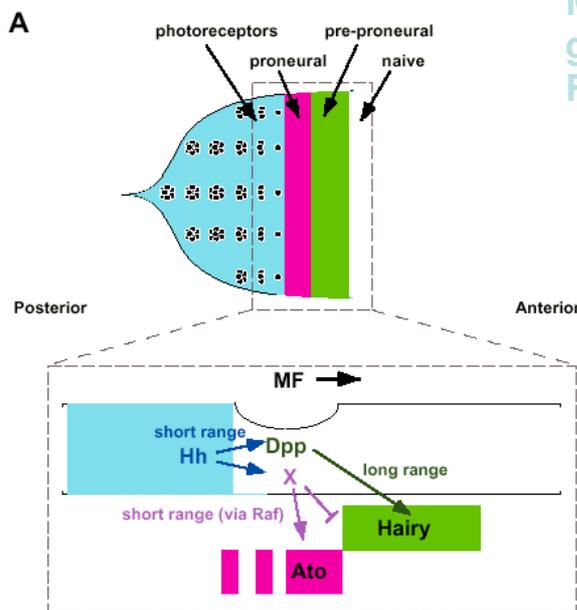
## Die Aktivierung von Sevenless führt zur Bildung von „rauhem“ Augen



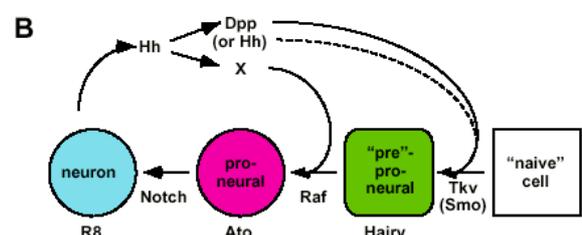
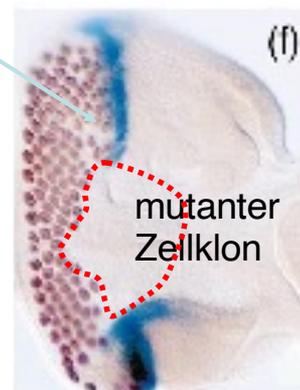
# Die Suppression des $Sev^{GOF}$ Phänotyps führte zur Aufdeckung der RTK-Signalkaskade



## Die Differenzierungswelle in der Augenscheibe

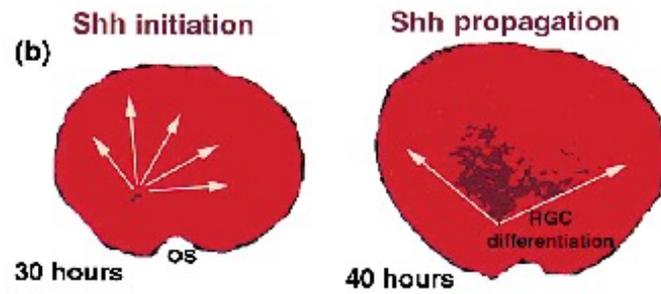
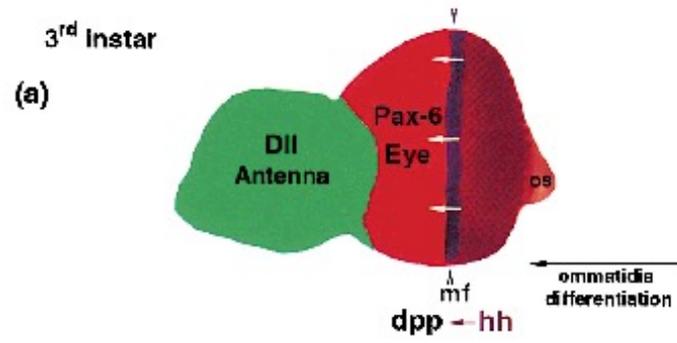


Morpho-  
genetische  
Furche

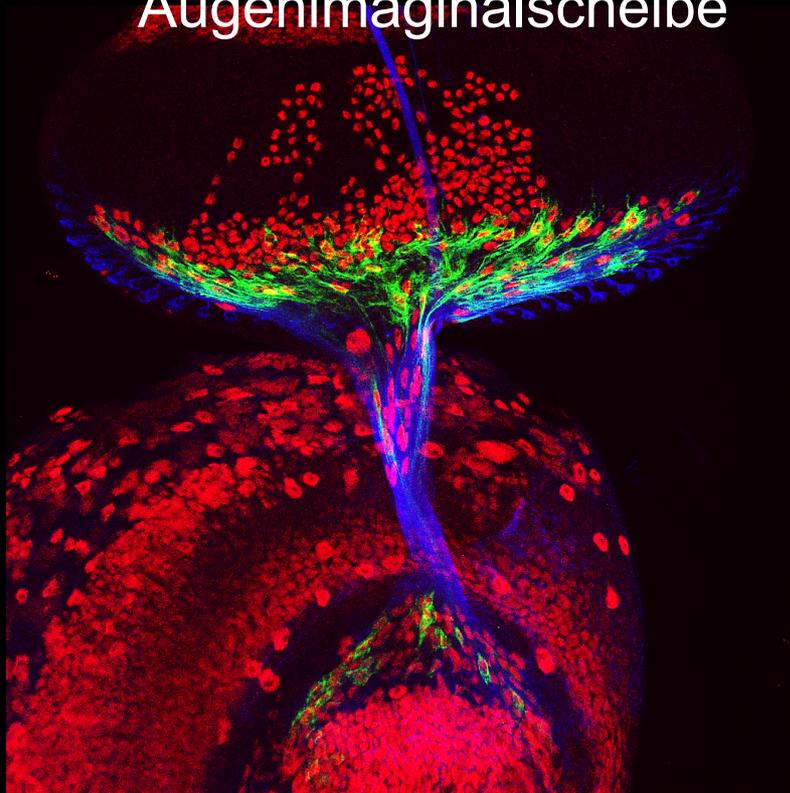


Hedgehog Signalweg

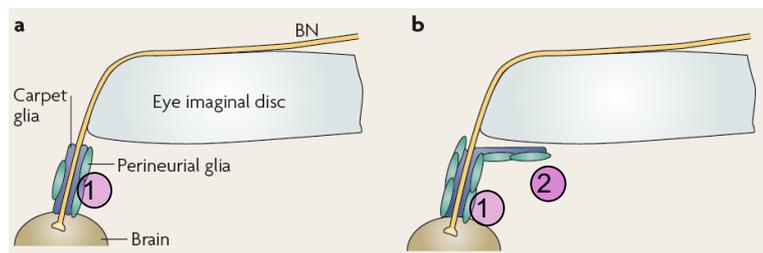
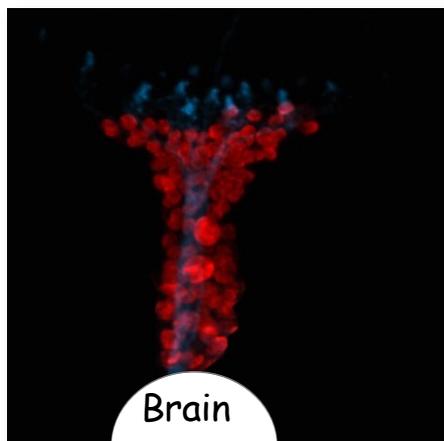
# Die Funktion von *hedgehog* scheint konserviert



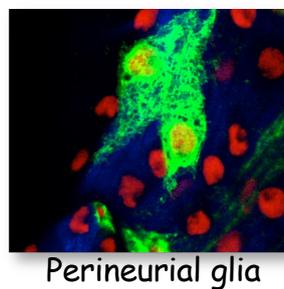
# Neurone und Gliazellen in der Augenimaginalscheibe



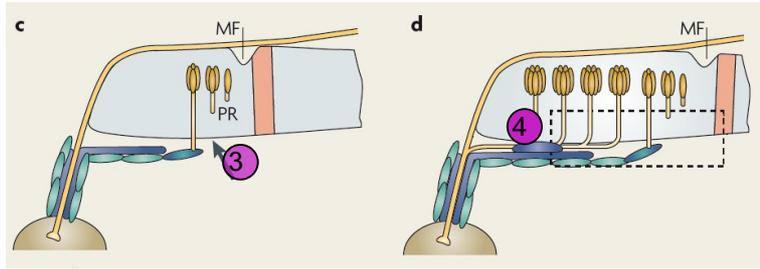
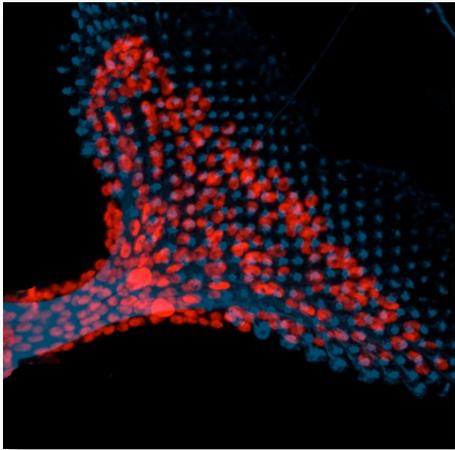
## Glial cell migration onto the eye disc



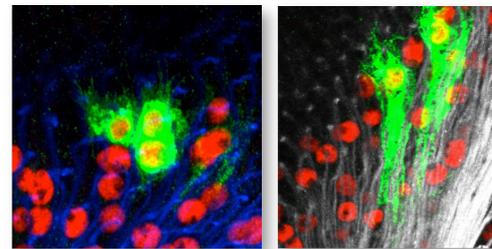
- ① Birth
- ② Migration



# Glial cell migration onto the eye disc

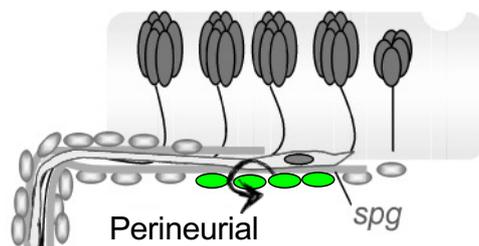
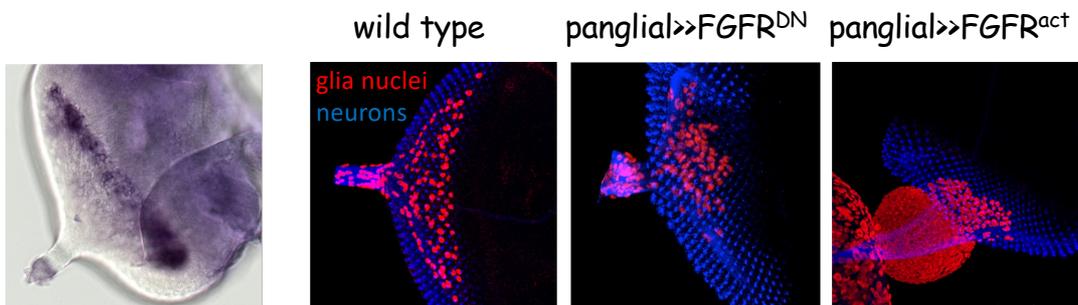


- ③ First contact with axons, glial cells become competent
- ④ Differentiation, wrapping



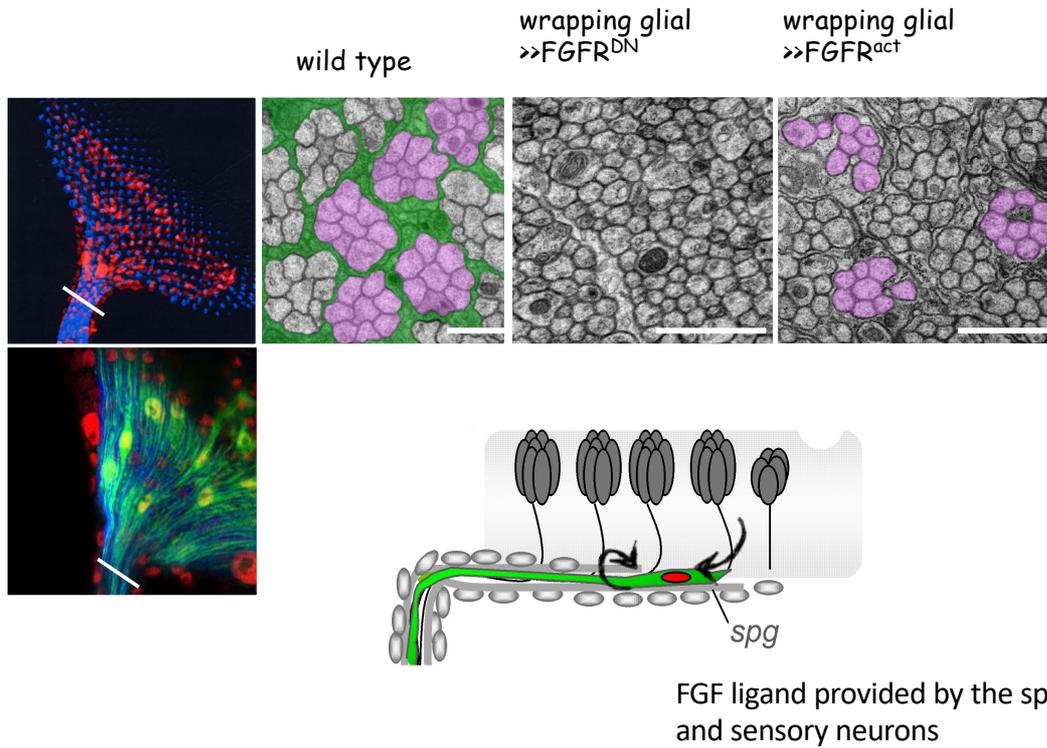
„Competence zone“ Wrapping glia

## Der FGF-Rezeptor (RTK) kontrolliert die gliale Proliferation und Differenzierung

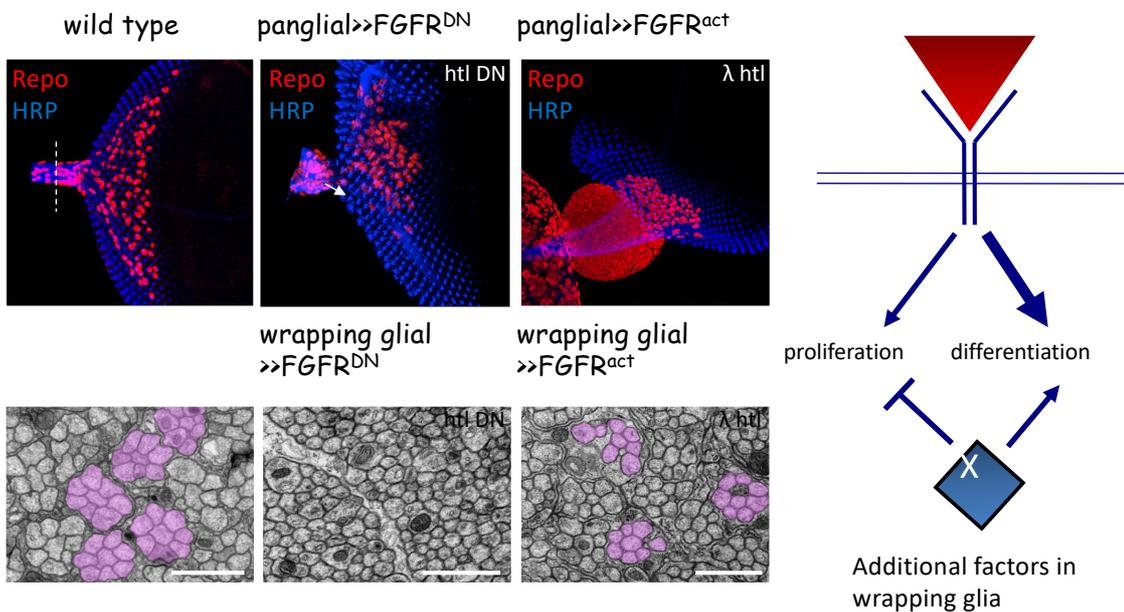


FGF ligand provided by the spg

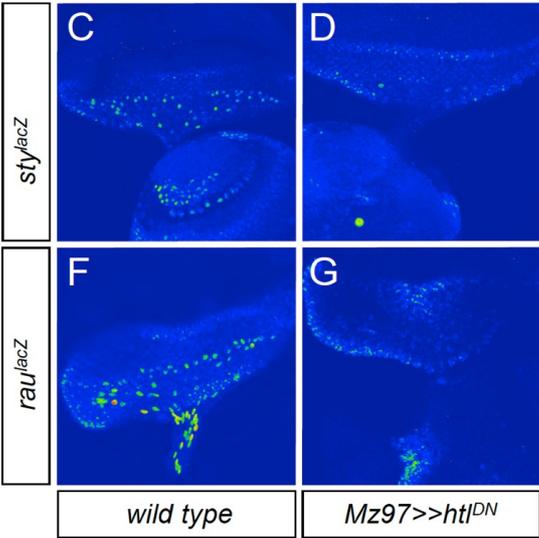
# Der FGF-Rezeptor (RTK) kontrolliert die gliale Proliferation und Differenzierung



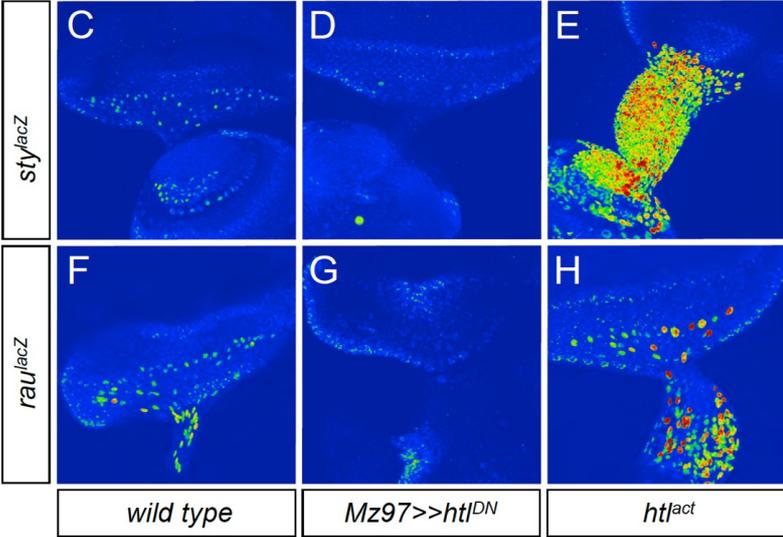
## Wie kann ein Rezeptor zwei unterschiedliche Dinge steuern?



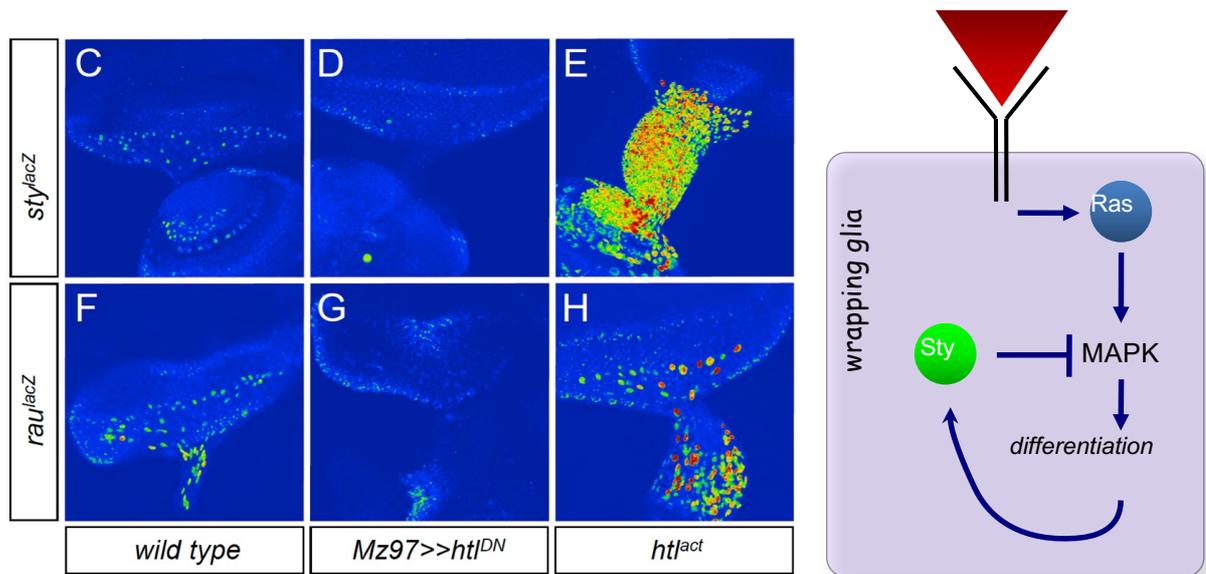
# Gene mit spezifischer Expression, die abhängig von der Aktivität des FGF-Rezeptors sind



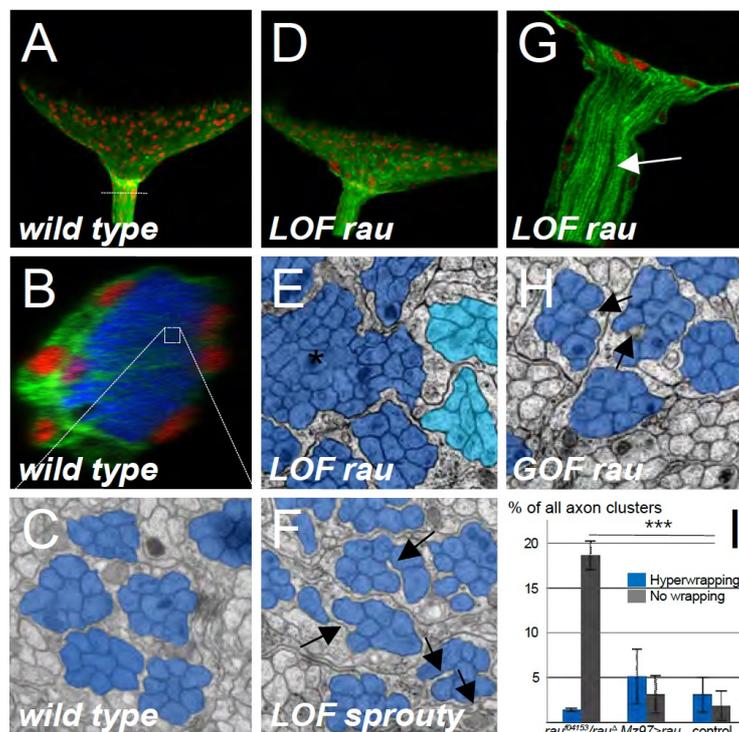
# Gene mit spezifischer Expression, die abhängig von der Aktivität des FGF-Rezeptors sind



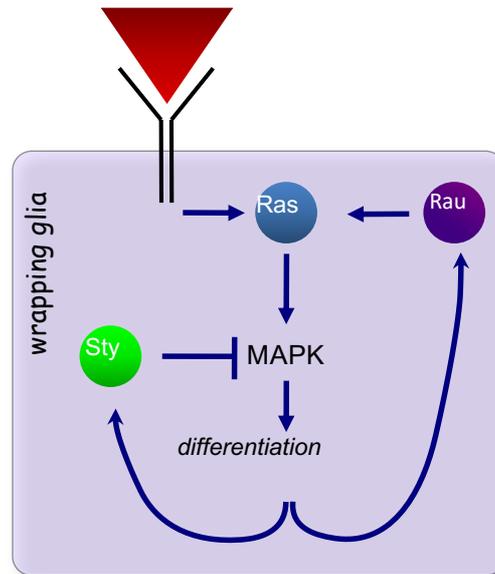
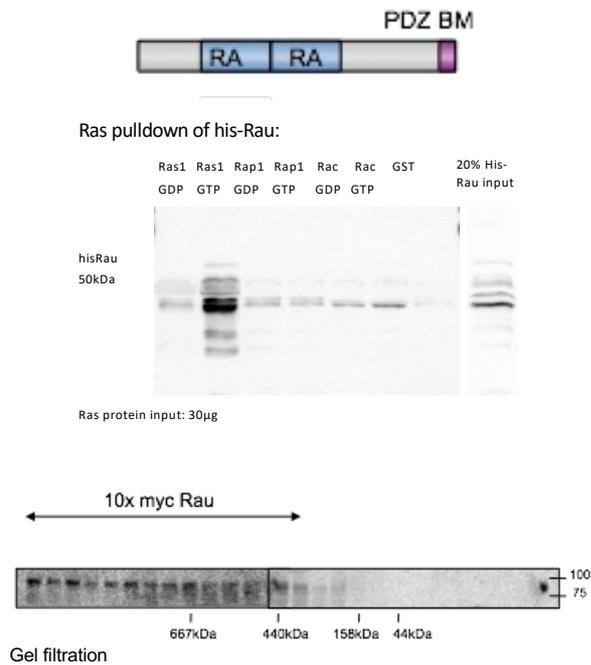
# Sprouty ist ein negativer Feedback Regulator des FGF-Rezeptors



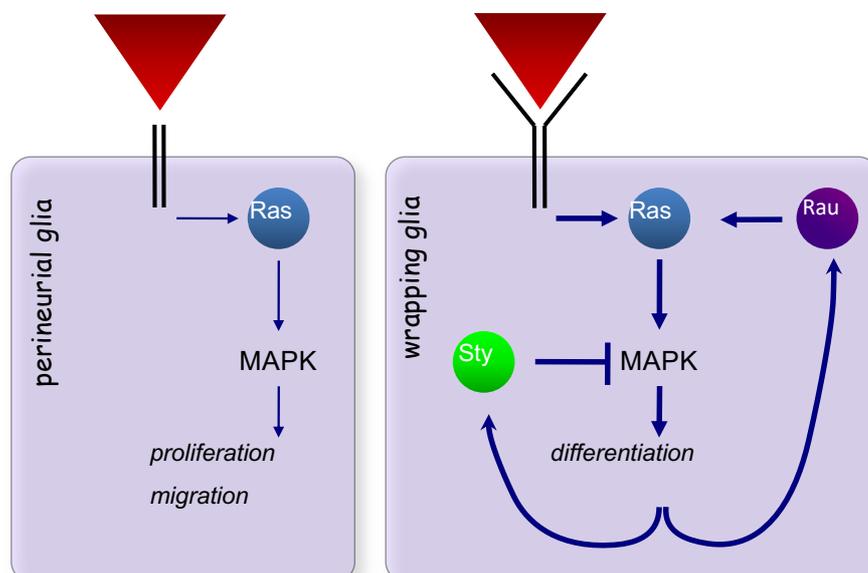
# Rau ist ein positiver Feedback Regulator des FGF-Rezeptors



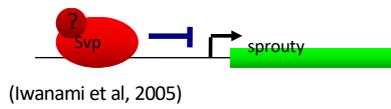
# Rau ist ein positiver Feedback Regulator des FGF-Rezeptors



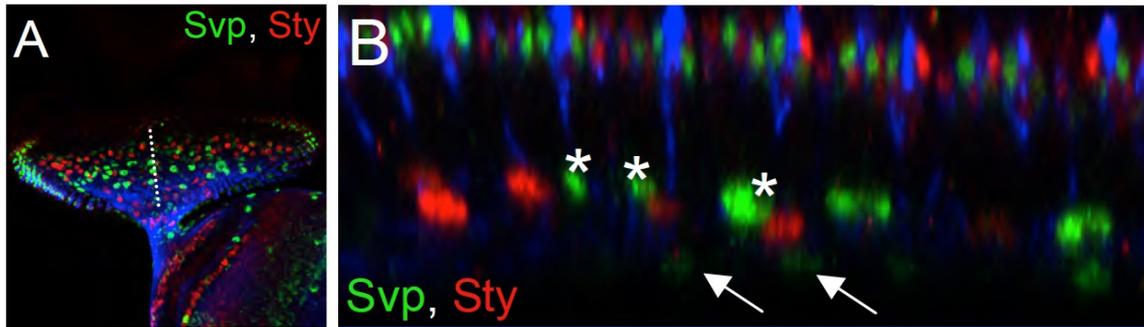
# Rau ist ein positiver Feedback Regulator des FGF-Rezeptors



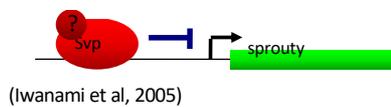
# Wechselwirkung von Rau und Sprouty



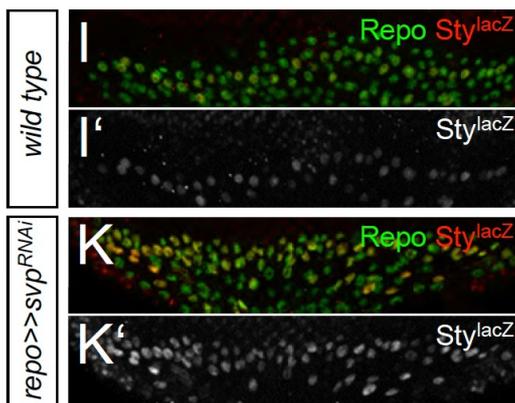
During photoreceptor development Sprouty is inhibited by the orphan hormone receptor Seven-up (Svp)



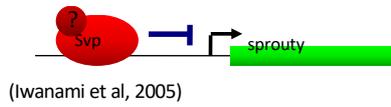
# Wechselwirkung von Rau und Sprouty



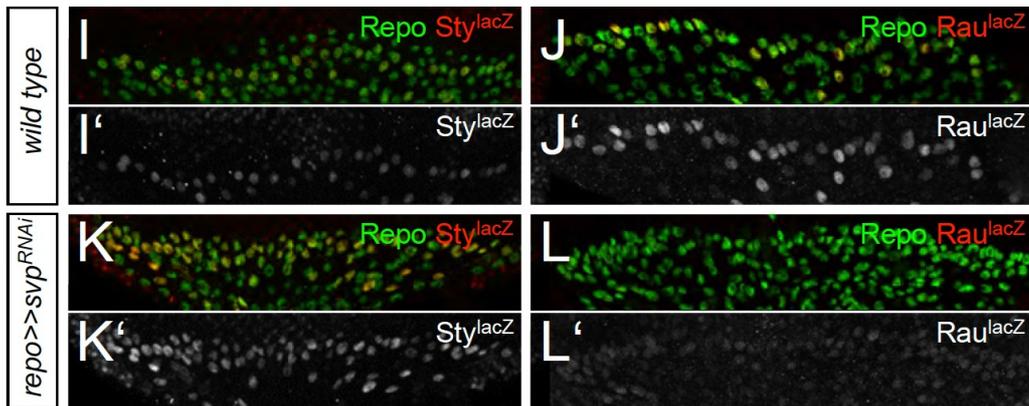
During photoreceptor development Sprouty is inhibited by the orphan hormone receptor Seven-up (Svp)



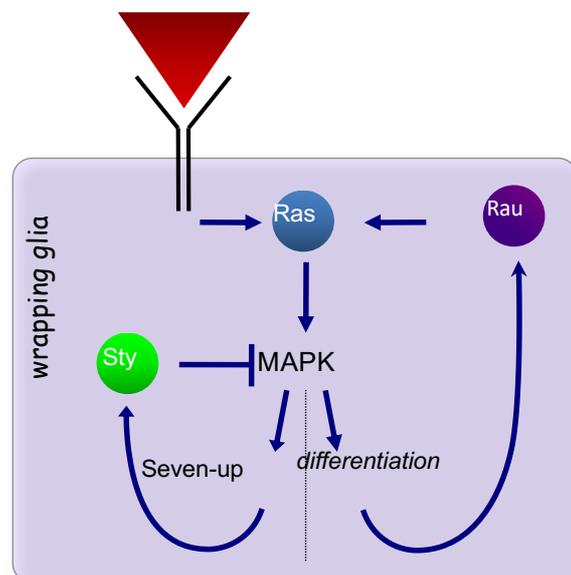
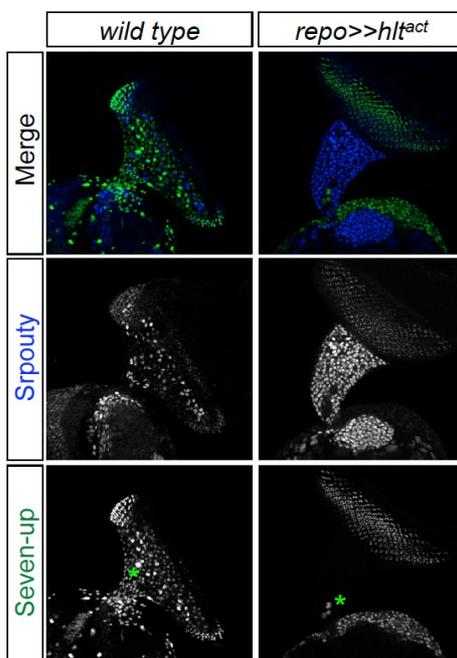
# Wechselwirkung von Rau und Sprouty



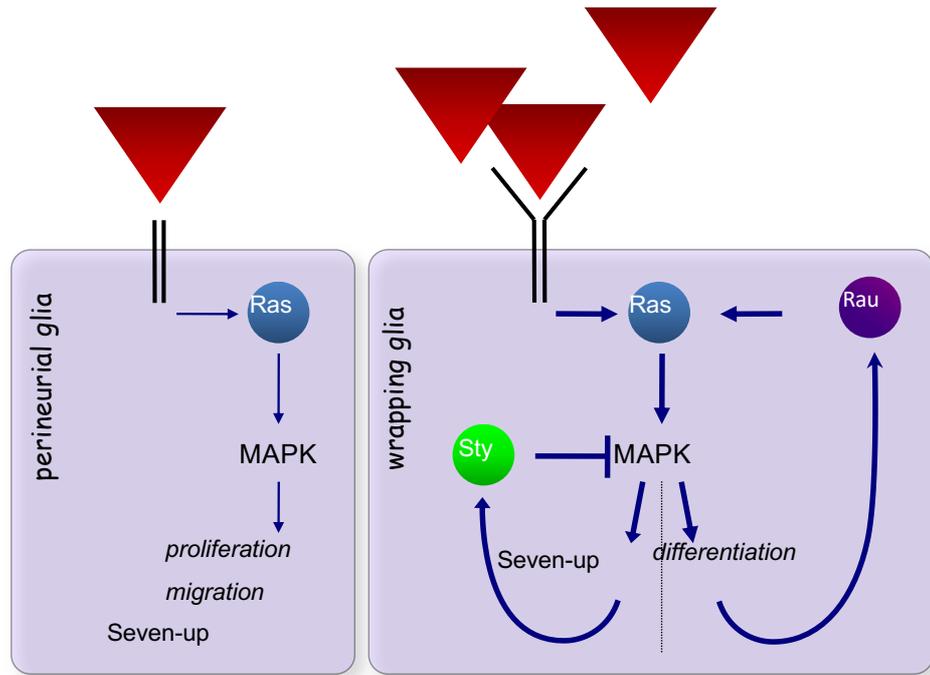
During photoreceptor development Sprouty is inhibited by the orphan hormone receptor Seven-up (Svp)



## Modell

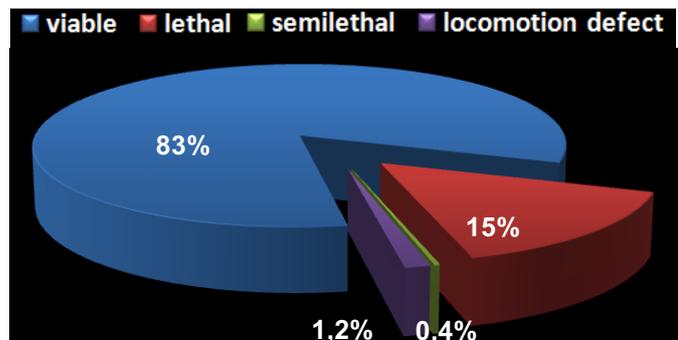
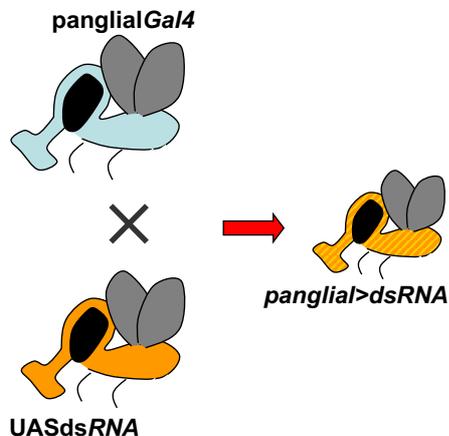


# Modell



What determines proliferation and what differentiation?

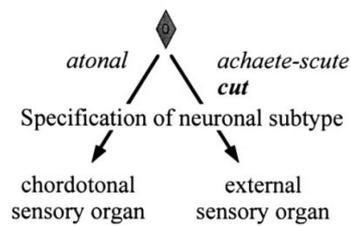
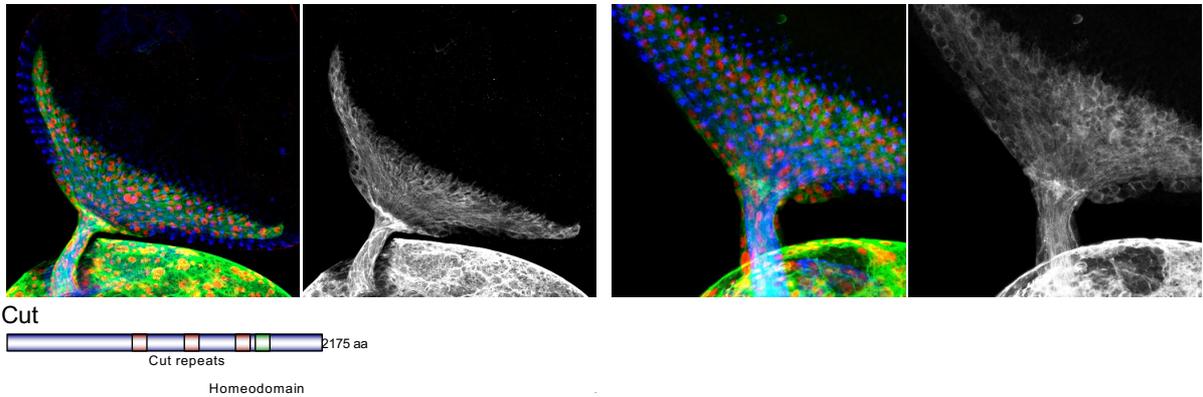
RNAi Screen um weitere Gene zu finden, die an der glialen Differenzierung beteiligt sind



Confocal analysis of the knockdown phenotypes of all genes encoding transcriptional regulators (ca. 900)

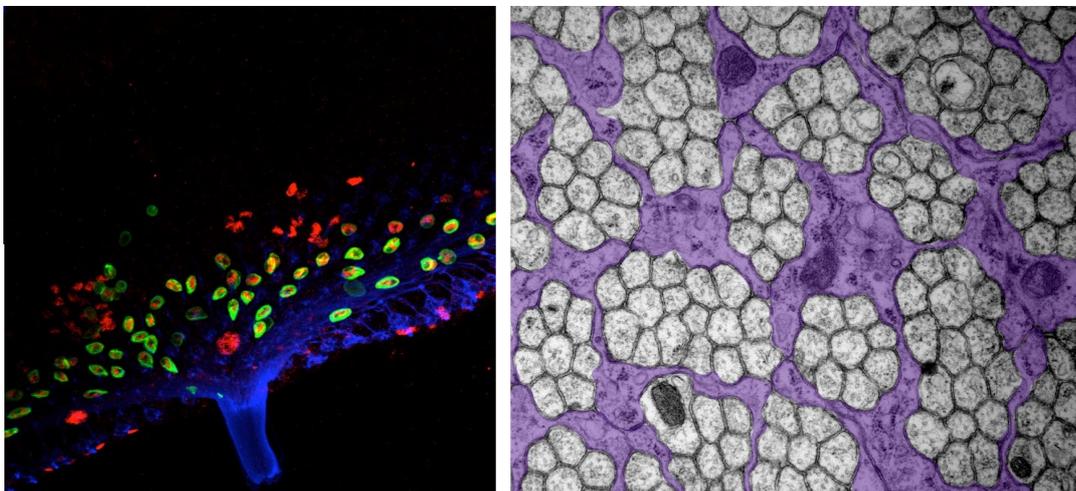
# Transkriptionsfaktor Cut:

## loss of function Analyse (RNAi)

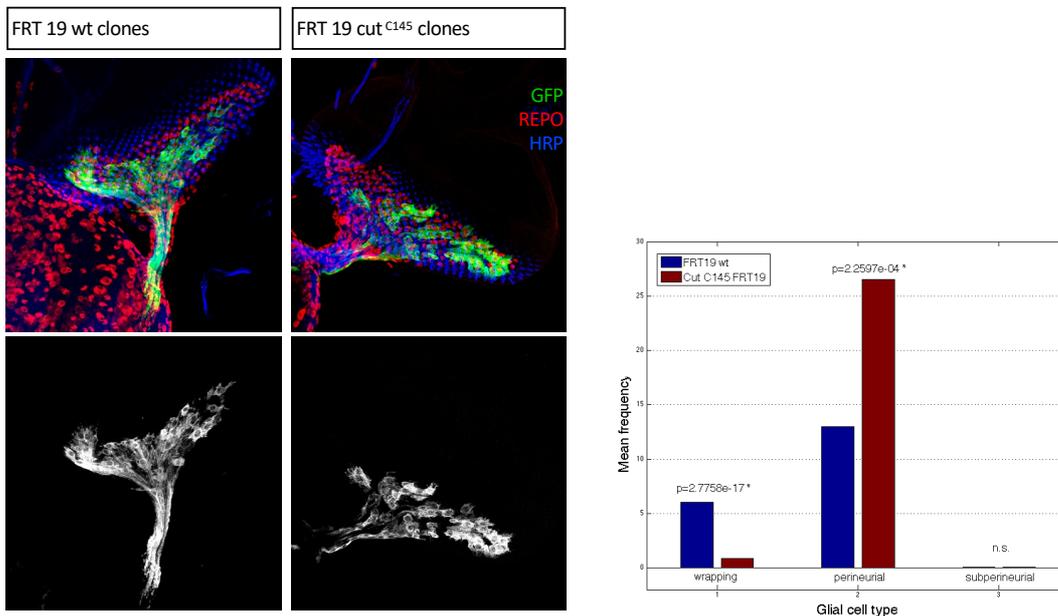


# Transkriptionsfaktor Cut:

## loss of function Analyse (RNAi)

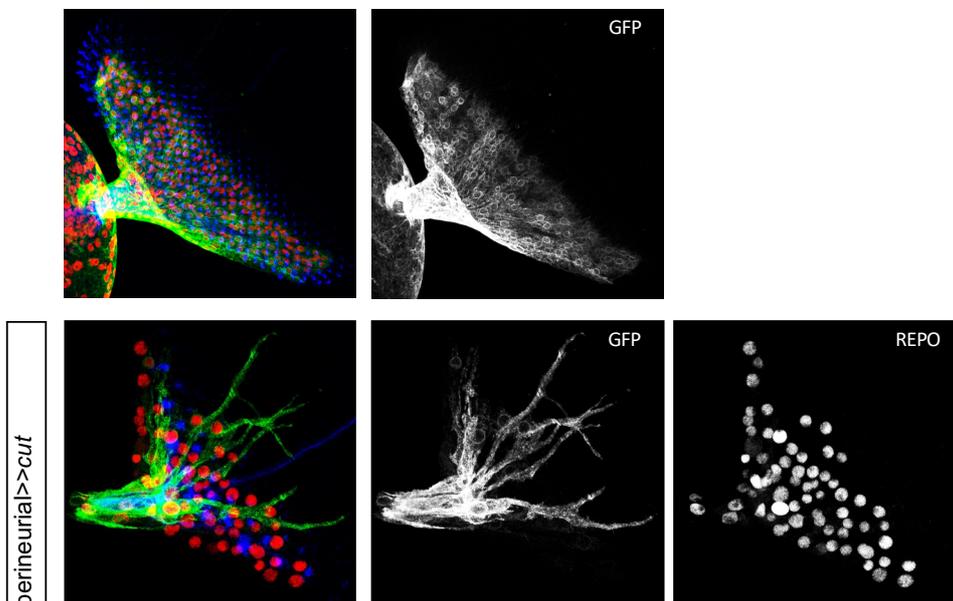


# Transkriptionsfaktor Cut: loss of function Analyse (MARCM)

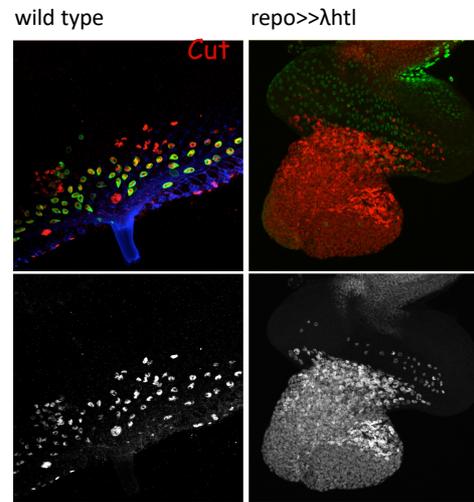
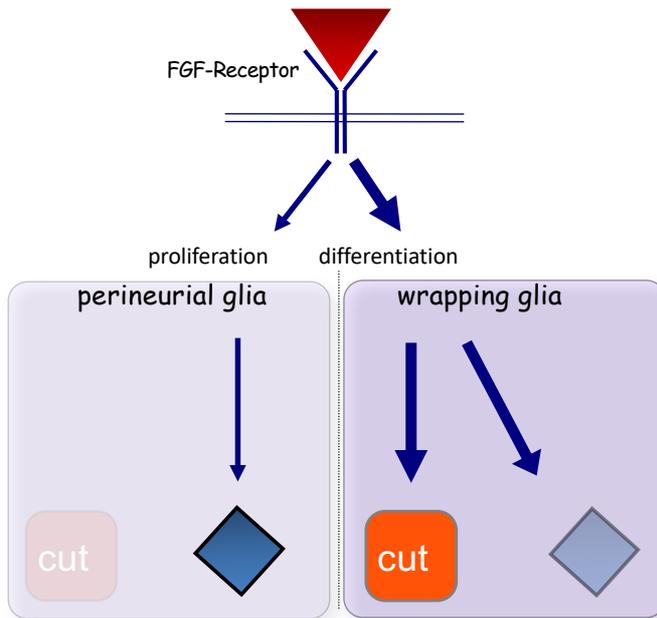


*cut* is required for wrapping glial cell fate

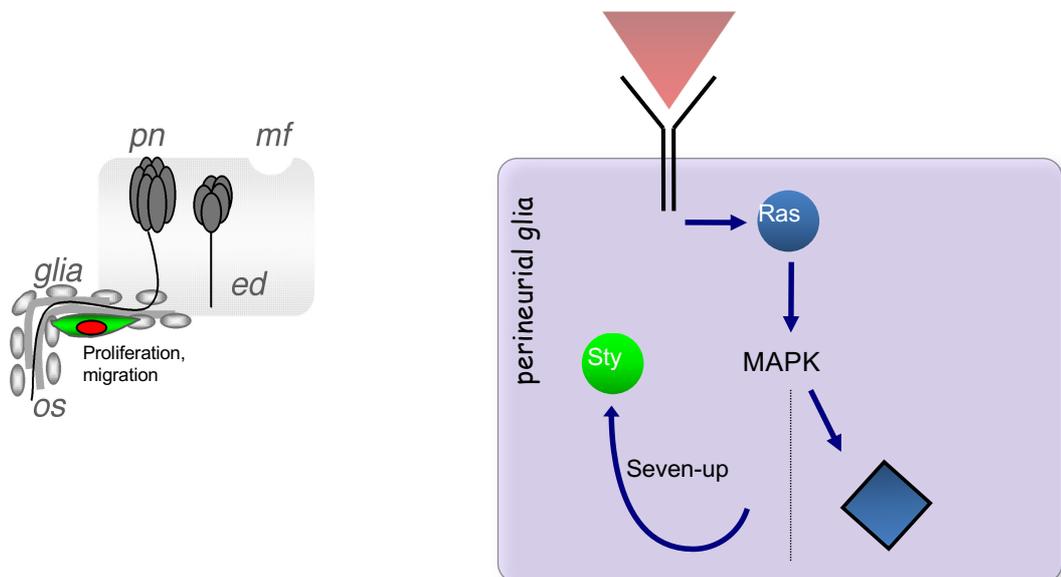
# Transkriptionsfaktor Cut: gain of function Analyse (RNAi)



# Interaktion FGF-Rezeptor und Cut

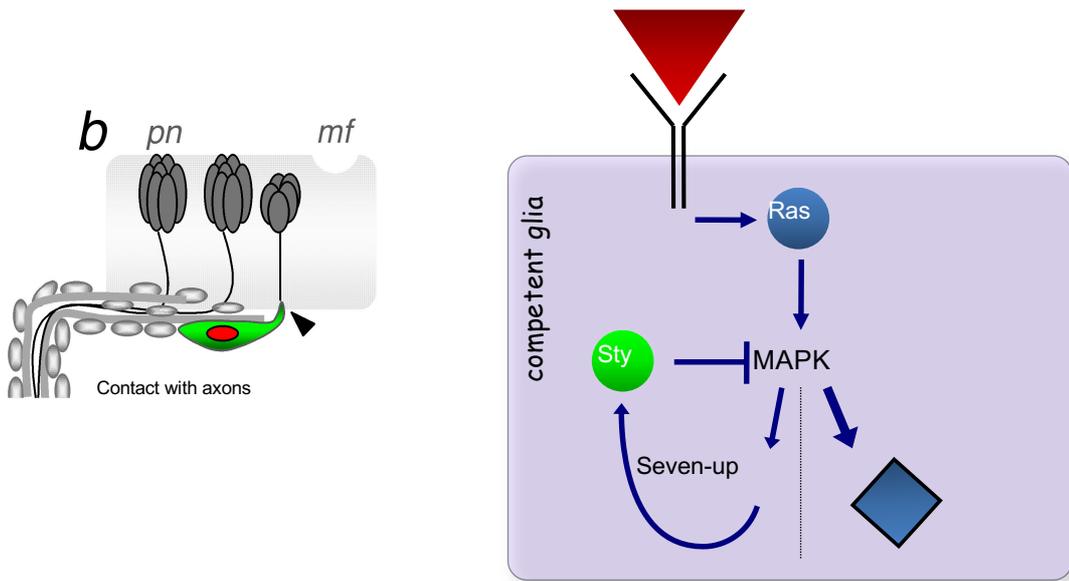


## Modell



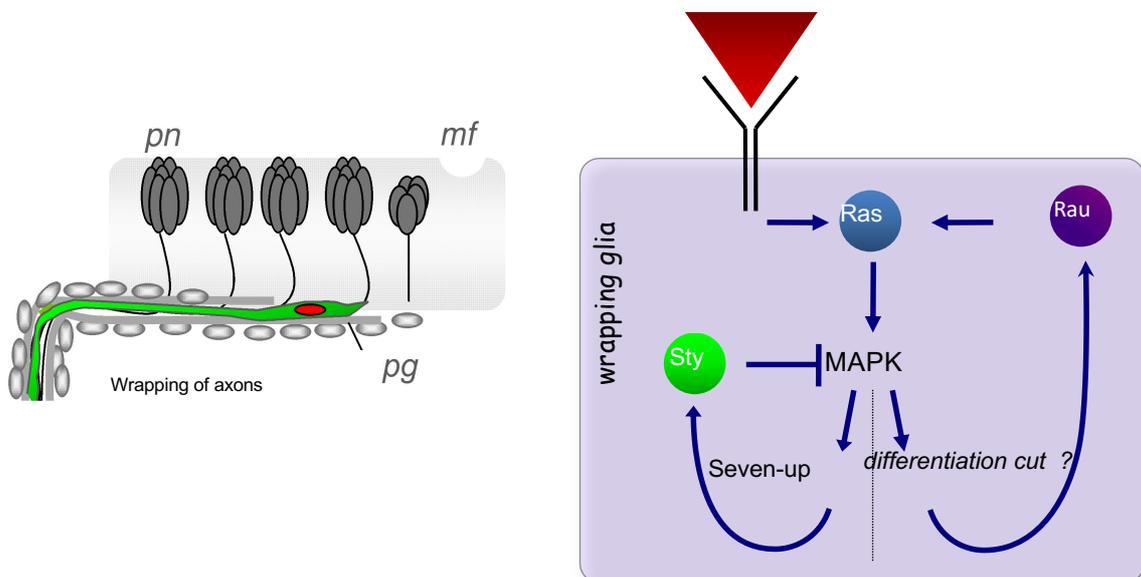
Low levels of FGF-R activity promote proliferation and migration

# Modell



Highs levels of FGF-R activity during first axon contact suppress and sustain FGF-R signaling via Sprouty and Rau and induce Cut expression, triggering differentiation

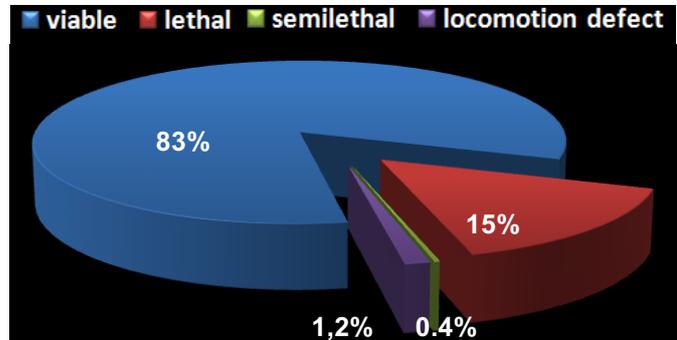
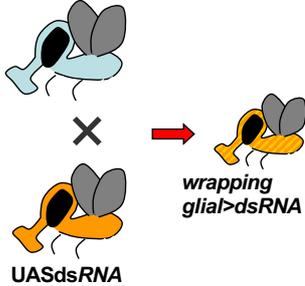
# Modell



Moderate levels of FGF-R activity are maintained during differentiation

# Wie wird die molekulare Differenzierung der Gliazellen gesteuert?.

wrapping glial *Gal4*



Behavioral analysis following specific knockdown in wrapping glia

About 8.000 genes were tested

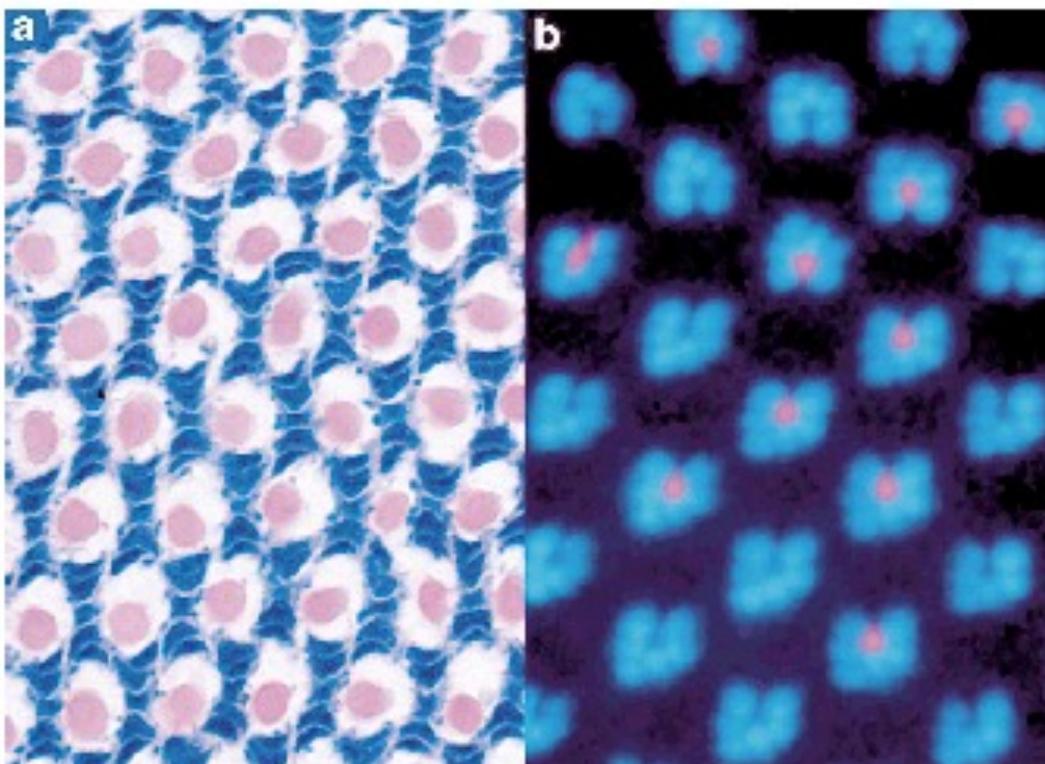
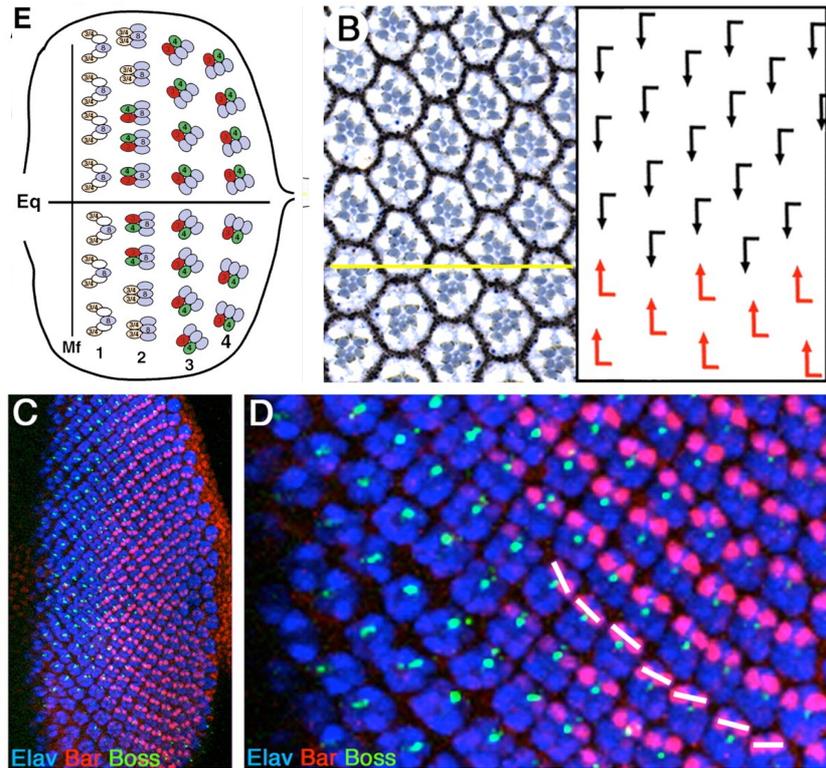
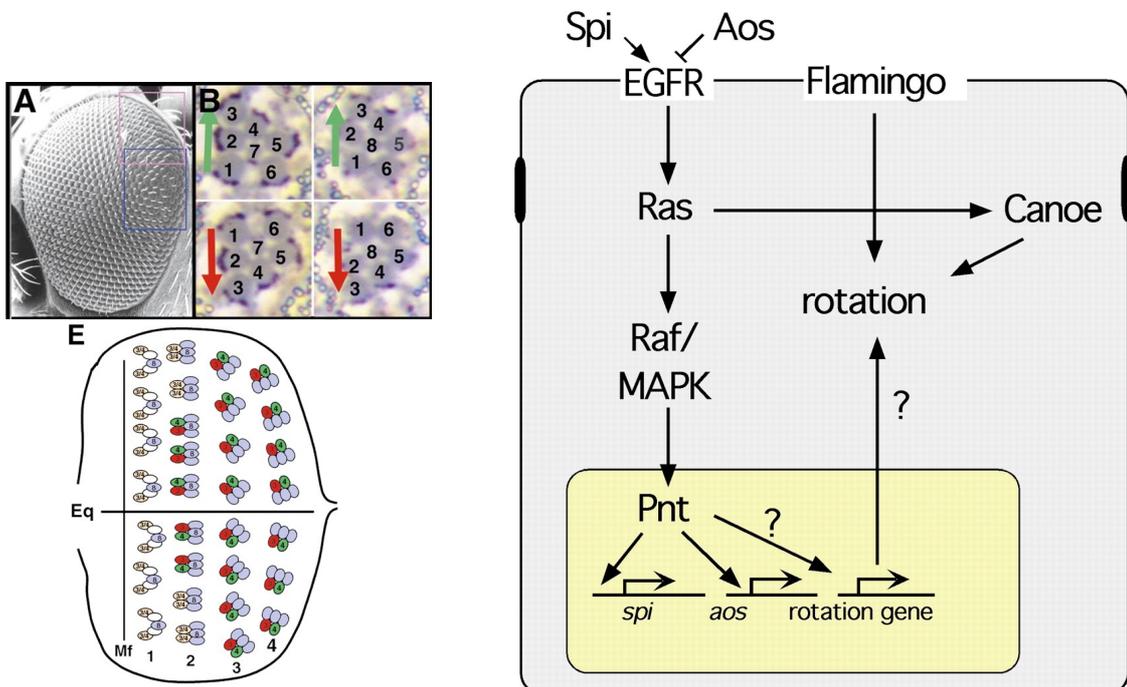


Figure 3. Crystalline Organization of the Fish and Fly Eyes

# Rotation der Ommatidien



# Rotation der Ommatidien



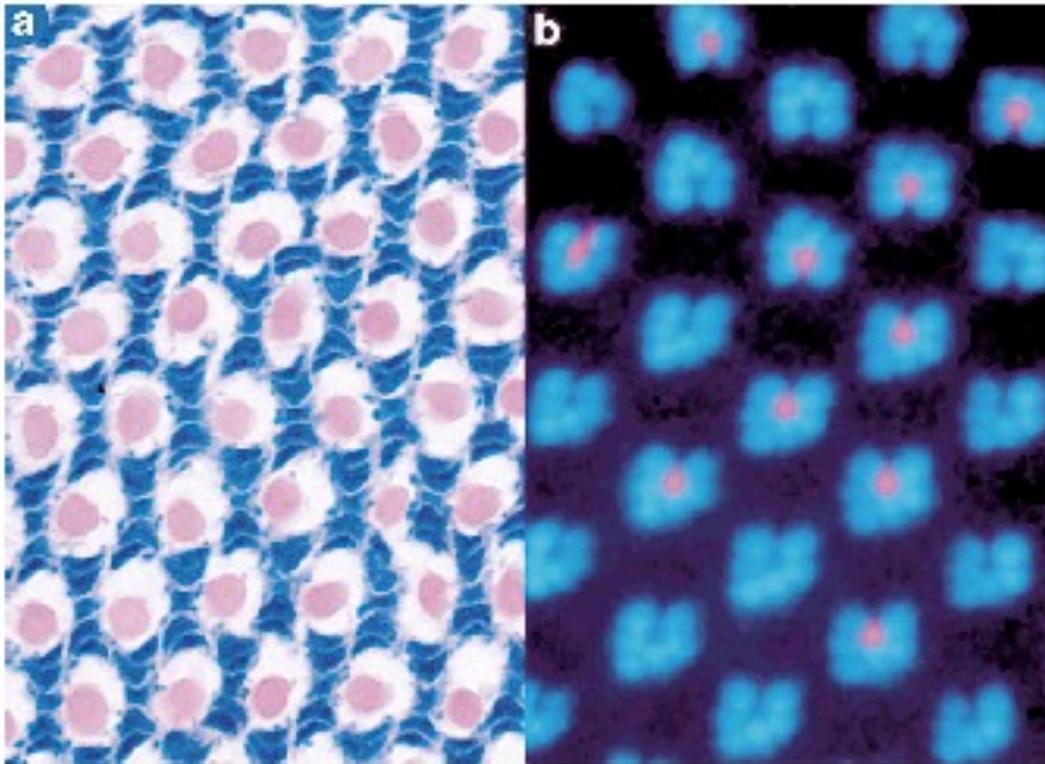
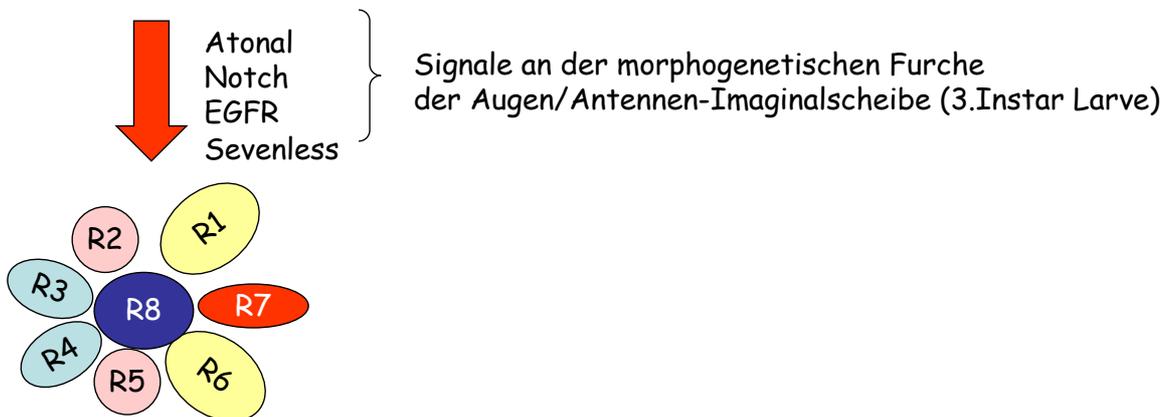
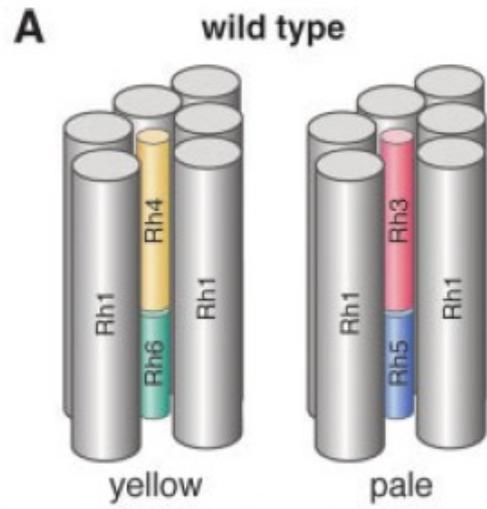
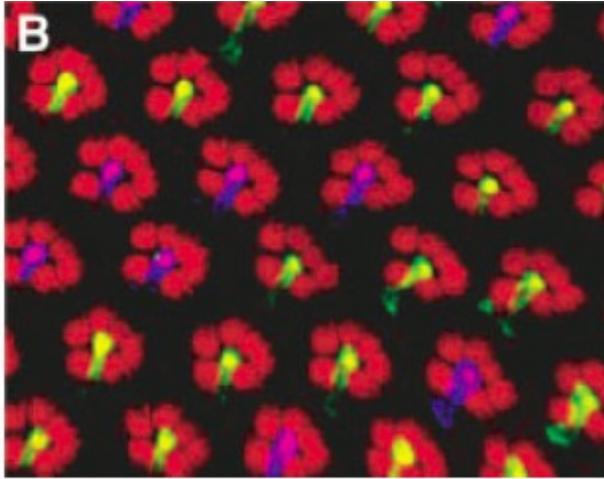


Figure 3. Crystalline Organization of the Fish and Fly Eyes

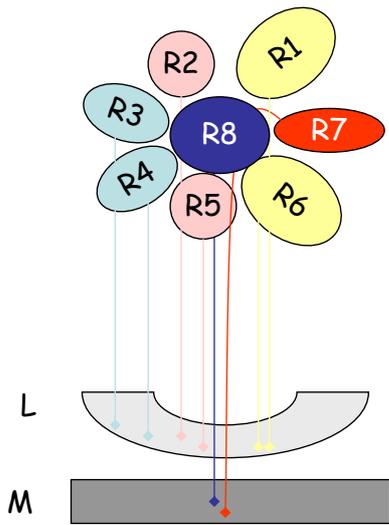
Jeder Photorezeptortyp ist durch die Expression eines spezifischen Rhodopsins definiert

	Rezeptortyp	Lokalisation	Pigment $\lambda_{max}$
	R1-R6	in allen Ommatidien	490 (Rh1)
	R7 R8	dorsaler Augenrand	335 (Rh3) 335 (Rh3)
	R7 <sub>pale</sub> R8 <sub>pale</sub>	1/3 aller Ommatidien	335 (Rh3) 460 (Rh5)
	R7 <sub>yellow</sub> R8 <sub>yellow</sub>	2/3 aller Ommatidien	425 (Rh4) 540 (Rh6)

# Die verschiedenen Opsine sind in Drosophila stochastisch verteilt



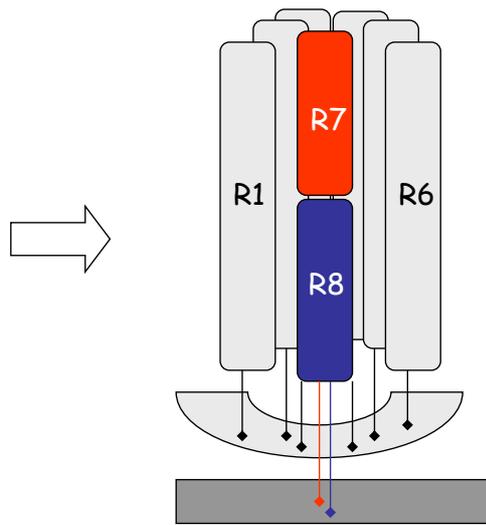
Larve



Fünf Zelltypen:

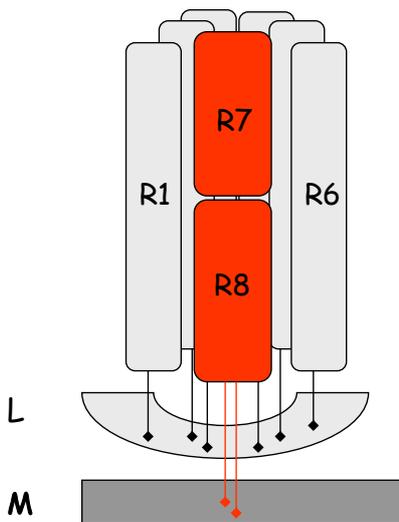
- R8
- R2 + R5
- R3 + R4
- R1 + R6
- R7

Imago

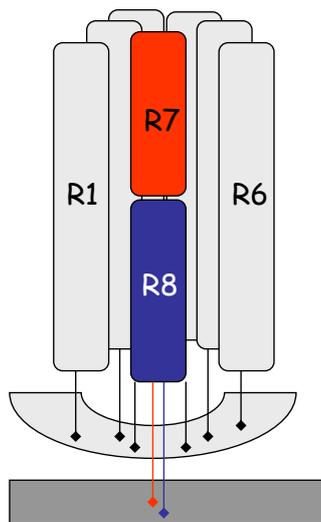


Drei Zelltypen:

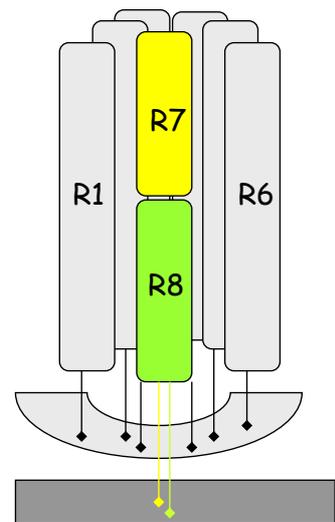
- R1-R6
- R7
- R8



DRA  
Rh3 und Rh3

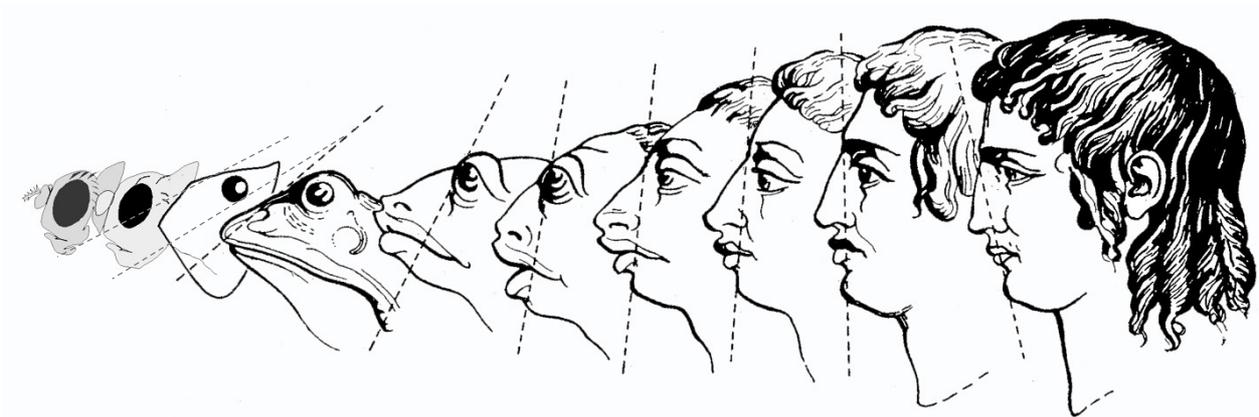
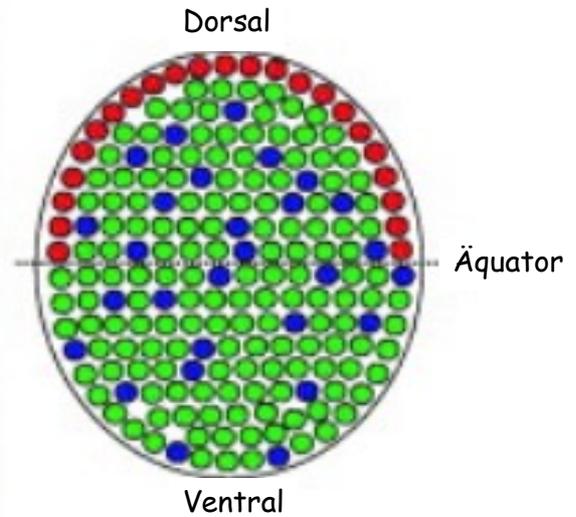
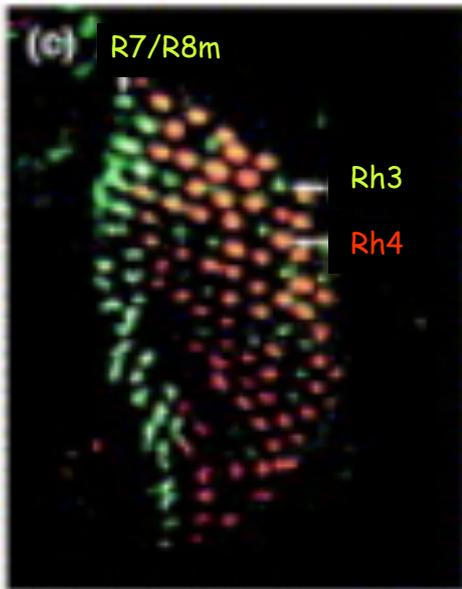


*pale*  
Rh3 und Rh5



*yellow*  
Rh4 und Rh6

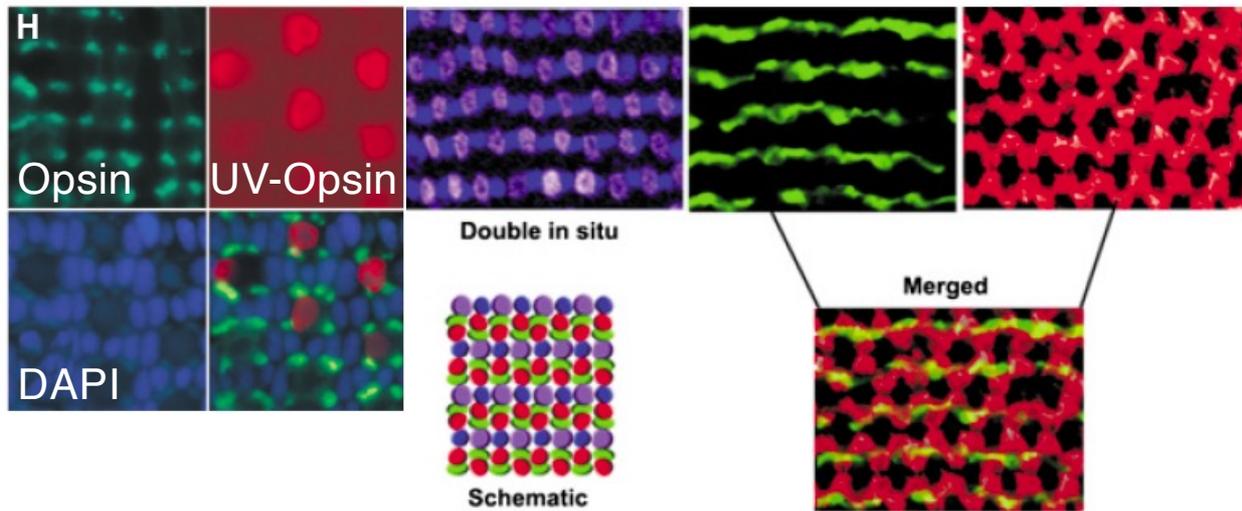
# Verteilung der Photorezeptoren im Komplex Auge



Proneurale Gene und neurale Kompetenz  
Laterale Inhibition  
Steuerung der Augenentwicklung  
Asymmetrische Zellteilung  
Alle fundamentalen Aspekte scheinen konserviert.

Mit Hilfe der Genetik kann man Antworten  
auf komplexe Fragestellungen finden.

# Verteilung der Zapfen in der Retina des Zebrafisch



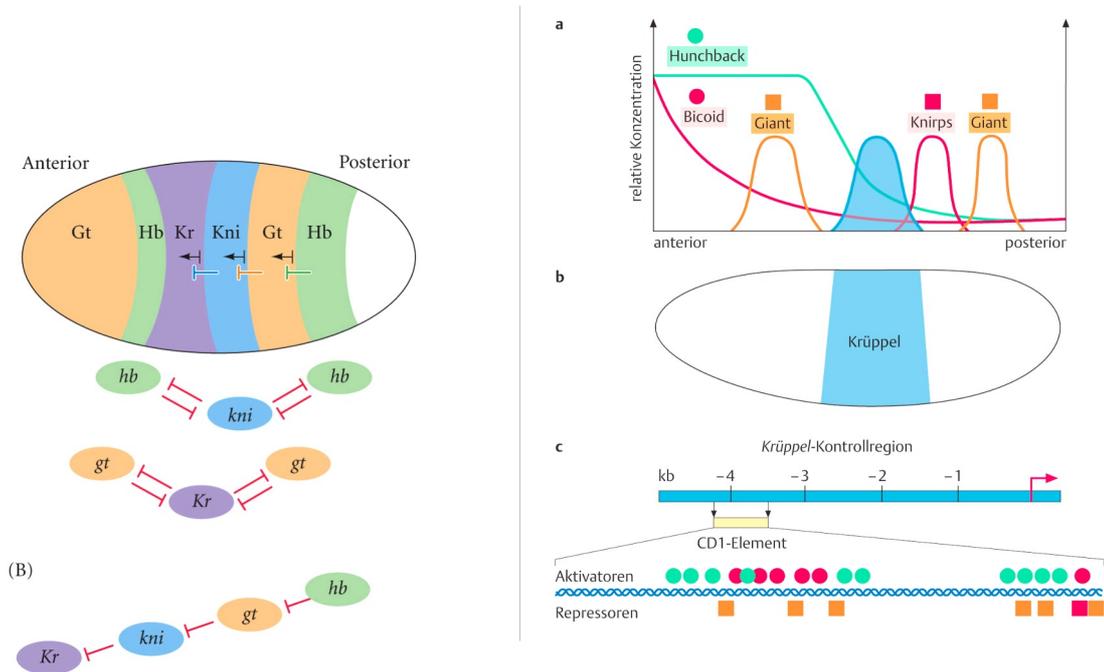
Proteinverteilung

mRNA in situ Muster

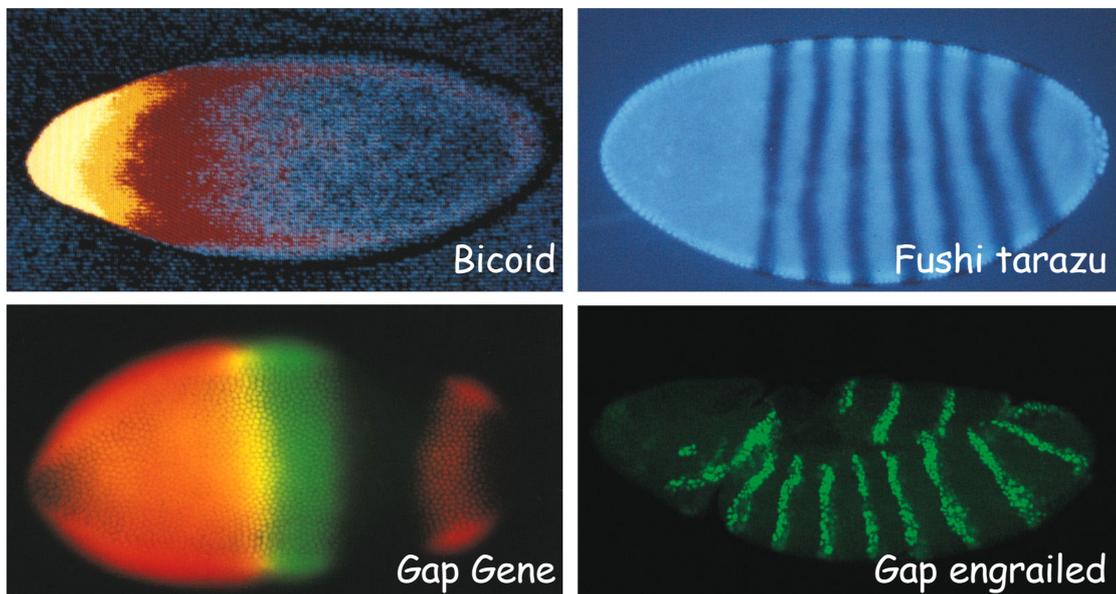
## Konservierung der Signalwege

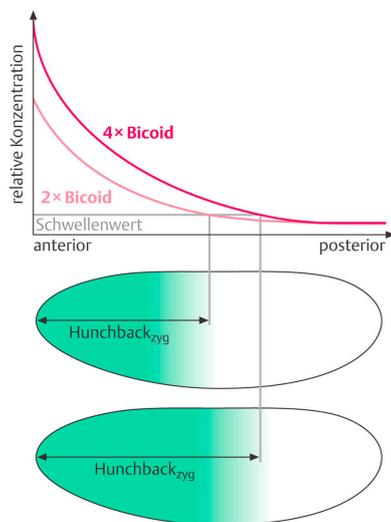
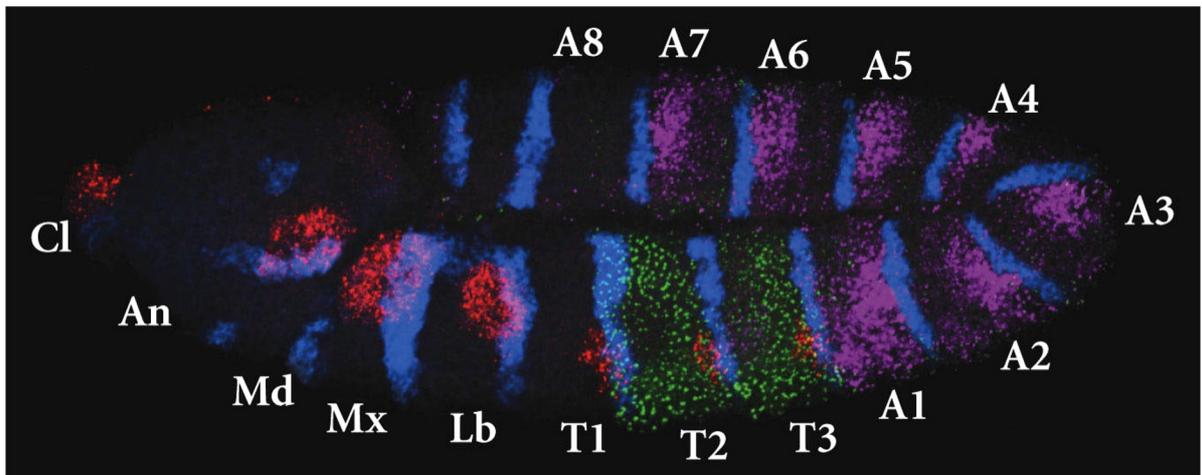
<i>Drosophila</i>	Vertebrate	Eye Phenotype (loss of function)	References
<i>Ey</i>	<i>Pax6</i>	small eyes, anophthalmia, Aniridia	Hill <i>et al.</i> , 1991; Glaser <i>et al.</i> , 1994
<i>Eya</i>	<i>Eya1-3</i>	<i>Eya1</i> : open eyelids <i>EYA1</i> : anterior segment anomalies	Xu <i>et al.</i> , 1997; Azuma <i>et al.</i> , 2000
<i>So</i>	<i>Six1/2</i>	none	Laclef <i>et al.</i> , 2003
<i>Optix</i>	<i>Six3/6</i>	holoprosencephaly, anophthalmia	Gallardo <i>et al.</i> , 1999; Wallis <i>et al.</i> , 1999; Pasquier <i>et al.</i> , 2000; Li <i>et al.</i> , 2002;
<i>D-six4</i>	<i>Six4/5</i>	<i>Six5</i> : adult onset cataracts	Sarkar <i>et al.</i> , 2000; Klesert <i>et al.</i> , 2000; Winchester <i>et al.</i> , 1999
<i>Dac</i>	<i>Dach1</i>	none	Davis <i>et al.</i> , 2001
<i>Hh</i>	<i>Shh</i>	holoprosencephaly, cyclopia	Chiang <i>et al.</i> , 1996
<i>Atonal</i>	<i>Math5</i> ( <i>Xath5</i> , <i>ath5</i> )	> 80% loss of RGCs	Brown <i>et al.</i> , 2001; Wang <i>et al.</i> , 2001
<i>hairy</i>	<i>Hes1</i>	premature retinal neurogenesis resulting in a retina with very few of each major type of neuron	Tomita <i>et al.</i> , 1996

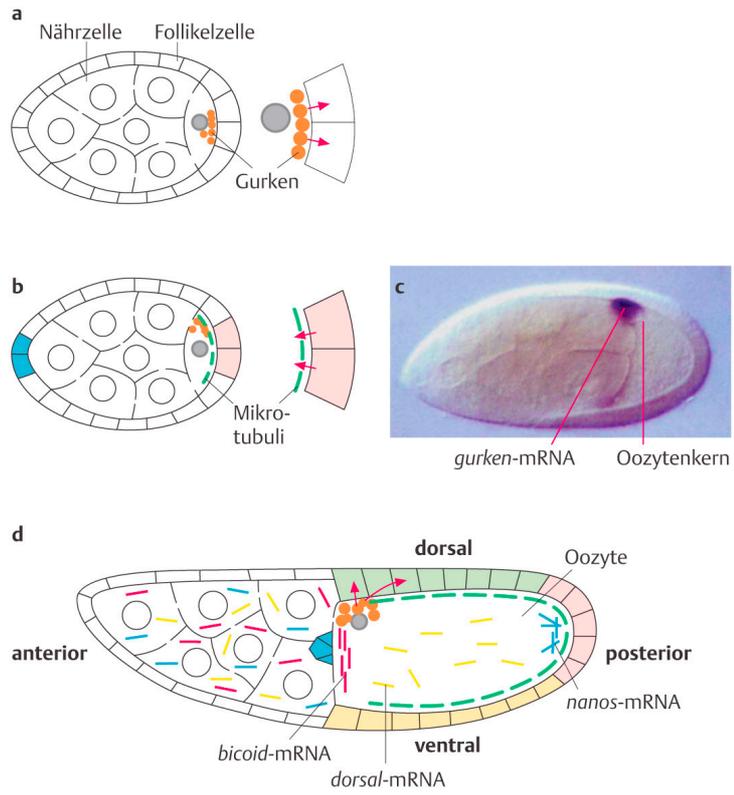
# Wechselseitige Inhibition der Gap Gene



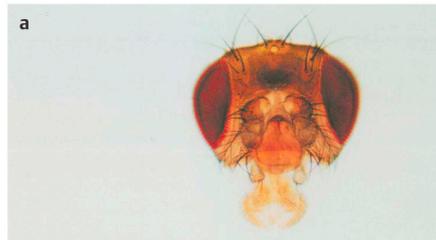
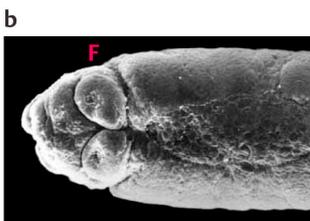
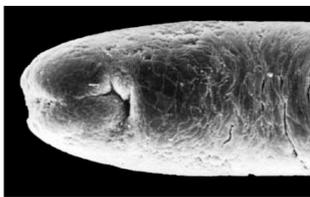
## Expressionsmuster





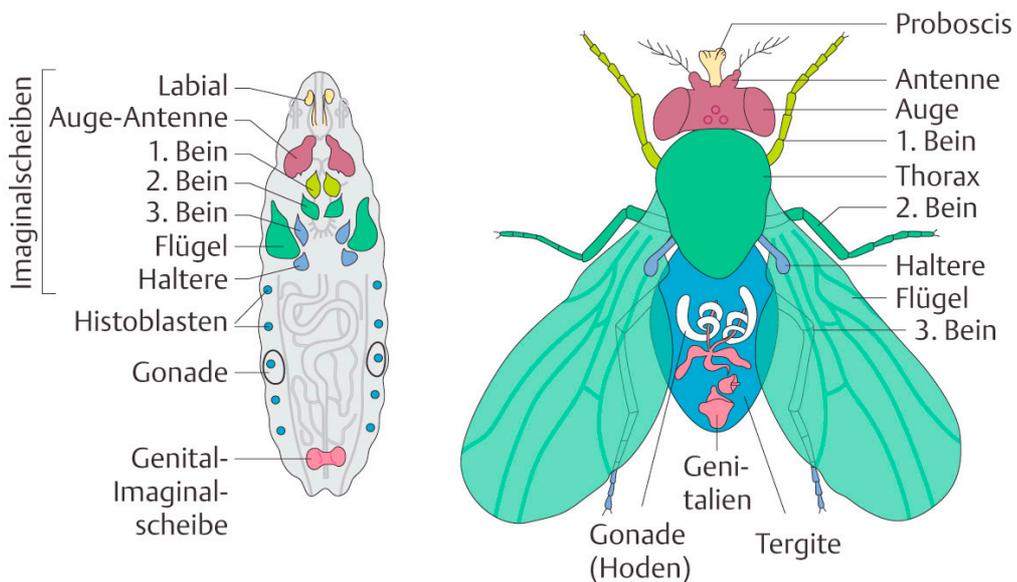


© Georg Thieme Verlag · Janning/Knust: Genetik · 1. Aufl. 2004

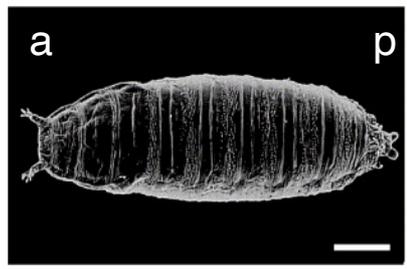
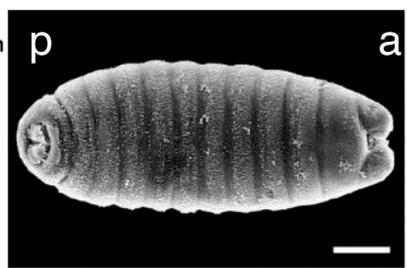
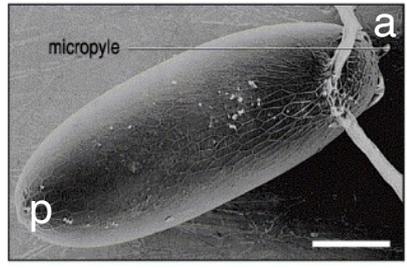
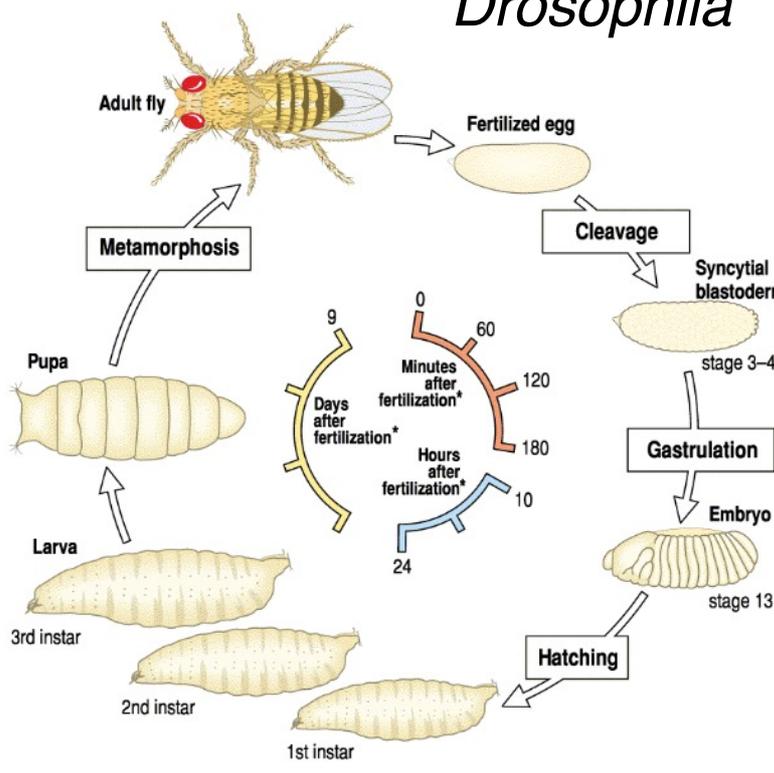


© Georg Thieme Verlag · Janning/Knust: Genetik · 1. Aufl. 2004

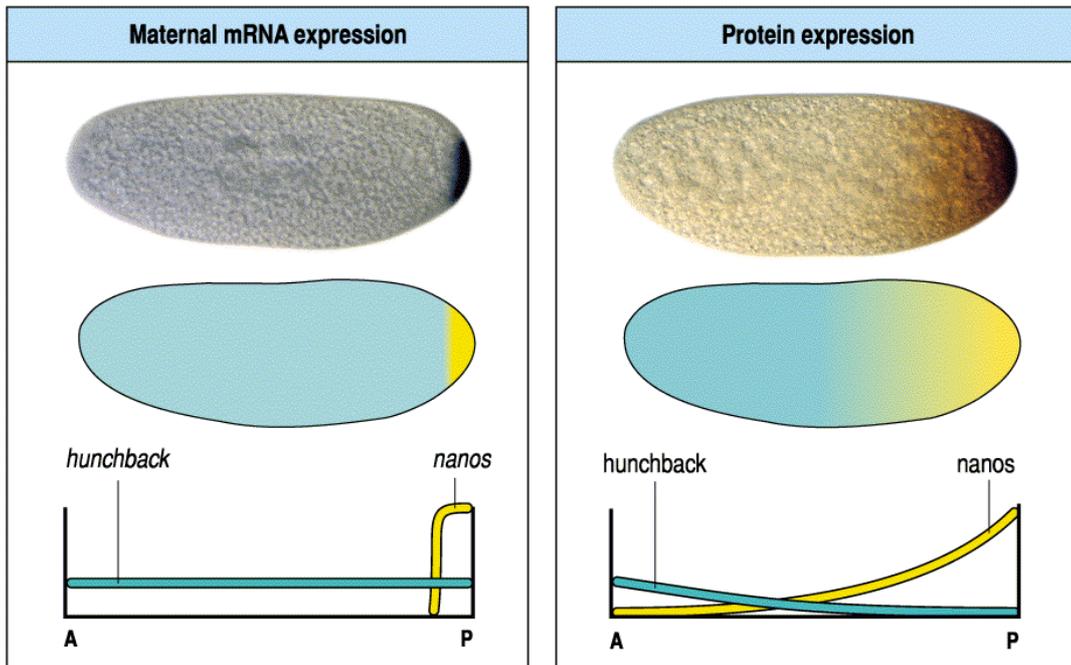
# Die Fliege entsteht aus Imaginalscheiben (Metamorphose)



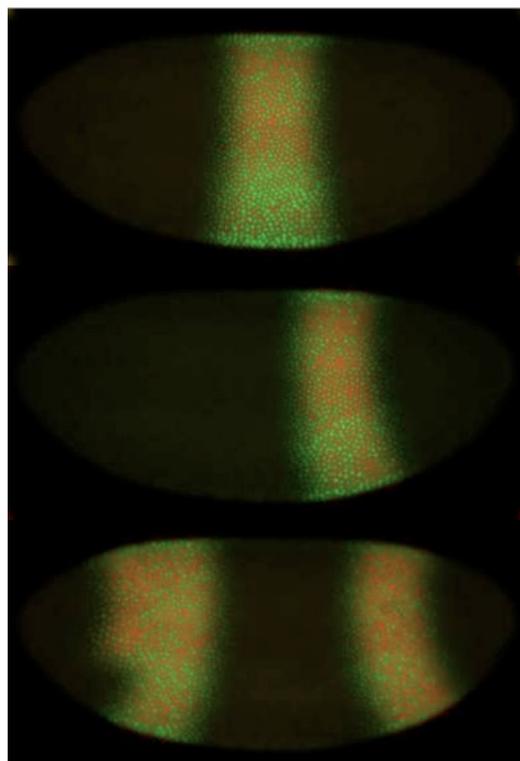
# *Drosophila*



# Nanos blockiert die Translation von Hunchback mRNA



## Gap gene expression

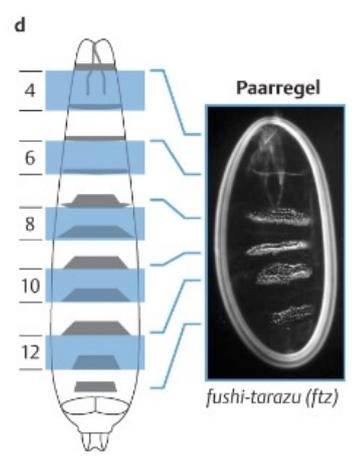
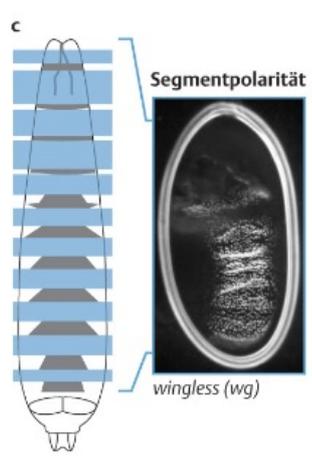
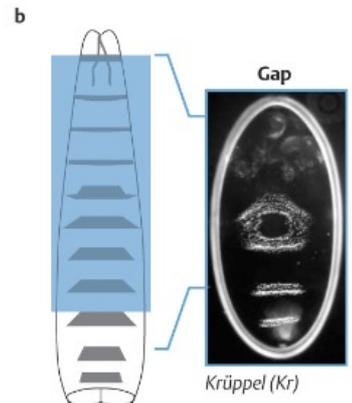
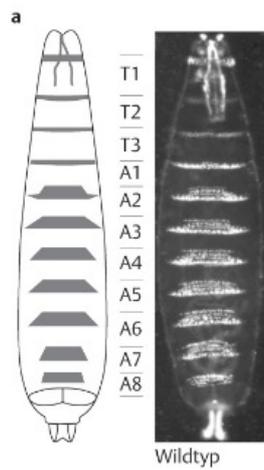
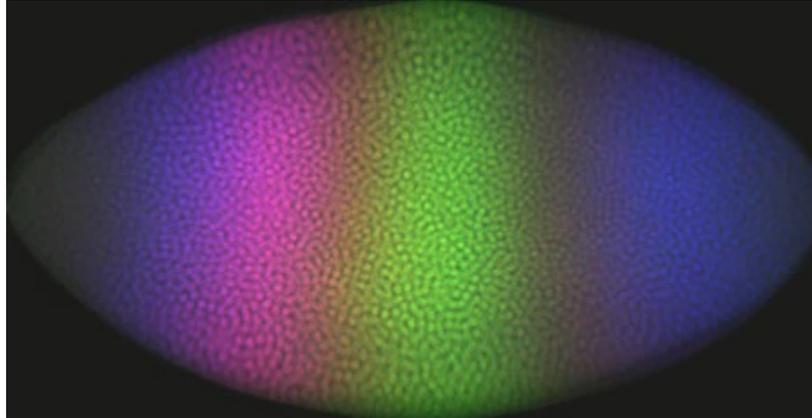


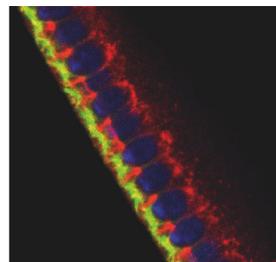
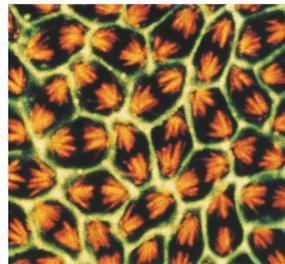
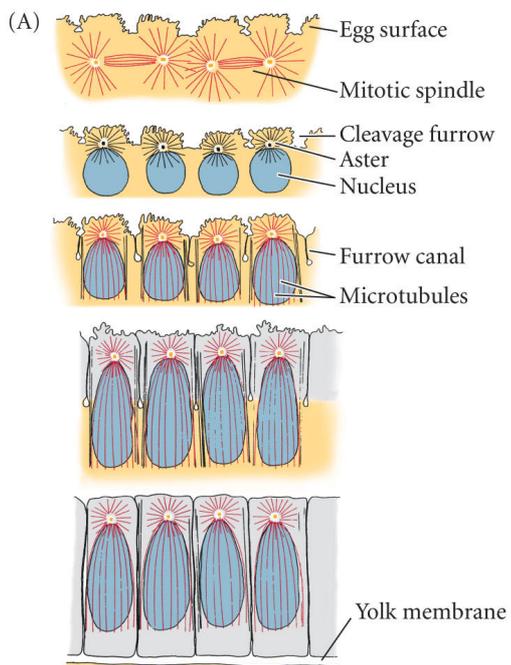
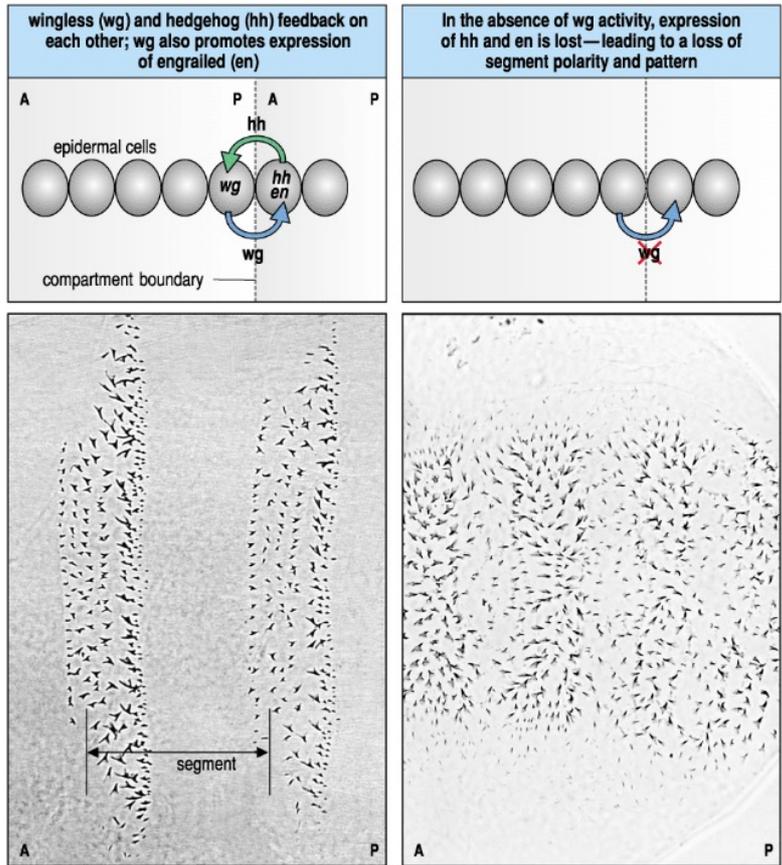
*Krüppel*

*knirps*

*giant*

# Sequenzielle Genaktivitäten





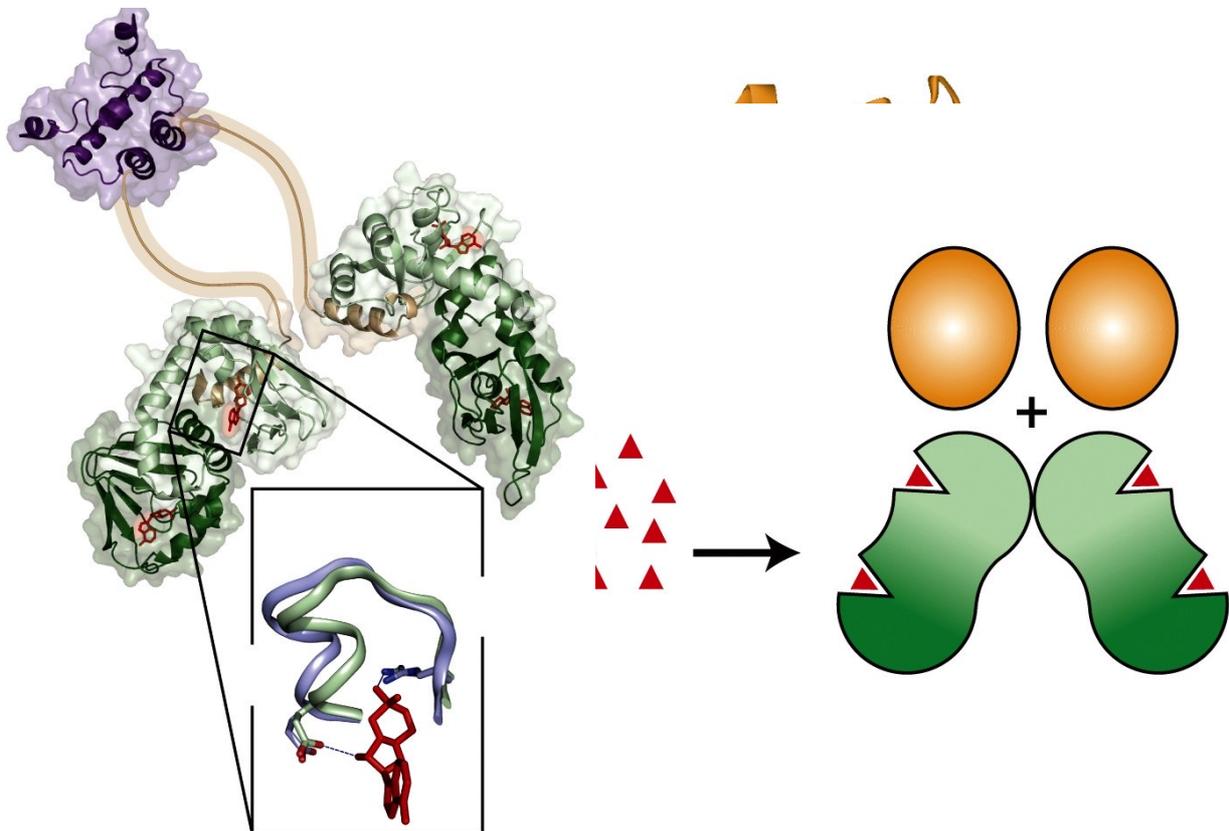
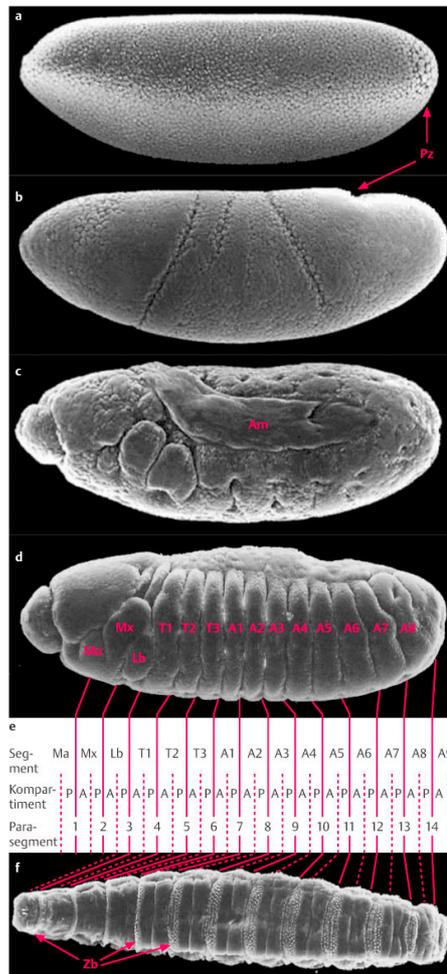


Figure 15-23b  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
 © 2008 W.H. Freeman and Company  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
 © 2008 W.H. Freeman and Company

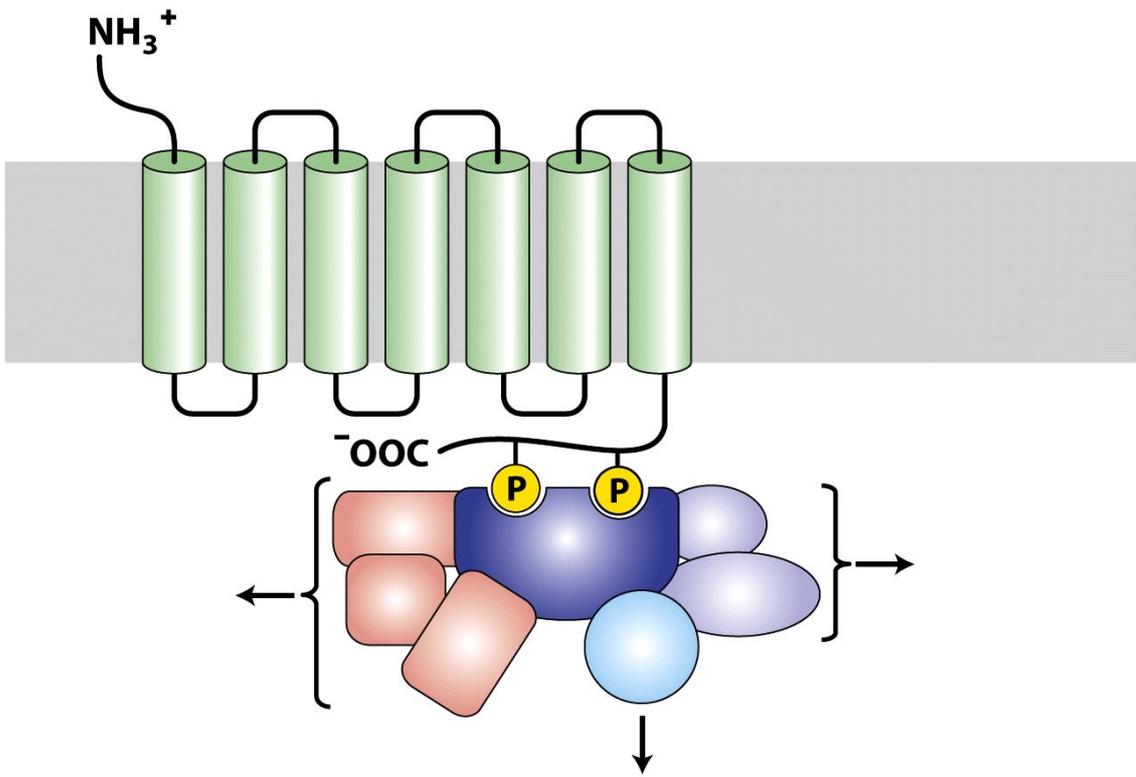


Figure 15-27  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
 © 2008 W. H. Freeman and Company

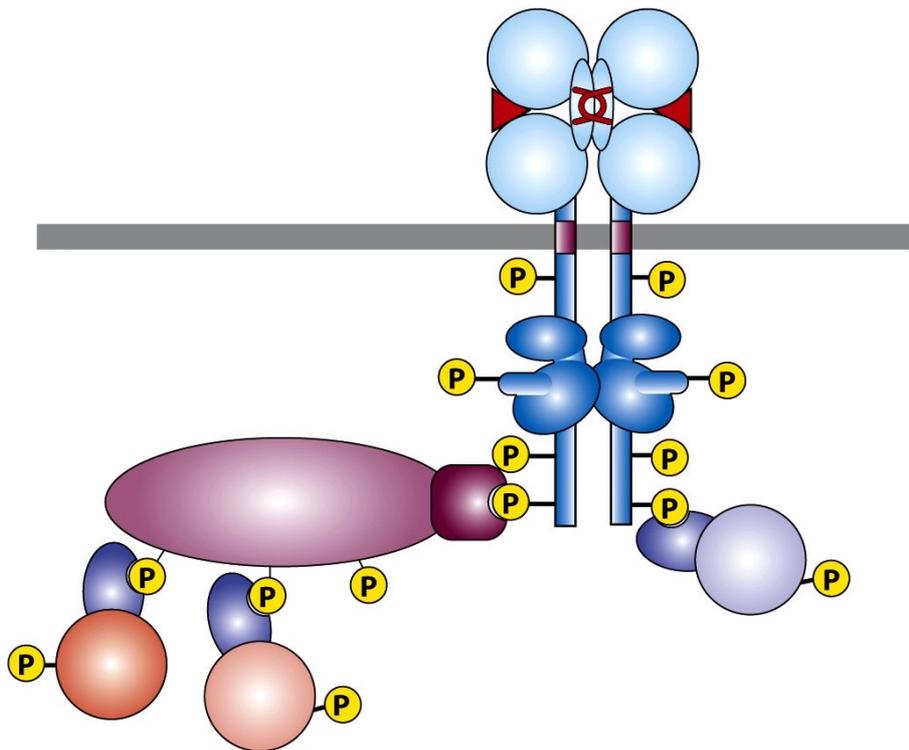


Figure 16-19  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
 © 2008 W. H. Freeman and Company

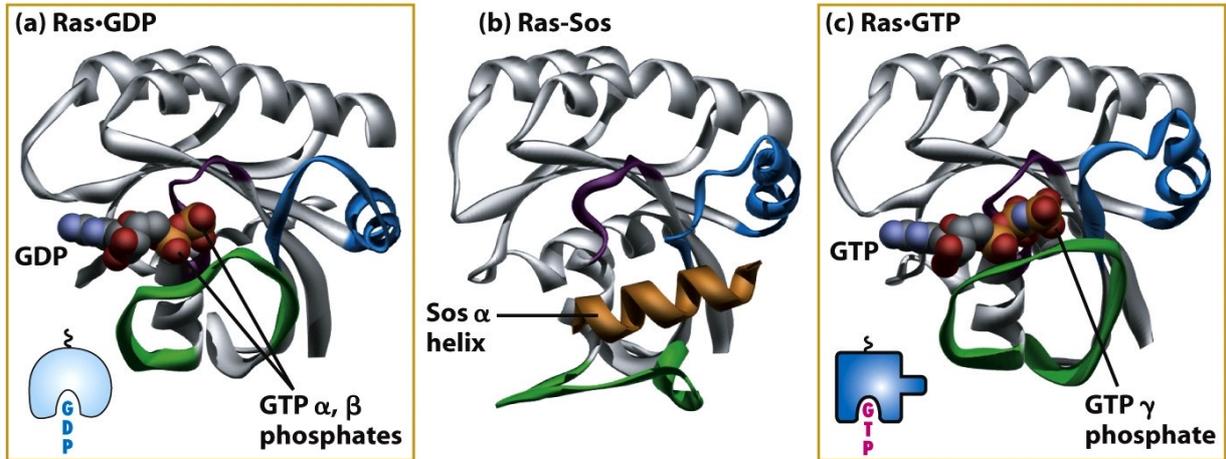


Figure 16-24  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
 © 2008 W. H. Freeman and Company

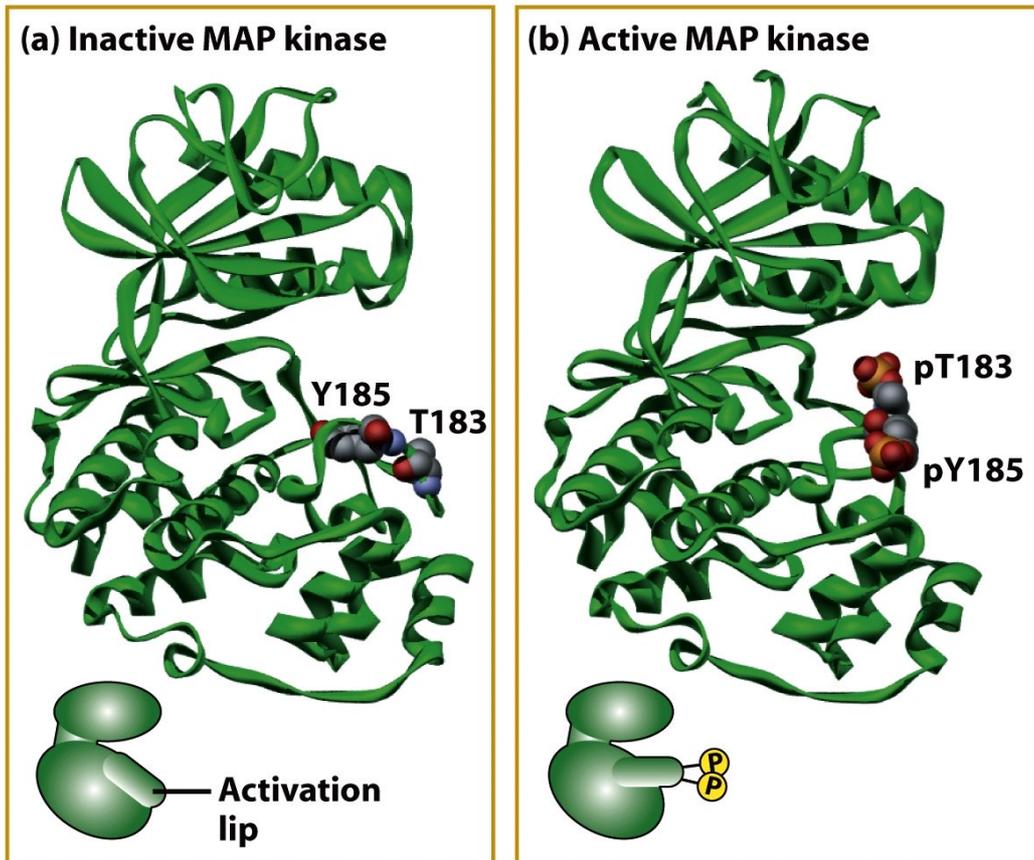
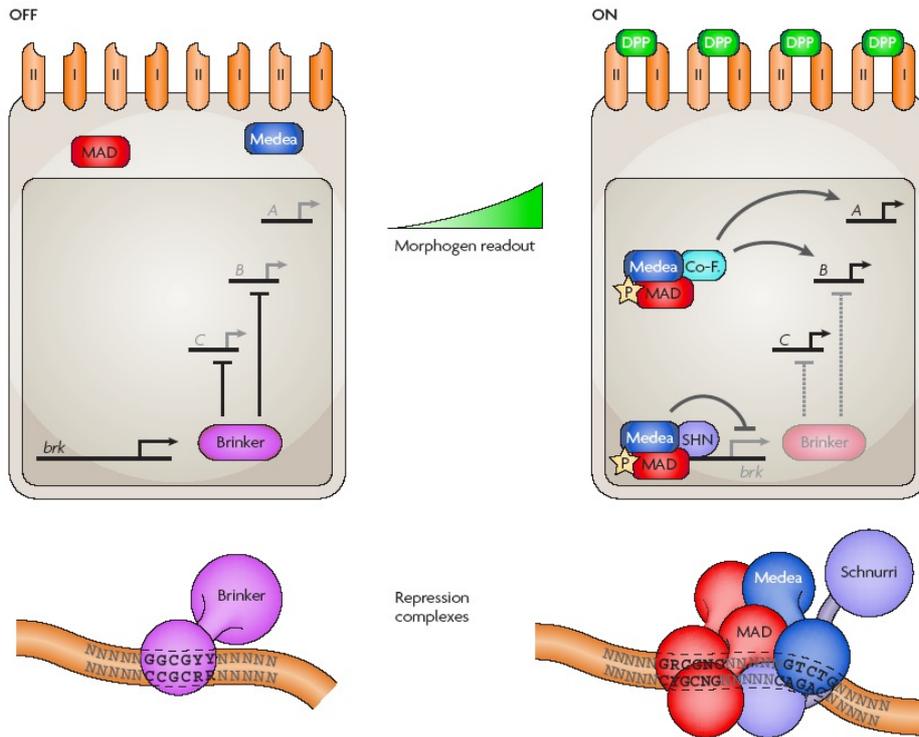
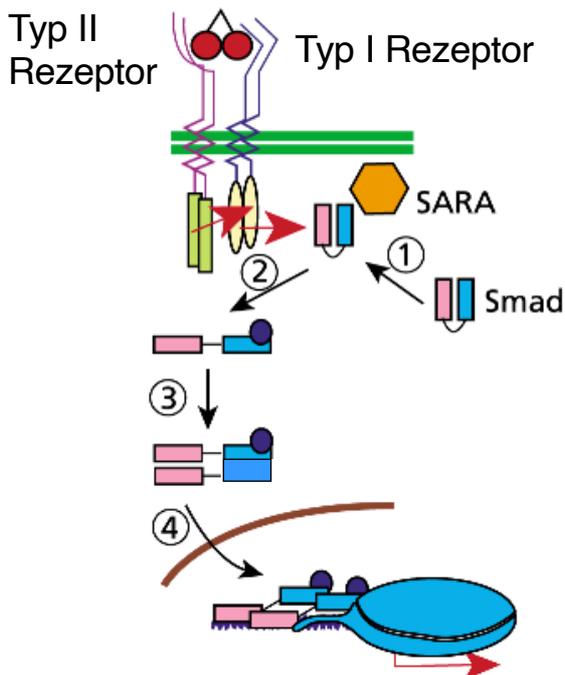


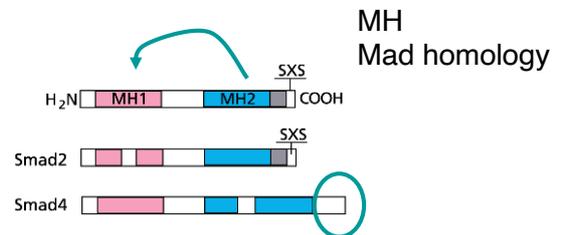
Figure 16-26  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
 © 2008 W. H. Freeman and Company



## TGF- $\beta$ Signaltransduktion

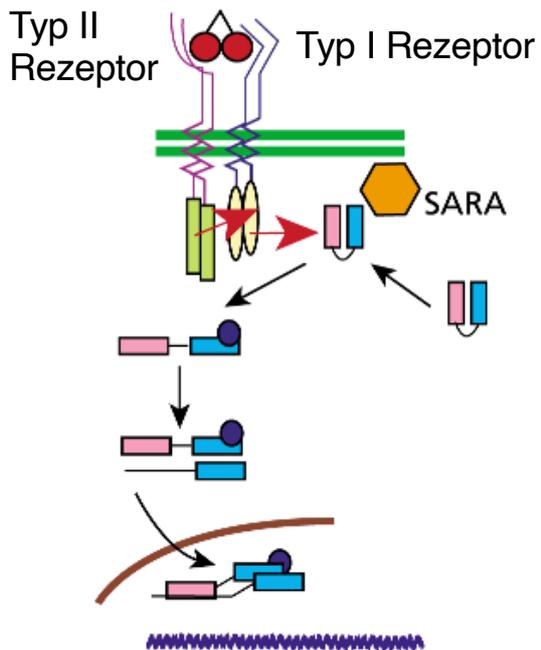


**SARA** Smad anchor for receptor activation

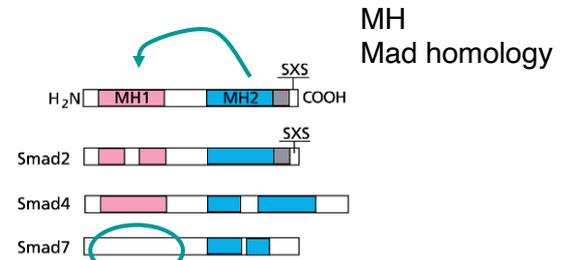


**Co-Smad:** kann nicht phosphoryliert werden.

# TGF- $\beta$ Signaltransduktion I-Smads



**SARA** Smad anchor for receptor activation



**I-Smad: kann nicht aktivieren.**

Ligand    R-Smad    Co-Smad    I-Smad

dbl-1	sma-2, -3	sma-4	
daf-7	daf-8	daf-3	

dpp	Mad	Medea	Dad
Dactivin	Dsma2		

BMPs	Smad1, 5, 8	Smad4	Smad6
activin	Smad2, 3	Smad4	Smad7
TGF $\beta$			