

Zusammenfassung Biologie 2. Semester

Inhalt

A: Biophysik der Zellen (K. Weiss).....	3
Vorlesung 1	3
Vorlesung 2	6
B: Zellbiologie der Prokaryoten	13
Zusammenfassung	13
Vorlesung 1	15
Vorlesung 2	25
Vorlesung 3	34
Vorlesung 4	42
C: Konzepte in Eukaryoten (Y. Barral).....	54
Vorlesung 1	54
Vorlesung 2	64
Vorlesung 3	69
D: Eukaryotische Genexpression (F. Allain)	75
Vorlesung 1	75
Vorlesung 2	83
Vorlesung 3	93
E: Kompartimente und Proteinsortierung (I. Zemp und U. Kutay)	104
Zusammenfassung	104
Vorlesung 1	107
Vorlesung 2	120
Vorlesung 3	128
F: Vesikulärer Transport (U. Kutay).....	137
Zusammenfassung	137
Vorlesung 1	140
Vorlesung 2	147
Vorlesung 3	155
Vorlesung 4	163
Vorlesung 5	171
G: Membranlose Kompartimente (K. Weiss)	179
Zusammenfassung	179
Vorlesung 1	179

Zusammenfassung Biologie Semester 2

Vorlesung 2	185
H: Zellteilung (M. Peter).....	189
Vorlesung 1	189
Vorlesung 2	196
Vorlesung 3	200
Vorlesung 4	207
I: Funktionelle Vielfalt bei Eukaryoten (Y. Barral)	213
Zusammenfassung	213
Voresung 1	213

A: Biophysik der Zellen (K. Weiss)

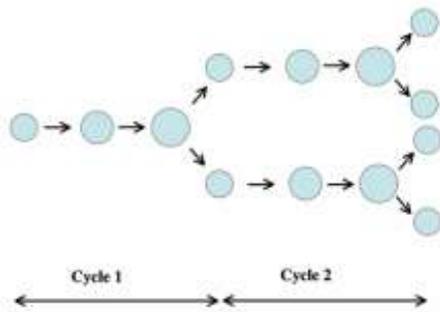
Vorlesung 1

Der menschliche Körper besteht aus **50-100 Trillionen Zellen**. Nur 10% davon sind menschliche Zellen, 90% sind Mikroben (**Mikrobiom**).

Robert Hooke

War der erste Wissenschaftler, der Mikroorganismen unter dem Mikroskop untersucht hat. Hat den Begriff Zelle erfunden.

Zellwachstum und Zellteilung



Das Zellwachstum und die Zellteilung laufen in koordinierten Zyklen ab (= Zellzyklus). Einer dieser Zyklen wird als Generation bezeichnet.

Zellen vermehren sich (in optimalen Bedingungen) Exponentiell (2^n).

Generation Time und Anzahl Zellen berechnen

$g = \frac{t}{n}$

$N_t = N_0 \times 2^n$

t = time of exponential growth (in min, h)
 g = generation time (in min, h)
 n = number of generations

N_t = number of cells at a certain time point
 N_0 = initial number of cells
 n = number of generations

Example: You inoculate a cell culture. The culture is growing exponentially. You measure the following cell numbers:

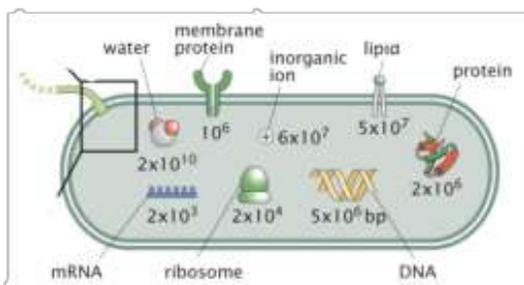
9.00 Uhr	10.00 Uhr
10^4 cells/ml	8×10^4 cells/ml

Generation time = ?

$$n = 3.3 \times (\log N_t - \log N_0) = 3.3 \times (\log 8 \times 10^4 - \log 10^4) = 3.3 \times (4.9 - 4) = 3$$

$$g = \frac{t}{n} = \frac{1 \text{ h}}{3} = 20 \text{ min}$$

Zellwachstum Rechnung



Eine E.Coli Zelle besitzt **3×10^6 Proteine**.

Wenn sie sich alle **20-30 Minuten (1500s)** teilt, so muss sie in diesem Fall **2000 Proteine/s synthetisieren**.

Ein **Protein hat ca. 3000aa**, somit muss der Translationsapparat **6×10^5 aa/s** verarbeiten.

Jede Zelle besitzt ca. **20 000 Ribosomen**.

Das bedeutet jedes Ribosom muss **30aa/s** translatieren.

Es wurde herausgefunden, dass **Ribosomen ca. 20-30aa/s synthetisieren können**. Das bedeutet, wenn die Zelle die höchstmögliche Teilungszahl erreichen will, müssen die Ribosomen an ihrem maximalen Translationsvolumen Operieren.

Die DNA Polymerase kann ca. **250-1000bp/s** replizieren. Das ist in etwa das, was die Zelle in einem Zyklus replizieren muss, um das gesamte Genom zu verdoppeln.

E. coli DNA: $5 \cdot 10^6$ bp

Generationszeit im Vergleich zum Zellvolumen

	Volume	Generation time
E. coli	1 fl	20-30 min
Budding Yeast	60 fl	90 min
Human Fibroblast (culture)	4300 fl	3440 min (24 hr)

Im Volumen um ein Vielfaches grössere Zellen müssen viel mehr Proteine synthetisieren, aber ihre Generationszeit ist trotzdem nicht viel höher (siehe links).

Das bedeutet, dass **grössere Zellen auch ein viel grösseren Protein und DNA Synthetisierungsapparat besitzen müssen.**

	Volume (fl)	Surface Area (mm ²)
E. coli	1	6
Yeast	60	80
Fibroblast	4,300	10,000

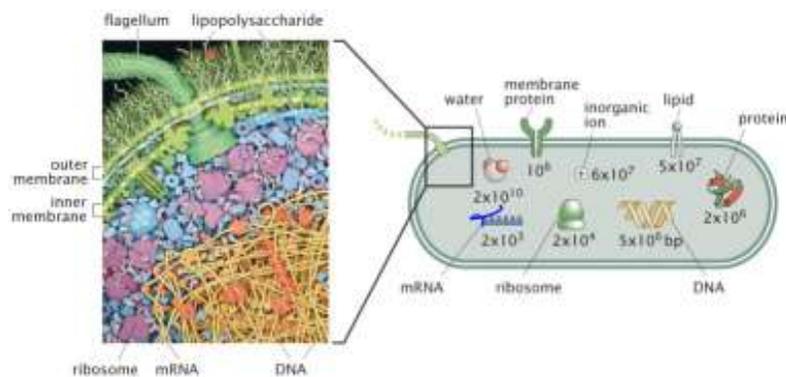
Ausserdem wichtig: Je grösser das Volumen einer Zelle, desto kleiner seine Oberfläche im Vergleich zum Volumen.

Die Oberfläche könnte also limitierend für das Zellwachstum sein.

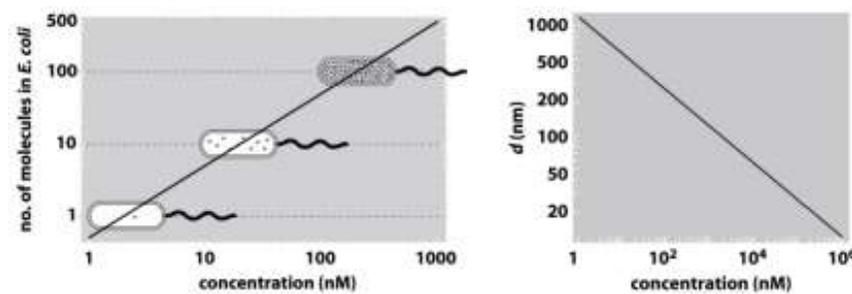
Otto Warburg

Hat herausgefunden, dass sich schnell teilende Zellen (Hefe, menschliche Krebszellen) oft Glykolyse betreiben. Somit scheint nicht die Anzahl Energie in Form von ATP limitierend für das Zellwachstum zu sein (Glykolyse erzeugt 2 ATP, Atmung 38 ATP), sondern die Anzahl Baustoffe.

Dicht bepackte Zellen



Zellen sind sehr dicht bepackt (crowded). Als Faustregel kann man sich merken, dass der **Abstand zwischen zwei Molekülen** etwa so gross ist, wie **das Molekül selbst.**



Je mehr Moleküle sich in einer E. Coli Zelle befinden, desto höher die Konzentration (nM). Je grösser ein Molekül, desto kleiner die Konzentration.

$d \sim c^{-1/3}$

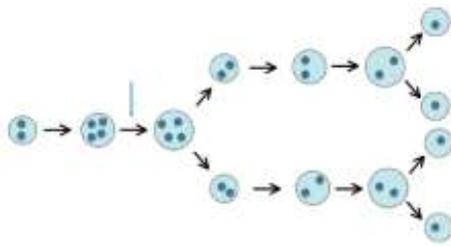
Entkopplung Zellwachstum und -teilung

Beispiel 1: Teilung ohne Wachstum im frühen Wachstum (Zellzahl wird erhöht, ohne Wachstum)

Beispiel 2: Wachstum ohne Teilung, beim Muskelzellen trainieren werden die Zellgrößen erhöht, aber es entstehen keine neuen Zellen durch Teilung

Antwortzeit (Response time)

Die Antwortzeit gibt an, wie schnell eine Zelle auf eine Veränderung reagieren kann (z.B. Änderung der Anzahl eines Proteins).



→ wenn eine Zelle ein Protein nicht mehr braucht, muss es es abbauen (AA wiederverwenden + Platzsparen)

Die Response Time ist für ein stabiles Protein nur von der Verdünnung durch Zellteilung abhängig. (Das stabile Protein wird mit der Zeit immer weniger vorhanden sein, bis hin zu komplett verschwinden durch Verdünnung).

Dies würde extrem lange dauern. Aus diesem Grund ist für die Zelle nicht nur Synthese, sondern auch Abbau wichtig.

Menge eines Proteins in einer Zelle werden also durch folgende Faktoren bestimmt:

1. Rate der Synthese
2. Rate des Abbaus (Degradierung und Verdünnung)

$$\frac{d[\text{protein}]}{dt} = k_{\text{production}} - k_{\text{decay}} \cdot [\text{protein}]$$

@ steady state:

$$\frac{d[\text{protein}]}{dt} = 0 \quad \text{or} \quad [\text{protein}]_{\text{st}} = \frac{k_{\text{prod}}}{k_{\text{decay}}}$$

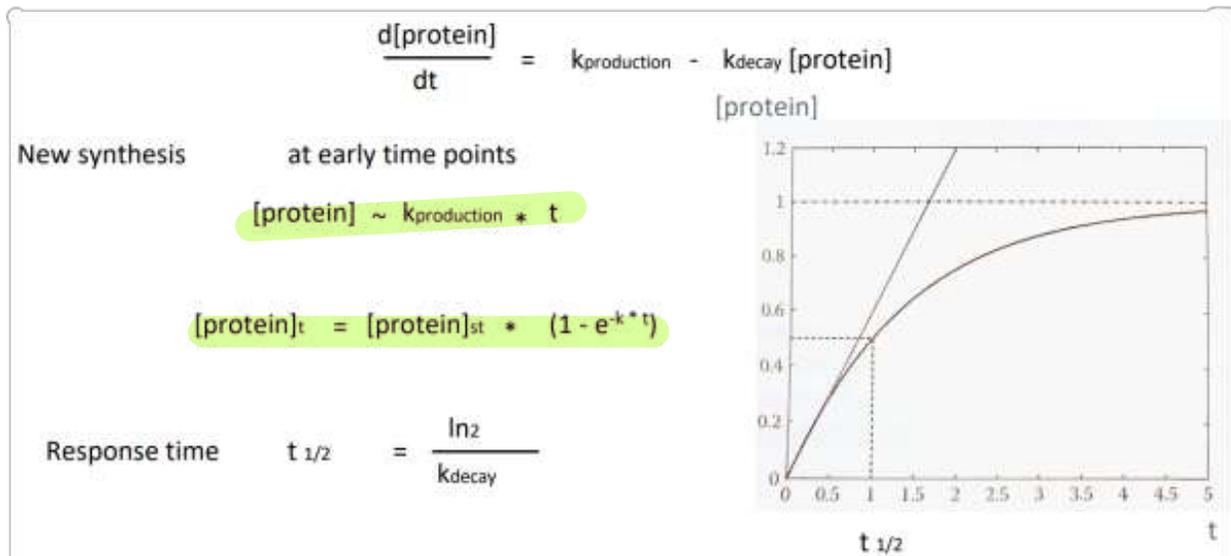
$\frac{d[\text{protein}]}{dt} = k_{\text{production}} - k_{\text{decay}} [\text{protein}]$

Complete Repression : $k_{\text{production}} = 0$

$$\frac{d[\text{protein}]}{dt} = -k_{\text{decay}} [\text{protein}]$$

$$[\text{protein}]_t = [\text{protein}]_{\text{st}} \cdot e^{-k \cdot t}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{\text{decay}}}$$



Die Response Time (Halbwertszeit) ist nur abhängig von der Abbaurrate. Die Syntheserate bestimmt zwar, wie steil obige Kurve ist, jedoch wie lange es geht, bis sich wieder ein neuer Steady State bildet ist nur abhängig davon, wie schnell ein Protein abgebaut wird.

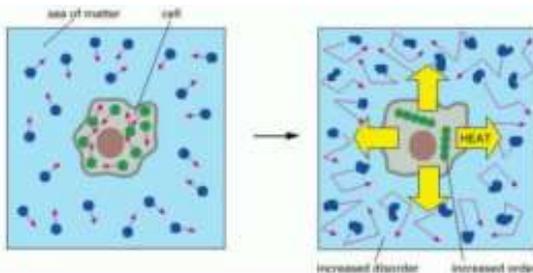
Folge: Ein Protein, welches sich schnell regulieren muss, muss eine kurze Halbwertszeit haben. Stabile Proteine, die sich nur durch Verdünnung abbauen können, haben eine sehr lange Halbwertszeit.

Dies ist ein Beispiel dafür, wo die Zelle "Energieverschwendung" in Kauf nimmt, um eine schnelle Reaktionszeit gewährleisten zu können.

Vorlesung 2

2. Gesetz der Thermodynamik

Der Gleichgewichtszustand der Entropie (= Mass der Unordnung) liegt auf der Seite der grösseren Unordnung -> 2. Gesetz der Thermodynamik. Will man wieder eine Ordnung erschaffen, so muss man Energie anwenden.



Zellen müssen konstant Energie aufwenden, um diesen Gleichgewichtszustand auf der Seite der grösseren Ordnung zu halten. Durch Abgabe von Hitze wird das mass Der Ordnung in der Zelle erhöht und das der Umgebung erniedrigt.

je höher Entropie desto unwahrscheinlich

Aber: Entropy ist nicht nur ein Mass der Unordnung, sondern eher ein Mass der Wahrscheinlichkeit. 1 Zustand

Beispiel: Box mit 1000 Münzen wird geschüttelt. Die Wahrscheinlichkeit, dass 500 Kopf sind und 500 Zahl ist höher als z.B. 1000 Kopf oder 1000 Zahl. Dies weil es viele verschiedene Möglichkeiten für 500/500 gibt, für 1000 Kopf/Zahl gibt es lediglich eine Möglichkeit.

→ zelluläre Makromoleküle verhalten sich zufällig nicht zielgerichtet

→ energetisch günstigere Ereignisse sind wahrscheinlicher

1.8872

$Entropie = \Delta S = R * \ln\left(\frac{P_B}{P_A}\right)$

$R = Gaskonstante = \frac{2cal}{K * mol}$

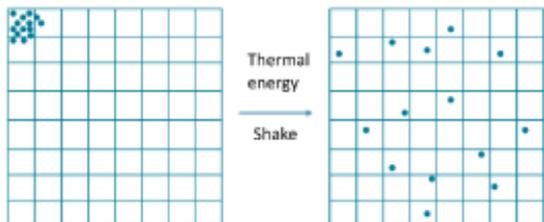
$\Delta S = R * \ln(10^{299})$ wenn gilt: 500/500

Die Gibbs Freie Energie wird definiert durch: Enthalpie minus Temperatur mal Entropie:

$\Delta G_0 = \Delta H - T\Delta S$

Was man daraus lernen kann: Die grösste mögliche Unordnung hat die grösste Wahrscheinlichkeit.

Diffusion



Wenn man eine Box mit Teilchen in einer Ecke schüttelt (Wärme) werden die Teilchen sich mit der Zeit am wahrscheinlichsten in der ganzen Box verteilen.

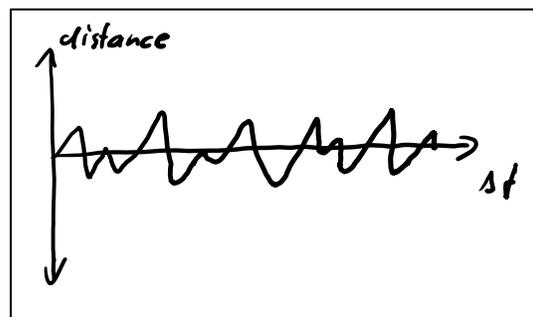
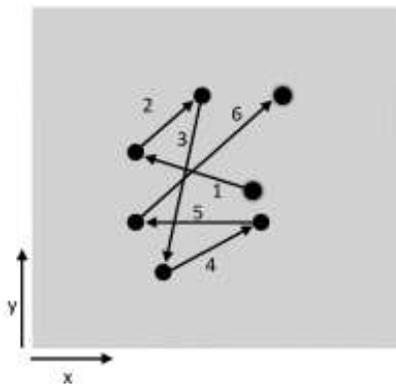
Am wahrscheinlichsten ist die grösstmögliche Unordnung. Das ist die Treibende Kraft der Diffusion.

Diese Art der nur durch die Temperatur abhängigen Diffusion wird Thermische (Brown'sche) Diffusion genannt. Diese Bewegung hat keine Richtung.

Thermische Diffusion beobachten, zwei Möglichkeiten:

1. Mehreren Partikeln über einzelne Schritte folgen
2. Einzelnen Partikeln über mehrere Schritte folgen

Ergodenhypothese



Im Bild Oben sieht man die Bewegung, die ein Teilchen machen könnte. Diese Bewegung wurde rechts in ein Diagramm eingetragen. Ist eine Bewegung x_i , dann gilt:

$Durchschnittsposition = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} = 0$ -> Da positive sowie negative x vorkommen

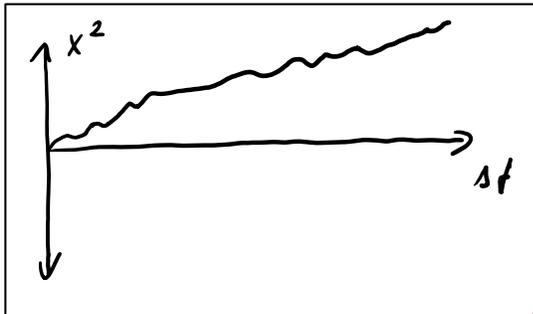
Also die Durchschnittliche Distanz nach einer gewissen Zeit eines Teilchens ist nach der thermischen Diffusion, wenn keine Zusätzliche Energie zugeführt wird am wahrscheinlichsten 0.

Befrag

Mean Square Displacement (MSD)

Nach einer Zeit durchschnittliche Verschiebung im Quadrat ist nicht 0 (es sei denn es fand gar keine Positionsänderung statt).

Durchschnittsposition = $\frac{x_1^2 + x_2^2 + x_3^2 + \dots + x_n^2}{n} = C$ -> Durch das Quadrat nur noch positive x



Dies führt zu folgender Gleichung:

$$x^2 = 2 * D * t$$

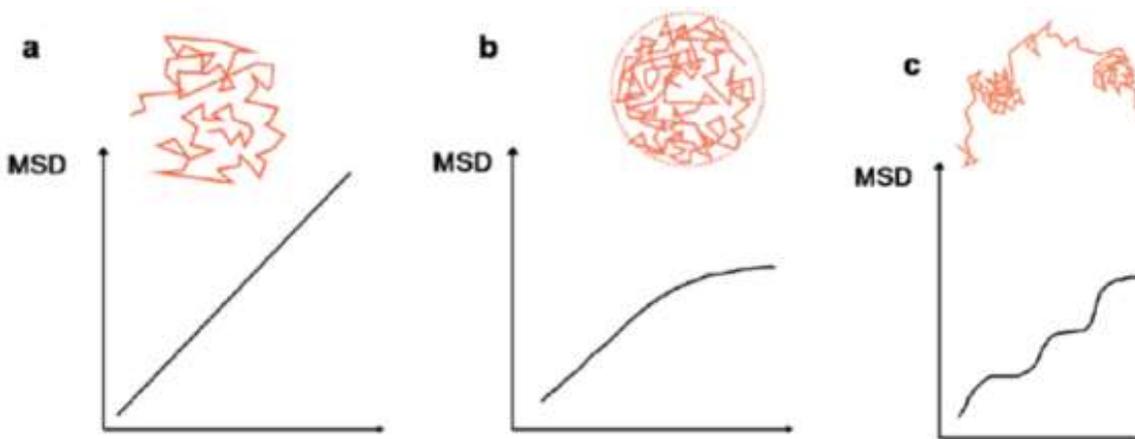
D = Diffusionskonstante t = Zeit

Einsteins Diffusionskonstante (T = Temperatur, kB = Boltzmann konstante):

$$D = \frac{T * k_B}{6 \pi r * viscosity}$$

↳ Dickflüssig

Drei Möglichkeiten für MSD:



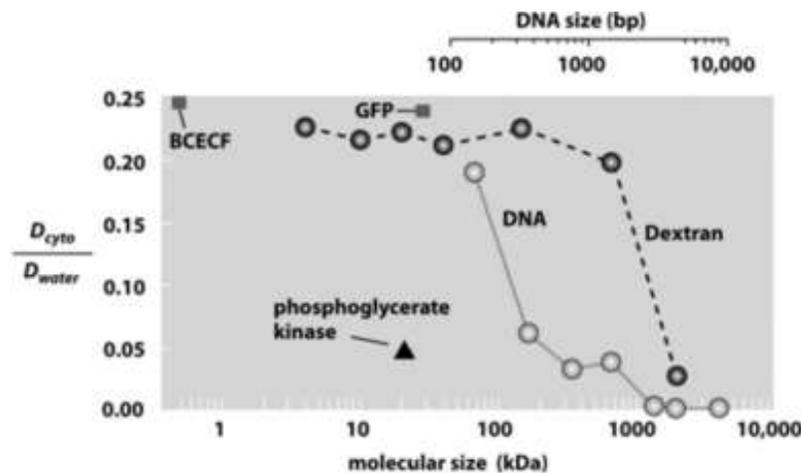
- a: MSD in Freiem Raum (z.B. Ozean) -> normale Diffusion
- b: MSD in beschränktem Raum (z.B. Gefäß) -> normale Diffusion
- c: MSD in der Zelle, da die Zelle sehr stark bepackt ist -> abnormale Diffusion

→ keine freie Bewegung durch äußere Korrelation beeinflusst

Zusätzlich: Fast exponentieller Graph: Kann sich um aktiven Transport handeln (siehe weiter unten)

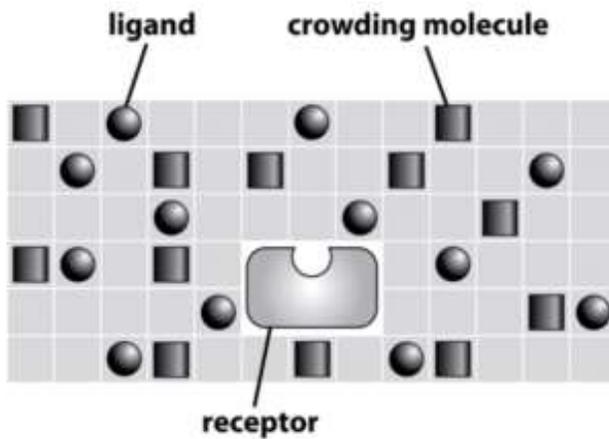
Vermutung

Das Diffusionsverhalten eines Moleküls ist auch abhängig von ihrer Grösse:



Dextran ist ein Zucker, welcher in verschiedenen Grössen vorhanden ist, genauso wie DNA.

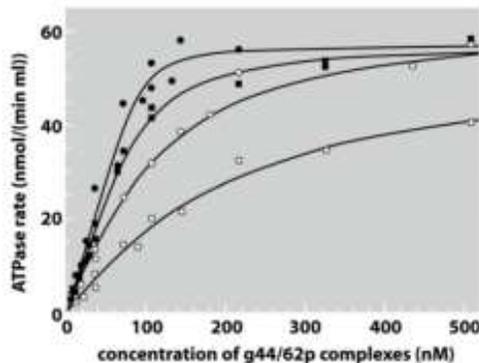
Je grösser das Molekül, desto kleiner auch das Verhältnis des Diffusionsverhaltens im Cytoplasma mit dem im Wasser. Oder je grösser das Molekül desto grösser die Differenz zwischen D von Cytoplasma und D von Wasser.



Im Bild links stellen die Kästen Möglichkeiten für Moleküle dar sich aufzuhalten. Überlegung: Wie wahrscheinlich ist es, dass ein Ligand den Rezeptor findet?

Crowding Moleküle sind (in unserem Modell) stationäre Moleküle, die die Ligandmoleküle bei der Diffusion behindern. Je mehr Crowding Moleküle desto grösser die Wahrscheinlichkeit, dass der Ligand den Rezeptor findet, da der Ligand weniger mögliche Wege zur Diffusion hat.

→ Crowding erhöht die «effektive» Konzentration



Dies lässt sich auch experimentell bestätigen: Auf der Grafik links wird die Kurve nach links verschoben, wenn crowding höher ist (schwarze Punkte). Somit wird die Wahrscheinlichkeit, dass Ligand und Protein zusammenstossen erhöht, je mehr crowding vorliegt.

Crowding hat also zwei Seiten:

Zwar verlangsamt es das Diffusionsverhalten von v.a. grossen Molekülen, auf der anderen Seite aber erhöht es die Wahrscheinlichkeit, dass ein Ligand ein Rezeptor trifft.

Molekulare Interaktionen: können auch dazu führen, dass Zellen sich in bestimmte Richtung bewegen

Passive Diffusion und aktiver Transport

Passiver Transport:

- Kein Energie Input
- Freie Diffusion / Brownian Bewegung
- Erleichterte Diffusion (durch Membranprotein)

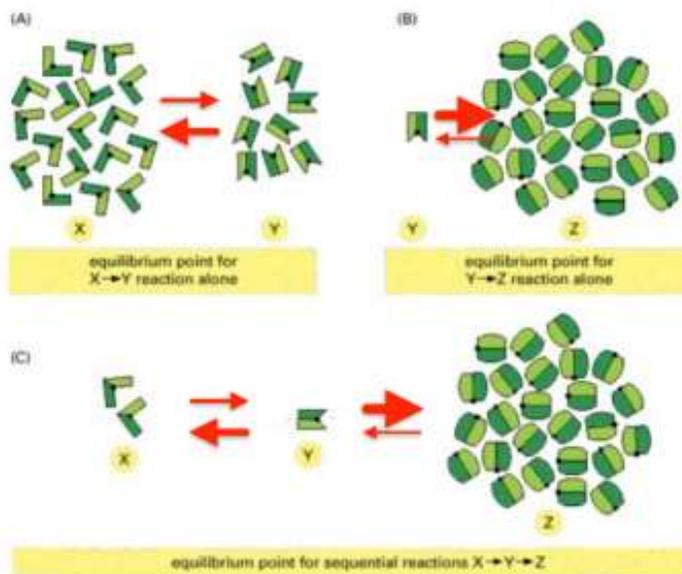
↳ Mit Gradient

Aktiver Transport:

- Transport durch Membrane (geg Gradient)
- Direkter Transport: Motorproteine

Zellen operieren nicht am Gleichgewichtszustand

So erzeugen Zellen Ordnung

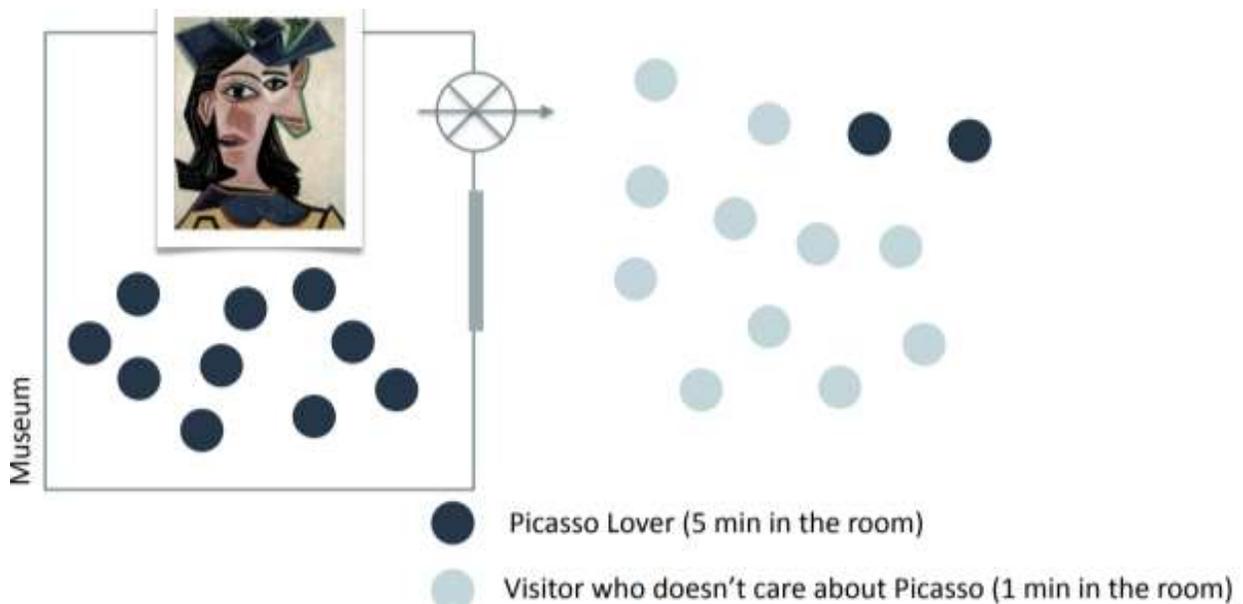


Ein für die Zelle unvorteilhafter Metabolit (x) und ein vorteilhafter (y) stehen im Gleichgewicht und das Gleichgewicht liegt auf der x Seite. Die Zelle erzeugt in diesem Fall Ordnung, indem **eine weitere Reaktion gekoppelt wird (y -> z)**. Bei dieser Reaktion liegt das Gleichgewicht auf der Seite von z. Dadurch **wird die Menge von x deutlich verringert**.

Am Ende wird trotzdem ein Gleichgewichtszustand ohne Nettofluss (x,y,z Menge ändert sich nicht mehr) erreicht.

Die Zelle generiert Nettoflüsse, indem zum Beispiel ATP verwendet wird um die Reaktion $y \rightarrow z$ irreversibel zu machen. Dadurch ist dann fast kein x mehr vorhanden.

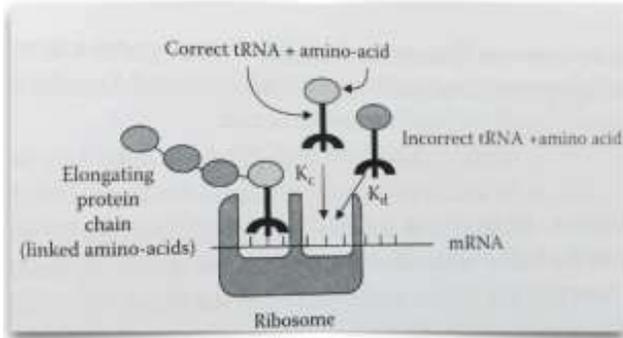
Beispiel wie ein Gleichgewicht verwendet wird um Ordnung zu Schaffen



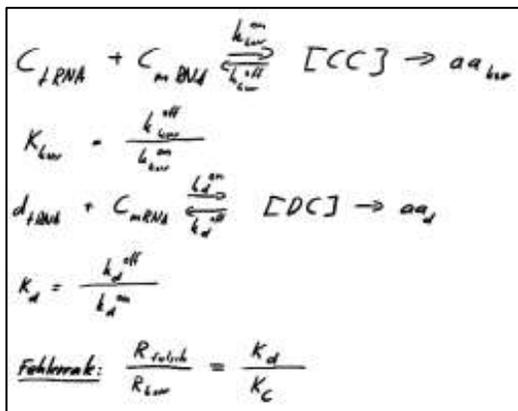
Zuerst wird raum geöffnet, da Picasso Liebhaber länger drin Bleiben ist Anteil an Liebhabern im Museum grösser. Dann wird nur noch ein one Way Ausgang geöffnet. Ergebnis: Alle Nichtliebhaber haben das Museum verlassen mit nur sehr wenig Einbusse an Liebhabern.

Also: Wenn man zuerst Equilibrium schliesst und dann mit einer irreversiblen Reaktion koppelt, so wird der gewollte Stoff häufig angereichert.

Beispiel aus der Biologie: Translation

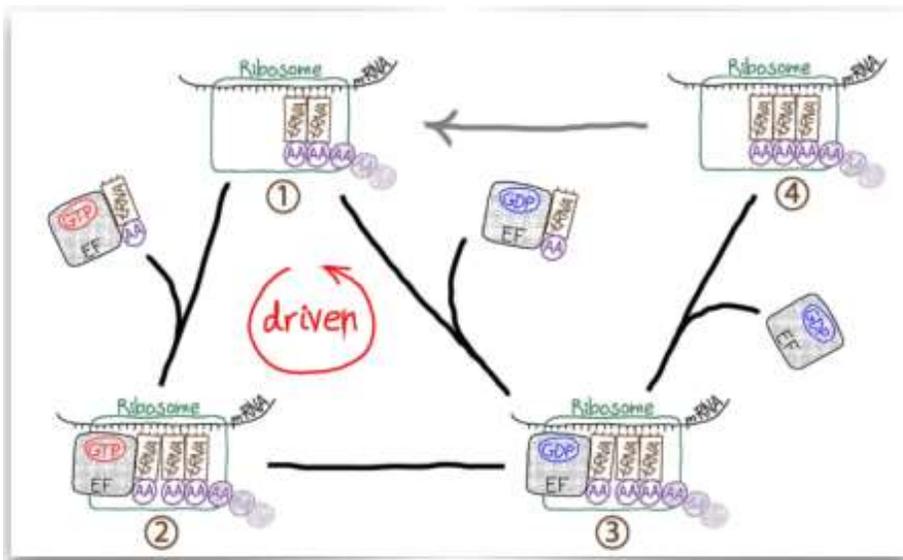


Zum Teil ist Unterschied zwischen tRNA Anticodons nur eine Base (sehr geringer Energieunterschied). Somit können Fehler entstehen (1:10000).



Links sieht man, wie die Reaktion der Bindung abläuft. Sowohl C als auch d tRNA kann an das Codon binden. Da die tRNA Moleküle zufällig an die Aktive Stelle des Ribosoms gelangen ist kon ähnlich. Lediglich koff ist stark unterschiedlich. Allerdings beträgt die Differenz der beiden k Werte lediglich 1/100.

→ welche länger bindet gewinnt



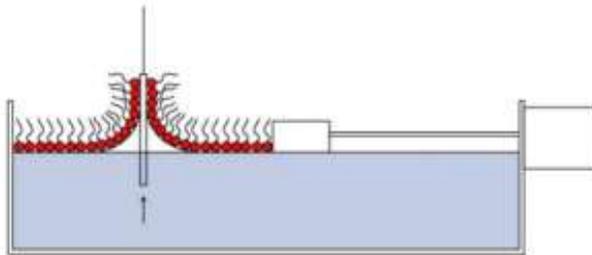
Die sehr geringe Fehlerrate wird so erreicht: GTP Ase (EF Tu) kann an tRNA binden und bindet zusammen mit tRNA an ein RNA Codon. Dann hydrolisiert GTP eine Phosphatbindung und erzeugt so ein «Drehkreuz» ähnlich dem Museumsbeispiel, denn die Reaktionen 2 -> 3 und 3 -> 1 werden irreversibel.

Dadurch ist die tRNA gezwungen länger an der RNA zu binden. Wenn die tRNA stimmt, so wird sie auch weiterhin binden (4). Stimmt sie nicht wird sie die RNA viel eher wieder verlassen (direkt

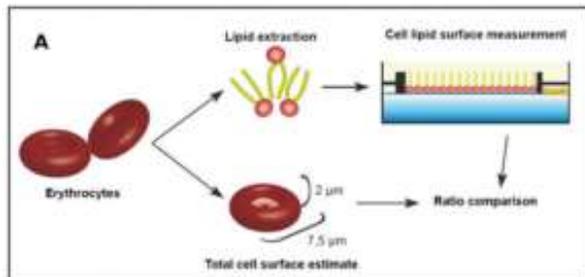
→ GDP kann nur bei richtiger Bindung dissoziieren, falsche tRNA kann nicht von EF-Tu dissoziieren
↓
Paarung

wieder zu 1). Am Punkt 1 kann die Reaktion von vorn beginnen. Die Zelle verbraucht also Energie, um die Fehlerrate zu erniedrigen. Diese Reaktion garantiert zusätzlich eine Fehlerrate von $1/100$ zusammen mit den anderen $1/100$ der unterschiedlichen k_{off} Werte ergibt sich eine Fehlerrate von $1:10000$.

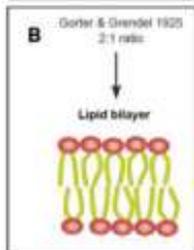
Gorter und Grendel Experiment



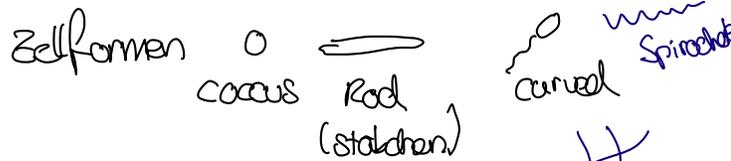
Links eine Skizze des Langmuir apparatus. Gorter und Grendel wollten 1925 dieses System verwenden, um herauszufinden, wie gross die Oberfläche einer Zelle ist.



Dies haben sie dann gemessen, genauso wie sie die Oberfläche einer Zelle abgeschätzt hatten. Sie fanden heraus, dass das Verhältnis geschätzter Oberfläche zu Lipid Oberfläche immer $1 : 2$ war. So haben sie entdeckt, dass es sich bei der Zellmembran um einen Bilayer handeln muss.



Doch es gab zwei Probleme mit dem Experiment: hätten sie andere Zellen (mit Intermembransystemen) verwendet hätten sie falsche Ergebnisse bekommen. Ausserdem haben sie unter dem Mikroskop nicht die richtige Form der Erythrozyten erkannt. Dies wurde durch Zufall ausgeglichen, da ihre Aufreinigung mit Azeton einen kleinen Teil der Lipide zerstörte.

Zellformen 

unterscheiden: • Ribosomale RNA 

→ hoch konservierte Regionen
 (unterscheiden Archaeen und Bakterien)
 → allgegenwärtig

B: Zellbiologie der Prokaryoten

Zusammenfassung

(Unbedingt können)

Zellgröße: 1µm

Vorlesung: 1 Prokaryotische Zellteilung und Form

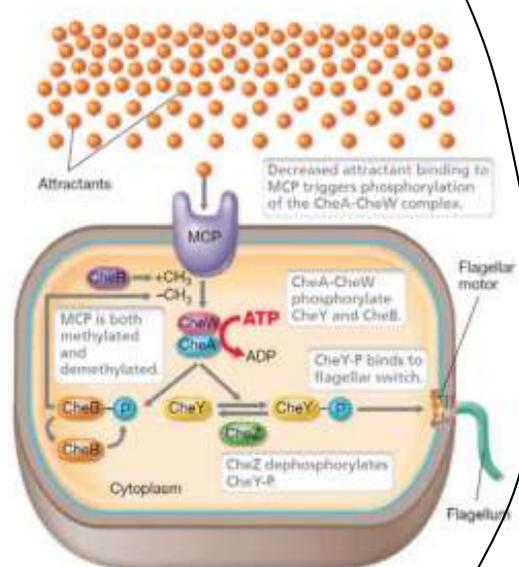
- Zellteilung ist für jede Spezies sehr wichtig
- Actin-, Tubulin- und ESCRT-III Homologe kontrollieren Zellteilung und -form ⇒ FISH (Fluorescent)
- Homologe in Archen und Bakterien (mit unterschiedlichen Funktionen?)
- Archaeale Versionen von Homologen sind Vorfahren von eukaryotischen Gegenstücken
- Diversität: Da drei Hauptmechanismen zur Verfügung stehen, und die noch mutieren können, gibt es eine grosse Diversität: Die phylogenetische Position von Prokaryoten kann nicht vorhergesagt werden durch seine Morphologie (= Form) und anders herum. Beispiel: Alphaproteobakterien besitzen alle eine unterschiedliche Form obwohl sehr nah verwandt.

Vorlesung 1: Zellstrukturen

- Bakterien und Archaeen haben unterschiedliche Lösungen für dasselbe Problem
- Die Zellhülle schützt (Chemikalien, Enzyme, Osmolyse...), es gibt mehrere Varianten
- Äussere Oberfläche Gram⁻ oder Kapseln: Zucker
- Äussere Oberfläche Gram⁺: modifizierte, phosphorylierte Alkohole
- Äussere Oberfläche Archaeen: Negativ geladene 2D kristalline Schicht (S-Layer)
- Das Cytoskelett der Bakterien kontrolliert die Zellhüllen Biosynthese, Wachstum, form sowie Zellteilung. Einige Elemente sind konserviert in Eukaryoten
- Barriere führt zu Transportproblemen -> Spezialisierte Lösungen (Transporter, Flipasen, äussere Membran Porine) erlauben den Zusammenbau äusserer Strukturen (Peptidoglycan, LPS) oder den Wechsel von Metaboliten

Vorlesung 2: Motilität (Fähigkeit zur Bewegung)

- Chemotaxis Rezeptoren erkennen Nährstoff Konzentrationen, welche 10 – 100 Mal kleiner sind, als die Zelle benötigt um Effizient wachsen zu können. Sie erhöht die Wahrscheinlichkeit der Zelle in strukturierter Umgebung (= Nährstoffe sind nicht gleich verteilt) schneller wachsen zu können.
- Biased random movement -> voraussagbare Bewegung in Richtung Attraktant aber nicht direkt (run / tumble)
- Die Motilität ist ein Beispiel der biologischen Signalübertragung
- Membran Rezeptoren = Sensoren
- Signalintegration durch CheY
- Signalverstärkung durch Protein Phosphorylierungs Kaskaden



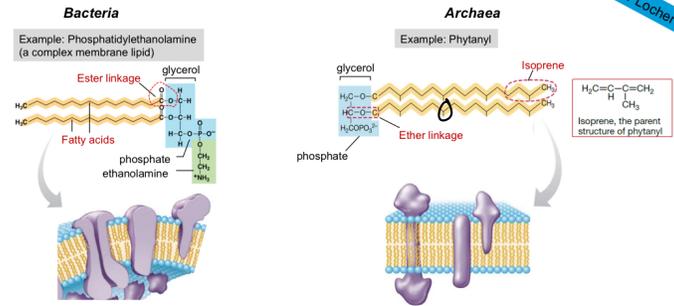
FRIT: Fluoreszente Einfärbung von Basensequenz → unterschiedlichen Spezies

Turbidimetrie: Brechung von polarisiertem Licht untersuchen

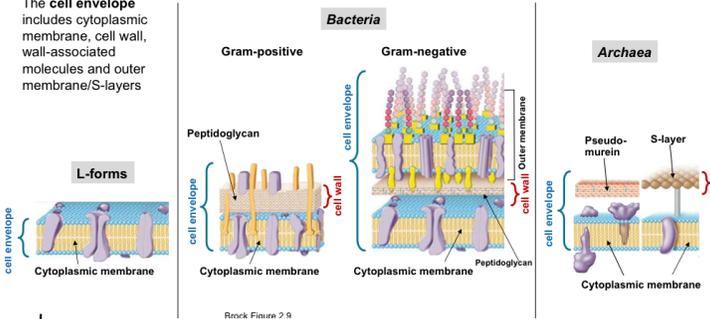
Cytoplasmatische Membran

Bakterien:

Super Locher



The cell envelope includes cytoplasmic membrane, cell wall, wall-associated molecules and outer membrane/S-layers



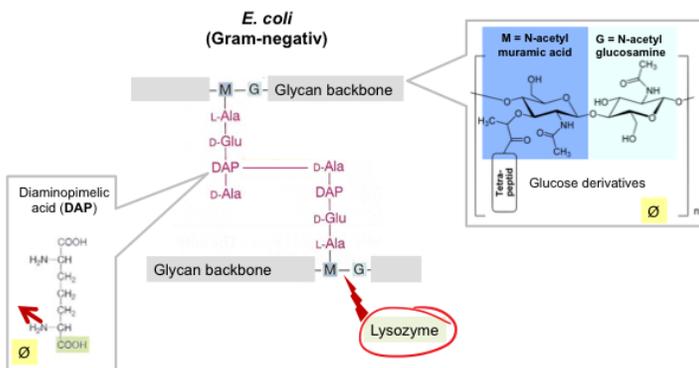
peptidoglycan ≈ Zellwand + murein

→ Zellwand schützt vor osmotischer Lyse
→ feste, flexible äußere Schicht ⇒ Netz

↓
bakterien ohne Zellwand → können aber eine auf
hoch sensitibel für osmotische Lyse

kann primordiales Verfahren von LUCA
ähueln

Peptidoglycan



wiederholende Einheit: Disaccharid - Tetrapeptid

→ Peptidgerüst enthält D-Ala
↓ (selten in Biologie)

Peptidbindung zwischen D-Ala und DAP

- Protein Phosphatasen werden verwendet, um das System zurückzusetzen (garantiert schnelle Reaktionszeit)
- Diversität der Rezeptoren, Signalkaskaden, ... zwischen den Bakterien **aber**: Bauplan der Flagellen ist grundsätzlich gleich, lediglich Unterschiede zwischen Bakterien, Archaeen und Eukaryoten

Vorlesung 2: Antibiotika

Antibiotika:

- Hindern Bakterien in ihrem Wachstum oder töten sie ganz
- Werden häufig aus Bakterien isoliert

Genetische Resistenz

- Mutationen
- Resistente Gene (möglicherweise auch aus anderen Stämmen)

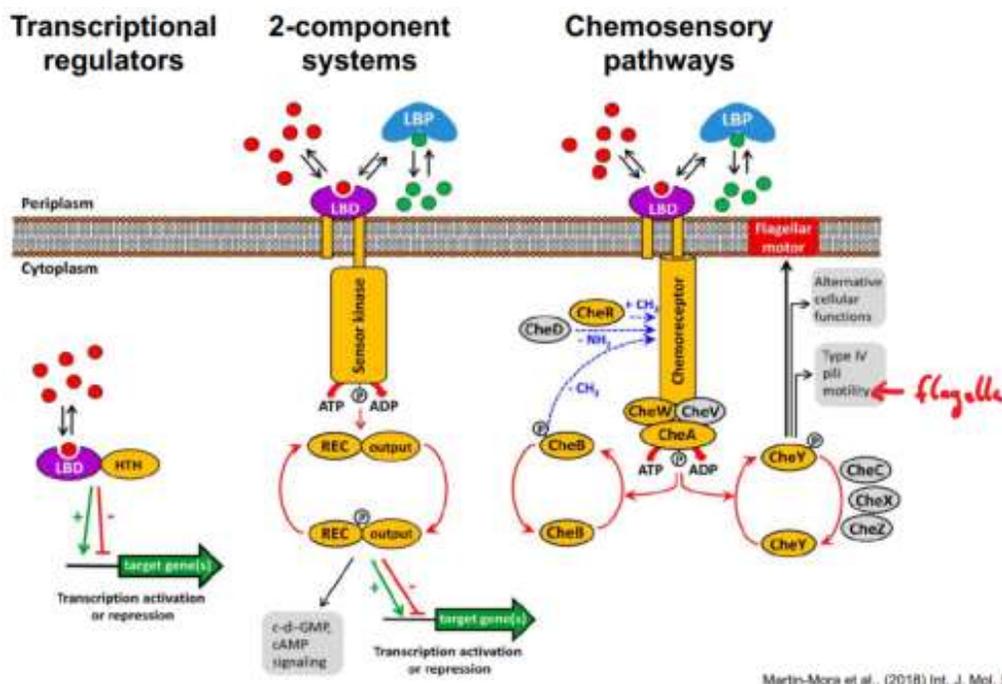
Toleranz, Persistenz

- Weitverbreitet
- Genotyp ist unverändert
- Kann Antibiotikatherapie erschweren

Endosporen

- Beispiel von Zelldifferentiation
- Genotyp ist unverändert
- Überleben über langen Zeitraum

Vorlesung 3: Die wichtigsten Transduktionssysteme der Bakterien

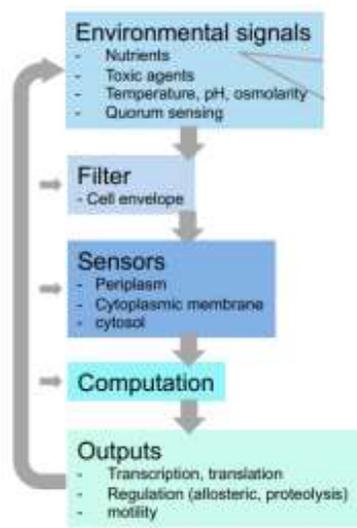


Bakterien analysieren die Umwelt (Chemikalien, Nährstoffe, Physio-chemische Parameter), welche als Input für das Berechnen der optimalen Anpassung dienen.

Die Zellhülle dient als Filter und beeinflusst so, welche Signale die Rezeptoren (LBD) erreichen.

In Bakterien kommen 3 Signal Transduktionssysteme häufig vor (siehe oben).

Vorlesung 3: Regulierung der Genexpression



Regulierung: Optimales Wachstum oder Überleben in einer bestimmten Umgebung

Sekundäre Messengers: Nukleotide Derivative

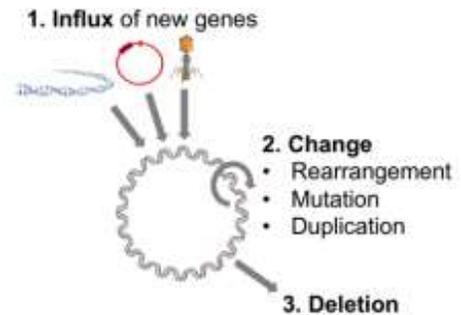
Gleichgewicht: wird erreicht in konstanten Umgebungen

Richtige Umgebungen sind **Strukturiert** und beherbergen **Interaktionspartner**

Da Umgebungen meist nicht konstant sind, müssen sich Bakterien konstant ändern (Interaktionsnetzwerke, Phänotypische Anpassung), siehe Schema links.

Vorlesung 4: DNA in Prokaryoten

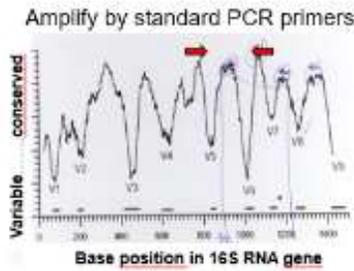
- Genome werden permanent evolviert
- Neue DNA wird durch horizontalen Gentransfer erworben
- Verteidigungen limitieren Vireninfektionen (Co-Evolution)
- Diversität durch Mutation, Genduplikation, Transposablen Elementen
- Genom Umlagerungen minimieren die Genomgröße und optimieren seine Struktur



Vorlesung 1

Mikrobiologie hilft, die Geschichte des Lebens besser zu verstehen (alles beginnt mit LUCA) und Mikroorganismen sind ein Prototyp des Lebens (einheitliche Prinzipien wurden von Prokaryoten übernommen und bieten spezielle Lösungen für z.B. Therapien oder Immunabwehr). Ausserdem gibt es praktische Gründe wie Biotechnologie, Risikobeurteilung, Düngung oder das Lösen von Antibiotika Resistenz Problemen.

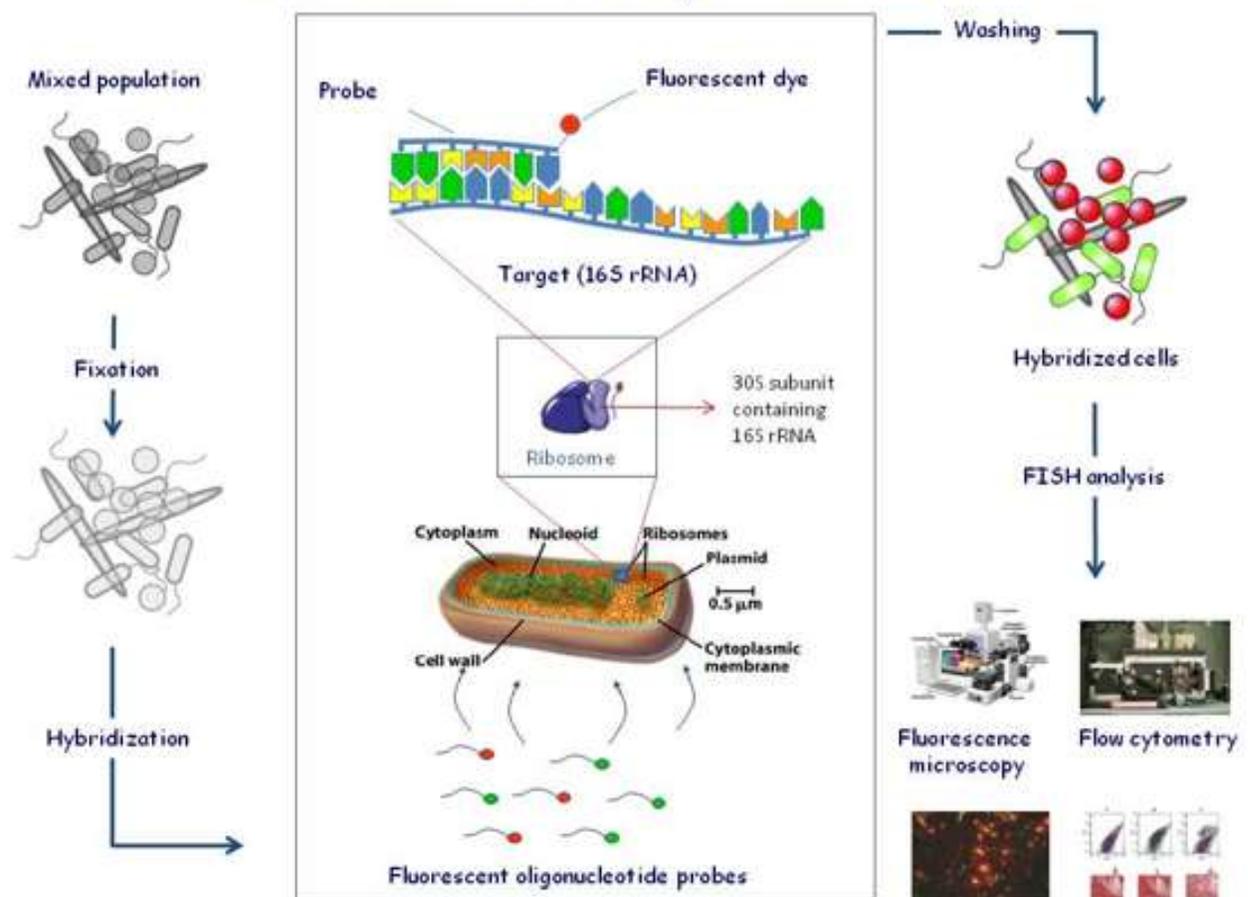
FISH



Fluorescent in situ hybridization färbt verschiedene Bakterien sodass sie unter dem Lichtmikroskop unterschieden werden können. Dabei werden konservative und nicht konservative Sequenzen von rRNA ausgenutzt (da sie in allen Organismen vorkommt). Durch die hoch konservierten Regionen lassen sich Bakterien von Archeen unterscheiden, durch die Variablen Regionen (V1 – V9) können dann Stamm, Gattung, Spezies... bestimmt werden.

Diese Technologie kann verwendet werden um Mikroorganismen zu entdecken, zu spezifizieren oder Ribosomale RNA Sequenzen zu erkennen.

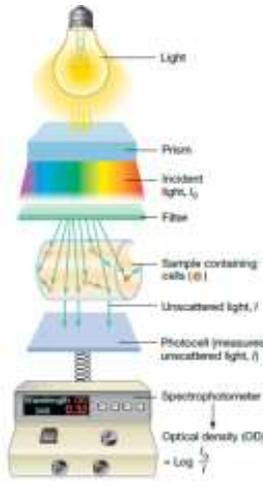
Fluorescent in situ Hybridization



Bakteriengröße

Bakterien sind klein (0.25 – 3 µm), dieses Wissen erlaubt zwei Dinge:

1. Sterilisierung einer Probe durch Filter mit z.B. 0.2 µm Porendurchmesser
2. Menge an Bakterien kann bestimmt werden durch Trübung einer Flüssigkeit (andere wellenlänge) -> Turbidimetrie, siehe unten

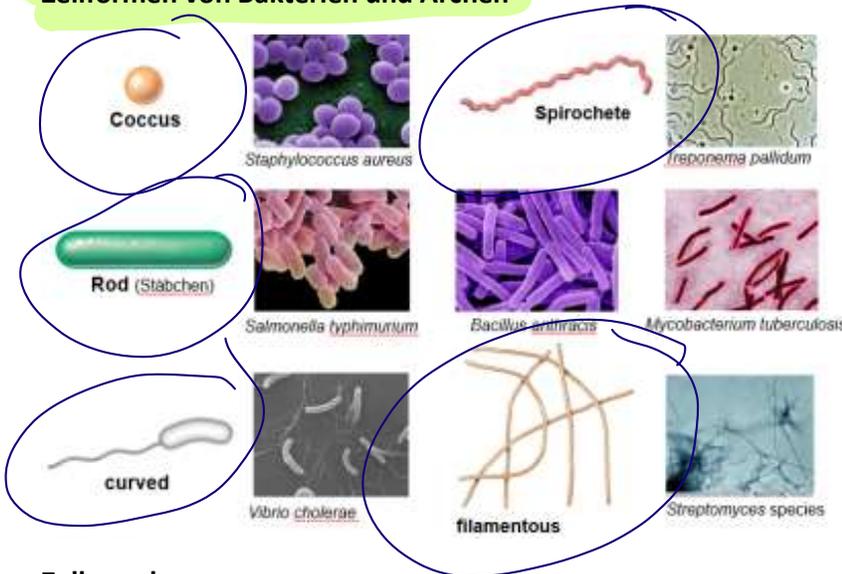


Der Tyndall Effekt ist: Licht streut sich durch Partikel, da es mit ihnen kollidiert. Je mehr Partikel, desto mehr streut es sich. Das Licht kann dann durch ein Spektrophotometer gemessen werden. ~~Je mehr Licht durchdringt, desto mehr Bakterien sind vorhanden.~~

E. coli: $1-2 \times 10^9$ Zellen / ml entspricht $OD_{540} = 1$

$\log \frac{I_0}{I}$ $I = \text{Lichtintensität}$

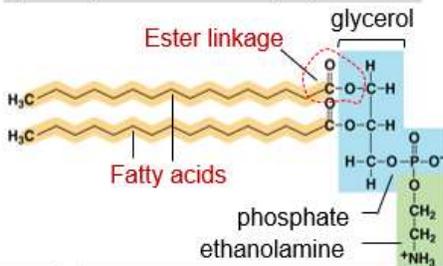
Zellformen von Bakterien und Archen



Zellmembranen

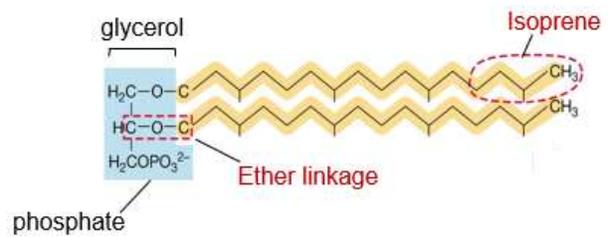
Bacteria

Example: Phosphatidylethanolamine (a complex membrane lipid)



Archaea

Example: Phytanyl



→ methyliert

→ keine Kopfgruppen

Wichtig: Phosphatidylethanolamin lernen!

Die Zellmembran hat 3 Aufgaben:

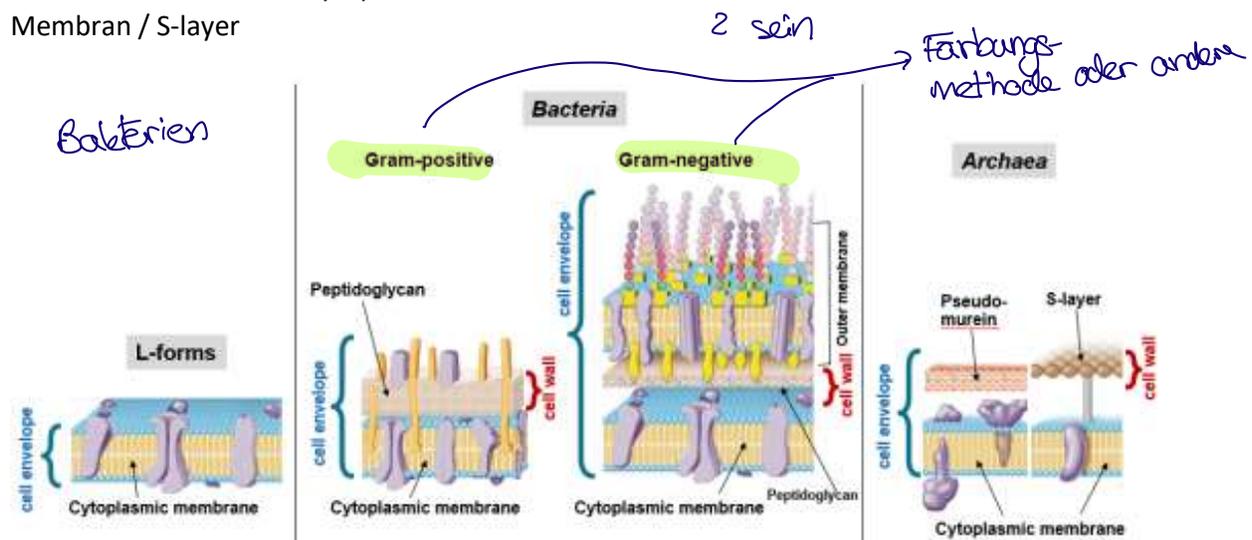
→ Gradient

1. **Permeable Membran** verhindert unkontrollierten Austausch von Makromolekülen und garantiert **evolvierbarkeit** (eine Zelle kann effizienter als eine andere sein)
2. **Proteinanker** für Membranproteine und Chemosensoren
3. **Batterie** Durch Protongradient kann ATP Ase ATP hergestellt werden (oder ATP aufwenden um Protongradient aufrechtzuhalten)

Zellhülle von Prokaryoten

→ Zellmembran gehört zur Zellkalle
→ nicht bei Eukaryoten

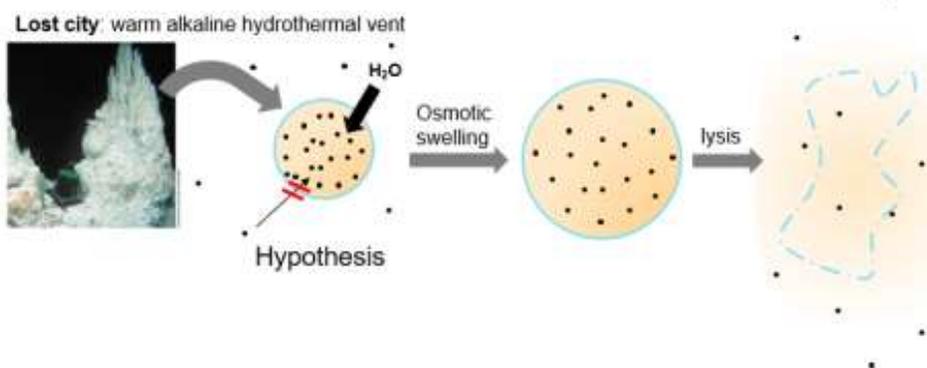
Die Zellhülle enthält die Zytoplasmamembran, Zellwand, Wand verbundene Moleküle und äussere Membran / S-layer



L-Form (sehr selten)

↳ 2 Membranen

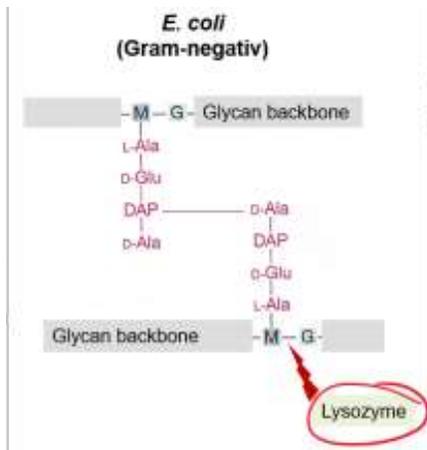
- Besitzen keine Zellwand (besitzen aber Enzyme um eine herzustellen)
- Möglicherweise war LUCA in L-Form
- Hochsensitiv zu Osmotischer Lysis (Auflösung von Zellen nach Zerstörung ihrer Membran)



Zellwand von Bakterien

Andere Worte für Zellwand sind: **Peptidoglyanschicht** und **Morinsacculus**. Sie schützt die Bakterie vom osmotischen Tod. **Evolution:** Bereits vorhanden in LUCA, Ursprung von Cytoskelett Proteinen und Glycosyl Transferasen. **Medizin:** Ziel einiger unserer besten Antibiotika und triggert die Immunantwort.

↳ weil wir keine Zellwand haben



Die Zellwand besteht aus sich **repetierenden Disaccharide-Tetrapeptide** (zwei Zuckerreste, M, G), welche durch u.a. **D-Aminosäuren** (sehr selten in der Biologie!) verbunden werden.

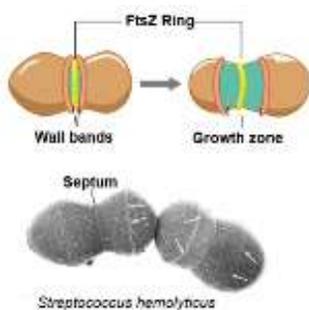
Es handelt sich um D-AS, um Protease Resistenz zu garantieren.

DAP ist eigentlich ein Lysine mit einer COOH Gruppe dran, es gibt auch die Möglichkeit, dass Lysine anstelle von DAP verwendet wird.

→ baut Proteine ab (von Enden)

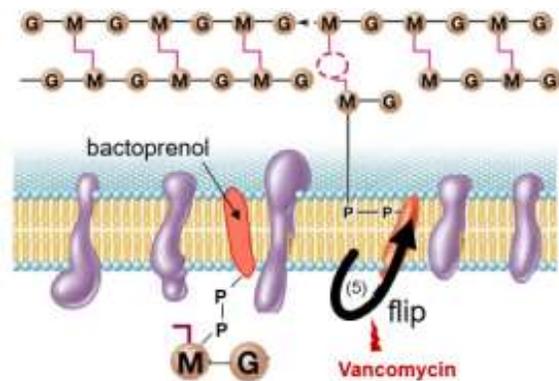
↓
deshalb Schutzsequenzen

Peptidoglycan Biosynthese



Um zu wachsen muss das Bakterium eine **limitierte Hydrolyse**, also einen **Schnitt der Zellwand** (durch **Autolysin Enzyme**) durchführen. Danach können durch eine **Synthese neue Murein Einheiten** hinzugefügt werden.

Links sieht man die Teilung von zwei Bakterien. Die Mureinschicht wächst nach innen (gelb) und in der Mitte dieser neuen Mureinschicht werden zwei Schichten durch Hydrolyse gebildet. Es entstehen zwei Zellen mit je eigener Zellwand, ohne Risiko durch osmotischen Tod.



Murein Bausteine werden vom zentralen Metabolismus geliefert. Es gibt ein Vorläufermolekül (**Penta-Peptid**, **roter Knick** sowie die beiden Zucker, M/G), welches an ein **Bactoprenol** bindet. Das Bactoprenol wird dann unter Energieaufwand mit dem Vorläufermolekül auf die andere Seite der Zellmembran gedreht und kann in die Zellwand eingebaut werden.

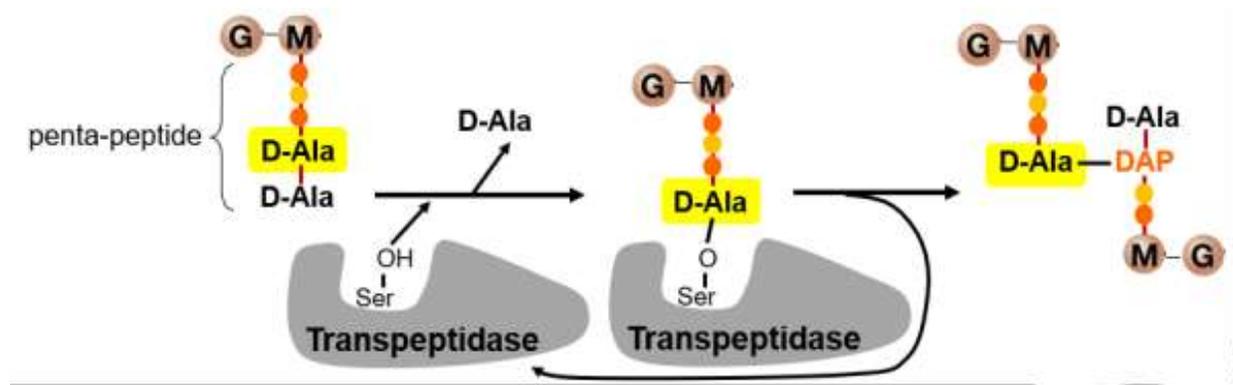
Murein Bausteine werden mithilfe von zwei enzymatischen Schritten (oft mithilfe desselben Proteins): **eingebaut**

1. **Transglycosylase** schafft eine neue Verbindung und fügt so den neuen Baustein in die Murein Schicht ein. Die **Energie kommt von der Phosphodiester Bindung am Bactoprenol**, welche dafür aufgespalten wird (**roter Kreis**). **Schwarzer Pfeil**
2. **Transpeptidase** spaltet eine Peptidbindung (ein D-Ala wird entfernt) und formt eine neue Peptidbindung (**schwarzer Pfeil**). Es wird aus einem **Pentapeptid ein Tetrapeptid**.

roter Kreis

↳ hinter DAP

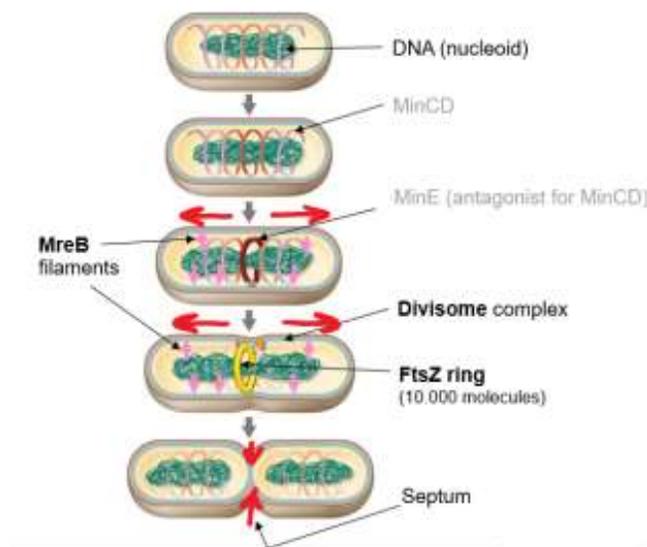
Transpeptidase



Penicilin und D-Ala-D-Ala sieht sich relativ ähnlich und kann so an die Transpeptidase binden. Danach führt eine chemische Veränderung im Penicilin dazu, dass die Bindung Penicilin-Transpeptidase irreversibel wird. Dies macht die Transpeptidase unbrauchbar. Dies führt zu «Löchern» im Mureinsacculus und später zum Zelltod durch Osmose (Zelle platzt da sie zu viel Wasser aufnimmt).

↳ irreversibler Inhibitor

Regulierung des Peptidoglycan



Wie man im Bild links sehen kann, gibt es zwei Wachstumszonen für neues Murein:

- Entlang der Bakterienachse: Wird durch MreB Filamente reguliert, welche
- Beim Septum: Für die Zellteilung muss in der Mitte der Zelle neues Murein gebildet werden (siehe oben). Dieser Vorgang wird durch FtsZ kontrolliert.

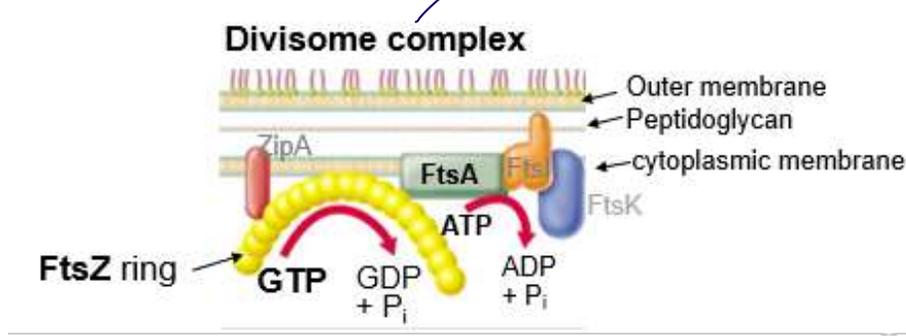
Im Bild links in Grau sind Antiregulatoren (verhindert, dass FtsZ sich an der falschen Stelle aufbaut, zwingt es, eine ringförmige Struktur in der Mitte zwischen einer sich teilenden Zelle aufzubauen).

Wichtig:

- Wachstum wird stark reguliert
- Stäbchenbakterien wachsen wie oben gezeigt (entlang ihrer Achse und in der Mitte)
- Cytoskelett Proteine Rekrutieren und bewegen Proteine, welche für die Peptidoglycan Synthese benötigt werden.

Zellteilung

Zellteilungskomplex



Divisome Komplex =
 Murin Biosynthese
 Maschinerie =
 Koordination von
 Chromosomteilung,
 Peptidoglycan und
 Membranbiosynthese
 am Septum

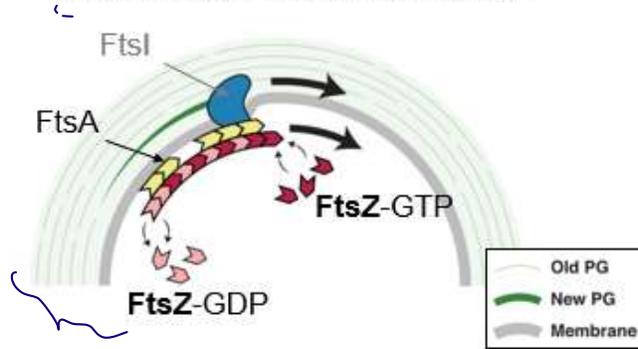
Wichtige Divisom Proteine (**merken, die anderen oben nicht**) verantwortlich, den Divisom Komplex zu bewegen:

FtsZ: GTPase, Koordiniert Z-Ring formation, bewegt divisome (FtsZ = Tubulin Homolog*)

FtsA: ATPase, Rekrutiert FtsZ und andere Komponenten (FtsA = Actin Homolog*)

*sind bei Eukaryoten zentrale Elemente des Zytoskeletts

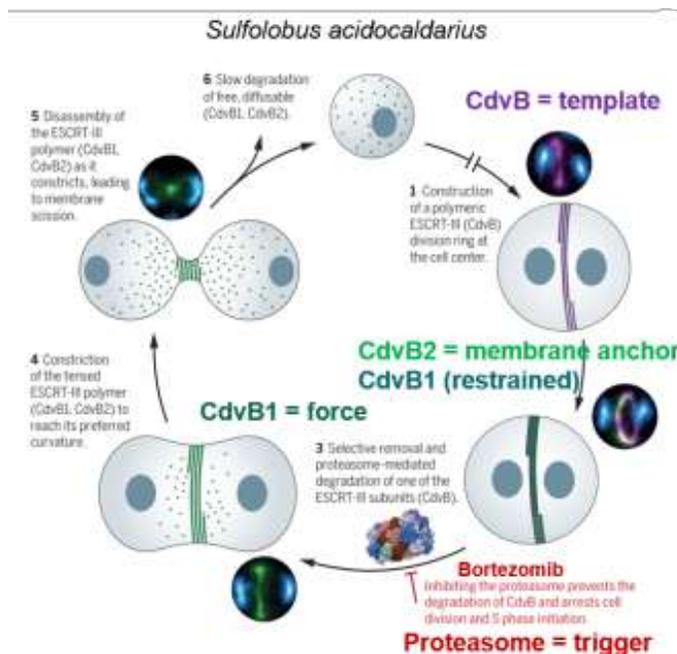
Treadmilling model for cell division



Septum

FtsZ-GTP wird vorne an den Komplex binden und hydrolysiert werden. Sobald dies geschehen ist, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass es aufhört an den Komplex zu binden. Dies wird immer wiederholt und mit der Zeit bilden sich kleinere Kreise am Septum. So kann FtsZ eine gerichtete Bewegung für den Divisome Komplex erzeugen.

Zellteilung in Eukaryoten



ESCRT-III Komplex und der 20 S Proteasome sind homolog und kommen sowohl in Hefe (Eukaryot) als auch in Archaeen vor.

besitzt, teilt beide Tochterzellen

Prokarioten

Template bildet CdvB1 und CdvB2 Komplex aus, diese Proteine sind dieser ESCRT-III Komplex.

Die 20 S Proteasome wirken als Trigger: Das Template wird abgebaut und es kommt zu einer Abschnürung durch Kraft aus dem CdvB1.

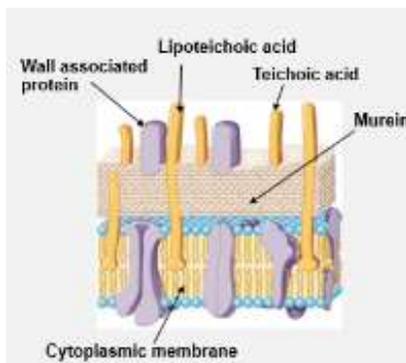
Protein Superfamilien, welche das Cytoskelett sowie Membran Form/Teilung kontrollieren haben einen prokaryotischen Ursprung. Sowohl Prokaryoten als auch Eukaryoten können diese 3 Superfamilien besitzen und sogar mehrere.

Diese Superfamilien sind:

- PspA / ESCRT-III
 - FtsZ / Tubulin
 - FtsA / Actin
- Prokaryoten* (handwritten) points to the first two items. *Eukaryoten* (handwritten) points to the last two items.

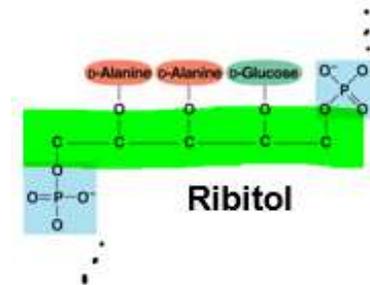
Funktionelle Diversität: Zusätzliche Domänen haben unterschiedliche Effekte auf die Zellform und Lebensfähigkeit.

Gram Positive Zellhülle → Farbe bleibt weiß in Mureinschicht
langer



Grampositive Bakterien besitzen einen «Panzer» aus vielen Murein Schichten.

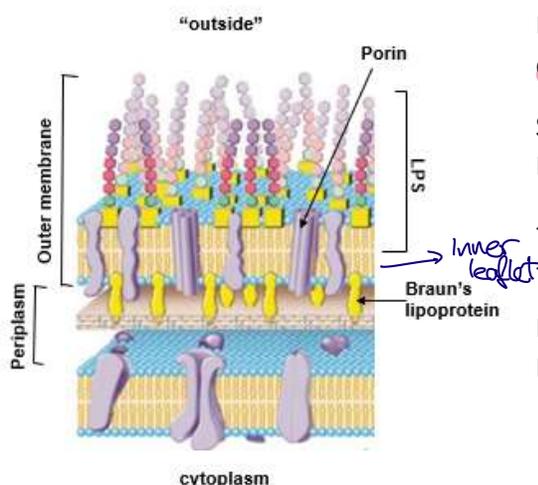
Dieser ist durch kovalente Bindungen Modifiziert mit Teichonsäuren (rechts, lange Ribitol Stränge, welche D-Ala und Glucose enthalten und durch Diesterverbindungen miteinander verbunden sind.



Lipoteichonsäuren sind wie Teichonsäuren aufgebaut, besitzen aber einen Membranlipidanker und sind mit der Cytoplasmamembran verbunden.

Durch die Phosphatreste besitzen Gram Positive Bakterien eine negative Ladung an ihrer Oberfläche.

Gramnegative Bakterien



Besitzen eine dünne Mureinschicht und Ausserhalb eine Membran. → viel Zucker

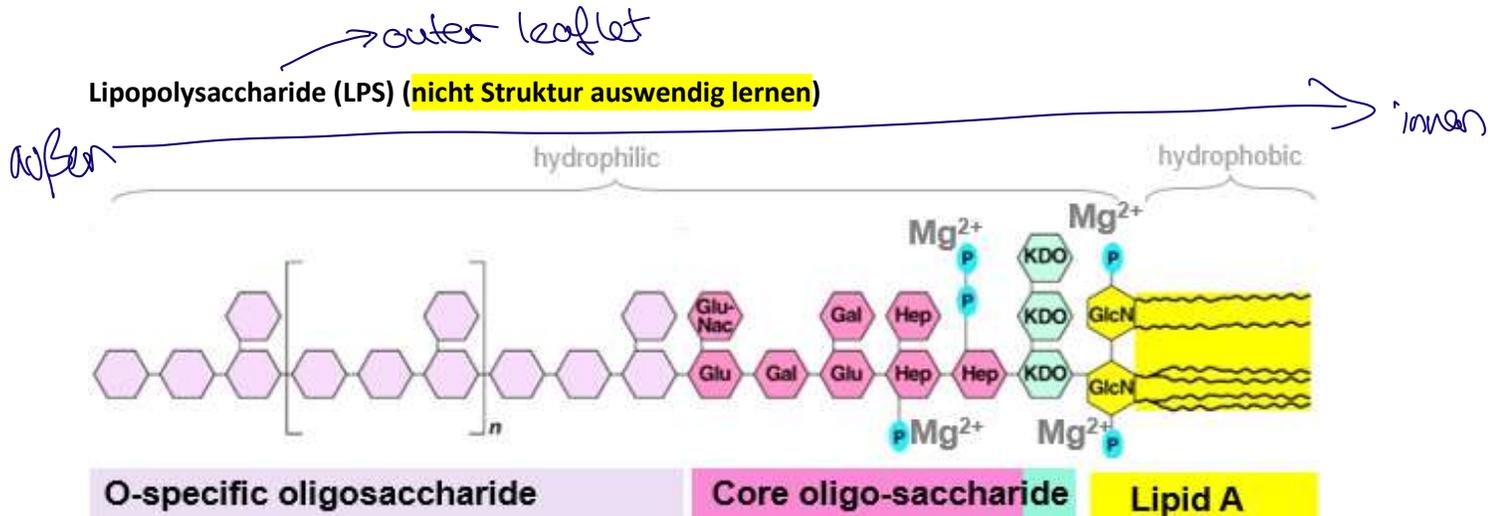
Sind asymmetrisch aufgebaut (was speziell ist für biol. Membranen):

- Outer Leaflet = LPS (Lipopolysachharide)
- Inner Leaflet = Vor allem Phosphatidylethanolamine

Proteine: Porine, Brauns Lipoprotein (verbindet äussere Membran mit Mureinschicht), Oberflächenorganellen

Aufgaben:

- Schützt die Zelle durch Kontrolle der Aufnahme von Gallensalzen, Antibiotika, Proteasen, Lysozyme, Antimikrobiologischen Peptiden
- **Periplasma** ist eine Lücke zwischen Cytoplasma und äusserer Membran. In ihm befinden sich z.B. Nährstoffe, dass die Zelle Stoffwechsel betreiben kann
- Durch die äussere Membran hat die Zelle nur begrenzten Zugang zu Nährstoffen. **Porine** erlauben den Zugang zu kleinen Nährstoffmolekülen



O-spezifische Oligosaccharide

Besteht aus repetitiven Oligosaccharide Einheiten -> gram Negative sind «Zuckerumhüllt»
O-Antigen ist sehr variabel zwischen den Strängen

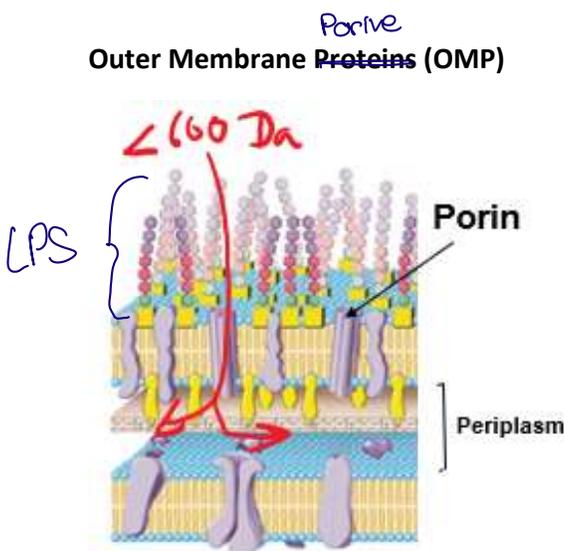
Kern Oligo Saccharide

Barrierefunktion, die Phosphatgruppen werden durch positiv geladene Ionen (Mg) abgepuffert, welche verhindern, dass sich die Membranlipid Bestandteile voneinander abstossen.

Lipid A

Ein sehr langes Membran Lipid mit 4-7 Acyl Seitenketten. Ist stark konserviert und ein Schlüssel Trigger für die tierische Immun Verteidigung (Endotoxin)

Outer Membrane Proteins (OMP)



Die Äussere Membran wirkt wie eine Barriere

Porine formen Wasser gefüllte Poren (ca. 1 nm) in der äusseren Membran. Durch diese können kleine (< 600 Da) hydrophile Moleküle ins Periplasma diffundieren.

Will sich also eine gram Negative Bakterie von Proteinen ernähren, so muss diese zuerst Proteasen ausschütten, die die AS abbauen und diese können dann ins Periplasma gelangen.

Grösse: 34 – 37 kDa ⇒ Porine

Spezifische Porine: z.B. für Vitamin B12

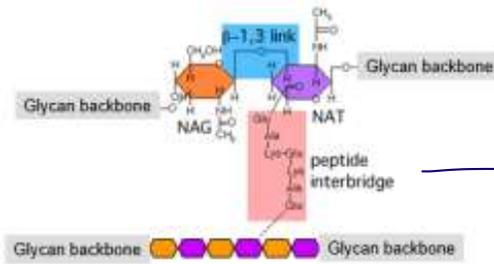
Porine

Zellhüllen auflösen (z.B. um an die DNA zu gelangen)

1. EDTA verwenden, um Mg^{2+} mit $Tris^+$ zu ersetzen
2. Lysis mithilfe von alkalischen Detergentien (SDS, NaOH)

Zellhüllen von Archaeen

Pseudopeptidoglycan (exakte Struktur nicht auswendig können)

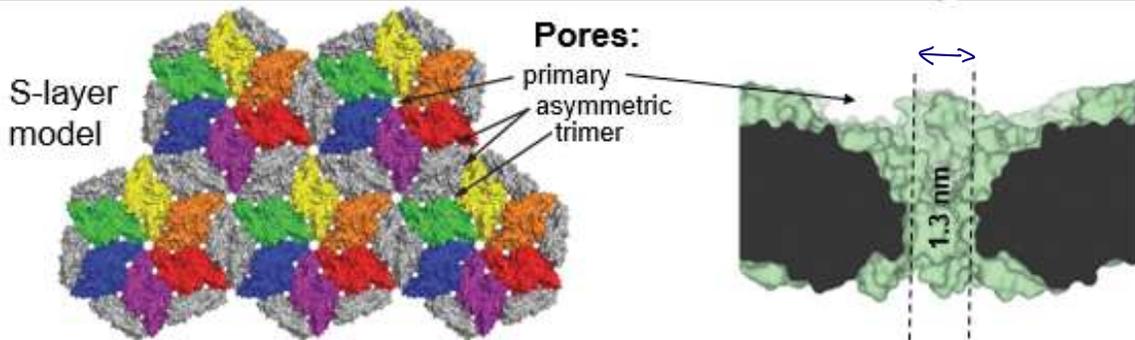


Stoffe, die eine B-1,4 Verbindung (bei Prokaryoten) knacken können, können die B-1,3 Verbindung von Archaeen nicht durchbrechen.

andere AA

S-Layer (= Surface Layer)

Selbst polymerisierende Oberflächenproteine, welche einen 2D kristallinen Surface Layer an der Oberfläche der Archaeen bilden. Diese enthalten negativ geladene Poren mit ca. 1.3 nm Durchmesser.



Kapseln

Kapseln = Dicht angehängte äussere Schicht, welche kleine Partikel abhält

↳ bildet } außen

Schleimschicht = Weniger dicht angehängt, hält keine kleinen Partikel ab

Zusammensetzung: Polysaccharide (inkl. Amino-Zucker, Polyalkohole), variable Dicke

Funktion:

- Adhesion → Halten
- Biofilm formung → Schleim ist Art Biofilm
- Anti Phagazytose (aufnehmen der Bakterienzelle durch eine eukaryotische Zelle)
- Gegen Austrocknung

Diversität: Sogar bei strängen derselben Spezies (welche Zucker genau aneinander gehängt sind, wie modifiziert...)

Vorlesung 2

Chemotaxis

1 Zelle bauen: 16×10^9 ATP Moleküle und 3×10^9 Glukose Moleküle (aerobisch)

Lösungen:

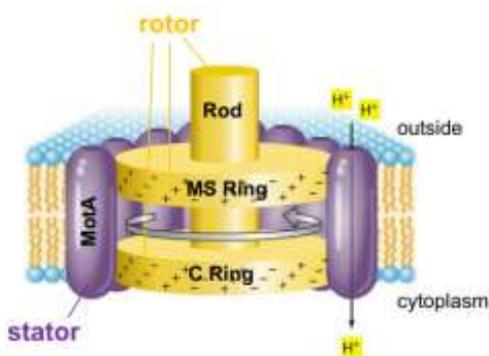
- Anpassen: Die richtigen metabolischen Wege gehen, Hydrolasen absondern, Andere Zellen töten, Kooperation
- Bewegen: Neue Quellen erreichen
- Einfrieren: Sporen, Persister Zellen
- Ändern: Neue DNA erwerben

Flagellen

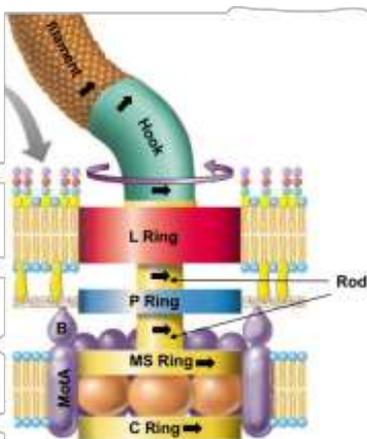
Bakterien benutzen Flagellen um sich in Richtung für Wachstum und Überleben günstige Umgebungen zu bewegen. Der Mechanismus ist in allen Bakterien relativ konserviert. Die maximale Geschwindigkeit beträgt 60x Zelllänge pro Sekunde.

Flagellen sind rotierende Maschinen und sie kommen unterschiedlich in Bakterien vor: Polares Flagellum (einfach begeißelt) oder peritrichöses Flagellum (mehrfach begeißelt).

innere Membran



Der Rotor dreht sich und der Stator ist starr. Durch einen Protonengradienten werden Protonen durch H⁺ Turbinen (Mot Proteine) von aussen nach innen befördert. Dies führt zu einer Drehbewegung des Rotors (C, MS Ringe) und dieser wird an den Rod übertragen und von diesem zum flagellaren Filament.



Die L und P Ringe drehen sich nicht und wirken wie ein Lager für den Rod.

Der Hook sorgt dafür, dass die Bewegung, die senkrecht von unten kommt in eine Horizontalbewegung gedreht wird.

innere Membran

Wichtige Zahlen und Fakten von Flagellen (lernen!):

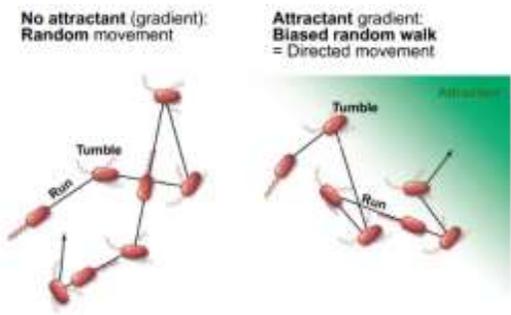
Energiequelle: H⁺ Gradient

Rotationsgeschwindigkeit: $100 - 300 \text{ s}^{-1}$

Energieoutput: 10^{-16} W

Geschwindigkeit: 60 Zelllängen/s = 17cm/h

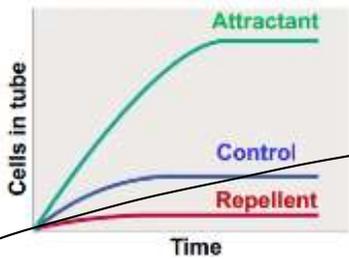
Betriebskosten: 0,1% Totaler Energieverbr. Synthesekosten: 2% der Totalen Biosynthese
von ganzer Zelle



Bewegung in Richtung Chemikalien wird **Chemotaxis** genannt. Z.B. O₂, Licht und Osmolarität können Taxis Reize sein.

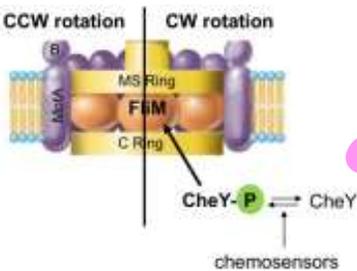
Chemotaxis: Bakterien erkennen temporäre Gradienten. Ein positiver Gradient eines Attraktanten bewirkt längere Runs, weniger Tumbles.

Chemotaxis Messen



In einer Kapillare befindet sich ein **Attraktant**, nichts (**Control**) oder ein für Bakterien gefährlicher Stoff (**Repellent**). Nach einer gewissen Zeit lässt sich die Bakterienkonzentration bestimmen. Sie ist links aufgezeigt und stimmt mit der Theorie überein.

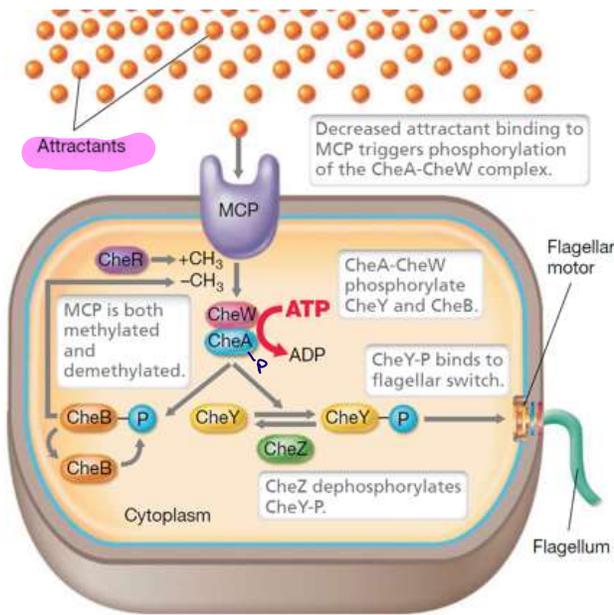
Rotation umkehren



Das CheY Protein kann **Phosphoryliert** werden und an das **FliM** des Rotors binden (**CW rotation**, Polar begeißeltes Bakterium schwimmt rückwärts). Wenn kein phosphoryliertes CheY Protein angehängt ist, führt dies zu einer **CCW rotation** (Polar begeißeltes Bakterium schwimmt vorwärts).

Bei **Peritrich** begeißelten Bakterien führt **CCW rotation** der Flagellen zur Ausbildung eines Superflagellums, **CW rotation** führt zu Tumble.

Sensor und Regulation



Methylierung

Sensor

An ein Membranprotein (z.B. Methyl-accepting Chemotaxis Protein MCP) bindet ein

Attraktant. Je weniger Attraktant an das MCP bindet, desto mehr wird CheA Phosphoryliert.

Normalerweise besitzen Bakterien viele Rezeptoren für verschiedene Attraktanten (Liganden). Diese Rezeptoren befinden sich an der Cytoplasmamembran und Liganden

müssen demnach bei z.B. Gram⁻ Bakterien

zuerst durch Porine diffundieren. *weil 2 Membranen*

Typische Ligand Affinitäten: $K_D = 0.01-0.03 \text{ mM}$

Computation

Signal Kaskade: CheA Autophosphorylierung; Phosphotransfer zu CheY; Dephosphorylierung CheY

Output

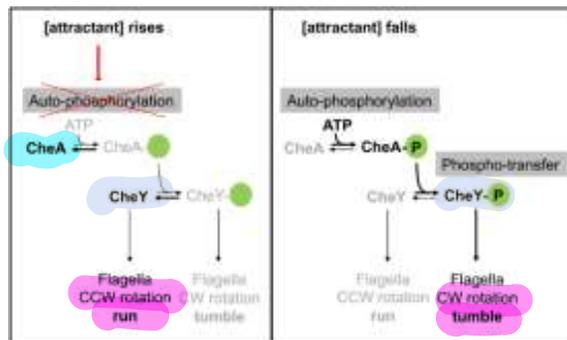
CheY-P bindet an FliM, ändert von CCW (run) zu CW (tumble)

Es handelt sich bei diesem System um ein modifiziertes zwei Komponenten System (siehe nächste Vorlesung). Das MCP, CheW und das CheA mit seinem Histidine wirken als Rezeptor Kinase. Das CheY und CheB wirken als Response Regulatoren.

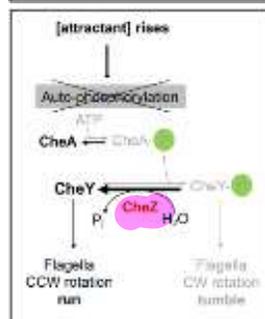
Die Antwortzeit dieses Systems beträgt etwa **1/10 Sekunde**.

übertragen Phosphat von ATP auf Substrat

CheA, CheZ und CheY



Sensor kinase CheA ist eine Histidine Kinase. Das Signal wird Verstärkt durch Protein Phosphorylation. Phosphat Transfer von CheA zu Asp im CheY um das Signal zu übertragen. LUCA besass vermutlich auch CheA.



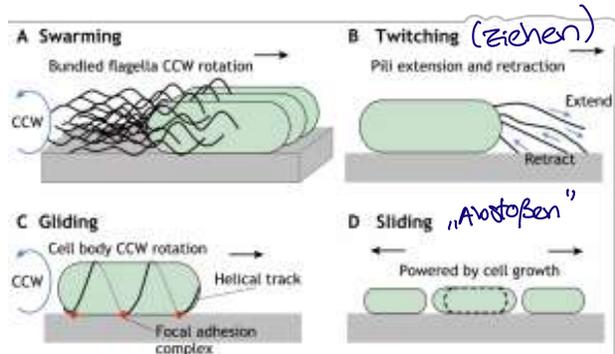
CheZ ist eine Protein Phosphatase, welche die Phosphat Gruppe von der CheY-P entfernt. Dies erlaubt einen schnellen Wechsel von hoch zu wenig tumble-Frequenzen (z.B., wenn Attraktant Konzentration sich erhöht).

Dies Garantiert eine ähnliche Funktion wie das Museumsbeispiel, wo Energie verwendet wird, um schneller reagieren zu können.

Unterschiede der Flagellen

Characteristic	Flagella (Bacteria)	Archaea (Archaea)	Cilia/Flagella (Eukaryotes)
Appearance	<ul style="list-style-type: none"> length: up to >20 µm diameter 18-22 nm rotating hollow helical tube 	<ul style="list-style-type: none"> Length: up to >2 µm diameter 10-14 nm rotating type IV pili 	<ul style="list-style-type: none"> length: 12-50 µm diameter: 240-1200 nm beating tubulin filaments
Function	<ul style="list-style-type: none"> Locomotion Sensory organelle Surface attachment 	<ul style="list-style-type: none"> Locomotion Sensory organelle Surface attachment 	<ul style="list-style-type: none"> Locomotion Sensory organelle Surface attachment

Arten der Bewegung von Mikroorganismen



Protein Sekretionssysteme

Oberflächen- und Sekretionsproteine erlauben Interaktionen mit der Umwelt. Es gibt lediglich wenige Protein Sekretionsmechanismen.

Sec Transport System

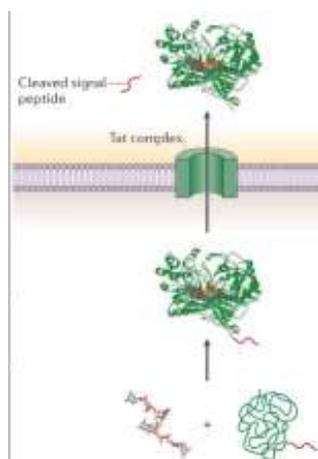
→ CC und posttranslational Abgabe von Flüssigkeiten → Protein wird gelöst

wird von SecA erkannt

Dass das Protein sekretiert werden kann muss es ein **SecA-Protein** und ein **Signal recognition Particle** am N Terminalen Ende enthalten. Hat es das, wird es durch das **Sec System** zur Membran transportiert. Dieses Sec System funktioniert so gut, dass auch Eukaryoten es übernommen haben (ein homologes System besitzen). Die Proteine werden dann ungefaltet sekretiert.

nur posttranslational

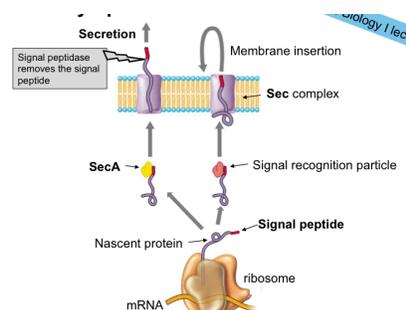
Tat Sekretionssystem



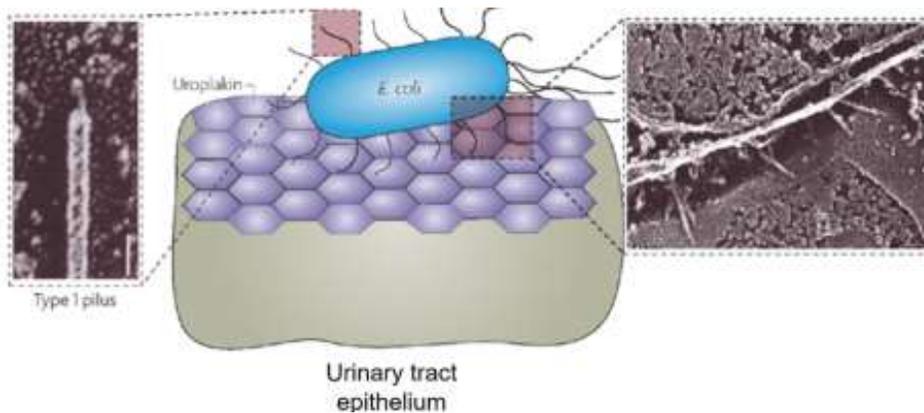
Erkennt N-Terminale Signalsequenz, welche 2 typische Arginin Reste enthält (**Twin Arginine Translocation**). Diese werden dann im Cytoplasma gefaltet und gefaltet sekretiert.

Auch LUCA hatte vermutlich so ein System, da viele Biochemische Reaktionen an Vents durch Eisen-Schwefel Cluster katalysiert werden.

Dieses System ist wichtig für die Evolvierbarkeit von Kofaktor basierter Katalyse.



Typ I Fimbrien



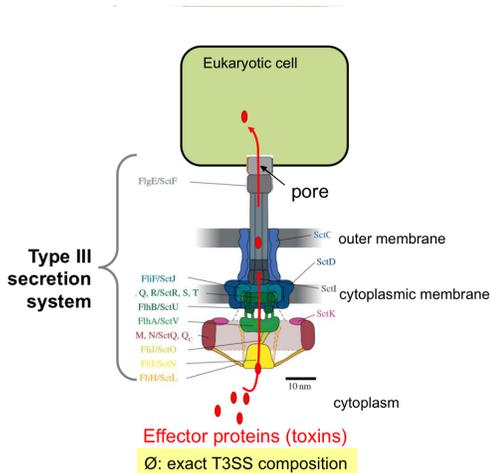
Fimbrien sind kleine, Haarähnliche Verlängerungen.

An der Typ I Fimbrie oder Typ I pili (Pilus) = Lange Struktur, die an Zelloberflächen oder anderen Strukturen bindet) befinden sich

ist das Gleiche

Lektine (Proteine, die an Zucker binden). Diese Typ I Fimbrien helfen dem Uropathogenen E.Coli sich am Harnweg festzusetzen (und so eine Infektion zu verursachen).

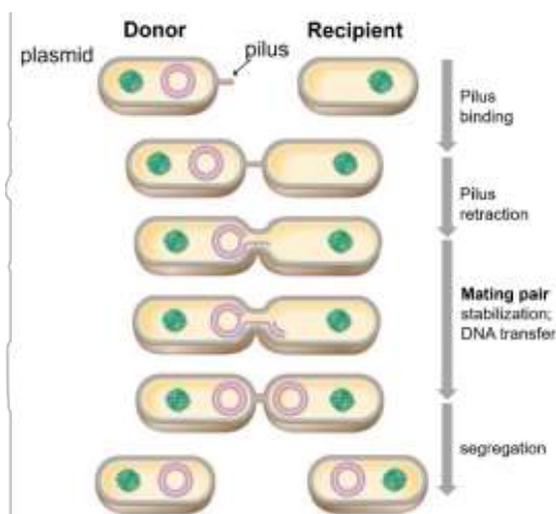
Typ III Sekretionssysteme



Typ 3 Sekretionssysteme (T3SS) werden von vielen pathogenen Bakterien verwendet, welche Pflanzen und Tiere infizieren. T3SS injiziert Toxine vom bakteriellen Cytoplasma direkt in das Cytoplasma einer Wirtszelle.

Diese T3SS Systeme entstanden aus Flagellen. Gewisse Teile der Flagellen wurden übernommen. Die Röhre durch die Membran beispielsweise, welche die Flagelle braucht, um sich aufzubauen wurde übernommen. Das Flagellum wurde durch eine Nadel ersetzt. Der Stator (MotA) sowie Teile des Rotors (Flig) wurden nicht übernommen.

Sex Pilus



Plasmide besitzen meist zusätzlich zu z.B. der Information über Antibiotikaresistenz Informationen zur Ausbildung eines Sex Pilus. Diese Information zwingt die Donor Zelle (männliche Zelle) ein Sex pilus auszubauen, dieser zieht die weibliche Zelle an sich heran (Mating pair wird gebildet) und sorgt so dafür, dass eine spezielle Art der Replikation passieren kann (z.B. Rolling Circle Replikation des F plasmids): Einer der beiden Stränge wird aufgeknackt, repliziert und während der Replikation landet ein Strang in der weiblichen Zelle. So geschieht je eine Replikation in einer Zelle. Am Ende dieses Vorgangs hat man 2 männliche Zellen.

*! kann vorher abbrechen
=> nicht ganz reibbar*

Typ IV Secretion System



Pili, welche eigentlich DNA übertragen (Konjugation). Genauer übertragen sie Proteine, an welche DNA angehängt sind.

Kann aber auch als Sex pilus (siehe oben) verwendet werden.

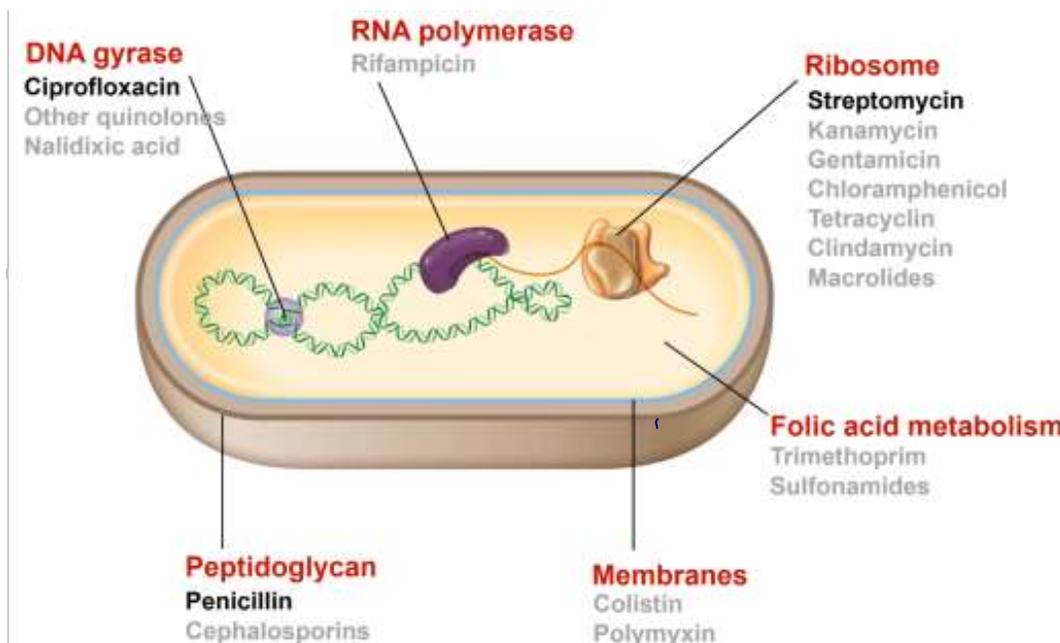
Antibiotika

Definition Antibiotika von Selman Waksman: Chemische Substanz, welche von Bakterien (können aber natürlich auch chemisch hergestellt werden) **produziert wird und bakterielles Wachstum hemmen oder sogar zum Bakterientod führen kann selbst in geringer Konzentration.**

bakteriostatisch
Antibiotika greift andere Bakterien an, mit dem Ziel, an mehr Nährstoffe zu kommen. Ausserdem haben sie möglicherweise eine Signalwirkung (andere Bakterien nicht töten, sondern lediglich von einem fernhalten).

bakteriell
Zytostatika greift Eukaryoten an, mit dem Ziel, die Bakterie vor Feinden (wie Würmer, Amöben...) zu schützen.

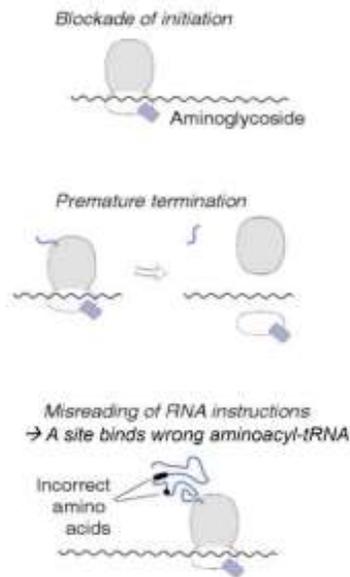
Target Strukturen von Antibiotika und Beispiele: (nur TS und schwarze lernen!)



Ausserdem wichtig: 2/3 der Medizinischen Antibiotika greifen das Peptidoglycan an.

Aminoglycoside

B Effects of Aminoglycosides



z.B.: Streptomycin (bakterizid = wirkt tödlich für Bakterien), welches von im Erdboden lebenden Bakterien produziert wird und das Wachstum von Mycobacterium Tuberculosis hemmt.

→ Störung der Proteinsynthese der Bakterien durch Bindung an Ribosomen → bakterizid

β -Lactam → Penicillin + Cephalosporin

bakterizid

hemmen Zellwandsynthese

→ Tod bei Teilung

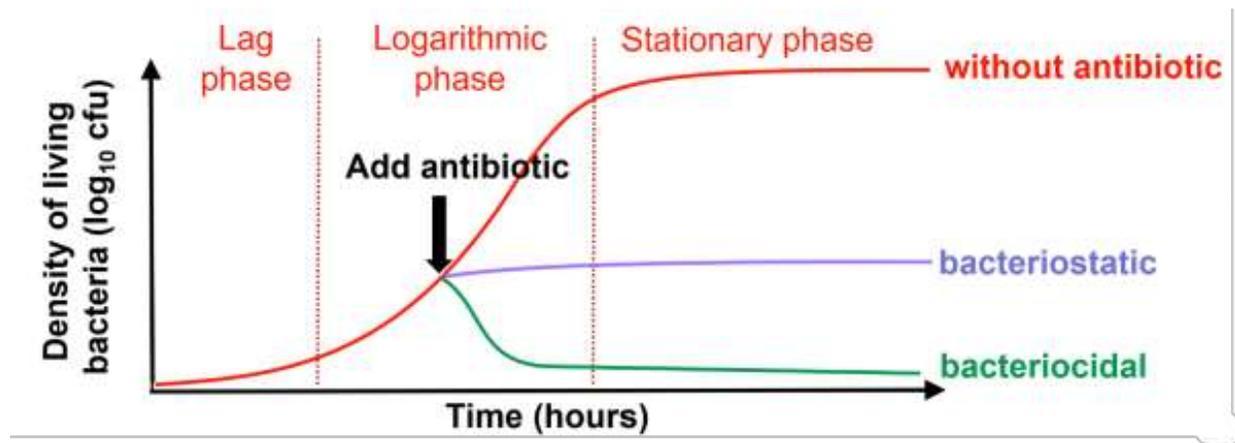
2 Möglichkeiten, wie Antibiotika wirken

Bakteriostatisches Antibiotika

Reduziert das Wachstum von Bakterien

Bakterizides Antibiotika

Tötet Bakterien



MIC Assays (= Minimal inhibitory concentration, Patientenproben werden analysiert, um eine Therapie für sie zu finden)

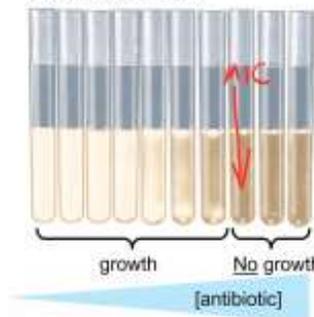
Disk diffusion test (= Hemmhofest)



E-Test



Serial dilution test



→ Minimal inhibition concentration

Resistenz gegen Antibiotika

Bakterien können Antibiotika aus folgenden Gründen überleben:

- Natürliche Resistenz (Target Struktur nicht vorhanden, Permeabilität der Membran)
- Genetische Resistenz (Target Struktur mutierte, bessere Efflux Pumpe, modifizierte Enzyme deaktiviert Antibiotika)
- Phänotypische Resistenz (Persistenz = Toleranz, Endosporen über längere Zeit)
 - ↳ Spores
 - ↳ schadet aber tötet nicht

Verteidigungsmechanismen (Tabelle ist wichtig, auswendig lernen)

Resistance mechanism	Antibiotic (example)	Genetic basis of resistance	Mechanism found in
Enzymatic modification	Penicillins, Cephalosporins	β -lactamases, chromosome or plasmid	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>S. aureus</i>
Target modification	a) Streptomycin b) Ciprofloxacin	a) Ribosome mutation (<i>rpsL</i>) b) DNA gyrase mutation	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium, etc.
Efflux pump	Chloramphenicol	Efflux pumps, chromosome or plasmid	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium, etc.

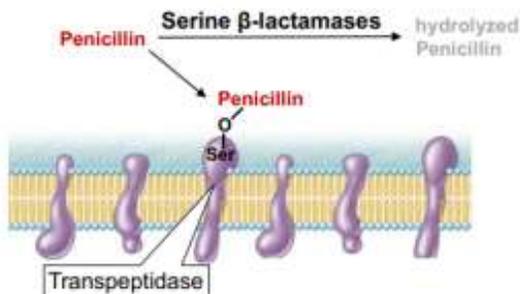
→ Antibiotika Abbau
→ selbst Verdauen

Efflux Pumpen: Ähnlich wie Museum Beispiel: Zelle wird so designed, dass wenig Antibiotika in die Zelle gelangt und zusätzlich ein Protein (Efflux Pumpe) sorgt dafür, dass die Antibiotikakonzentration geringer wird.

Enzymatische Modifikation

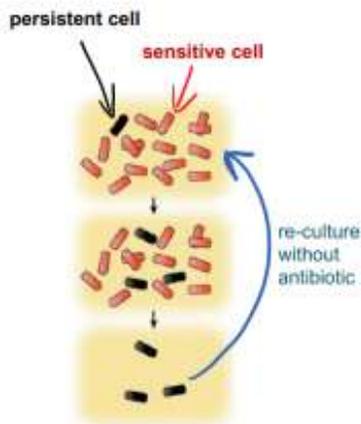
Punktmutation: Schon eine Punktmutation reicht aus, um z.B. eine Resistenz gegenüber Streptomycin auszubilden.

Serine β -Lactamasen

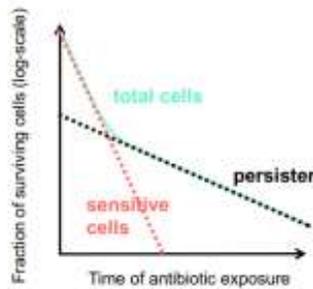


Dieses Enzym wird über Resistenzgene encodiert und **hydrolysieren β -Lactam Antibiotika** (z.B. Penicilin). Diese Resistenz kann durch horizontalen Gentransfer vererbt werden.

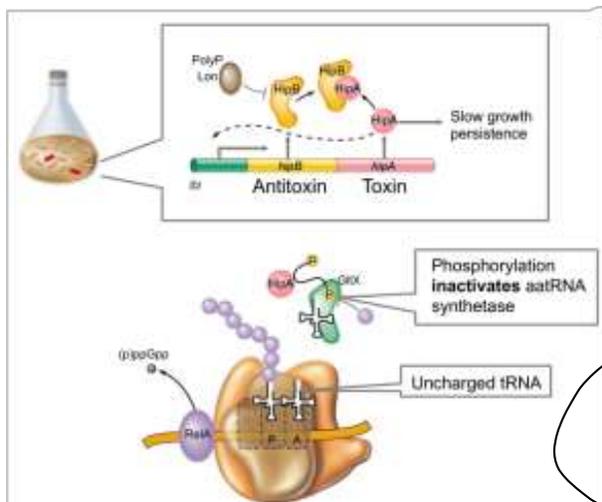
Persister



Bi-phasic antibiotic killing curve



Persister besitzen einen Phänotyp, welcher es ihnen ermöglicht, Antibiotika zu überleben. Bakterien formen kleine Fraktionen Persister. Diese Persister wachsen oft langsam, erneutes schnelles Wachstum findet statt (= anfälliger Phänotyp), wenn die Antibiotikakonzentration wieder abnimmt.



Der Mechanismus beruht auf der Inhibition des HipB Proteins, welches normalerweise das HipA Protein inhibiert. Wird HipB inhibiert, so kann HipA seine Phosphorylierungsfunktion erfüllen: es inaktiviert bestimmte aa-tRNA Synthetasen, wodurch ungeladene tRNAs beim Ribosom ankommen was dazu führt, dass die Bakterie aufhört zu wachsen. Auf diese Weise kann durch hungern das Erreichen eines Persisterstadiums sehr wahrscheinlich gemacht werden.

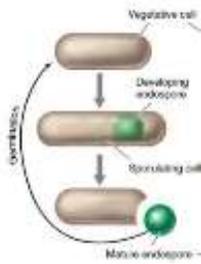
→ nur Lebenserhaltung

Es gibt viele Persisterzellen, wenn:

- Die Zelle hungert
- In Biofilmen
- In infizierten Wirten (z.B. Tuberkulose: Makrophagen sorgen dafür, dass Tuberkulosebakterien hungern indem sie sie umschließen. Dadurch bilden sich viele Persister Bakterien. Die Behandlung mit Antibiotika wird stark erschwert / dauert viel länger (bei Tuberkulose Infektion bis zu 9 Monate)

Endosporenbildung

Charakteristik	Vegetative Zelle	Endospore
Hitzeresistenz	Gering	Hoch
Chemikalienresistenz	Gering	Hoch
Antibiotikaresistenz	Gering/Absent	Hoch



Durch eine asymmetrische Teilung der Zelle bildet sich eine Endospore aus und der andere Teil der entstandenen Zelle stirbt ab. Die entstandene Endospore ist extrem resistent (siehe Tabelle oben). Sobald die Umweltbedingungen wieder besser sind, kann die Endospore sich wieder in eine vegetative Zelle umwandeln.

Endosporen machen nichts

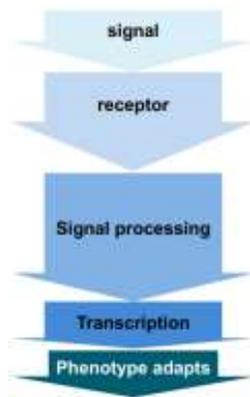
Vorlesung 3

Phenotypänderung

Anpassung durch zwei Möglichkeiten:

- **Aktivität** von Enzymen verändern (Enzym Inhibition) -> meist kurze Veränderung, Reaktionszeit: < 1 sec
- **Enzym- / Proteinkonzentration** ändern -> über eine längere Zeit, Reaktionszeit: min

↳ Proteinbiosynthese regulieren



Bakterien und Archaeen können sich anpassen, indem sie ihr Gen **Expressionsprofil ändern**. Meistens wird dafür eine transkriptionale Kontrolle verwendet. Das grundsätzliche Design von Signalübertragungen ist immer gleich: Chemosensor -> Signalprocessing -> Änderung der Transkription.

↳ Auf Sinneszellen, nimmt Änderungen wahr

Konzept: Die möglichen phänotypischen Anpassungen sind encodiert im Genom. So kann eine Evolvierbarkeit garantiert werden (Bakterien können den Phänotyp wieder ändern, wenn die Bedingungen günstiger sind).

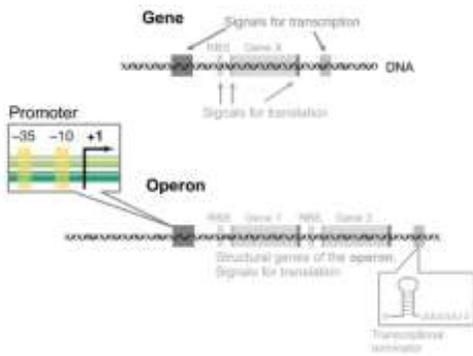
Transkriptions Regulationsnetzwerk Komplexität

Bakterien und Archaeen besitzen **viele parallele Signalkaskaden**, welche viele Interaktionen miteinander besitzen. Von Bakterie zu Bakterie sind diese Interaktionen variabel.

Kernelemente der Transkriptionsmaschinen sind Grundsätzlich erhalten, es sind bei Archaeen jedoch viele **zusätzliche Regulationsfaktoren** dazugekommen -> Promotorstrukturen sind unterschiedlich.

Die RNA Polymerasen von Bakterien, Archaeen und Eukaryoten sind **gleich in den Kern Subunits** sowie der **Initiation factor Sigma70 bei Bakterien, TFB bei Archaeen und TFIIB bei Eukaryoten**.

Operon



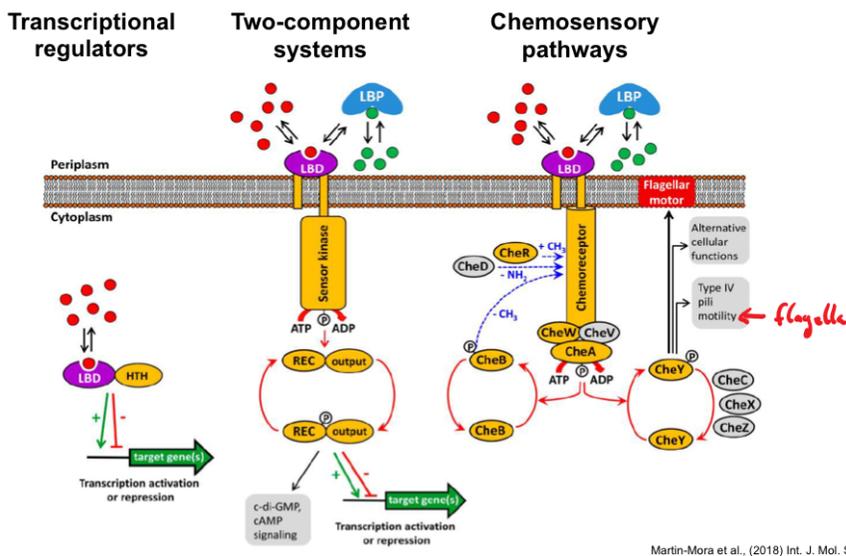
Gen: Beschreibt ein Locus, welcher Signale für die Transkription und Translation für ein Protein (oder einer RNA) encodiert.

Operon: Beschreibt einen Locus, welcher Signale für die Transkription und Translation von mehreren Proteinen (= Koordination, z.B.: Biosynthese einer partikulären Aminosäure). Sind weit verbreitet in Bakterien und Archaeen.

↳ braucht Regulierung

Evolution: Horizontaler Gentransfer «en bloc», Selfish operon Hypothese.

Die wichtigsten Transduktionssysteme der Bakterien



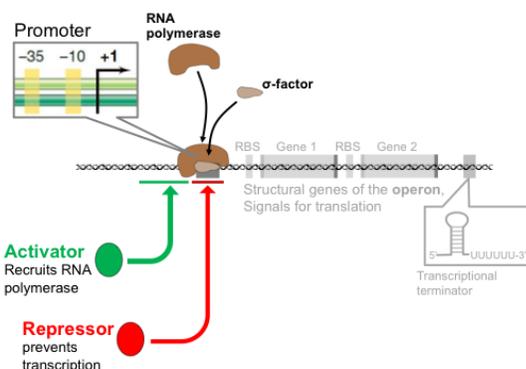
House-keeping Gene: Wird nicht reguliert. Ein Beispiel: σ^{70} Faktor für -35 Sequenz: TTGACA

Die Umwelt wird gemessen: Input für das Computing der optimalen Anpassung

Zellhülle wirkt wie ein Filter, welcher nur die für die Zelle wichtigen Signale bis zum Rezeptor (LBD = Ligand binding domain) durchlässt.

Oben: Die drei wichtigsten Transduktionssysteme der Bakterien.

Regulation der Transkription



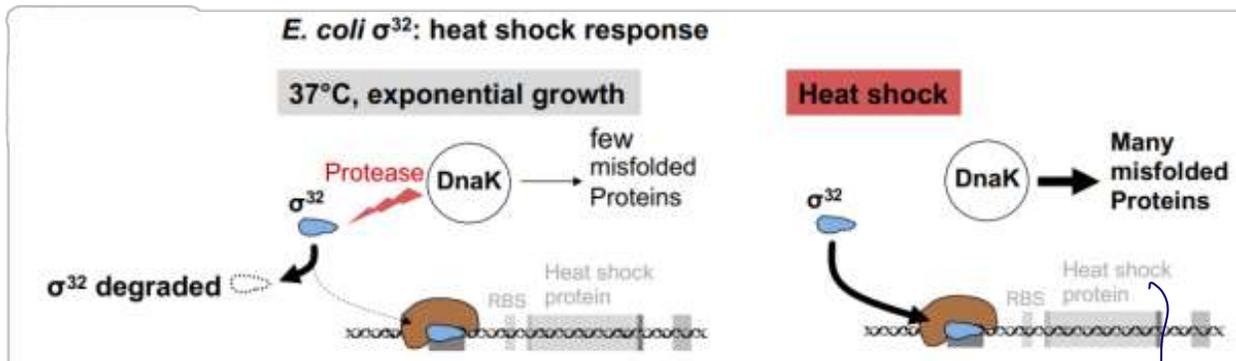
Drei verbreitete Mechanismen regulieren die Transkriptions initiation:

- Sigma Faktoren → erkennen Promoter und helfen bei RNA Polymerase Bindung
- Der negative Transkriptionsfaktor Repressor
- Der positive Transkriptionsfaktor Aktivator

Die Sigma Faktoren und der Aktivator Rekrutieren eine RNA Polymerase → bestimmen Initiation Häufigkeit

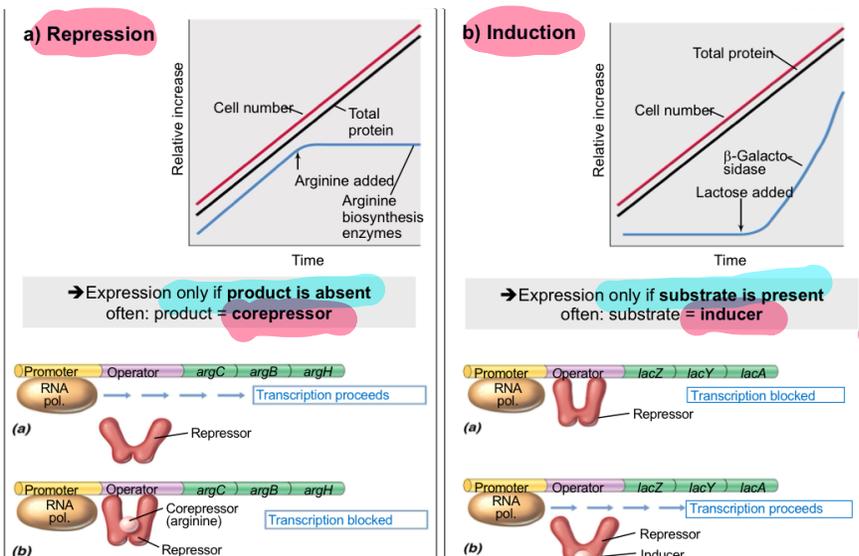
In Bakterien erlauben alternative σ Faktoren einen schnellen Wechsel von speziellen Gensets (Regulon). → binden Promotoren, die normalen σ -Faktoren nicht zugänglich sind

Beispiel Heatshock response: (Im normalen wachstum baut Dank Protease die Sigma 32 Subunit ab. Bei Hitze gibt es viele falsch gefaltete Proteine und die Dank ist zu beschäftigt, die Sigma 32 Subunit abzubauen. Dadurch werden die benötigten DNA Sequenzen transkribiert)



Archaeen besitzen andere transkriptionale Regulationen.

Transkriptionsfaktoren: Negative Regulation

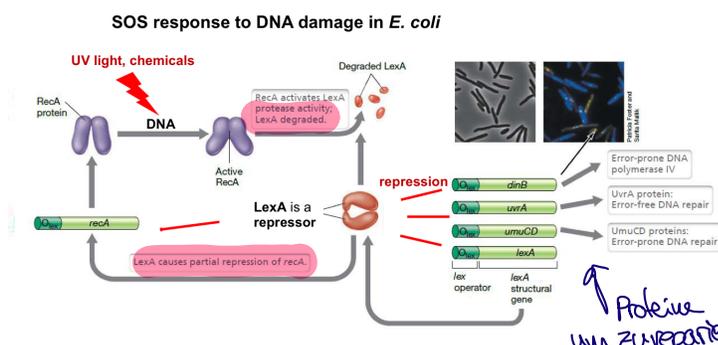


Ziel: Den Metabolismus zu optimieren

hilft anderen Proteinen bei der Faltung / Erhaltung sekundärstruktur

Repressoren binden an den Operator (Teil der DNA, der für Repressor bestimmt ist). Der Corepressor sorgt dafür, dass der Repressor am Operator bindet, sonst bindet er nicht. Ein Inducer sorgt dafür, dass ein Repressor nicht mehr am Operator bindet.

LexA Repressor



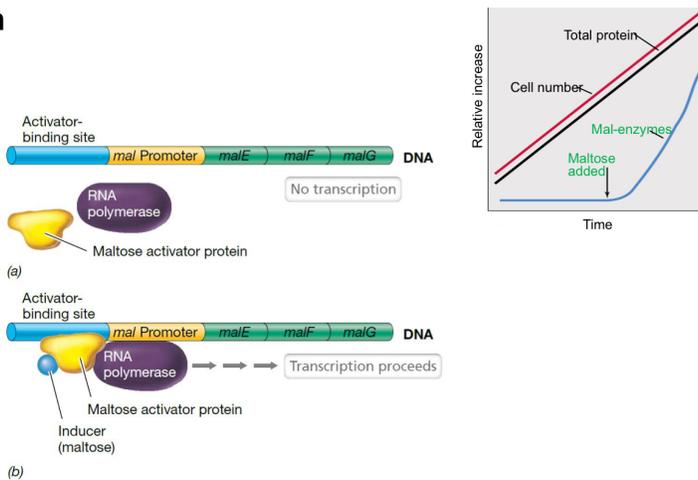
Ziel: DNA Schaden reparieren

LexA Repressor unterdrückt im bakteriellen Ruhezustand die Transkription von Rekombinationsproteinen (rechte Seite) sowie die DNA Damage Response (linke Seite). Wenn ein DNA Schaden auftritt, ändert sich die Konformation des RecA

(Rheostat Architektur) und der LexA Repressor bindet daran. Durch eine Sollbruchstelle wird dieser zerstört und die beiden Pfade generieren Proteine zur Schadensbekämpfung. Ausserdem wird LexA produziert, um der Zelle irgendwann wieder zu ermöglichen, diese SOS Response zu verlassen.

Positive Regulierung

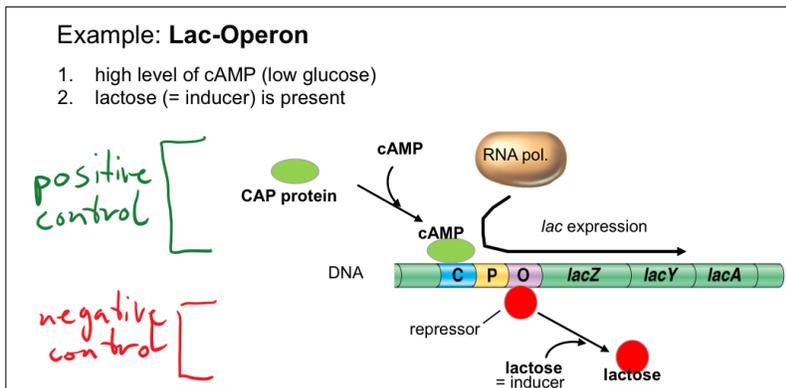
1



Ziel: Katabolische Enzyme nur herstellen, wenn Substrat vorhanden ist

Aktivator: Nur Komplex mit Inducer bindet an Aktivator Bindungsstelle

RNA Polymerase kann die Transkription nur beginnen mithilfe des Aktivators.



Katabolit Repression

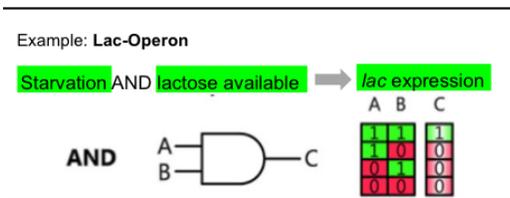
Ziel: Sicherstellen, dass der preferierte Katabolit (in unserem Beispiel: Glukose) zuerst verwendet wird.

Die Glukose inhibiert die Synthese von cAMP (= Verhungersignal) und stimuliert den Export von cAMP.

Ist die Konzentration an cAMP hoch, so gilt dies als Verhungersignal und der cAMP-CAP (CAP = Catabolite Activator Protein) Komplex bindet am Promoter und rekrutiert RNA Polymerase.

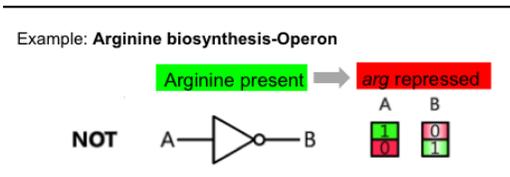
Ist nun cAMP sowie Laktose vorhanden, so werden Proteine zur Umsetzung von Laktose transkribiert.

Transkriptionsfaktor

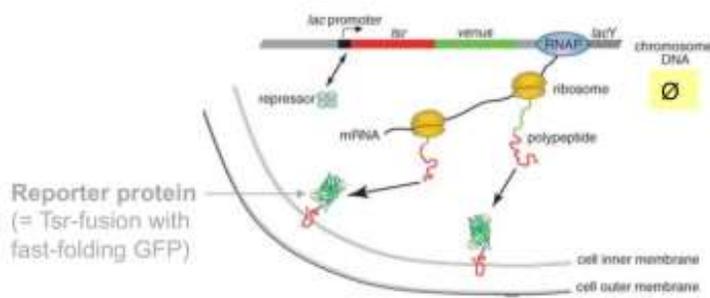


Dieses Beispiel kann wie ein AND Gate bei Computern betrachtet werden.

Biobricks: Signalmodule für Bioengineering, können verwendet werden, um Bakterien mit bestimmten Eigenschaften synthetisch herstellen zu können.



Repression: Backgroundnoises



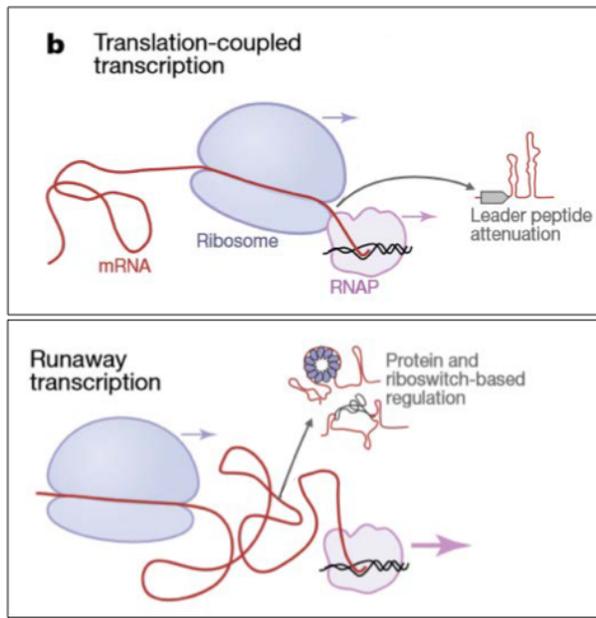
→ Polymerase kommt trotzdem weiter aber Repressor bindet nicht

Der lac-promoter erzeugt trotz Repressor ein paar mRNA Moleküle pro Stunde. (Transkriptionale Regulation in Bakterien ist mehr als 100-mal kleiner als normale Produktion).

Diese «Hintergrundgeräusche» führen dazu, dass sich in einer Bakterienpopulation Variation entsteht.

Oben ein Beispiel in dem man ein Protein, welches eigentlich unterdrückt werden sollte mit einem Farbstoff sichtbar macht. Beobachtet man das Bakterium, so fallen einem einige wenige leuchtende Punkte auf.

Post Transkriptionale Regulation



In E. Coli ist die Transkription mit der Translation gekoppelt (Es wird gleichzeitig transkribiert und translatiert): Die Ribosomen regulieren die RNA Polymerase. Dies findet in den meisten Bakterien so statt.

In z.B. B. subtilis ist die Transkription schneller als die Translation: Dies führt zu einer Zeitverschiebung und einer Räumlichen Trennung (freie mRNA), Ribosom abhängige Regulation (z.B Riboswitch, s.u.)

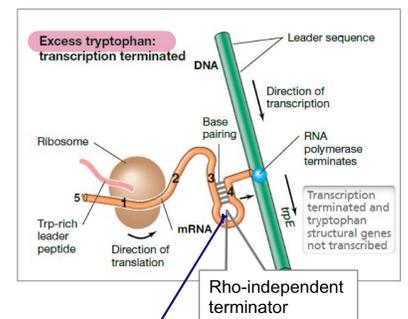
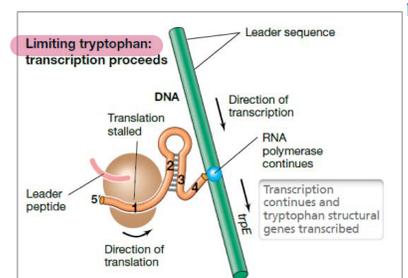
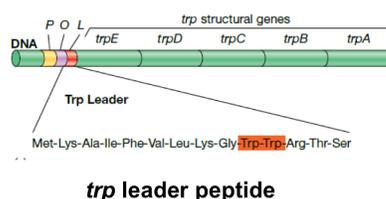
Transkriptionale Attenuation

Ziel: Fine Tuning der Enzym Expression

Die Transkriptionale Attenuation findet bei E. Coli Aminosäure Biosynthese Operons statt.

Das Leader Peptid kontrolliert den Stop der Transkription

- beendet Transkription vorzeitig
- Im mRNA-Anfangsbereich wird Haarnadelstruktur gebildet an Terminatorstelle → Attenuator
- Voraussetzung: synchrone Transkription und Translation

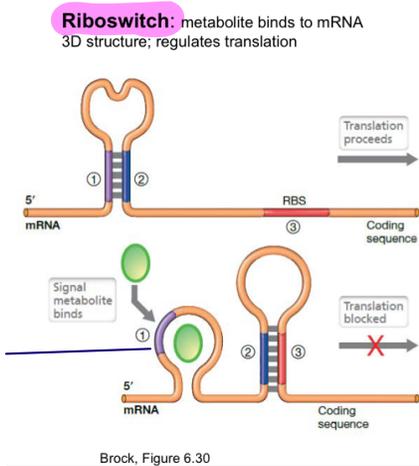


Terminator Sequenz; wird unter bestimmten Bedingungen ausgebildet → beendet RNA polymerase

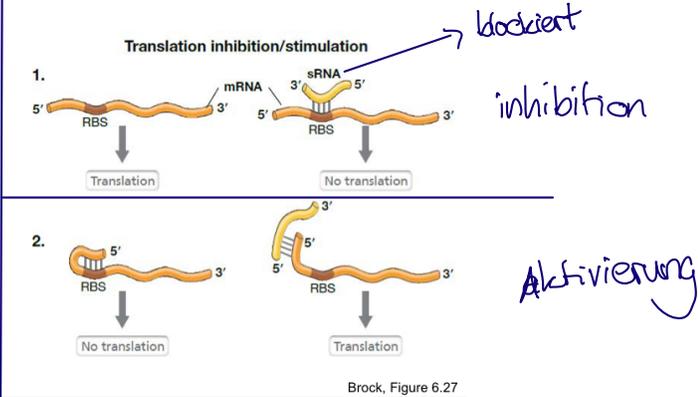
Regulierung durch mRNA

reguliert Translation

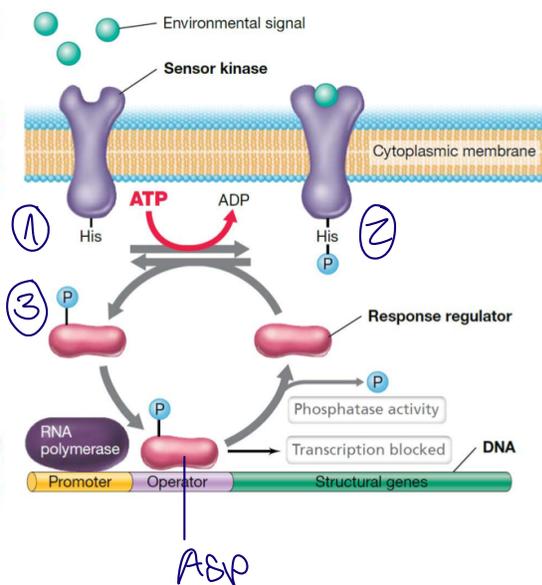
ribosomale Bindungsstelle verbergen



Small regulatory RNAs bind to mRNA; regulate translation/ mRNA stability



Zweikomponenten Regulationssysteme



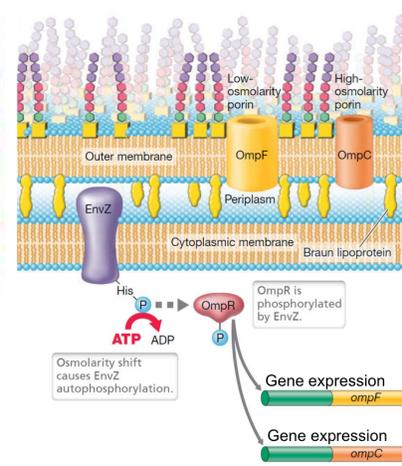
Evolution: Zweikomponenten System Homologe in Pflanzen, Algen, Pilzen (Ethylen Signalisation)

Die Signale werden von einer in der Membran Sensor Kinase erkannt. Dies führt zu einer Strukturänderung und dadurch zu einer Autophosphorylierung von His innerhalb der Cytoplasmamembran (dazu wird ATP benötigt). Dieses Phosphat wird dann an ein Asp von einem Response Regulator weitergegeben, welcher dann z.B. als Repressor an den Operator bindet. Auch eine positive Regulation ist möglich.

Eine Phosphatase limitiert diesen Prozess. Diese hydrolysiert das Phosphat wieder weg.

His-P: hohes Phosphorylierungspotential

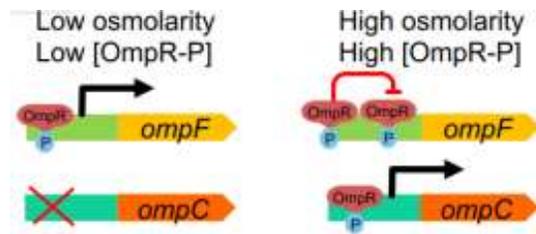
EnvZ/OmpR Zweikomponentensystem von E.Coli für Osmolarität



EnvZ: Sensorkinase in der Zytoplasmamembran. Durch eine Erhöhung der Osmolarität kommt es zu einer leichten strukturellen Veränderung des EnvZ (-> Entfernung einer Wasserstoffbrücke) wodurch ein His durch ATP Autophosphoryliert werden kann. Dieses wird an den OmpR Regulator übertragen.

Bei niedriger Osmolarität ist wenig OmpR-P vorhanden. Eine hochaffine Bindestelle des OmpF Gens kann dann besetzt werden und das OmpR wirkt als Aktivator. OmpF wird Produziert. Dieses hat einen grossen Durchmesser und sorgt dafür, dass mehr osmotisch aktive Substanzen ins Periplasma gelangen. OmpC hat einen kleineren Durchmesser und lässt weniger osmotisch aktive

Stoffe ins Periplasma.



Wenn die Osmolarität steigt, so wird die Konzentration an OmpR erhöht. Dadurch kommt es zusätzlich zu einer Bindung an einen Operator am OmpF Gen und dies führt zu einer Inhibition des OmpF Proteins. Ausserdem kann OmpR an dem OmpC Gen binden und wirkt dort als Aktivator. Als Folge davon

wird weniger OmpF und mehr OmpC gebildet. Es werden weniger osmotisch aktive Stoffe ins Periplasma gelassen und der osmotische Druck wird an der Cytoplasmamembran erniedrigt.

Diese Regulierung dauert mehr als **100 Sekunden**.

Überleben, Wettkampf und Kooperation

Natürliche Lebensräume: Verhungern, Raub und Verteidigen:

- ➔ **Individuelle Anpassung** (Gleicher Genotyp unterschiedlicher Phänotyp)
- ➔ **Kooperation:** Interaktionen, bei welchen beide Organismen profitieren (z.B.: Arbeitsteilung, Biofilme)
- ➔ **Antagonismus:** Interaktionen, bei welchem ein Organismus profitiert, einer verliert
- ➔ **Wettkampf:** Ein Organismus profitiert mehr als ein anderer

Biofilm

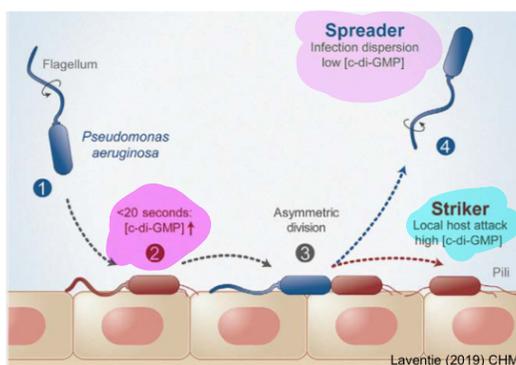
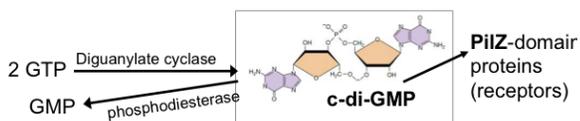
Diverse Phänotypen (sogar, wenn der Biofilm aus Zellen desselben Genotyps besteht): Einige Bakterien sind zuständig für die Sekretion der extrazellulären Matrix, einige für Metabolismus, einige für Wachstum...

Einige (vor allem am Boden des Biofilms liegende Bakterien) leiden unter Nahrungsknappheit (-> **Persistenzstadium**) und können, auch wegen dem langen Weg der Wirkstoffe durch den Biofilm, Antibiotika für sehr lange Zeit gut aushalten.

Biofilme kommen in verschiedenen natürlichen Lebensräumen vor: z.B. Katheter, chronische Infektionen, Medizinische Implantate...

→ können sich im Biofilm differenzieren

Bildung des Biofilms



3 Signalkaskaden, die wichtig sind für die Biofilmbildung: (Schritt 2)

- **Flagellen Drehmoment erhöht sich**, dadurch kann sie sich nicht mehr so gut drehen, das wird erkannt und der C-di-GMP Spiegel wird erhöht
- **C-di-GMP Synthese** Signalisieren Bakterien, dass ein Biofilm gebildet werden sollte (siehe Bild links)
- **Adhäsine** (= Faktoren, die es dem Bakterium ermöglichen, anzuhafte)

Differenzierung (Schritt 3):

Striker

Hohe Konzentration an C-di-GMP

Die zurückbleibende Zelle besitzt Typ 4 Pili (Adhäsine) und keine Flagelle. Diese führt dann zu einer Biofilmbildung (z.B. chronische Infektion)

Spreader

Geringe Konzentration an C-di-GMP

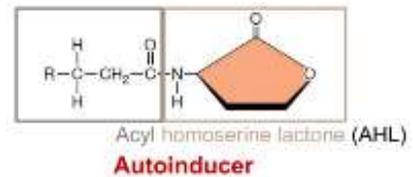
Besitzt ein Flagellum. Durch Phosphodiesterase beim Flagellum wird C-di-GMP abgebaut.

Quorum Sensing

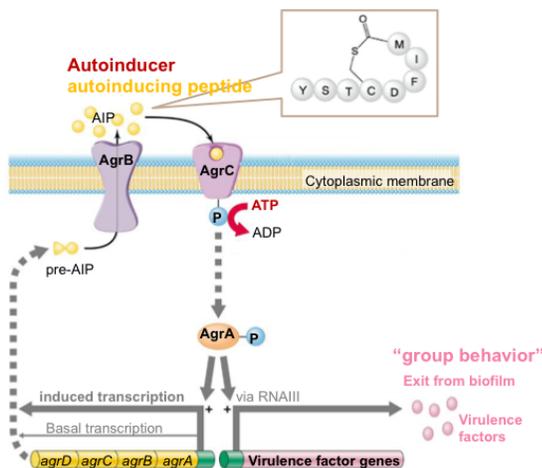
Mechanismus, mit welchem Bakterien herausfinden können, wie viele von ihnen vorhanden sind (Zelle zu Zelle Kommunikation).

Autoinducer (Sekretiertes, chemisches Signal z.B. AHL oder Peptide) werden ausgeschüttet und können von Bakterien empfangen werden.

Sobald ein gewisser Schwellwert erreicht ist, kann dies der Zelle zum Beispiel signalisieren, dass ein Biofilm gebildet werden soll oder bestimmte Virulenzfaktoren exprimiert werden sollen.



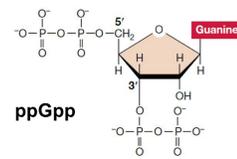
Biofilm Auflösung



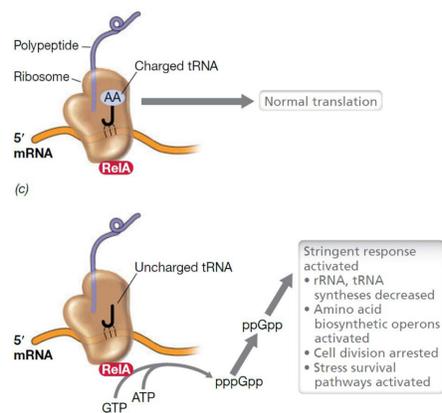
Beispiel Staphylococcus aureus bildet sich bei kleinem pH (Zucker Metabolite) und löst sich durch ein AIP/Agr Signal auf -> einige Individuen treten aus dem Biofilm aus und bilden an einer neuen Stelle einen neuen.

Autoinducer ist ein kurzes, modifiziertes Peptid (AIP), welches von einem Rezeptor (AgrC = Histidine Kinase) erkannt werden kann. Durch ein Zweikomponentensystem wird das Signal weitergegeben: AgrA (= Response Regulator) wird phosphoryliert und führt zu einer erhöhten Expression des Operons, welches AgrC, AgrB und AgrA Produziert (positiver Feedback Loop: Es wird noch mehr AIP

ausgeschüttet und noch mehr AgrC bzw. AgrA können phosphoryliert werden) und zusätzlich zu einer erhöhten Expression des Gens, welches die Virulenz Faktoren decodiert. Diese lassen das Bakterium aus diesem Biofilm herausschwimmen.



Stringent Response



ppGpp hat als Ziel, ein Hungerstadium zu überleben.

Das RelA Protein befindet sich am Ribosom und prüft, ob die tRNAs geladen sind. Sind sie es wird es nichts tun. Sind die tRNAs nicht mehr geladen, so synthetisiert das RelA Protein ppGpp und signalisiert der Zelle so, dass sie sich im Hungerstadium befindet.

Die Biosynthese wird angehalten (RNA Polymerase wird gehemmt), die Zellteilung wird angehalten und das Überlebensstadium wird aktiviert (Persisterstadium).

Phänotypische Diversität

Viele Bakterien formen 2 oder mehr verschiedene Phänotypen (Differenzierung). Dies garantiert eine optimale Anpassung an die Umgebung. Das phänotypische Spektrum ist genetisch encodiert (= Selektiv durch die Evolution). Es gibt die Möglichkeit des Zufalls, welcher den Phänotyp eines einzelnen Bakteriums bestimmt oder eine kontrollierte Differenzierung.

Biofilm

Beispiel: Kooperation (zwei Phänotypen arbeiten zusammen) von Salmonella Typhimurium

Bilden zwei unterschiedliche Typen: Typ 3 kann nur langsam wachsen, aber in die Darmepithelzelle vordringen und eine Durchfallreaktion auslösen, welche für den zweiten Typ (ttss-1), der sich schnell vermehren kann, positiv ist, da die normalen Darmbakterien dann ausgeschieden werden.

Beispiel: Bet-hedging von Bacillus subtilis

Wenn Bacillus subtilis die Nährstoffe ausgehen, so bilden sie Endosporen (siehe vorherige Vorlesung). Aber nicht alle neuen Bakterien bilden Sporen (nur max. ca. 15%), sodass der Genotyp egal was in Zukunft kommt überleben wird oder besser: sich vermehren kann.

Diese zwei Beispiele wurden vermutlich so durch Evolution geformt.

Sporenbildung

Vorlesung 4

Grundsätzlich ist Leben:

- Energieumsetzung
- Kompartimentierung -> wichtig für Evolvierbarkeit
- Informationsspeicherung -> wichtig für Evolvierbarkeit
- Replikation -> wichtig für Evolvierbarkeit

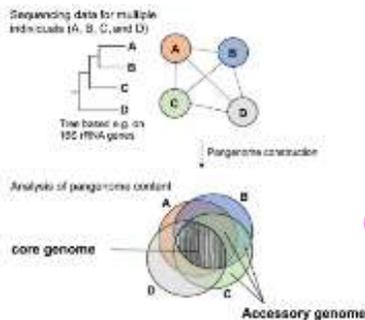
Vermutetes Genetisches Makeup von LUCA

LUCA hatte mehr als 100 Kerngene (Bauteile)

Startpunkt = LUCA, Eine Population von Organismen, von welchen aus alles zelluläres Leben auf der Erde entstanden ist.

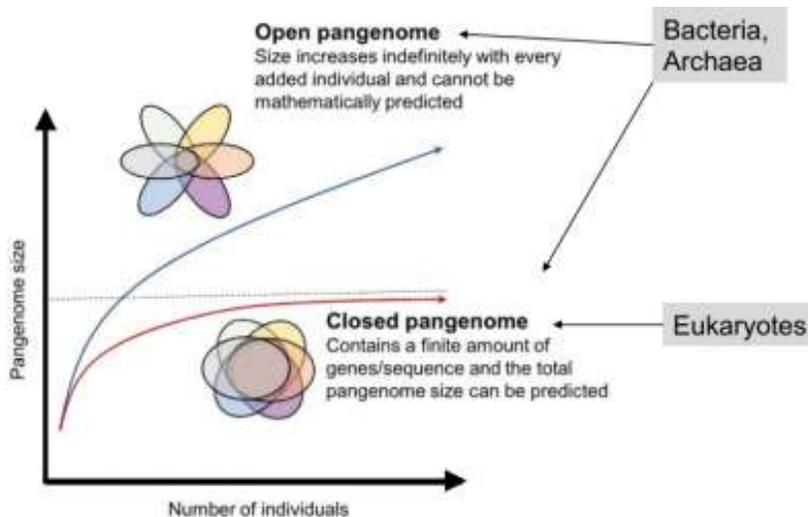
Die Bestandteile, die universell sind, hatte vermutlich LUCA bereits

function	molecule	comment
Genome	DNA	Core + accessory = pan-genome
replication	DNA-dependent DNA polymerase, plus sliding clamp, clamp loader, ssDNA binding protein	Similar to archaeal family D DNA polymerases
transcription	DNA-dependent RNA polymerase, several regulators	universal
translation	ribosome	universal
Protein transport	Signal recognition particle	universal
Cell envelope	Mixed archaeal and bacterial membrane lipids?	Variable in Archaea, Bacteria; essential for compartmentalization



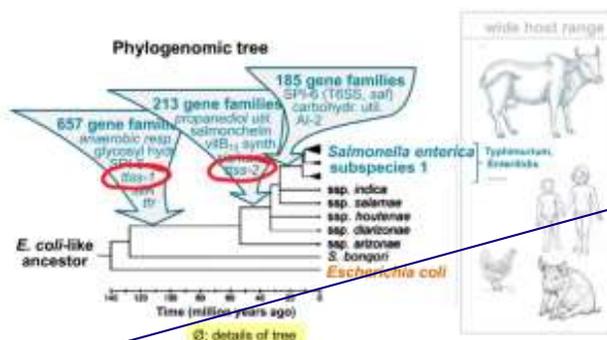
Das Pangenom ist die Summe aller Gene, die in mehr als einem Stamm von Spezies vorkommen und wird zusammengesetzt aus Kerngenom (= Monophyletisch, in allen Stämmen der untersuchten Spezies gefundenes Genom, z.B. Replikation, Genexpression, Zentraler Metabolismus) und Akzessorisches Genom (= Sequenzen, die nur in einigen Stämmen vorkommen, oft Polyphyletisch, z.B.: Plasmide, Viren, Verteidigung, Virulenz, ergänzender Metabolismus).

Pangenom vergrößert sich im Laufe der Evolution



Das Pangenom wird immer grösser, je mehr Stämme man sequenziert. Das Kerngenom immer kleiner. → Anzahl der Genome die in allen vorkommen nimmt ab
Bakterien und Archaeen besitzen meist ein offenes Pangenom, Eukaryoten sowie Archaeen und Bakterien, die wenig horizontalen Gentransfer erfahren besitzen oft ein geschlossenes Pangenom.
mehr Veränderung

Beispiel: Salmonella enterica



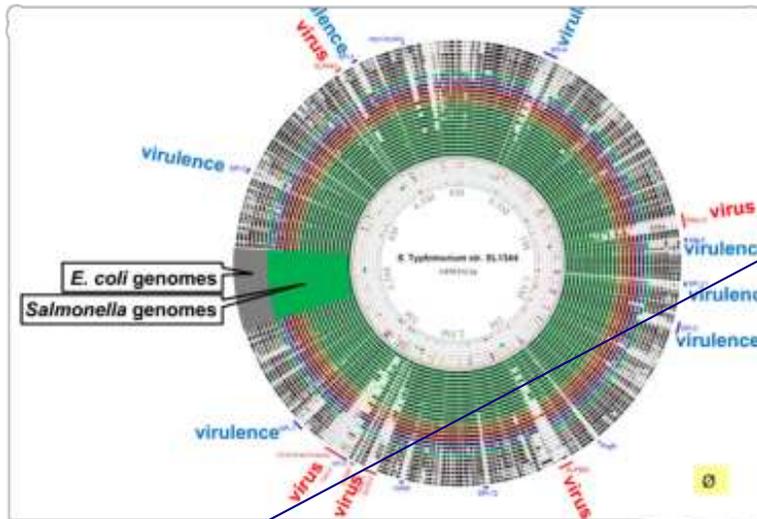
Ist aus gemeinsamem Vorfahren mit E. Coli entstanden vor ca. 140 Mio Jahren, besitzt ein offenes Pangenom.

Während seiner Evolution hat S. E. immer wieder Gene aufgenommen (z.B. tss-1 und tss-2), also die Virulenz entstand durch die Aufnahme von Virulenzgenen.

Es kommt bei der Sequenzierung der Genome auf den Blickwinkel an: Sequenziert man lediglich S. E. Bakterien, würde man die zwei ttss Gene zum Kerngenom zählen. Vergleicht man es z.B. mit dem Genom von E. Coli, so handelt es sich um Akzessorische Gene.

→ Es kommt auf den Blickwinkel an, was Akzessorisches Genom und was Kerngenom ist

Beispiel: Salmonellen vs. E. Coli



Innen: Der grüne Kreis ist das Genom von Salmonellen, der graue das Genom von E. Coli. Die einzelnen Stücke des Kreises sind einzelne Gene.

Was sofort auffällt ist, dass die beiden Genome relativ ähnlich sind, nur die Virulenten Gene besitzt E. Coli nicht.

↳ stellt Viren vor

Salmonella Enterica Typhimurium Stamm SL1344 besitzt:

Ein Genom bestehend aus $4.8 \cdot 10^6$ Basenpaare und 3 Plasmide mit ca. 5112 Genen. Kerngenom: 2800 Gene

Zusammenfassung Pangenom

Genom von Bakterien oder Archaeen: 10^5 bis $1.5 \cdot 10^6$ BP

Freilebende Prokaryoten besitzen ca. $4.9 \cdot 10^5$ BP, das eigentliche Genom von E. Coli ist c.a. $4.7 \cdot 10^6$ BP gross, es wäre aber viel grösser, da es im Pangenom viel mehr Codierungsmöglichkeiten besitzt. Es können also ständig neue Stämme durch Austausch von Akzessorischen Genen entstehen.

Das Pangenom ist im Normalfall Grösser als das Genom einer gegebenen Spezies. Dies erlaubt eine sehr gute Evolvierbarkeit an Umgebungen, Wirte...

Wiederholung aus der Vorlesung von J. Vorholt

Mutation (DNA changes, mutant phenotype)

Gene duplication (Mutant alleles, Orthologs, Paralogs)

Horizontal gene transfer (gene acquisition/gene exchange)

- Transformation
- Conjugation
- Bacteriophages
- Bacterial infection immunity

Genome rearrangement

- Transposable DNA (IS elements, transposons)
- Inversion, genome contraction

→ Genetic variation

Natural selection

Genetic drift (the random loss of sequences)

→ Sorting genetic variation

Mutation

Mutationsrate: c.a. 10^{-8} pro Nukleotid pro Generation

Bakterienpopulationen sind oft gross: z.B.: 10^9 Individuen in 1 ml Nährmedium -> Diese Menge enthält bereits einige Mutanten

Schnelle Evolution ist wichtig für eine Anpassung an neue Herausforderungen.

Wachstum durch Zellteilung:

Exponentielles Wachstum der Anzahl Zellen ($N_t = N_0 * 2^n$). Mutanten mit besserer Wachstumsrate werden mit der Zeit ihre Vorfahren ersetzen.

Fitness fasst Wachstum, Tod, Verbreitung... zusammen.

Wild type *E. coli*
Over night culture:
≈ 25 generations

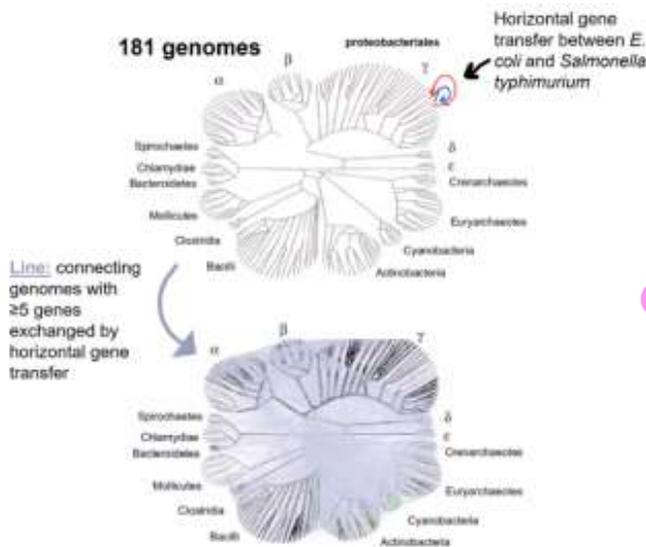
Mutant *E. coli* (10% faster growth)
Over night culture:
≈ 27.5 generations

≈ 5.7-fold more

→ ≈ 2^{2.5}-fold more mutant cells than wt *E. coli*

Lenski Versuch: Ersetzung einer alten Spezies durch eine neue durch schnelleres Wachstum

Phylogenetisches Netzwerk

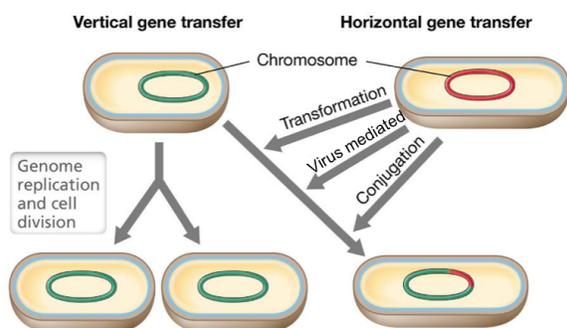


Der phylogenetische Baum zeigt die Beziehungen von Spezies aufgrund eines monophyletischen Marker Gens (z.B. 16S rRNA Gen). *→ nur rRNA → hoch konserviert*

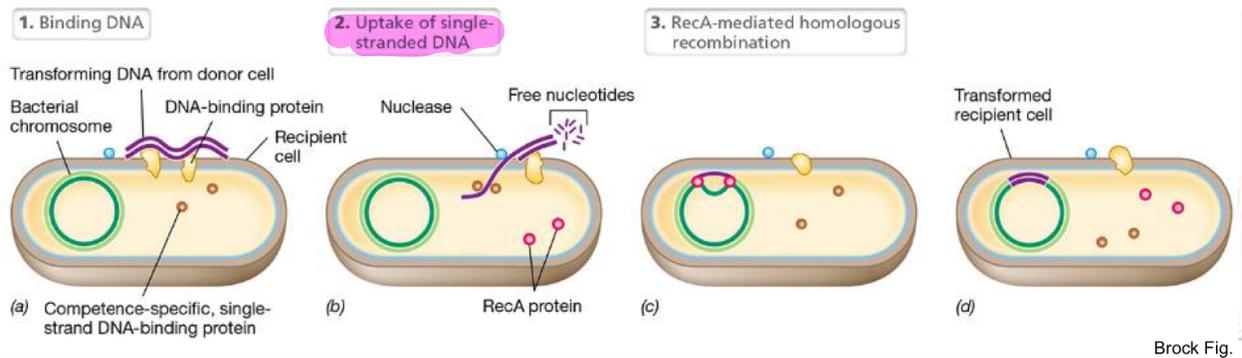
Das phylogenetische Netzwerk zeigt die Beziehungen von Spezies aufgrund ihres Gesamten Genoms. *mit horizontalem Gentransfer*

Wichtig: Netzartige Struktur, alles ist mit allem Verbunden: Horizontaler Gentransfer können auch über sehr grosse Distanzen (zwei Spezies, die im phylogenetischen Baum weit auseinander sind) passieren können.

Mechanismen von horizontalem Gentransfer



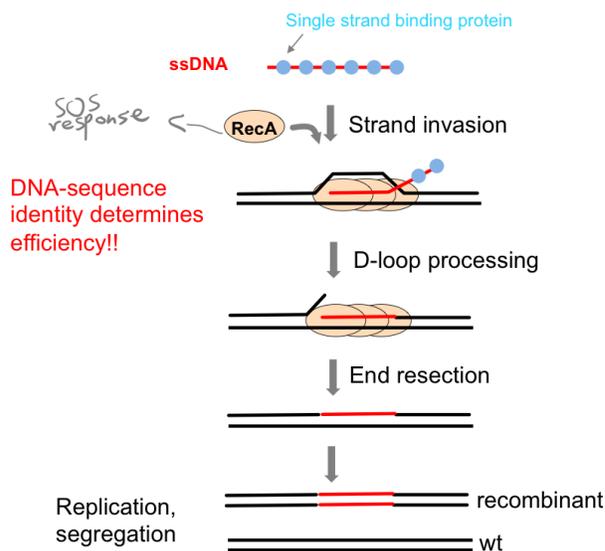
Natürliche Transformation



Natürliche Kompetenz (Kompetenz = Fähigkeit von Zellen, freie DNA aufzunehmen, Voraussetzung für Transformation) → *Aktiver DNA Import*

- Einige Bakterien, wenige Archaeen
- Aktiver DNA import durch Typ IV Pilus
- Einfachstrang lineare DNA im Cytosol (= flüssiger Bestandteil des Cytoplasma)
- Oft an homologe Rekombination gekoppelt

Homologe Rekombination → *Während Teilung*



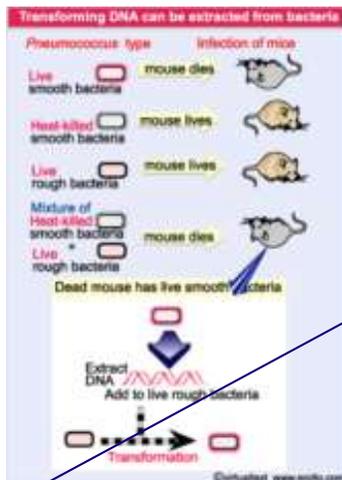
Genetischer Wechsel zwischen homologer DNA von zwei verschiedenen Quellen. Passiert, nachdem DNA aufgenommen wurde durch natürliche Kompetenz Zellen.

RecA: ATP angetriebener ssDNA (= single stranded DNA) Wechsel

- **Inkorporation** (= Eingliederung) der DNA nach dem Gentransfer
- Löschung / Inversion (= Umwandlung) von DNA → *Austausch*
- Mischung von Allelen innerhalb einer Population von Bakterien / Archaeen

Ergebnis: nach Zellteilung eine Tochterzelle, die den alten Genotyp und eine die den neuen Genotyp trägt.

Avery, MacLeod and McCarty Experiment (1944)

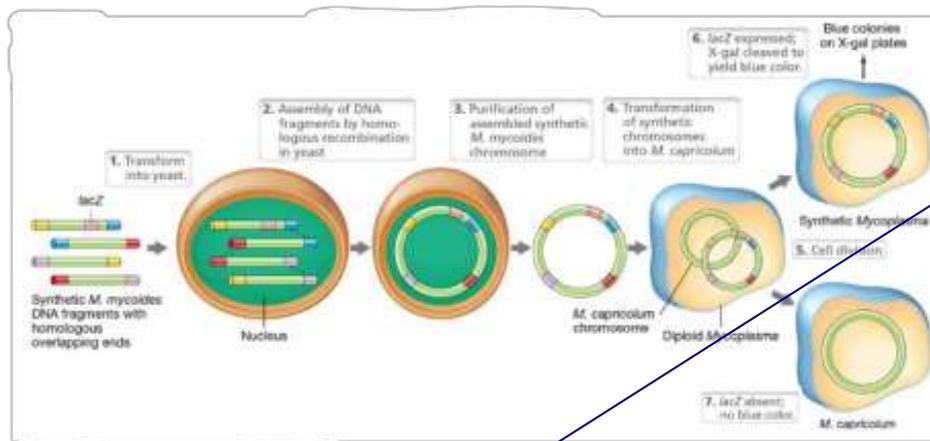


Kapseln (= Dicht angehängte äussere Schicht, welche kleine Partikel abhält) sind der wichtigste Virulenzfaktor von Streptococcus pneumoniae (Die Fresszellen können die Kapseln nicht richtig bekämpfen)

Entdeckung: Durch Zusammenführen von hitzegetöteten glatten Bakterien und lebenden rauen Bakterien stirbt die Maus ebenfalls, da diese lebenden rauen Bakterien die DNA von den getöteten Kapselbildenden Bakterien aufnehmen und anwenden können um selbst Kapseln bilden zu können.

Dies war der erste Nachweis dafür, dass DNA die Erbsubstanz ist.

Craig Venter und Clyde Hutchinson Experiment



Der Versuch bewies, dass man synthetisch hergestellte DNA verwenden kann, um eine Zelle zu steuern.

Dazu war eine Labortransformation nötig:

- dsDNA, nicht ssDNA
- keine / kleine Rekombination, da im Gegensatz zur natürlichen Transformation kein DNA Aufnahmesystem, wo ein DNA Strang hydrolysiert wird und es dann zu einer homologen Rekombination kommt
- Transiente (= Vorübergehende) Membranstörung. Die Membran wird kurzzeitig porös gemacht

Plasmide

Zirkuläre DNA ($10^3 - 10^6$ BP), die keine essentiellen Gene codieren. (Im Gegensatz zum bakteriellen Chromosom, welches essentielle Gene enthält)

Replikation: Autonom (also Unabhängig) vom Chromosom. Kontrolliert die Kopierungsanzahl in der Zelle selber. 1 – 100 Kopien pro Zelle.

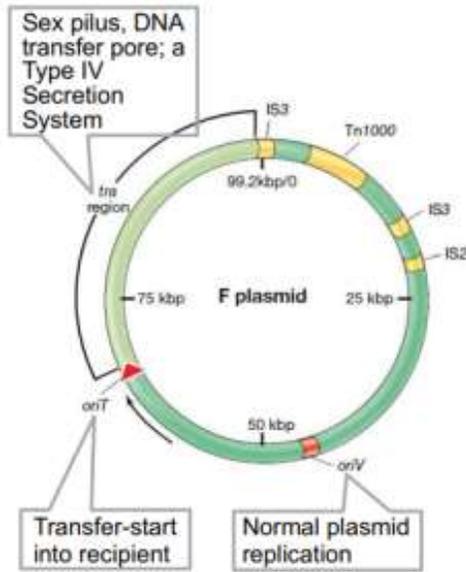
Segregation: Jede Tochterzelle wird mit einem Plasmid ausgestattet (Zufällig oder Reguliert)

Fracht Gene: Metabolische Wege, Antibiotikaresistenz, Resistenz gegenüber toxischen Metallen, Bakterizide, Virulenzfaktoren...

→ *benutzen Ribosome*

Plasmide erhöhen die Vermehrungsfähigkeit ihres Wirtes und nutzen dies aus, um sich selbst besser vermehren zu können -> Es sind selfish (selbstsüchtige) DNA Elemente

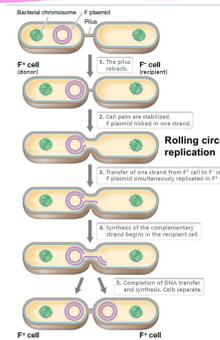
Plasmid Konjugation



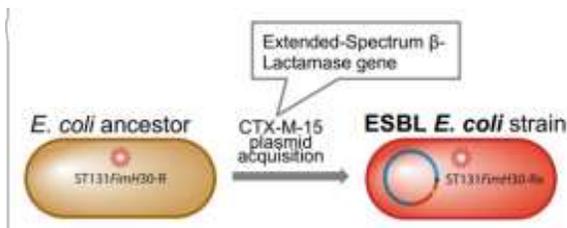
Sehr viele Plasmide (Konjugative Plasmide) enthalten die Gene, um ein Typ 4 Sekretionssystem (genauer: Sex Pilus) auszubilden.

Dieser wird dann verwendet, um das Plasmid von der männlichen Zelle zur weiblichen Zelle zu übertragen (siehe Vorlesung 2).

Diese Konjugation ist weit verbreitet in Bakterien und in einigen Archaeen.



Antibiotikaresistenzproblem in der Schweiz am Beispiel von ESBL E. Coli Stamm



Der ESBL E. Coli Stamm verbreitet sich schnell und transferiert (durch Konjugation) Resistenz Plasmide. Ausserdem werden die Vorgängerbakterien durch Antibiotikabehandlung abgetötet wodurch die ESBL E Coli Bakterien keine Konkurrenz mehr haben und sich noch mehr verbreiten.

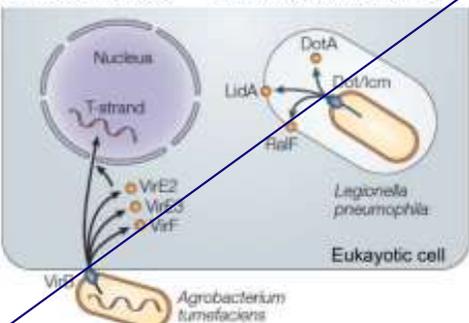
Andere Typ IV Sekretionssysteme

1. Conjugation



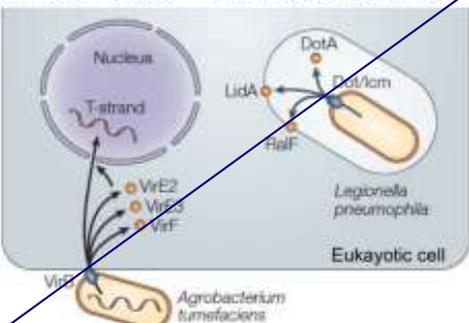
Typ IV Sekretionssysteme Transferieren (ausser konjugativen Plasmiden):

2. Plant infection



- T-DNA -> Verändert Pflanzenzellen genetisch um dafür zu sorgen, dass die Pflanzenzelle das Bakterium ernährt (z.B. A. Tumefaciens). Kann auch in der Pflanzengenforschung eingesetzt werden, um Gene in Pflanzenzellen einzuschleusen.

3. Animal/Amoeba infection



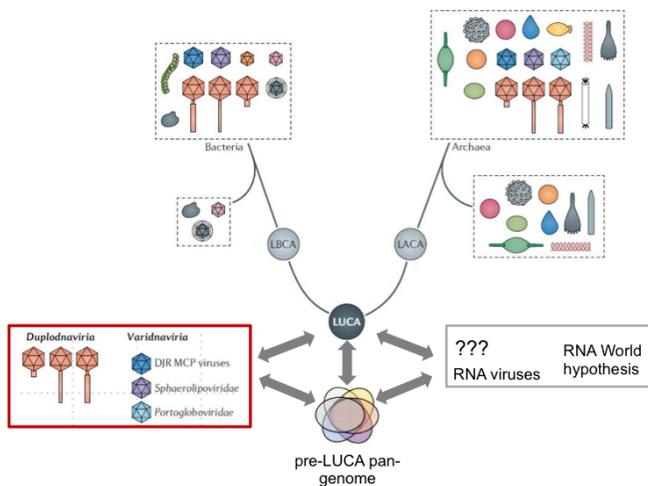
- Virulenzfaktoren -> Zellbiologisch aktive Substanzen werden in eine tierische Wirtszelle eingeschleust, um diese zu zwingen, etwas Vorteilhaftes für das Bakterium zu tun (z.B. L. Pneumophila).

Viren

Definition Virus: Genetisches Element, welches sich lediglich innerhalb von lebendigen Zellen (= Wirtszellen) replizieren kann.

Anzahl: Mehr als 10^{31} Viren

Klassifizierung: Ist Schwierig: Diversität, konservierte Konstruktionsprinzipien. Es gibt aber vermutlich 4 Reiche von Viren. Zwei davon waren vermutlich schon bei LUCA vorhanden: Duplodnaviria und Varidnaviria. Diese sind bei Bakterien nachweislich sehr weit verbreitet und bei Archaeen auch, aber dort gibt es etwas weniger komplette Informationen. Diese Virenreiche infizieren auch Eukaryoten.



Module für die Replikation und Kapsid evolvierte vermutlich von Genen von Pre-LUCA Pangenom.

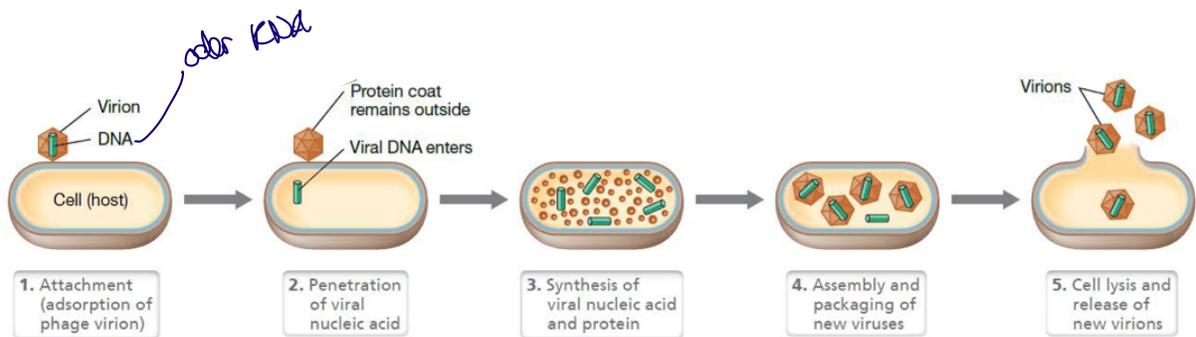
Take home message: Vermutlich hatte auch schon LUCA ein Problem mit Viren

RNA Welt Hypothese mit RNA Viren ist vermutlich nicht logisch, da es heute kaum Bakterien und Archaeen Viren gibt, die RNA als Genom besitzen. Die Eukaryoten Viren (mit RNA) sind vermutlich erst entstanden, als es Eukaryoten gab.

Virusinfektion: Lytische Infektion

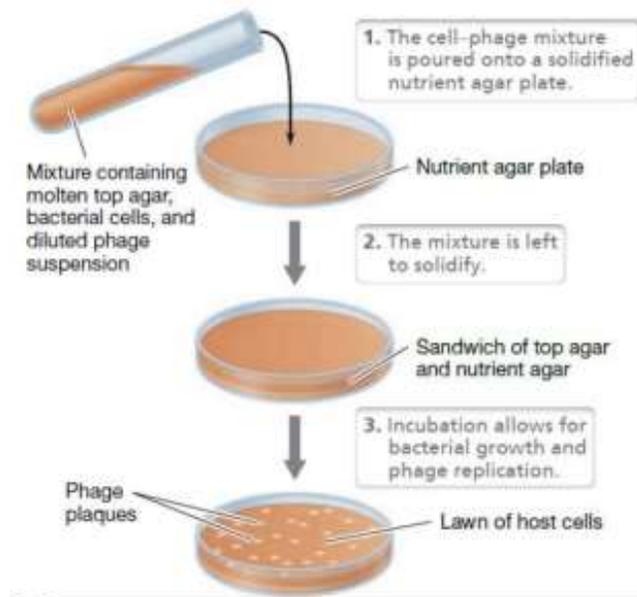
Virulente Phagen = Lytische Infektion, tötet die Wirtszelle

Transduktion



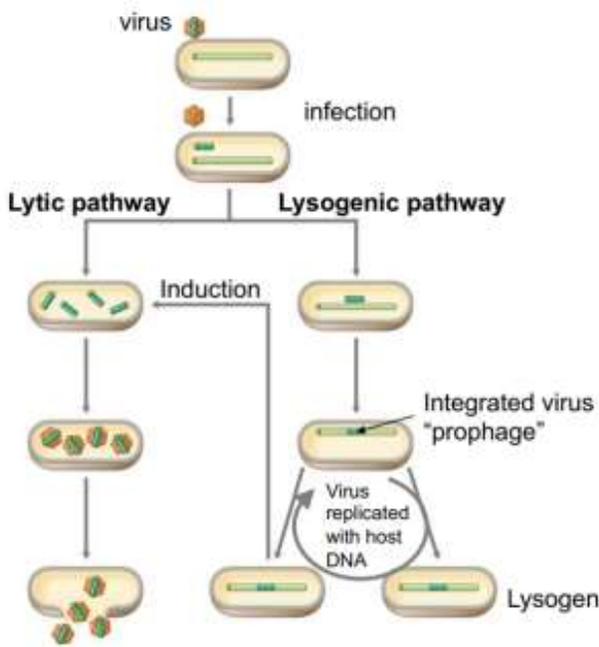
Phagen $\hat{=}$ Viren, die Bakterien
 ↳ fallen

Virulentes Virus: Plaque Test



Bei den Plaques (Löcher) vermehren sich aus einem Phagen viele, töten vorhandene Bakterien und macht es neuen Bakterien schwer / unmöglich sich dort zu vermehren. Da Phagen viel kleiner sind und es dort keine Bakterien mehr gibt, gibt es dort keinen Tyndall Effekt -> An den nicht trüben Stellen befand sich zu Beginn ein Phage.

Temperate Viren \rightarrow Retroviren für Bakterien & Archaeen



Temperate Viren entscheidet sich ein gewisser Anteil für den lytischen Weg, bei welchem die Virenproduktion erhöht und der Wirt am Ende getötet wird und ein Anteil für den lysogenen Weg. Bei diesem wird das Virusgenom in das Genom des Wirts eingebaut und wird so zur Prophage. Diese werden dann zusammen mit der Zelle repliziert. Hat die Bakterienzelle Probleme (z.B. SOS Response, siehe vorherige Vorlesung), so verwendet die Prophage den LexA Repressor, um seine lytischen Induktionsgene freizuschalten und den lytischen Weg zu gehen. Dies wird Induktion genannt. Prophagen beherbergende Archaeen und Bakterien werden Lysogene genannt. Prophagen encodieren manchmal auch Cargo Gene, die die Fitness des Wirts sogar erhöhen können.

Beispiel für diese Fitness Faktoren: Cholera Toxin Phage

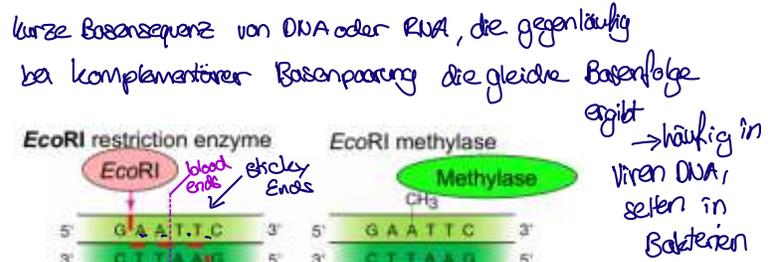
Das Cholera Toxin wird encodiert durch einen Phagen, welcher ein Vibrio Bakterium befallen und Lysogen konvertiert hat. Das Cholera toxin führt bei Menschen zu starkem Durchfall (bis 25L pro Tag) und das Bakterium sowie der Prophage wird dadurch extrem effizient vermehrt.

Verteidigung gegen Infektion (Fremde DNA)

Verschiedene Bakterien besitzen verschiedene Verteidigungssysteme. Einige davon sind noch nicht entdeckt. Einige sind konserviert in Eukaryoten (Cyclisches Nukleotid -> STING Immunantwort bei Tieren auf Viren).

Restriction / Modification System

Die **Restriction Endonuclease** erkennt **Palindrome Sequenzen** und **spaltet diese**. Die Bakterieneigene DNA ist dabei geschützt, da diese EcoRI Enzyme nicht binden können, wenn die **DNA Methyliert** ist. Die Methylase sorgt für diese Methylierung der DNA (Modification).



→ **Palindrome Sequenzen in bakteriellen DNA immer methyliert**

Werner Arber, Daniel Mathans und Hamilton O. Smith haben 1978 herausgefunden, dass dieses Restriction System Phagen zerstören kann und so die Bakterienzelle überleben kann. Ausserdem haben sie herausgefunden, dass man diese Restriction Enzyme und eine DNA Ligase verwenden kann, um z.B. Plasmide synthetisch herzustellen (siehe Teil von N. Ban).

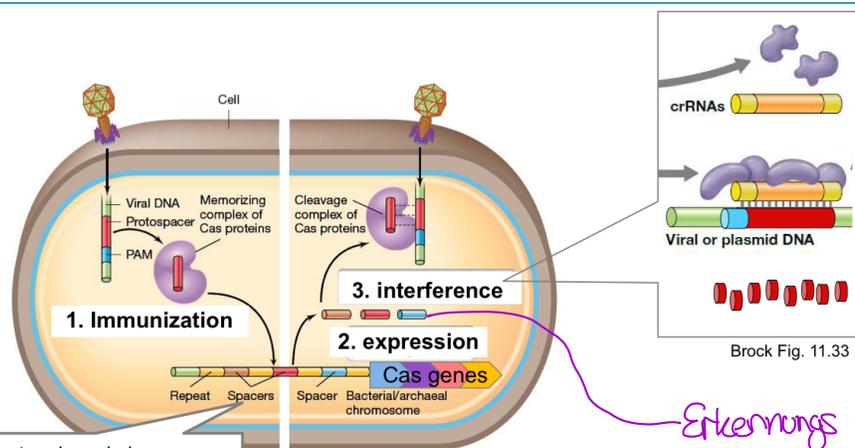
CRISPR System

CRISPR immunity

CRISPR/Cas systems form an **adaptive immune defence**.

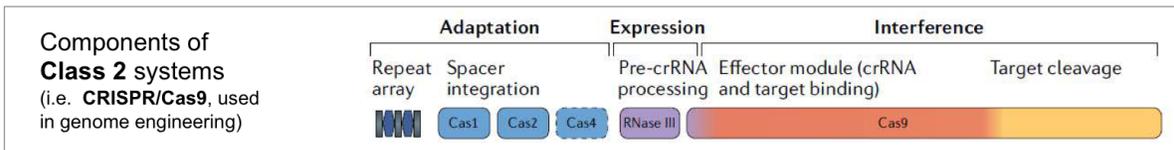
in many *Bacteria* (40%) and *Archaea* (90%).

If a host is **attacked** by the same phage for a **2nd time**, it can **stop the infection**.



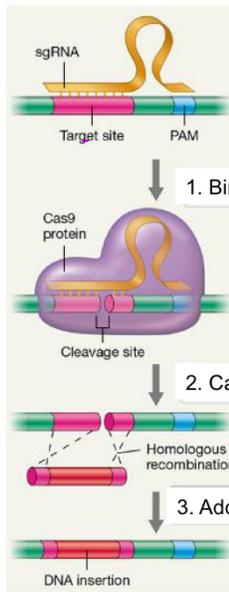
CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)

Erkennungs RNA



Markarova 2020 Nature Rev Micro

kann einfügen,
löschen oder ersetzen



DNA die du verändern willst
sgRNA: künstlich hergestellt

1. Binding of Cas9 to target:sgRNA

2. Cas9 site-directed cleavage

3. Add insert; integration by homologous recombination

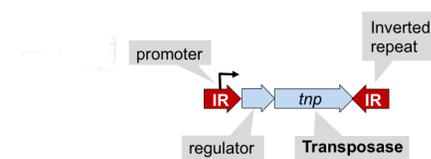
(a) Genome insertion

Genom Engineering

E. Charpentier und J. Doudna haben herausgefunden, dass dieses System in Bakterien auch für **Genom Engineering** verwendet werden kann. Das **CRISPR-Cas Komplex System** kann mit einer bestimmten **crRNA** beladen werden. Dieser Komplex wird dann zu einem **Sequenzspezifischen DNA Bindungs- oder Verarbeitungsenzym**.

Z.B. Kann, wie links beschrieben, ein solcher Komplex verwendet werden, um im Genom einen Schnitt an einer genau definierten Stelle im Genom gemacht werden und dort dann DNA eingefügt werden.

Genome Umbauen: Transposable Genetische Elemente

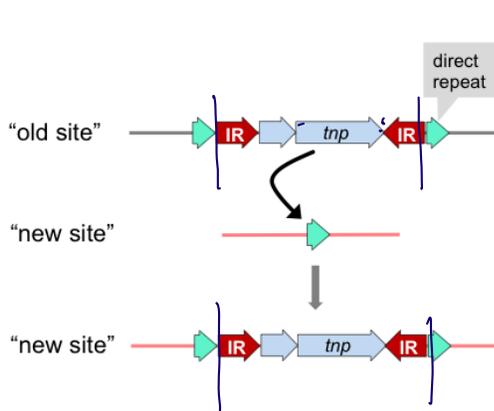


Insertionssequenzen sind die einfachsten Transposable genetische Elemente.

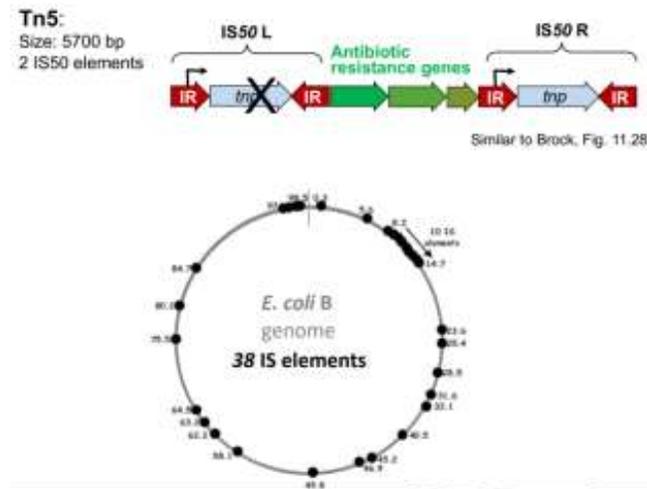
Diese sind interessant, weil:

- sie die Genomstruktur massiv verändern können
- sie Evolutiv wichtig sind, weil einige dieser Transposablen Systeme die Vorgänger vom CRISPR-Cas System waren
- sie eine Basis für verschiedene Molekularbiologische Werkzeuge sind

Transposition



Ist die Bewegung eines transposablen Elements zu einer anderen Stelle (Chromosom, Plasmid, Virus). Dies Passiert $10^{-5} - 10^{-7}$ mal pro Generation. Die **Transposase** Katalysiert die Transposition. Die **Direct Repeats** sind die doppelte Zielsequenz und bestehen aus 5-9 Nukleotiden. Die **Inverted Repeats** sind die Enden des **Transposons** (= können Locus ohne RNA Zwischenstufe ändern) und bestehen oft aus mehr als 15 Nukleotiden.



Bemerkung: Beim Transposon links befindet sich vor und nach dem gesamten Gen je ein Direct Repeat. Durch Genfehler ist eine Transposase defekt, aber eine Reicht für die Transposition aus.

Komposite Transposon

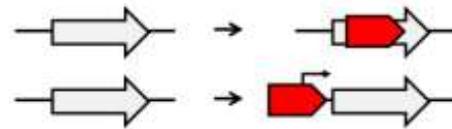
- Inverted Repeats = 2 Kopien eines IS Elements
- Encodieren eine Transposase und andere Gene (z.B. Antibiotikaresistenz)
- Integrieren und bewegen sich wie IS Elemente

Abundanz (= Häufigkeit) und Lokation

- Normalerweise mehrere **Transportable Elemente pro Strang**
- Befinden sich innerhalb von **Chromosomen, Plasmiden, Viren (selfish)**

Transposition

- **Gen unterdrückung / reaktivierung**
- Promotoren

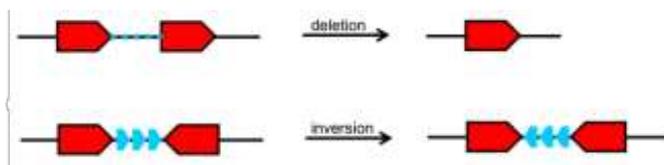


Excision

- **Präzise Excision:** Rekombination zwischen 5-9 BP Duplizierten Zielsequenzen
- **Impräzise Excision:** Rekombination zwischen >15 BP IS-Modulen eines gegenteiligen Transposons

Rekombination

- **Deletion:** Rekombination zwischen Zwei Elementen derselben Orientierung
- **Inversion:** Rekombination zwischen zwei Elementen in gegenläufiger Orientierung



→ Art von Mutation

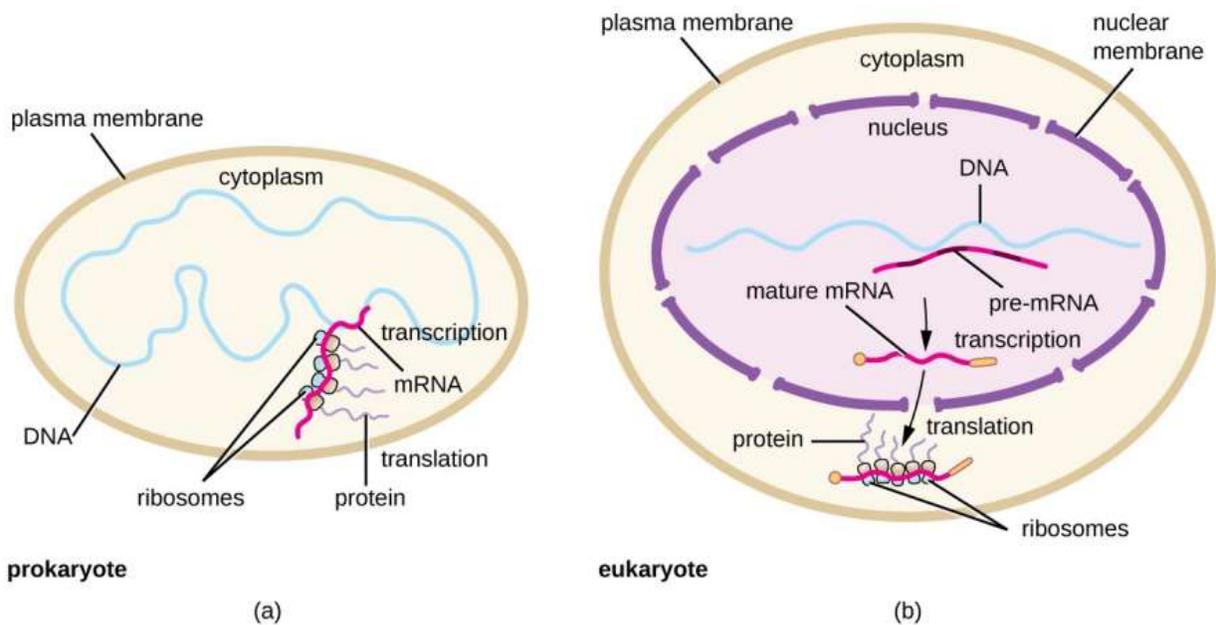
C: Konzepte in Eukaryoten (Y. Barral)

Vorlesung 1

Normalerweise besitzen Eukaryoten die folgenden Organellen

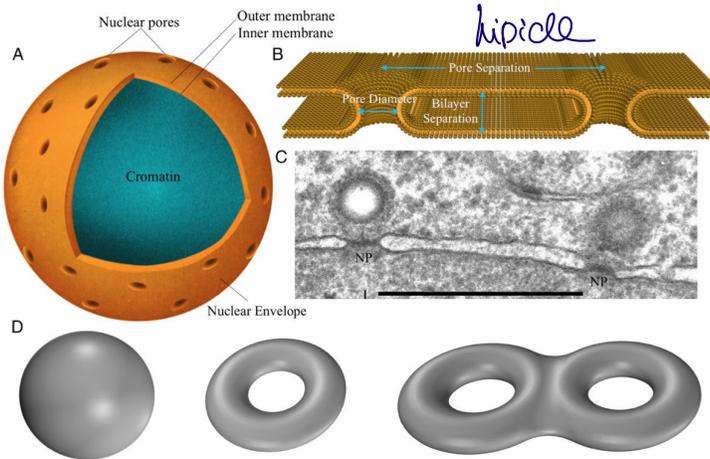
- Nucleus
- Cytoplasma
- sekretorischer und endozytischer Weg
- Mitochondrien und Chloroplasten
- Flagella und Cilia

Informationsmakromoleküle wie Nucleinsäuren und Proteine erlauben zelluläre Operationen wie Energieumwandlung und Reproduktion.



Wie man im Bild oben sehen kann, findet bei Prokaryoten die Transkription und Translation am selben Ort statt. Bei Eukaryoten findet die Transkription im Zellkern statt. Die gebildete pre-mRNA wird zur mature mRNA ausgebildet, verlässt den Nucleus und kann im Cytoplasma translatiert werden.

Der Nukleus



Nucleolus

Zusammenbau von ribosomalen Proteinen, aus dem Zytoplasma importiert, auf prerRNA im Nucleolus

nehmen an Produktion 60S und 80S-Untereinheit teil

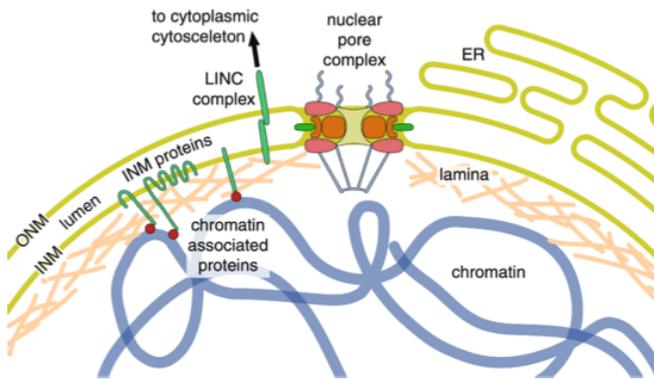
kleines Körperchen im Zellkern aus DNA, RNA und Protein, hat keine Membran

pre-mRNA: Zwischenprodukt DNA Transkription
Vorgänger mRNA

Nukleus Hülle

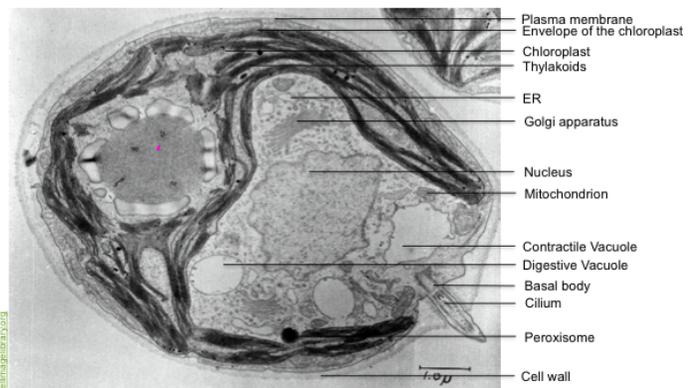
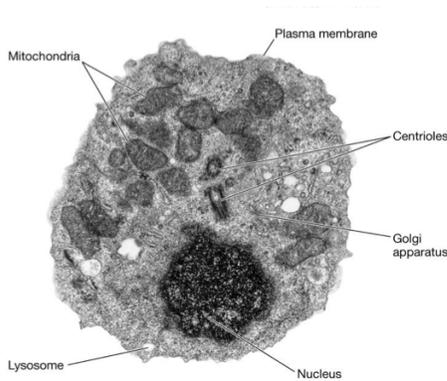
Besteht aus vielen aneinandergereihten Ringen (D), die so diese poröse Hülle bilden. Die Poren sind Elektronendicht (schließt die Pore und kontrolliert, was rein oder raus geht).

The Nucleus



Erweiterung der Nukleinhülle in das Cytoplasma. → ER

Unterschiedliche eukaryotische Zellen



Links: Eine Tierische Zelle. Rechts: Eine Zelle einer Alge

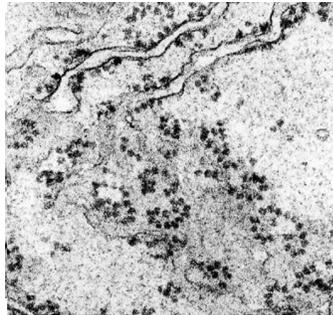
Kontraktile Vakuole: Ausgleichung des osmotischen Drucks durch Herauspumpen von Wasser aus der Zelle. Dazu füllt sie sich mit Wasser und zieht sich zusammen um das Wasser nach aussen zu pumpen.

Vorteile Kompartimentierung

- Kontrolle was rein, was raus
- Trennung von Mechanismen

Basal Body und Cilium: Werden benötigt, um die Zelle zu fortzubewegen. In ihrer Nähe befinden sich viele Mitochondrien, da diese Organellen viel Energie benötigen.

Cytoplasma

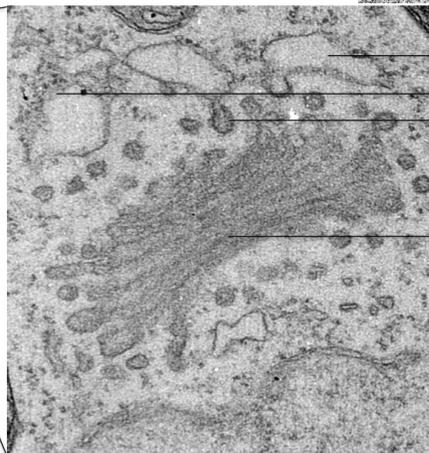
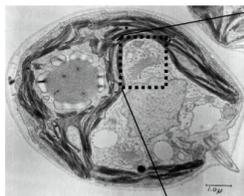


Auf dem Bild sieht man das Zytoplasma mit den Ribosomen (schwarze Punkte). Diese Ribosomen bilden «Ketten» aus. Das sind die Ribosomen, welche gerade an einer mRNA arbeiten. Da sie kleine Kreise bilden, gibt es die Theorie, wenn sie fertig sind mit der Translation beginnen sie wieder von vorn.

Oben sieht man das ER. Membranproteine oder Proteine, die später sekretiert werden, werden von Ribosomen translatiert, die sich auf der Oberfläche vom (rauen) ER befinden.



Endomembransystem

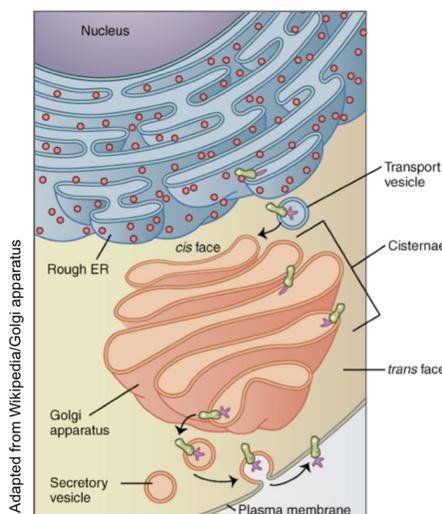


ER
Rough ER
Vesicle budding out
Golgi apparatus

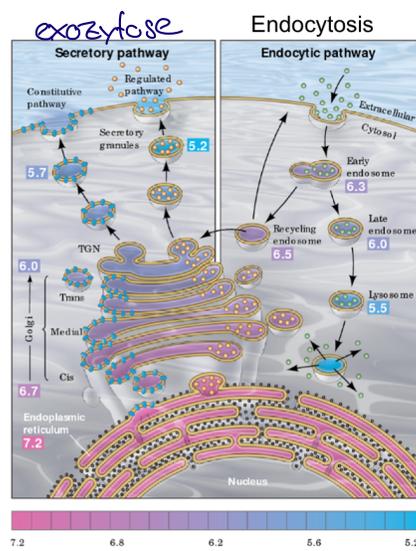
Das ER, an welchem Proteine hergestellt werden, bildet Vesikel aus. Die Vesikel sind voll mit noch nicht vollständig prozessierten Proteinen (noch keine Zucker angehängt). Diese Vesikel bewegen sich dann zum Golgi-Apparat und gibt seinen Inhalt in ihn.

Wenn der Golgi-Apparat mit seiner Arbeit fertig ist, werden die fertigen Proteine direkt durch das Cytoplasma oder durch Vesikel zu ihrem Zielort gebracht.

Wenn der Golgi-Apparat



Adapted from Wikipedia/Golgi apparatus



Paroutis et al., Physiology, 2004

Auf dem rechten Bild sieht man, dass das äussere der Zelle leicht sauer ist.

Wenn die Membranproteine oder Proteine zur Sekretion von der Synthese zu ihrem Zielort gelangen, ändert sich also der pH Wert ihrer Umgebung von neutral zu leicht sauer. Beim

Endozytose Weg werden Proteine von aussen in Vesikel verpackt. Entweder passt sich der pH Wert

↳ rein

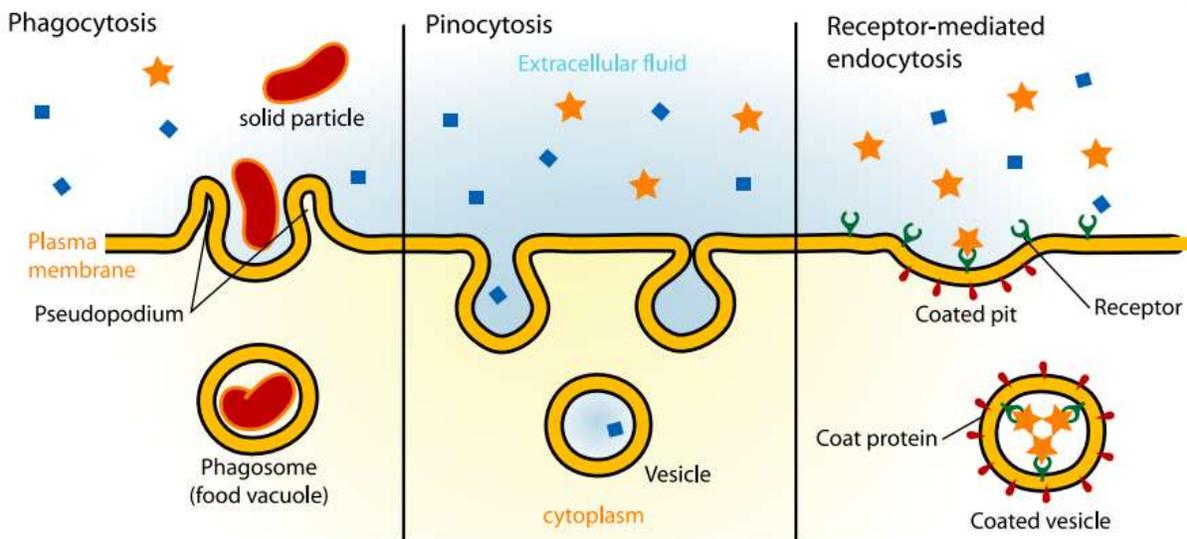
Exozytose: raus

dann an und die Proteine werden beim Golgi-Apparat rezykliert oder sie werden zum sauren Lysosom gebracht, wo der Inhalt überprüft werden kann.

Endozytose Beispiele

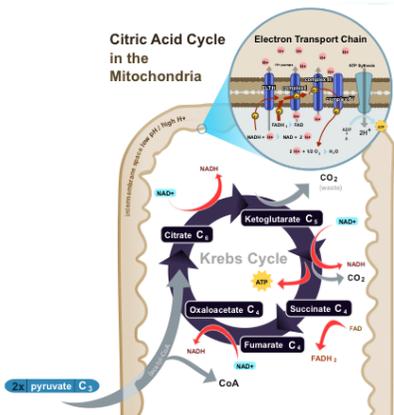
- Amöbe verschlingt eine Hefezelle
- Rindertrachealzelle nimmt Viruspartikel auf
- Herzendothelzelle nimmt Flüssigkeit auf

The main modes of endocytosis



Bei der **Phagozytose** werden grosse Partikel aufgenommen (Beispiel: Vorticella Convallaria, frisst Bakterien oder Chlorella (Alge), die sich in Vakuolen von einem Paramecium befindet und Glukose für diesen Produziert). Die **Pinozytose** sorgt dafür, dass extrazelluläre Flüssigkeiten und alles was in diesen Flüssigkeiten schwimmt in die Zelle aufgenommen werden kann. Bei der **Rezeptorvermittelten Endozytose** bindet ein bestimmter Stoff an einen Rezeptor. Danach Formen sich Vesikel mit diesem Stoff an den Rezeptoren im Innern mit Mantelproteinen auf der Aussenseite.

Mitochondrien



Wichtig: In Mitochondrien herrscht ein Protonengradient ([H⁺] gering innen und [H⁺] hoch aussen), wodurch die ATP Synthase ATP erzeugt.

↳ F₀ in Membran, F₁ außerhalb

2 Pyruvate (aus Glykose) werden durch den Krebszyklus in CO₂ umgesetzt, wobei NADH erzeugt wird. Dieses wird in der Elektronentransportkette verwendet, um O₂ zu H₂O umzusetzen und so einen Protonengradienten aufzubauen.

(Siehe Katabolismus Vorlesungen von J. Vorholt)

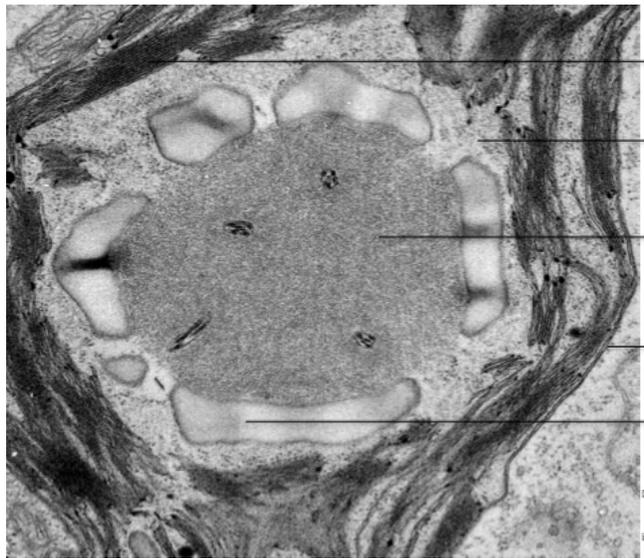
Endosymbiontentheorie: Mitochondrien waren früher unabhängige Bakterien, die von Zellen aufgenommen wurden → Symbiose; wurde abhängig

- eigene Membran (wie Bakterien)
- innere Membran wie Bakterien
- äußere Membran eukaryotisch
- mutual (wissen selbst teilen) → eigene DNA (ringförmig)

• eigene Proteine

↓
große Teile verloren

Chloroplast *Untergruppe Plastid*



Granum of thylakoids
↳ ATP Synthese

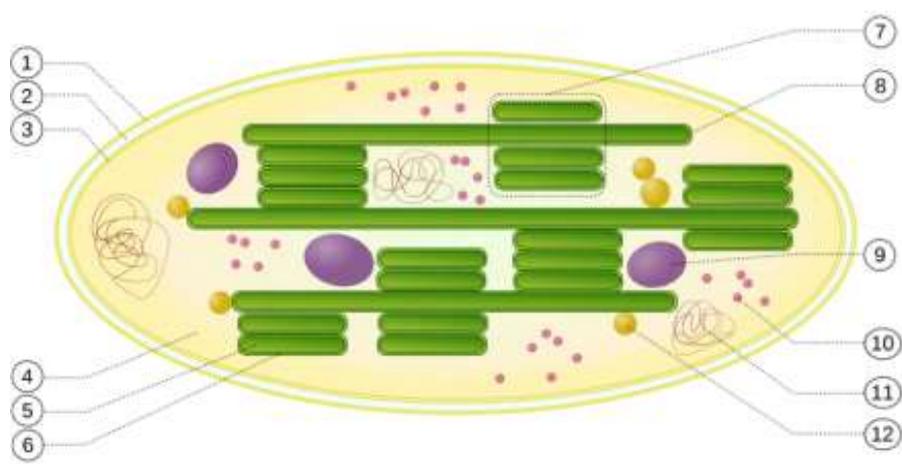
Stroma

Pyrenoid (CO2 storage)

Double membrane of the chloroplast

Starch granule
↳ Glucose Speicher

Der **Pyrenoid** (besteht hauptsächlich aus **RuBisCo**) ist wichtig, um **CO2 zu binden**, da das CO2 z.B. im Wasser nicht so leicht zugänglich ist. Die Synthetisierte Glukose wird in **Starch Granules** rund um den Pyrenoid gelagert. Die **Thylakoide** bilden im Normalfall Granums, wo ATP durch das Licht generiert wird.



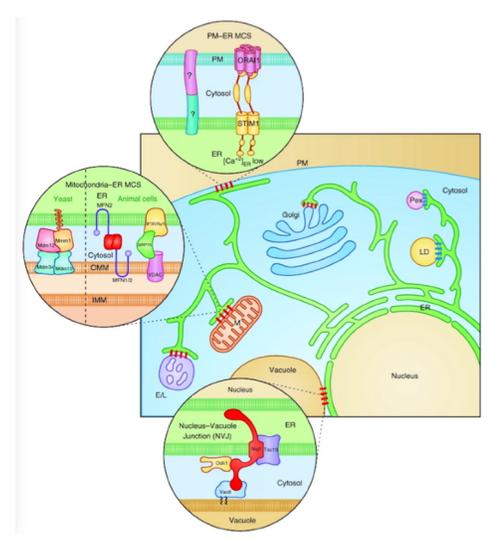
- Chloroplast ultrastructure:**
1. outer membrane
 2. intermembrane space
 3. inner membrane (1+2+3: envelope)
 4. stroma (aqueous fluid)
 5. thylakoid lumen (inside of thylakoid)
 6. thylakoid membrane
 7. granum (stack of thylakoids)
 8. thylakoid (lamella)
 9. starch
 10. ribosome
 11. plastidial DNA
 12. plastoglobule (drop of lipids)

Wichtig für hier: Katabolismus von J. Vorholt und Anabolismus von J. Piel, um zu verstehen, wie Photosynthese und RuBisCo funktioniert.

Lipidhandel

Wo kommen die Lipide für die Mitochondriale Membran her?

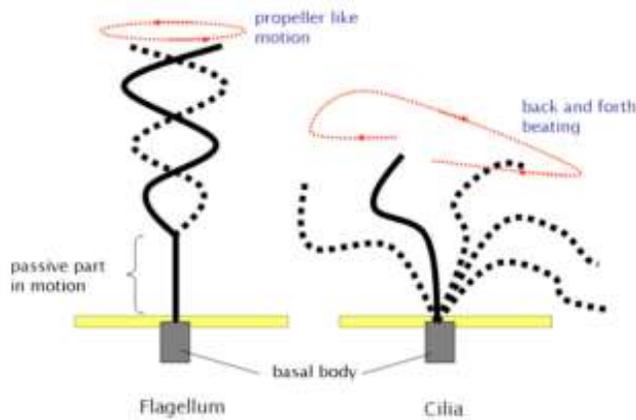
Es gibt einen **sehr engen Kontakt** (fusionieren aber nicht) zwischen der **Mitochondrialen Membran** und der **ER Membran**. **Dazwischen befinden sich Proteine**, die Lipide von der ER Membran durch das Zytoplasma auf die Mitochondriale Membran zu übertragen. Im Allgemeinen **besitzt das ER mit vielen anderen Organellen oder der Plasmamembran über Proteine kontakt** (Siehe Bild rechts). Diese sind sehr Wichtig für den Lipidhandel zwischen dem ER und Organellen oder der Plasmamembran.



Auch z.B. Calcium kann durch diese Kontaktstellen übertragen werden.

Mitochondrien bilden auch noch Kontakt (über Proteine) zu anderen Organellen wie dem Golgi-Apparat, Peroxisomen, Lysosomen, Lipidtropfen und Melanosomen.

Cilia / Flagella



Das Fortbewegungsorgan kann sich auf zwei unterschiedliche Arten bewegen: Wie ein Propeller (dann ist es ein Flagellum) oder wie eine Peitsche (dann ist es ein Cilium).

LECA hatte (aufgrund von dem, was Eukaryoten heute besitzen):

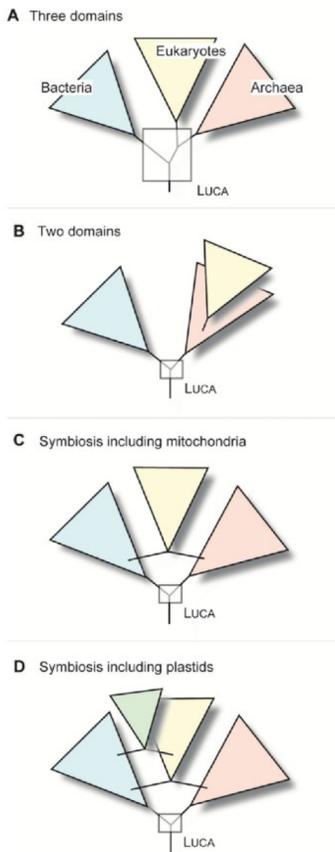
- Ein (oder Mehrere) Nucleus
- ER
- Golgi-Apparat
- Vakuolen
- Peroxisome
- Endosome
- Cilia oder Flagella
- Mitochondrien?
- Kein Chloroplast

Herkunft der Eukaryoten

- Viele Eukaryotische Gene besitzen ihre nächsten Verwandten in Bakterien oder Archaeen
- Chimärische Natur der Eukaryoten
- Monophyletische Herkunft der Eukaryoten

aus Archaeen und Bakterien

Verschiedene Möglichkeiten, um die Domänen Beziehungen im Lebensbaum zu sehen



A: Drei Domänen Baum: Basierend auf rRNA Phylogenie, Gleichrangige Domänen

Stammgeschichte

B: Zwei Domänen Baum: Bakterien und Archaeen. Eukaryoten sind aus den Archaeen entstanden.

→ ähnlichere Zellen, DNA

C: Symbiose mit Mitochondrien: Weil Eukaryoten nicht nur evolvierte Archaeen sind, LECA hatte Mitochondrien. Sobald die Mitochondriale DNA miteinbezogen wird handelt es sich nicht mehr um einen gegabelten Graph.

→ Endosymbiontentheorie

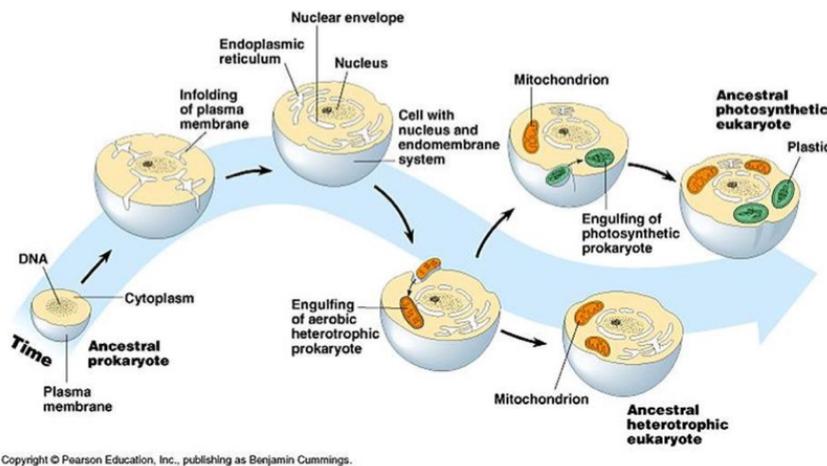
Organellen, die aus endosymbiontisch lebenden Zellen hervorgegangen sind und für Photosynthese gebraucht werden

D: Symbiose mit Mitochondrien und Plastiden: Wenn Plastide ebenfalls miteinbezogen wird, entsteht eine neue Domäne mit Photosynthese betreibenden Eukaryoten. Diese Eukaryoten besitzen auch Gene von einem Plastid Vorfahren.

→ Überbegriff Chloroplasten

Eukaryoten sind vermutlich aus Prokaryoten entstanden, die Eng miteinander Interagiert haben. Dies passiert oft, somit hätte es viele dieser Symbiosen geben müssen. Aber der Eukaryotische Phylogenetische Baum ist monophyletisch (haben alle den gleichen Vorfahren), es hat also nur einen Event gegeben, wo Eukaryoten entstanden sind.

Entstehung von Eukaryoten: Textbuch Ansicht



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

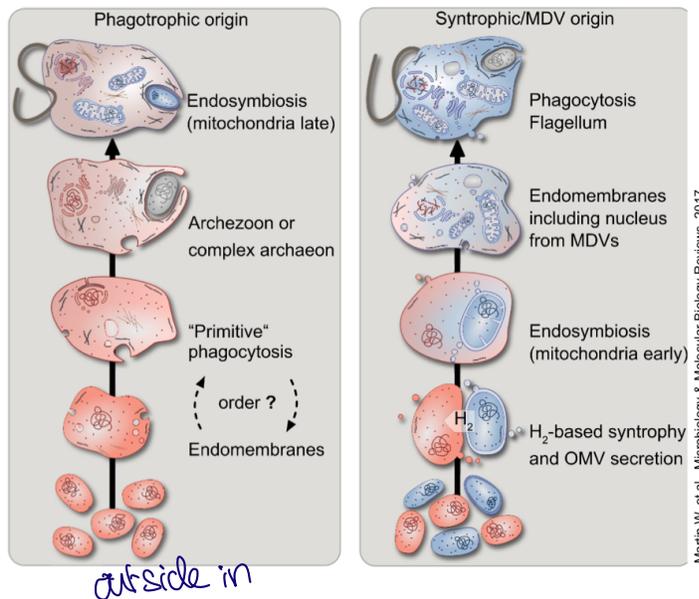
Eine Eukaryotische Zelle (oder Protoarchaeon) entstand aus einem Archaeon.

Später wurde ein Alphaproteobakterium aufgenommen, welches zum Mitochondrium wurde und das

Protoarchaeon aerob

machte (-> Vorfahre heutiger Eukaryoten). Eine dieser aeroben Eukaryoten ging dann eine Endosymbiose mit einer Cyanobakterie ein, die dann zu den Plastiden wurde. (-> Vorfahre heutiger Pflanzenzellen). Dies ist das klassische Modell, es gibt aber einige Probleme damit und es gibt mehr Modelle. Es wurde aber relativ lange angenommen, da es Eukaryoten ohne Mitochondrien gibt. Allerdings besitzen diese Eukaryoten Gene, die von Mitochondrien stammen (den Bauplan von Mitochondrien im Gen im Nukleus). Somit mussten diese früher auch Mitochondrien besitzen. Die Textbuchversion scheint somit doch falsch zu sein.

Endosymbiose Modelle → *outside in*



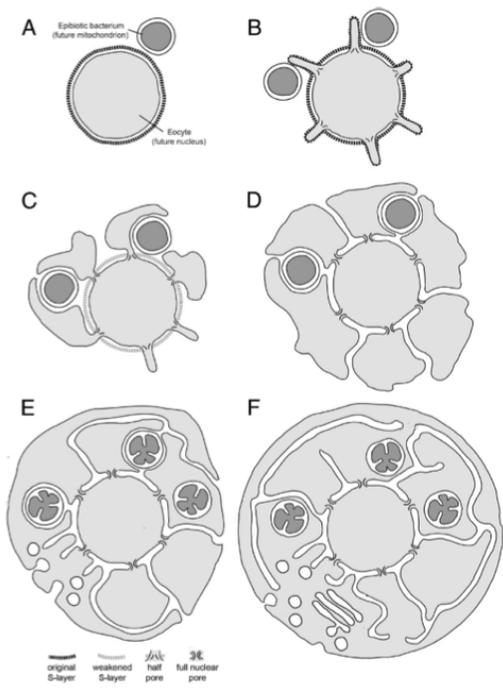
Phagotropischer Ursprung *mitochondria late*

Ein Alphaproteobakterium wurde von einer Phagozytose fähigen eukaryotischen Zelle gefressen aber nicht verdaut. Dadurch wurde es zu einem Organell.

Syntrophischer / MDV Ursprung *mitochondria first*

Ein Bakterium und ein Archaeon sind eine Symbiose eingegangen. Dadurch ist das Bakterium in das Archaeon aufgenommen worden. Der Nukleus hat sich erst später entwickelt.

Inside Out Model → *zelle bildet sich um Bakterium*



Ein Archaeon hatte eine enge Symbiose mit einem Alphaproteobakterium (A). Das Archaeon entwickelte dann Strukturen, die die engere Zusammenarbeit mit dem Bakterium ermöglichen (B). Diese extrazellulären Domänen mussten schon Proteinsynthesen durchführen können, um optimal mit dem Bakterium interagieren zu können, was die Separation von Transkription und Translation begünstigt hätte können. Da die Proteinsynthese die meiste Energie benötigte fand sie immer mehr in der Nähe der Bakterien statt, während sich die extrazellulären Domänen immer mehr ausbreiteten (C, D). Die Bakterien wurden mit der Zeit die Mitochondrien (E) und an einem gewissen Punkt gab es eine Abgrenzung zwischen der neu entstandenen Eukaryotischen Zelle und der Umgebung (F). Das was wir heute als Nukleus kennen sind die Überbleibsel des ehemaligen Archaeons und das Zytoplasma sind die entstandenen Verlängerungen.

Welches Modell stimmt?

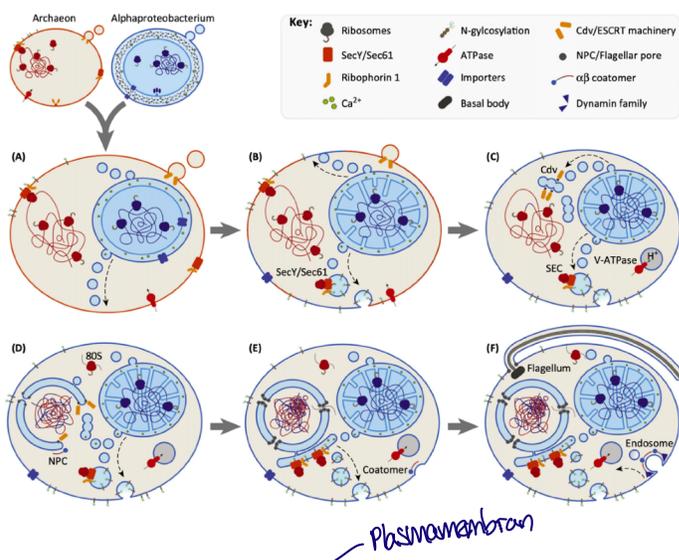
- Mitochondrien zuerst oder Später?
- Outside-in oder inside-out?

Probleme:

1. **Eukaryoten ohne Mitochondrien besitzen Gene von Mitochondrien** in ihrem Genom.
2. **Eukaryotische Lipide (z.B. für Nukleus Membran, ER, Golgi-Apparat, PM...)** besitzen einen **Bakteriellen Ursprung**. Archaeen besitzen andere Membranen und auch nicht die Maschinerie, um solche Membranen herstellen zu können (Bakterien schon). Diese Informationen hätten von Bakterien übertragen werden müssen, bevor die Zelle entstehen hätte können.
3. Woher kommen die Introns?
4. Was war der selektive Druck, welcher zur Bildung des Nukleus führte?

-> Mitochondrien später Modelle scheinen falsch zu sein

Zusätzlich zu 2: Argument für Mitochondrium first Modell



inside out

inside out

Archaeen sowie Bakterien können keine Vesikel nach innen Formen und durch diese Stoffe transportieren. Sie können sie aber nach aussen bilden.

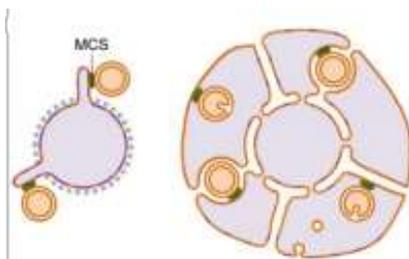
Archaeen besitzen eine relativ ähnliche Maschinerie wie die Escort Maschinerie der Eukaryoten.

Ein Alphaproteobakterium innerhalb eines Archaeons kann Vesikel mit Lipiden bilden (A). Archaeale und Bakterielle PM sind gut löslich ineinander und so könnte sich zuerst ein Mix aus Beiden gebildet haben (B).

Später hat die Bakterielle PM die archaeale dann vollständig ersetzt (B+C). Dasselbe System könnte dann auch den Nukleus erschaffen haben, sowie das gesamte Lipidhandel System, dass nötig ist für Exozytose und Endozytose (D+E). Endosome (= Sortieren Vesikel) sind später entstanden, da weder Archaeen noch Bakterien ähnliche Systeme besitzen. -> Argumente, dass das Mitochondrium first Modell stimmt.

Plasmamembran

Zusätzlich zu 2: Argument für Inside Out Modell



Membrankontaktstellen zwischen den Extensionen des Archaeons und den Bakterien könnten schon sehr früh entstanden sein (LECA hatte die benötigten Proteine dafür schon). Durch diese haben die Bakterien ihre Lipide an die Wirtszelle übertragen, **wodurch sich die bakterielle Lipid Doppelschichten an Nukleus, ER, PM... erklären lassen.**

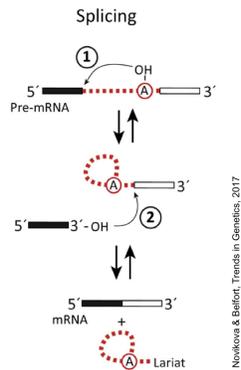
stabiler

Die archaeale Membran wurde vollständig durch bakterielle ersetzt, da die archaeale Membran zwar sehr stabil ist, aber nur schlecht Stoffe hindurchdiffundieren lassen, was bei der bakteriellen Membran viel besser geht.

*↓
bessere Versorgung*

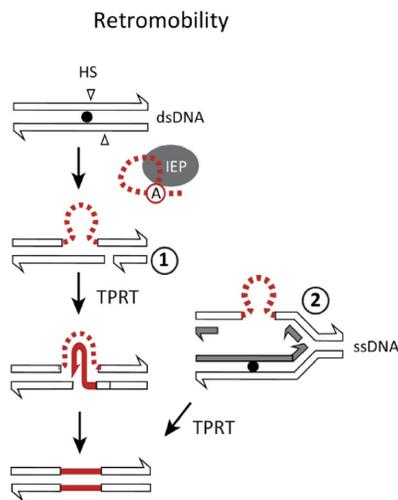
zw. Mitochondrien und Zelle bei bakterieller Membran

Zusätzlich zu 3: Typ II Introns (Bakterien)



Typ II Introns (Introns = Stellen in der DNA, die nicht codiert sind) sind eine Art von selfish DNA, welche sich nach der Transkription durch seine Sequenz automatisch aus der prä-rRNA spliced und einen Ring formt. Die zwei encodierenden rRNA stücke können sich verbinden und werden zur mature-rRNA. Dies ist ein guter Weg für selfish DNA, sich ins Genom des Hosts zu implementieren, ohne ihm zu schaden oder ihn zu töten.

Die heutigen Spliceosome haben sich vermutlich aus diesen Typ II Introns entwickelt. **Die Introns in dem eukaryotischen Genom müssen daher von Bakterien stammen.**

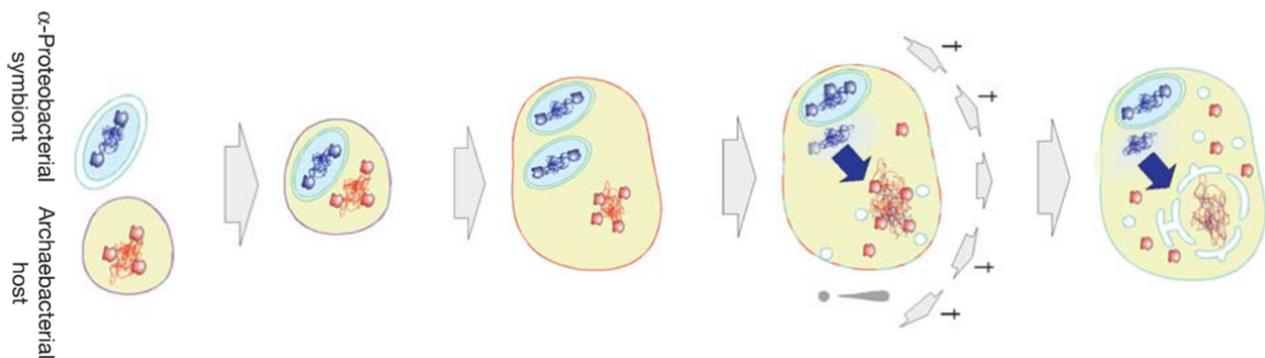


- The majority of introns are positioned exactly in the same positions in orthologous genes of divergent eukaryotes
- Most paralogs that formed by gene duplication since LECA have introns at homologous positions
- Paralogs that are the product of gene duplication that took place during eukaryogenesis are less likely to have introns at similar positions
- Conclusion 1: Most introns were inserted during eukaryogenesis; eukaryogenesis was a time of **intense bombardment of the nuclear genome** with type II introns from the mitochondrion
- Conclusion 2: Since the introns come from the endosymbiont, **mitochondria must have been there early**

→ Bakterien haben self-splicing introns
 → Anfangssequenz greift Endsequenz an

Zusätzlich zu 4: Selektiver Druck für Nukleus

Die Introns hatten vermutlich mit der Bildung des Nukleus zu tun.



→ Archäen nicht überlebt

Angenommen die Syntrophische Theorie stimmt: **Bakterien wachsen viel schneller als Archaeen** -> Viele Bakterien bildeten sich im Archaeon. Dies führte zu Kämpfen, was zu Lysis einiger dieser Bakterien führte. **Die freie, bakterielle DNA fusionierte dann mit der archaealen DNA.** Da Intron **Transposone nicht in Archaeen vorkommen, hatte die archaeale Zelle keine Verteidigungsmaschinerien gegen diese** und das Genom wurde stark von diesen angegriffen und Introns konnten sich an vielen Stellen niederlassen. Mit der Zeit haben gewisse dieser Introns andere gespliced und **gewisse haben dadurch mit der Zeit ihre Eigenschaft zum selbst splicen verloren.** Da **Transsplicing** eine gewisse Zeit dauert, wurden mit der Zeit fehlerhafte Proteine gebildet (Introns wurden mit translatiert). In diesem Moment hat sich ein starker **selektiver Druck aufgebaut**, der zur Ausbildung des Nukleus geführt haben könnte. Mit ihm, haben die Splice Gene genug Zeit um ihre **Arbeit zu machen, bevor die mRNA mit Ribosomen in Kontakt kommt** (Transkription / Translation räumlich getrennt).

Zusätzlich zu 4: Entstehung Nukleus beim Inside Out Modell

Hier hat sich der Nukleus aus der ehemaligen archaealen Zelle gebildet. Die Abgrenzung des Nukleus von den extrazellulären Bestandteilen war wichtig, da es vermutlich auch hier Angriffe von Intron II Transposonen von den Bakterien gegeben hat.

Zusammenfassung

LECA besass vermutlich Mitochondrien und Eukaryoten sind ein Produkt der Symbiose zwischen einem Archaeon und einem **Alpha-Proteobakterium.** Es entwickelte sich:

1. **Seperation von Translation und Transkription**
2. **Die Spliceosome** (und die mRNA 5' Kappe, die benötigt wird um Ribosome zu rekrutieren)
3. **Den Nukleolus, um die Ribosom Biosynthese zu beschränken**
4. **Breit erweiterte Faltungs- und Proteinregulierungsmaschinerien**
5. **Generalisierte die Post-Translationale Regulation von Proteinen durch Modifikation** (Phosphorylierung, Acetylierung)
6. **Die RNAi Maschinerie**
7. Das Cytoskelett: Seperation der Translation von der Transkription erlaubte vermutlich die Ausbildung des Cytoskeletts in dem Cytoplasma, um mit der Zellvergrößerung, der **Chromosom Segregation und der Zellteilung klar zu kommen**

All dies war vermutlich möglich durch die enorme Erhöhung von verfügbarer Energie durch die Mitochondrien. Folgende Fragen bleiben unbeantwortet: **Wieso gibt es mehrere lineare Chromosome?** Was hat zu der Erhöhung der Genomgröße geführt?

↳ Eukaryoten deutlich größere

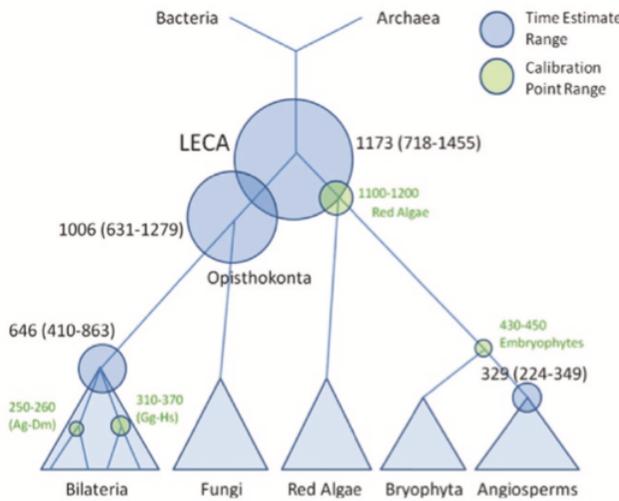
Vorlesung 3

Es gibt 8 Reiche bei den Eukaryoten, die sich sehr früh (nach LECA) gebildet haben. Es gibt noch andere Modelle, um die Reiche zu beschreiben. Z.B. Nummer der Flagellen: Unikonts haben eine Flagelle, Bikonts besitzen 2 Flagellen und Intermediates scheinen auf den ersten Blick Unikonts zu sein, besitzen aber noch weitere kleinere Flagellen.

Eukaryoten: 40s, 60s → 80 Untereinheiten

Bakterien: 30s, 50s → 70s

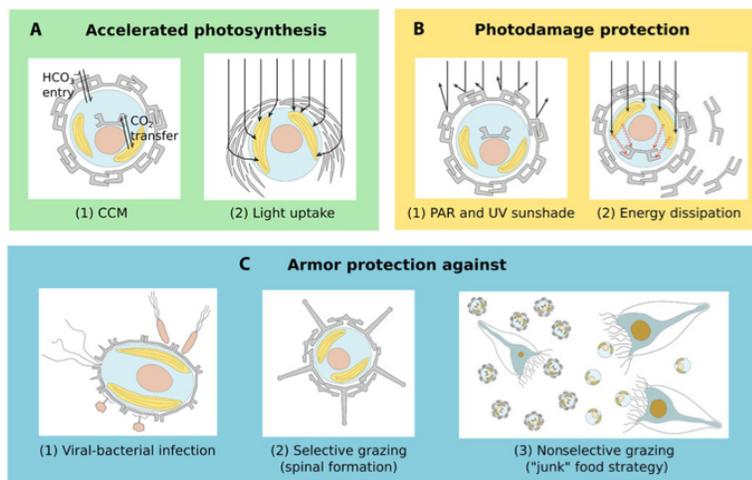
Geschw. wie schnell in Zeitstrahl ablesen



Nach LECA hat es viele Separationen in Phylogenetischen Baum gegeben. Alle heute lebenden Organismen sind die auf dem linken Bild gezeichneten Dreiecke. Diese haben sich alle vor weniger als 650 Millionen Jahren entwickelt. Es scheint dort also einen Event gegeben haben, nach welchem nur einige Eukaryoten überleben konnten. Die Entstehung von Landpflanzen scheint ein wichtiges Ereignis zu sein (Glukose an Land verfügbar in deren Früchten).

Reiche der Eukaryoten

Orphans *bi* *konts* Protisten



Sehr kleine, multizelluläre Organismen. Z.B: Coccolithophyceae formten unsere Erde, da die Felsen aus dessen Hüllen (CaCO_3) bestehen.

Lieblingsorganismus Barak

A: Die Hülle hilft den Organismen bei der CO_2 Anreicherung und Reflektiert das Sonnenlicht um sie bei der Photosynthese zu unterstützen.

B: Sie schützt vor UV Strahlung

C: Die Hülle schützt ausserdem vor Viraler oder Bakterieller Infektion sowie davor, vor anderen, grösseren Protisten gefressen zu werden

Rhizaria *Bi* *konts*

Grundsätzlich Heterotroph, Zwei grosse Kladen (= Monophyletische Gruppe)

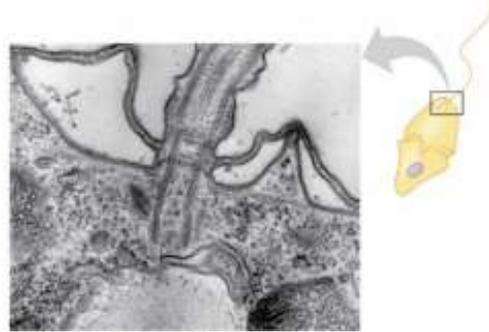
- Foraminifera:** Grosse Hülle (0.5 – 20mm) mit diversen Kompositionen im Normalfall aus CaCO_3 , 10 000 lebende Spezies, einer oder zwei Nuclei, sehen aus wie Schnecken, bestehen aber nur aus einer einzigen Zelle
- Radiolaria:** Durchschnittliche Zellgrösse (0.1 – 0.2µm), internes Skelett aus Silikaten, wenn sie sterben und im Meer sinken, verdichten sie sich und bilden Feuerstein (war mal sehr wichtig für die Menschheit)

Alveolata *bikonts* / Bläschen

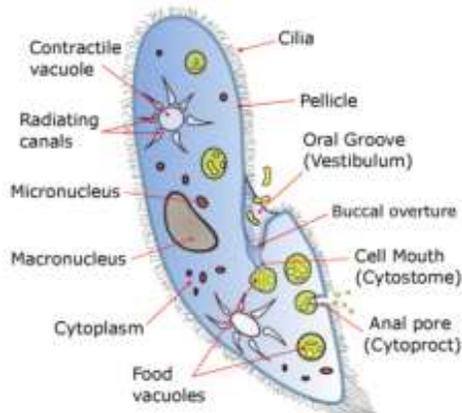
Neben ihrem Flagellum befinden sich einige Alveolen, wessen Funktion noch nicht ganz klar ist.

3 Grosse Kladen:

1. Dinoflagellate: Plankton, Zellwand aus Zellulose, 1500 lebende Spezies, produzieren Toxine, Autotroph/Mixotroph
2. Apicomplexa: Leben als Parasiten in Tieren (z.B. Plasmodium = Erreger von Malaria)
3. Ciliate: Plankton in Salz- und Süßwasser, Autotroph/Mixotroph, Symbiont in der Darmflora einiger Tiere, Mehr als 40 000 lebende Spezies



Ciliate (Teufeltierchen)



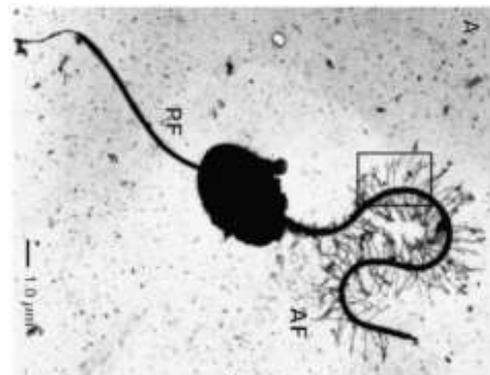
Ist relativ gross ($200\mu\text{m} = 0.2\text{ mm}$) und besitzt einen Mund, der Phagozytose erlaubt. Die Cilia erlauben die Fortbewegung. Besitzen eine Contractile Vakuole und zwei Nuklei: Den Makronukleus, worin sich die Genexpression abspielt und einen Mikronukleus, in welchem sich eine Kopie des Genoms befindet.

Diese Mikroorganismen können Algen in ihren Vakuolen lagern ohne diese zu töten. Diese Algen **betreiben Fotosynthese** und versorgen ihren Wirt mit Energie, und der Wirt schützt die Algen vor Fressfeinden.

Stramenophile *bikonts*

Bicons, welche einen Pilus besitzen, welcher **mit vielen kleineren Pili ausgestattet ist**. Es gibt 3 Kladen in diesem Reich:

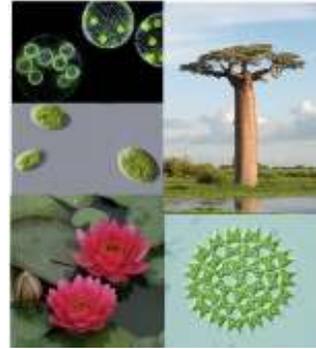
1. Diatome: Autotroph, 20 000 lebende Spezies, Unizelluläres Plankton, 2-200 μm gross, Zellwand aus Silikaten, Produzieren 20-50% des Sauerstoffs weltweit, erzeugen Diatomit (Kieselgur)
2. Gold (Süßwasser) und Braunalge (Salzwasser): Autotroph, gross, Multizellular
3. Oomycete (Algenpilz): Heterotroph, Filamentöse (= Fadenförmig) Organismen, die aussehen wie Pilze aber keine sind. Gamete besitzen Flagellen, Einige leben als Pflanzen pathogene.



Archaeplastida *bikonts*

Viele unizelluläre und multizelluläre Kladen, alle autotroph (Photosynthese). Besitzen einem grünen Chloroplast. Wichtige:

1. Rhodophyta (Rotalge): 7000 lebende Spezies, die meisten multizellulär
2. Chlorophyta: 7000 lebende Spezies, unizelluläre und multizelluläre grüne Algen in Süß- und Salzwasser
3. Embryophyta (Landpflanzen): >350 000 Spezies



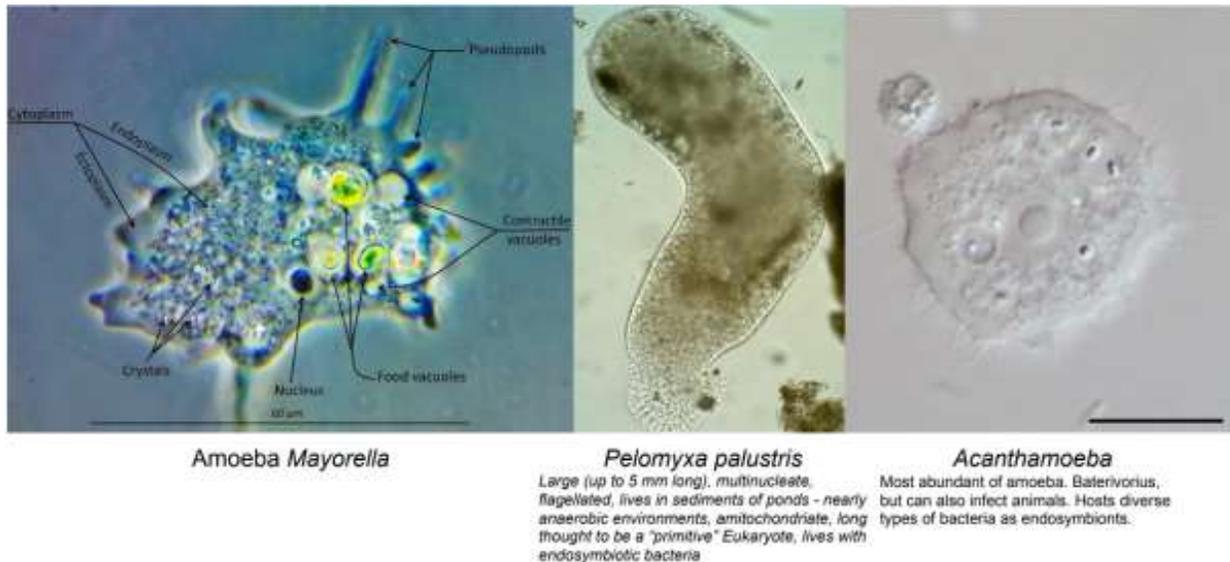
Excavata *Intermediates*

Unizelluläre Protisten mit Flagellen, normalerweise heterotroph (ausser Euglena)

1. Euglenozoa: Freilebend oder Parasitär
2. Metamonada: Besitzen keine Mitochondrien, heterotroph, leben im Darm von Insekten oder sind Parasiten von Säugetieren

Amoebozoa *unikonts*

Die meisten von ihnen haben das Flagellum verloren.

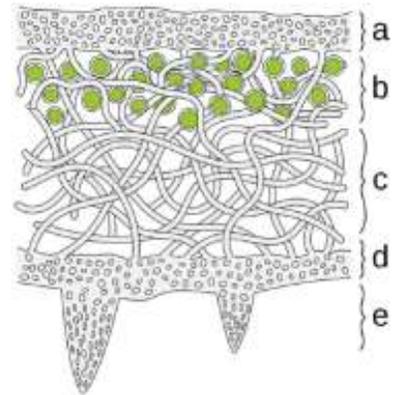


Mayorella besitzt Pseudopods, mit welchem es Sandkörner (um abzusinken) oder andere kleine Organismen aufnehmen können. Das Zytoplasma besteht aus zwei Teilen: Das Endoplasma ist sehr dicht und das Ectoplasma ist nicht sehr dicht und nur mit Flüssigkeit gefüllt.

Opisthokonts *uniconts*

Grundsätzlich Multizellulär, besitzen flagellen und sind heterotroph. Drei Hauptgruppen:

1. Pilze: 150 000 lebende Spezies, grundsätzlich ohne Flagellum, aber einige haben noch eins. Formen netzwerke (Mycelia, ein, zwei oder hunderte Nuklei pro Hypha) oder bleiben unizellulär (Hefe). Besitzen eine Chitin enthaltende Zellwand. Grundsätzlich Saprophyte, können in mutualistischen Beziehungen mit Insekten, (Ameisen und Termiten kultivieren Pilze als Nahrungsquelle) Algen (Lichen) oder Parasiten (*Candida albicans*) leben
2. Choanoflagellate: Nächste Verwandte der Tiere, welche noch immer unizellulär sind. Leben in Kolonien mit verschiedenen Zellen.
3. Tiere



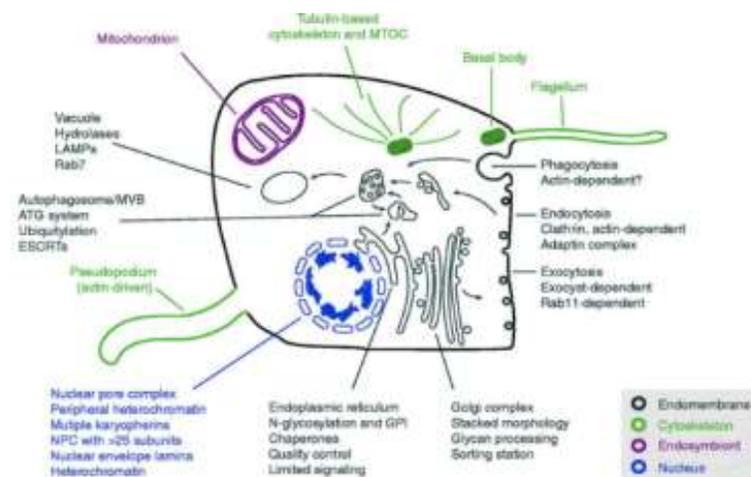
Symbiose in Eukaryoten

Endosymbiose: Sekundäre Endosymbiose: Durch sekundäre Symbiose eines Eukaryoten mit einer Rotalge oder einer Grünalge entstanden Plastide, die es den Eukaryoten ermöglichte, Photosynthese zu betreiben.

Kleptoplastie: Eine Schnecke frisst Grünalgen, die als Chloroplasten wirken und sich auf dem Rücken der Schnecke befinden. *Schlundsaackeschnecken*

Mikrobiom: Gewisse Mikroorganismen werden von einem Host nicht getötet und können diesem sogar helfen. Z.B. Darmflora

LECA



Wenn man sich die Eigenschaften der heute Lebenden Eukaryoten anschaut (besitzen sie ein Flagellum, ein ER...) dann kann man drauf schliessen, dass wenn alle oder die meisten etwas besitzen, dass auch LECA dies besass.

Es scheint, dass LECA alles hatte und sich Eukaryoten seitdem spezialisiert haben, Strukturen anpassen oder verloren haben, wie es am besten zu ihrem Lifestyle passt anstelle

komplett neuer Strukturen zu erfinden. Was führte zu dieser Explosion der Diversität?

Weitere Einteilung:

- uniflagellar *uniconts*
- diflagellar *biconts*
- multiflagellar (*intermediate*)

teilen sich asymmetrisch
 → werden immer kleiner
 → fusionieren mit anderen
 → Genomveränderung

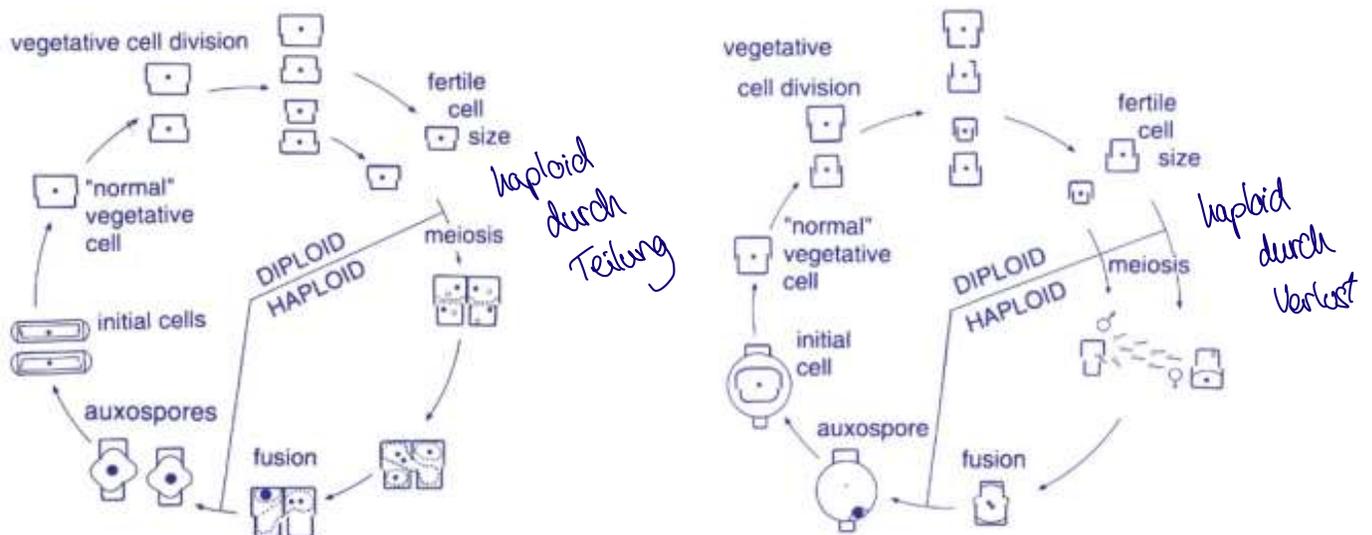
Vorlesung 3
 Der Sexuelle Zyklus

Beispiele

Diatomeen

Problem of size

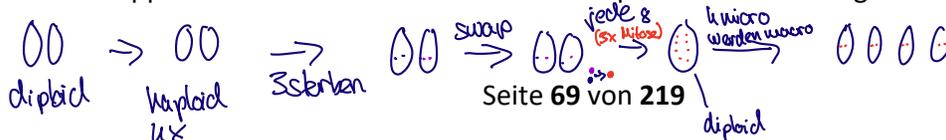
Bei pennaten Diatomen (nicht männlich oder weiblich, isogamos) werden die Zellen immer kleiner, da sie bei der Zellteilung eine normalgrosse und eine kleinere Schale bilden müssen. An dem Punkt, an dem die Zellen zu klein sind, gehen 2 von Diploid (= Infos von beiden Elternteilen, $2n$) zu Haploid (= Infos von einem Elternteil, n) über und betreiben zu zweit Meiose. Dabei formen sie 4 Nuklei und jeder der Zelle bekommt 2 unterschiedliche, welcher dann wieder zu einem Nukleus fusioniert wird. Ab diesem Zeitpunkt werden 2 wieder Diploide Auxosporen gebildet, die zu Initialen Zellen werden, die grössere Zellschalen bilden, welche dann wieder zu normalen vegetativen Zellen werden. Diese haben dann wieder die Anfangsgrösse und der Zyklus beginnt von vorn. Bei zentrischen Diatomen (anisogamos) gibt es einen ähnlichen Kreislauf. Aber einige Zellen sind männlich und bilden Spermzellen, die zu den fertilen Zellen schwimmen können und dort eine Meiose bilden.



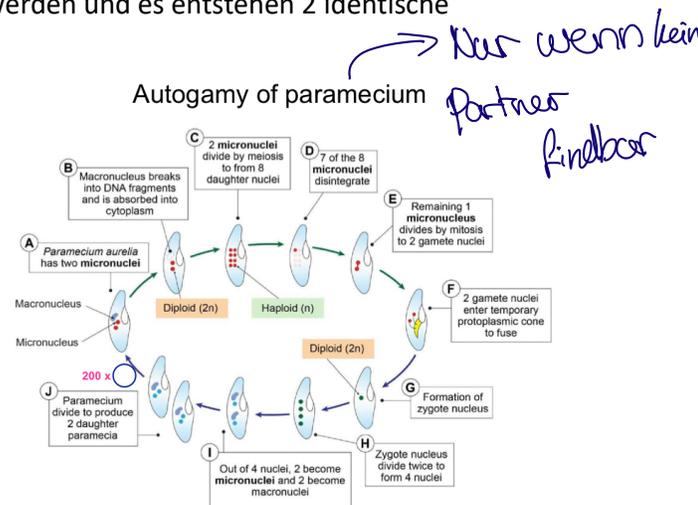
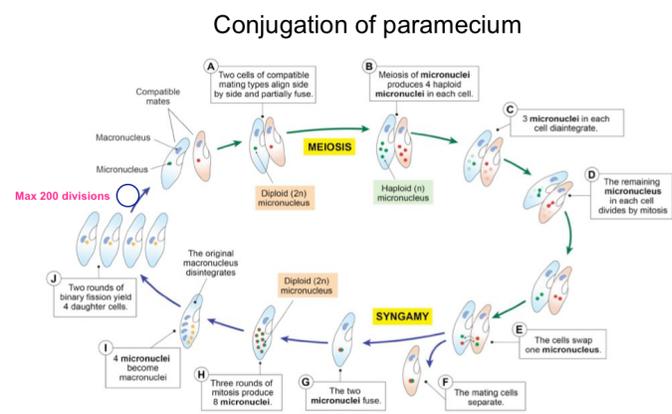
Ciliate

Problem of age

Paramecium besitzen einen Makronukleus und einen Mikronukleus und können maximal 200 Zellteilungen durchführen, dann werden die Zellteilungen immer langsamer und immer mehr Zellen sterben (sie «altern»). Zwei Zellen, die mindestens 75 Zellteilungen durchgeführt haben kommen zusammen und führen eine Konjugation durch (= die beiden Zellen verbinden sich) und führen dann eine Meiose durch. Es bildet sich in jeder Zelle zusätzlich 3 Mikronuklei (also insgesamt 4 haploide Mikronuklei aus einem diploiden Mikronukleus pro Zelle). Jede Zelle tötet dann 3 davon und kopiert den verbleibenden, sodass noch 2 Mikronuklei in jeder Zelle vorhanden sind. Dann wechseln die Zellen je einen, sodass jede Zelle 2 unterschiedliche Mikronuklei besitzt, welche dann fusionieren (Syngamie) und das Matingpaar teilt sich. Der fusionierte, wieder diploide Mikronukleus wird durch 3 Mitosen geteilt, wodurch 8 identische Mikronuklei entstehen. Der Makronukleus zerfällt und 4 Mikronuklei werden die neuen Makronuklei. Durch Zellteilung entstehen 4 identische Tochterzellen mit je einem Mikronukleus und einem Makronukleus und der Kreislauf beginnt wieder von vorne. Bei diesem Prozess gibt es 7 Zelltypen und man benötigt einen anderen Zelltyp für ein Matingpaar. Wenn die 200 Zellteilungen abgeschlossen sind, und die Zelle kein Partner gefunden hat, so teilen sich die zwei Mikronuklei von Paramecium aurelia durch Meiose in 8 haploide Mikronuklei, wovon 7 zerstört werden und der Makronukleus löst sich auf. Der verbleibende Makronukleus wird durch Mitose verdoppelt und durch einen Temorären Protoplasmatischen Kegel zu einem diploiden

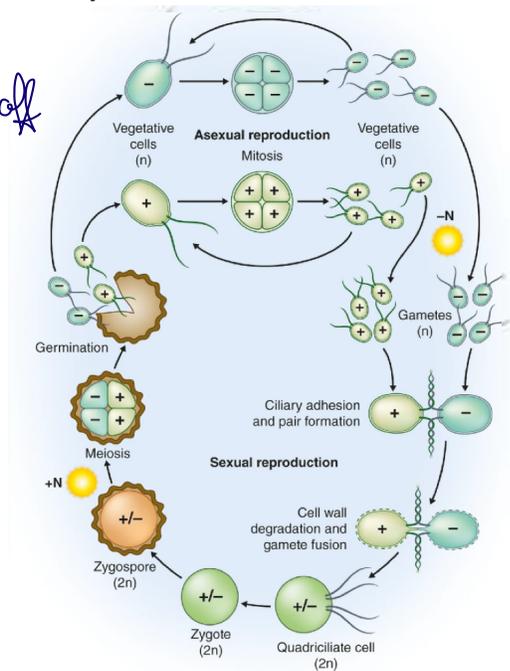


Nukleus fusioniert. Dieser wird 2-mal geteilt (4 Nuklei insgesamt) und 2 werden zu Mikronuklei und 2 zu Makronuklei. Die entstandene Zelle kann nun geteilt werden und es entstehen 2 identische Tochterzellen.



Nur wenn kein Partner findbar

Chlamydomonas

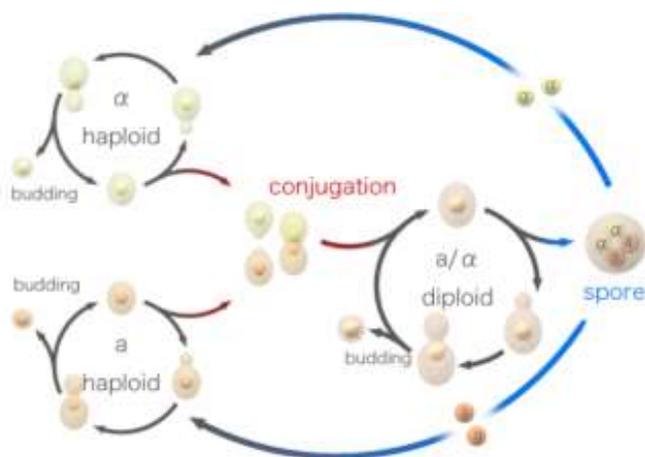


N: Stickstoff

Es gibt zwei haploide Vegetative Zellen (n, + und -), die je bei der Zellteilung 4 neue haploide Zellen bilden (2 Mitosen). Wenn kein Stickstoff mehr vorhanden ist, so bilden die Gameten (n) eine Zygospore mit Schale (2n) durch Verbindung der Flagellen, welche sehr widerstandsfähig ist. Sobald wieder Stickstoff vorhanden ist, so betreibt diese Spore Meiose und entlässt 4 Gameten (n), welche dann wieder selbständig leben können. Diese können also nicht als Diploide Individuen leben (wie z.B. Tiere).

Problem of starvation

Knospenhefe



Können Haploid (α oder a) oder durch Konjugation der haploiden Zellen Diploid leben. Wenn die Diploide Zelle hungert, so bildet sie Sporen bestehend aus zwei α und zwei a Zellen. Diese Sporen können sich dann in besseren Umgebungen mit ausreichend Nährstoffen wieder teilen, sodass die haploiden Zellen wieder beginnen können zu leben.

Vergleichung der Lebensweisen

1 Chromosom

2 Chromosomen

	Haploid	Diploid
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> - Mutationen haben eine unverzügliche Änderung des Phänotyps zur Folge, wodurch sie schnell eliminiert werden - Weniger DNA - Kein Wettbewerb zwischen Chromosomen 	<ul style="list-style-type: none"> - Mutationen sind gepuffert, bis sie nützlich werden - Reparation von DNA Schaden in G1 indem Homologe als Vorlage genommen werden - Genexpression ist robuster
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> - Toleranz zu genetischer Variation und Evolvierbarkeit ist reduziert - Genexpression ist «noisy» (= Level der Variation der entstehenden Produkte der Genexpression) 	<ul style="list-style-type: none"> - Mehr DNA zu Replizieren - Problematische Mutationen werden fixiert («Hitchhiking») - Chromosome kämpfen gegeneinander

→ Die Möglichkeit, zwischen Haploid und Diploid zu wechseln kann sehr Vorteilhaft sein für Organismen

Schlüsselfähigkeiten des Sexuellen Zyklus

Der Sexuelle Zyklus benötigt fusion von Partner / Gameten, abhängig von der Situation, wir sprechen von **Fertilisation** (Embryonischer Zyklus), **Konjugation** (Isogamie) oder **Syngamy** allgemein.

↳ Verschmelzen von Keimzellen (Gameten)

↳ Übertragen von Teilen des Genoms von einer Spenderzelle auf eine Empfängerzelle

Dazu notwendig ist die gegenseitige Erkennung von kompatiblen (= Mating Typen, Geschlechtern)

Partnern. Das Geschlecht ist nicht zu verwechseln mit der Sozialen Seite des Geschlechts: Dem Gender.

Es gibt grundsätzlich zwei Matingtypen, welche nicht mit Partnern desselben Typs fusionieren können.

Einige Spezies haben viele Matingtypen (> 1000 in einigen basidiomyceten Pilzen, 7 in Ciliaten...), bei welchen obigen geschriebene Regel (dass Fusion mit demselben Matingtypen nicht möglich ist) ebenfalls gilt. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, einen kompatiblen Partner zu finden.

Partnererkennung benötigt Zelle-Zelle Signalisation und muss mit Ploidie (= Anzahl Chromosomen) variieren. Dabei gibt es viele Modelle.

1. **Pheromon Signalisierung** (weitverbreitet in unizellulären Eukaryoten). Jeder Mating Typ stellt ein bestimmtes Pheromon sowie den Rezeptor für das Pheromon des kompatiblen Partners her. Diese können gleich aussehen (Isogamie). **Der Diploid verhindert die Expression von Pheromonen und Rezeptoren aber aktiviert die Fähigkeit der Meiose.**
 2. **Oberflächenproteine**, wie Reziproke Agglutine (Chlamydomonas, keine diploiden, vegetativen Zellen)
 3. **Viele andere: Visuelle** (Tiere), **vermittelnde Partner** (Insekten)...
- In allen Fällen benötigt es ein genetisches System, welches die Geschlechts- / Matingidentität prüft. **In Tieren wird die sexuelle Identität durch den Organismus (Diploid) verliehen, in unizellulären organismen durch haploide (Gameten oder Gametophyten)**
 - Dies führte **anschliessend zur Ausbildung deutlicher Geschlechter mit verschiedenen Gameten** (anisogamie, asymmetrische Syngenie)

Entstehung des Geschlechtersystems in Eukaryoten

Archaeen genauso wie wenige Bakterien können miteinander fusionieren in Form von **Parasexualität**, es gibt dabei aber keine oder nur geringe Partnerdiskrimination. Das könnte der Haupt Horizontal Gentransfer Weg in Archaeen sein und könnte zu der starken Erhöhung der Genomgröße in LECA geführt haben. Dies hat aber auch einige Nachteile:

Zytogenetik: keine über Zusammenhänge Vererbung und Zellaufbau

- Die **Karyotypen ändern sich regelmässig und können nicht fixiert werden**, ungewollte Gene co-evolieren (In Prokaryoten werden co-evolierende Gene in Operons zusammengehalten, was die Größe von solchen co-evolvierten Systemen klein hält)
- Es **begünstigt die Verbreitung von selfish DNA Elementen** (Transposone, Introns...)

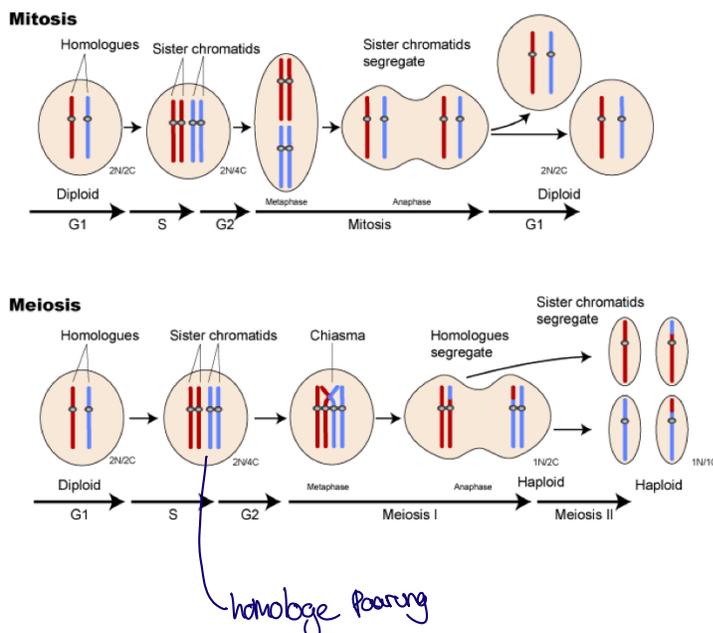
Aus diesen 2 Gründen formte das **Kompatibilitätssystem von Eukaryoten zwei neue Funktionen**:

- o **Mating ist nur mit derselben Art Organismus möglich** (Erfindung der Spezies)
- o **Unterscheidung zwischen Haploiden und Diploiden Stadien** (keine Zufällige Ploidie (= keine Zufällige Anzahl Chromosomen))

Sobald die Partner fusioniert sind, ist das erzeugte Objekt diploid. Es kann die Hauptform im Zyklus sein oder nur vorübergehend (siehe Chlamydomonas). Um in **den haploiden Zustand zurückzukehren**, können verschiedene Mechanismen eingesetzt werden:

- **Parasexuelle Zyklen** (zum Beispiel hat die Hefe Candida albicans die Gene für Meiose verloren): nach der Paarung und bei der Diploidisierung beginnt das Diploid, **Chromosomen auf halbzufällige Weise progressiv zu verlieren**, bis es **wieder haploid ist** (Mechanismus unklar).
- **Meiose** (alle Gene waren bereits in LECA vorhanden): die Induktion einer reduktiven Teilung, **zu der die Zellen zurückkehren Haploidie in einem Zyklus** (erste Division der Meiose)

Mitose und Meiose

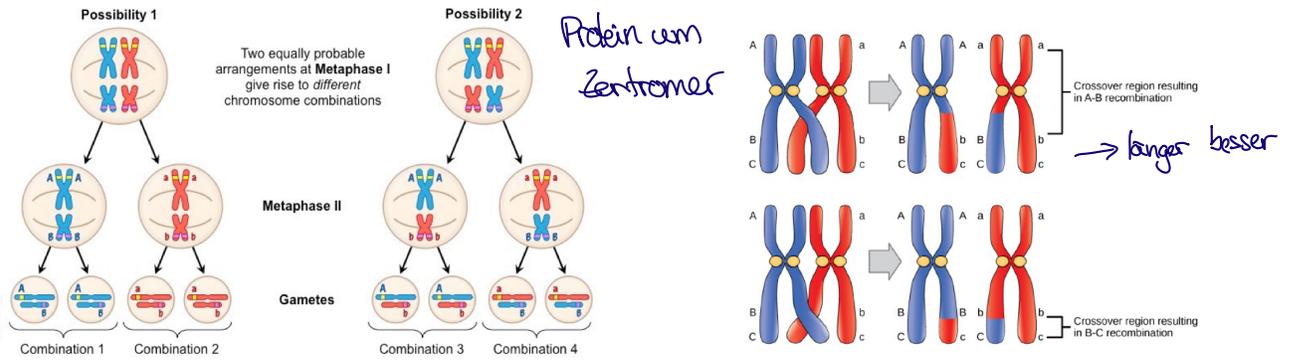


Schlüsselkonzepte Meiose

Die Homologen Chromosomen werden **gepaart**, was dessen Separation voneinander erlaubt.

Die zufällige Orientierung der Chromosomen zwischen zwei homologen Paaren erlaubt die **zufällige Verteilung** von Chromosomen von beiden Elternteilen.

Allel Austausch zwischen den homologen Chromosomen durch **Rekombination**.



Links: Die Chromosomen können in der Metaphase I durch ihre Position zufällig verteilt werden. → *gleich wahrscheinlich*

Rechts: In der Metaphase II können zwischen zwei gleichen Chromosomen durch Rekombination Teile von Chromosomen ausgetauscht werden. Je länger die Distanz zwischen zwei Punkten auf dem Chromosom ist, desto grösser ist die Wahrscheinlichkeit, dass auf dieser Distanz Rekombination stattfindet. Z.B. AB > BC → P(Rekombination AB) > P(Rekombination BC).

Mendelsche Regeln

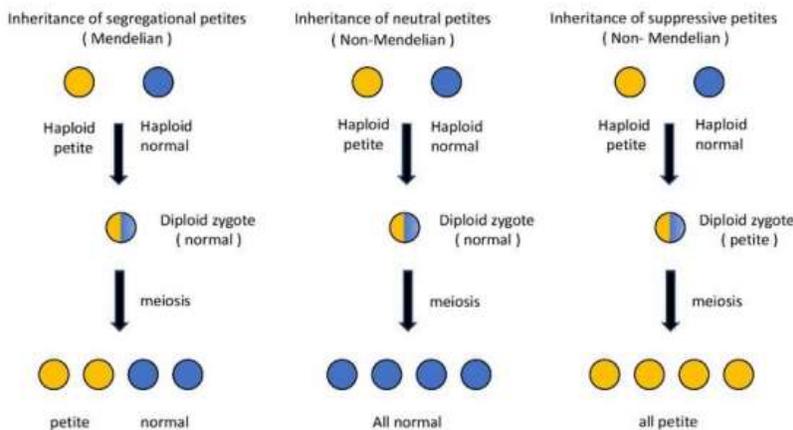
Gelten nur für Eukaryoten

1. Merkmale werden durch gepaarte Faktoren bestimmt: Gene, die paarweise in Diploiden, d.h. vor der Meiose *welche sind*
2. Prinzip der Dominanz: Bei heterozygoten Individuen erlegt ein Allel das Phänotyp; es wird das dominante Allel genannt *legt fest*
3. Die Gameten enthalten nur eine Kopie jedes Faktors (erstes Gesetz der Trennung): Gameten sind haploide und enthalten nur ein Allel von jedem Ort / Gen *in Bezug auf ein genetisches Merkmal unterschiedliche Anlagen besitzen*
4. Unabhängige Merkmale werden in den Gameten unabhängig voneinander sortiert (zweites Gesetz der Segregation) *Eizellen & Spermien*

Mitochondrien

Menschen: Informationen von Mitochondrien werden komplett von der Mutter übernommen.

Wenn die Mutter also eine Erbkrankheit der Mitochondrien besitzt, werden alle ihre Kinder krank, besitzt jedoch der Vater eine Erbkrankheit, so werden alle Kinder gesund zur Welt kommen.



Hefe: Normalerweise wird bei der Meiose eine Mutation halb / halb vergeben. Ist die Mutation in einem Mitochondrium, so werden die Nachkommen nach der Meiose alle nicht betroffen sein (durch Kompetition, die stärkeren Mitochondrien setzen sich durch). Es gibt aber mutierte Mitochondrien, die die Mutation vollständig an alle Nachkommen abgeben

(suppressiv, die schwächeren Mitochondrien gewinnen die Kompetition).

In unizellulären Lebewesen handelt es sich um einen **Sexuellen Zyklus**. Da bei multizellulären Lebewesen der sexuelle Weg die einzige Möglichkeit ist, sich zu vermehren, spricht man bei ihnen von **sexueller Reproduktion**.

Die Auswahl wirkt sich zugunsten des Sexualzyklus aus *Argomente* *höhere Fitness*

1- **Säuberung von Mutationen**: Haploide mit einer schädlichen Mutation verschwinden durch Gegenselektion (der Sexualzyklus kann waren eine Reaktion auf eine hohe Mutationsrate während des Auftretens von LECA, beispielsweise aufgrund von Introns)

2- **Lösung des Problems von Müllers Ratsche**: Schädliche Mutationen, die mit essentiellen oder vorteilhaften Genen verbunden sind, können dies nicht verloren gehen, es sei denn, die Verknüpfung wird unterbrochen. Das zufällige Sortiment stellt sicher, dass einige Personen eine geringere genetische Belastung haben als andere, so dass natürliche Auslese wirken kann.

→ wenige fit vermehrt sich weniger

3- **Erzeugung von Vielfalt**: Eine neue Kombination von Genen hilft im Falle einer sich ändernden Umgebung oder bei der Eroberung von **neue Nische**

Kosten des Sexualzyklus

→ Verschmelzen

1- **Verringerung der Populationsgröße** bei Syngamie

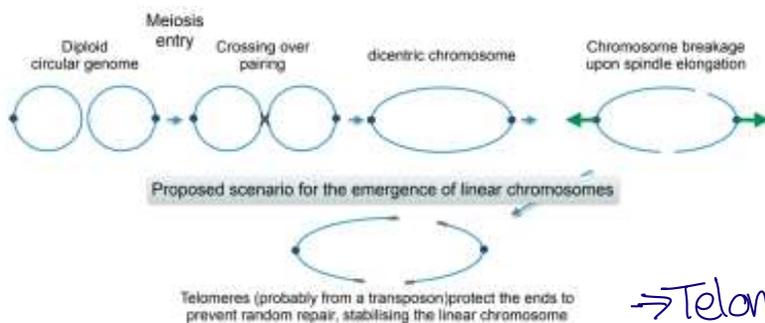
2- **Trennung** von gemeinsam entwickelten **Allelen**

3- Ermöglicht es **egoistischen Elementen**, sich zu verbreiten

4- Erforderte die **Entwicklung** ausgefeilter Signalwege und die Etablierung alternativer zellulärer Zustände

(Ursprung der Zellidentität und Differenzierung?)

Konsequenzen des Sexualzyklus: Chromosomenstruktur

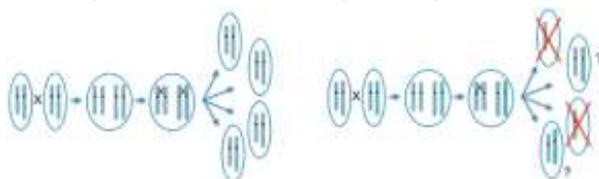


Der Sexualzyklus (die Meiose) könnte zu linearen Chromosomen geführt haben.

Dies führt zu einer sehr grossen Genomgröße bei multizellulären Eukaryoten.

→ Telomere

Konsequenzen des Sexualzyklus: Speziation



Vertikaler Gentransfer und **kleiner horizontaler Gentransfer in Eukaryoten** könnte zu **Speziation** (= Artenbildung) geführt haben.

D: Eukaryotische Genexpression (F. Allain)

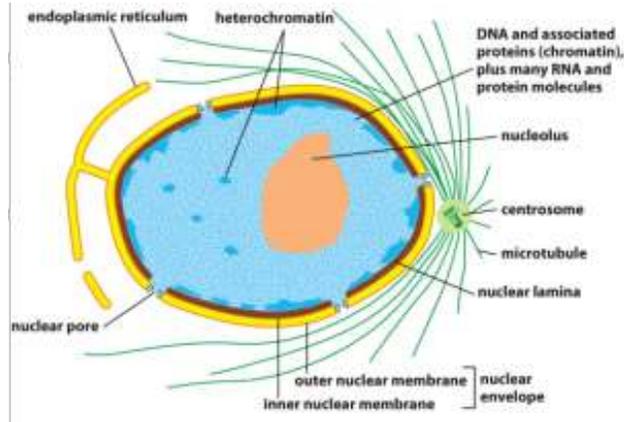
Vorlesung 1

DNA Gepackt im Nukleus

→ kondensierte Chromatin

Chromosom
 ↓
 Chromatid
 ↑
 Euchromatin: nicht so dicht
 Heterochromatin: dicht
 ↑
 wird abgelesen

Achtung: DNA kommt in Chromosomen vor (für Zellteilung) und in Chromatin (linear).



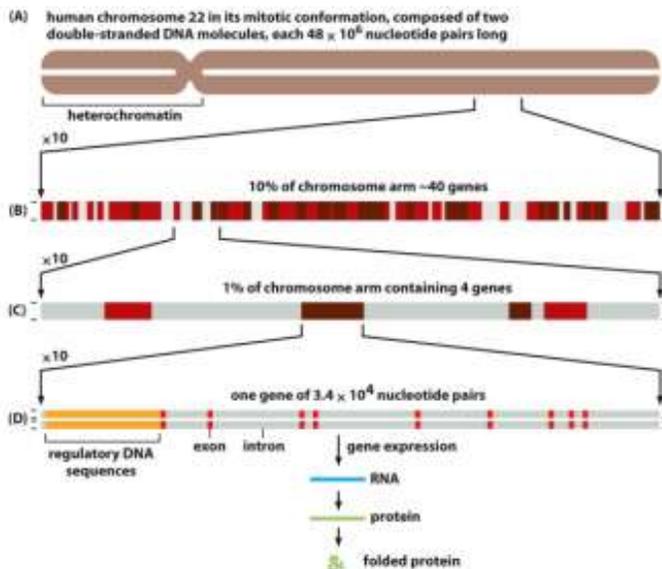
Im **Nukleolus** (nicht mit einer Membran vom Rest getrennt) befindet sich dicht gepackte DNA und wird rRNA transkribiert, prozessiert und gepackt. Rund um den Nukleus sowie an vereinzelt stellen befinden sich dichtere stellen, das **Heterochromatin**, an welchem keine Transkription stattfinden (10% der DNA). An den helleren stellen befindet sich nicht so dicht gepackte DNA (**Euchromatin**), welche transkribiert wird.

→ Ribosom

→ Zellkern sorgt für Trennung Transkription und Translation

Menschliche DNA

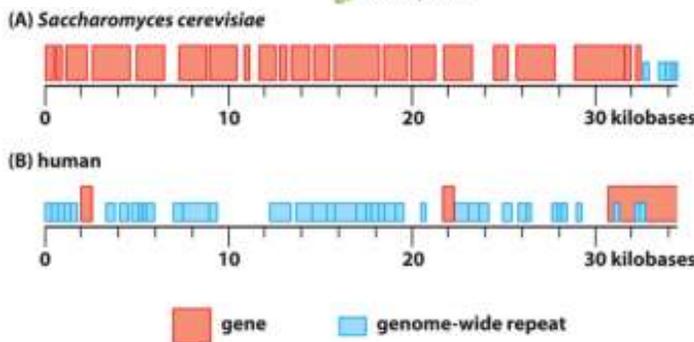
Es gibt 23 doppelte (= Diploid) Chromosomen



Exon: Stellen in der DNA, welche für die Proteinexpression benötigt werden

Intron: Werden bei der mature mRNA herausgeschnitten

→ nicht kodierend



Das Menschliche Genom dekodiert 24 000 Gene, das Hefegenom 6 000. Aber das Menschliche Genom ist 200-mal grösser als das der Hefe, somit ist die **Genverteilung im Menschlichen Genom viel grösser (15-mal)**. Dazwischen sind **Genomweite Repetition Sequenzen** (welche für die Regulierung wichtig sind).

→ Kopien von kurzen Sequenzen, nicht transkribiert
 - kein Zusammenhang Genomgröße und Komplexität

↳ Ausnahmen: manche wiederrepetierten Sequenzen, die rRNA codieren oder Transposons sind

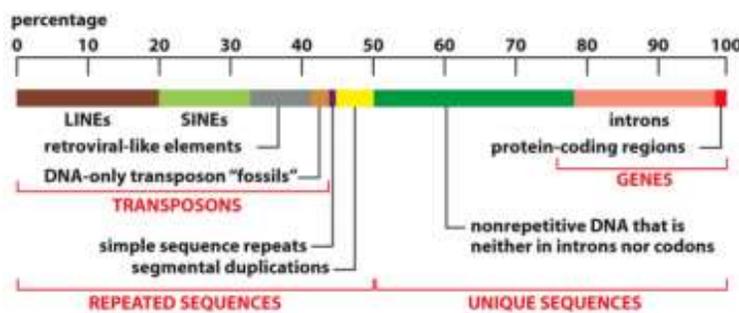
TABLE 4-1 Some Vital Statistics for the Human Genome	
Human genome	
DNA length	3.2×10^9 nucleotide pairs*
Number of genes coding for proteins	Approximately 21,000
Largest gene coding for protein	2.4×10^6 nucleotide pairs
Mean size for protein-coding genes	27,000 nucleotide pairs
Smallest number of exons per gene	1
Largest number of exons per gene	178
Mean number of exons per gene	10.4
Largest exon size	17,106 nucleotide pairs
Mean exon size	145 nucleotide pairs
Number of noncoding RNA genes	Approximately 9000**
Number of pseudogenes***	More than 20,000
Percentage of DNA sequence in exons (protein-coding sequences)	1.5%
Percentage of DNA in other highly conserved sequences****	3.5%
Percentage of DNA in high-copy-number repetitive elements	Approximately 50%

* The sequence of 2.85 billion nucleotides is known precisely (error rate of only about 1 in 100,000 nucleotides). The remaining DNA primarily consists of short sequences that are tandemly repeated many times over, with repeat numbers differing from one individual to the next. These highly repetitive blocks are hard to sequence accurately.
 ** This number is only a very rough estimate.
 *** A pseudogene is a DNA sequence closely resembling that of a functional gene, but containing numerous mutations that prevent its proper expression or function. Most pseudogenes arise from the duplication of a functional gene followed by the accumulation of damaging mutations in one copy.
 **** These conserved functional regions include DNA encoding 5' and 3' UTRs (untranslated regions of mRNA), DNA specifying structural and functional RNAs, and DNA with conserved protein-binding sites.

Wichtig zum Lernen von der Tabelle

Durchschn. Exonlänge: ca. ~~200~~ Nucleotides

145



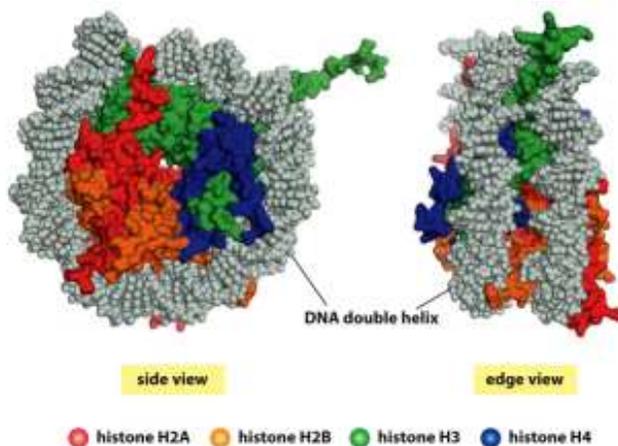
Nur 1,5 % des menschlichen Genoms decodiert Proteine, 3,5 % ist konserviert.

Chromatin → Fast alles was sich während Teilung des Zellkerns in den Chromosomen wieder findet



Das Chromatin besteht zu 1/3 aus DNA, 1/3 aus Histonen (die für die Form der DNA verantwortlich sind) und 1/3 aus nicht-Histon Proteinen (die der Regulierung dienen).

Nucleosome



Ein Komplex aus DNA und Histon wird Nucleosom genannt.

Ein Histon besteht aus 8 Untereinheiten (2 von jedem Typ) mit je 1 Tail (also insgesamt 8 Tails pro Histon).

→ DNA wickelt um Histone

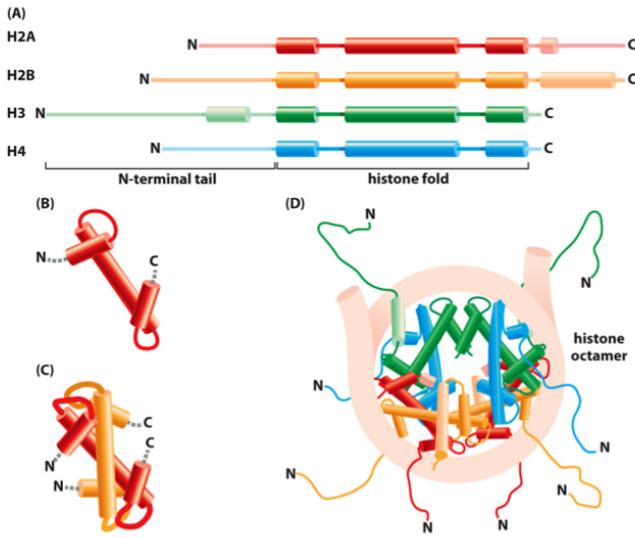


Figure 4-24 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Die Histone Proteine bestehen aus einem Helix-Turn-Helix-Turn-Helix Element. Immer Zwei zusammen bilden einen Viertel und je zwei Tails. Die Tails sind auf dem N Terminalen Ende der Proteine. *vom Nucleosom*

Je zwei Histone Proteine werden mit dem Phosphat Rückgrat der DNA (beide Stränge) verbunden. Diese Verbindung zwingt die DNA, sich zu beugen. Die Kontaktstellen sind somit nicht DNA Sequenzspezifisch.

Ausserdem ist sowohl der Minor Groove als auch der Major Groove der DNA noch immer erreichbar.

Struktur höherer Ordnung

→ Modifikation kann Ladung + Hydrophobizität verändern Kondensation

Die Tails sind positiv oder negativ geladen und spielen eine wichtige Rolle bei der Kompensation.

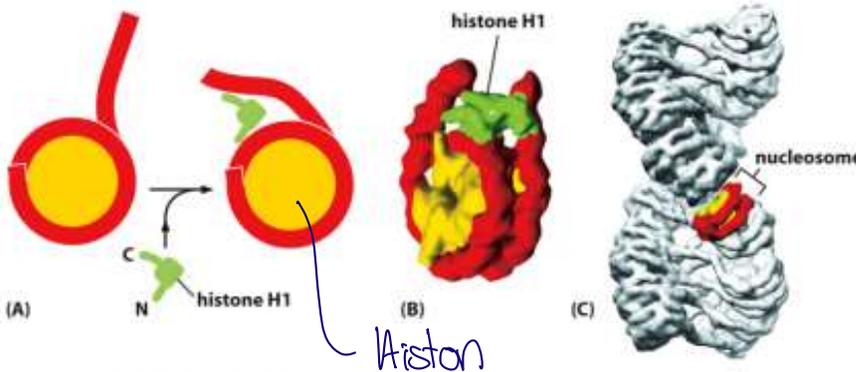


Figure 4-30 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Nucleosome kettenförmig aneinander gereiht

Immer zwei Nucleosome werden zusammengenommen, das Chromatin bindet um das erste, dann an das zweite, dann geht es weiter. Diese Nucleosome bilden ein Element in der höheren Struktur des Chromatins. Diese höhere Struktur sieht dann wieder aus wie eine Doppelhelix der Nucleosome.

Histone H1 verbindet die DNA und gibt ihr die Form, sodass die Doppelhelix gebildet werden kann.

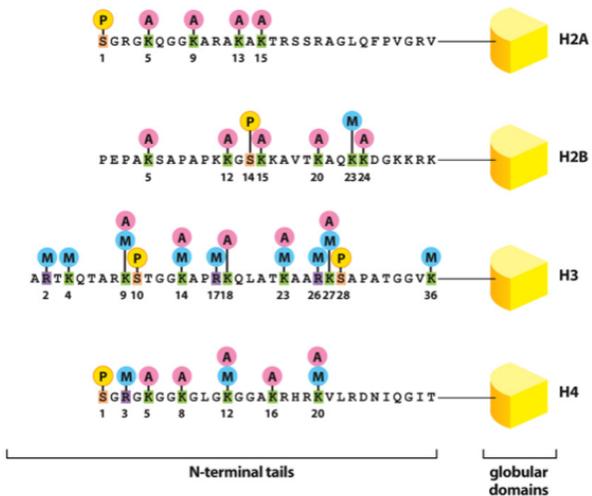
Histon Modifikationen

→ Chromatintypen

Diese Modifikationen definieren den Chromatinstatus.

Epigenetik = Die Lehre von Modifikationen, die die Genaktivitäten beeinflussen.

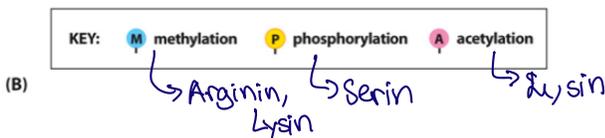




Wie man im Bild links sehen kann, können alle **Histon Protein Tails Acetyliert und Phosphoryliert** werden, und H2B, H3 und H4 können zusätzlich **Methyliert** werden. Einige AS können auch die eine oder die andere Modifikation haben (A oder M). **Dies führt zu mehr / weniger Kompaktisierung.** (A für offenes Chromatin, M für kompakteres Chromatin).

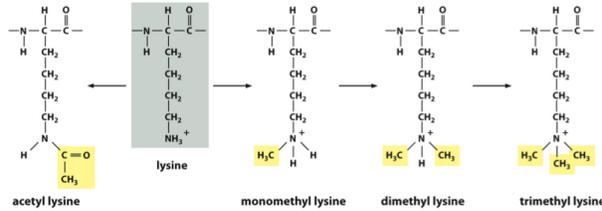
Histone können auch **Modifiziert** werden in den **α-Helix** Teilen.

Diese Modifikationen führen zu der **Rekrutierung** und **Bindung von Enzymen am Chromatin**, die die **Öffnung oder Schließung des Chromatins** bewirken (z.B. ING PHD Domain).

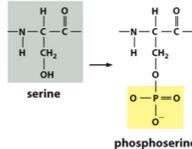


Lysin / Serine Modifikationen

(A) LYSINE ACETYLATION AND METHYLATION ARE COMPETING REACTIONS

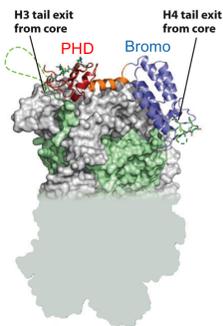


(B) SERINE PHOSPHORYLATION



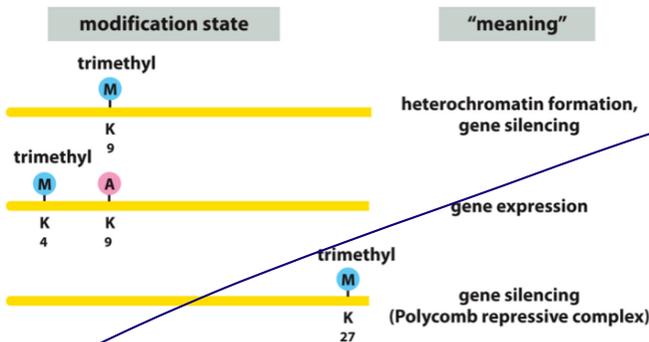
Handwritten notes: → Methylierung dichter gepackt (unpolar, schlechter gelöst) → Acetylierung, Phosphorylierung polar, weniger dicht → besser gelöst

Regulierung



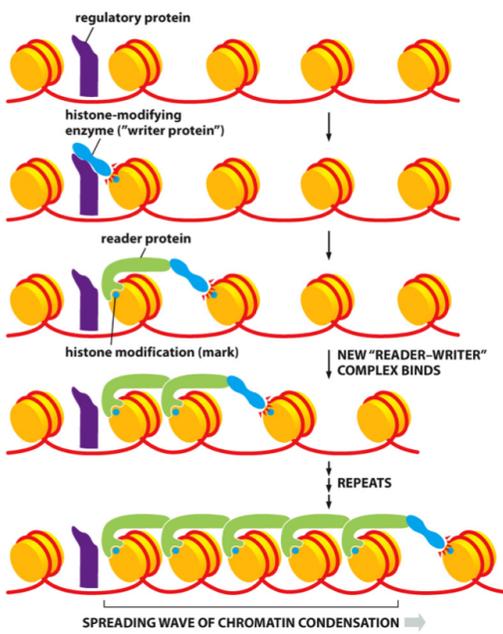
Gewisse Proteine besitzen z.B. eine **PHD Domain** (erkennt methyliertes Lys) und eine **Bromo Domain** (erkennt acetyliertes Histon). Dies garantiert, dass das Protein an gewissen Stellen binden kann und dass an diesen Stellen z.B. die **Transkription eingeleitet** werden kann.

Diese Proteine **können dann Enzyme rekrutieren**, die z.B. eine Transkription durchführen oder Gene silencing betreiben.



Links einige Beispiele, zu was Modifikation führen kann (z.B. zu Öffnung oder Schließung von Chromatin, Genexpression...)

Histon Tail Reader and Writer



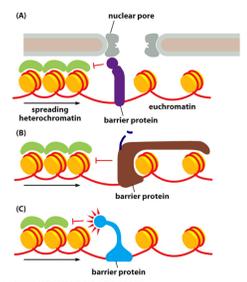
Proteine

Diese Reader und Writer können durch das Chromatin gehen (Spreading Heterochromatin).

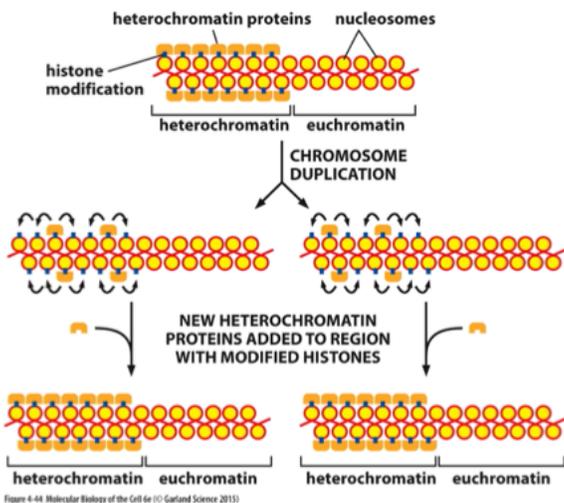
Z.B. im Bild links wird Chromatin durch eine Kombination aus Reader Proteinen und einem Writer Protein konserviert und führt zu einem silencing des Chromatins.

Diese Kondensation kann durch 3 Arten von Barrieren Proteinen gestoppt werden:

- Ein Protein blockt das spreading
- Ein Protein «schützt» das Euchromatin
- Ein Protein, welches die Modifikation der Histone ändert



Hetero- und Euchromatin Vererbung → Epigenetik

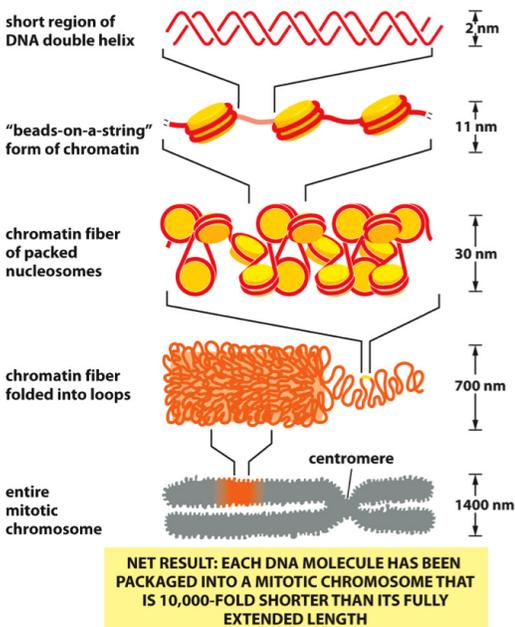


Wenn sich eine Zelle Teilt, so wird der Chromatinstatus an die Tochterzelle vererbt.

Die Histone werden halb, halb aufgeteilt auf die Tochterzellen. Die Histon Modifikationen werden bei der Replikation vollständig übernommen.

Sobald die Zellteilung abgeschlossen ist, so werden neue Heterochromatin Proteine gebildet, welche dann durch die Modifikationen wieder am Heterochromatin binden können.

Weitere Packung



Während der Meiose werden Chromosomen benötigt. An diesem Punkt ist die dichteste Packung des Chromatins gegeben. Die DNA ist dann 10 000 mal kürzer als seine normale Länge.

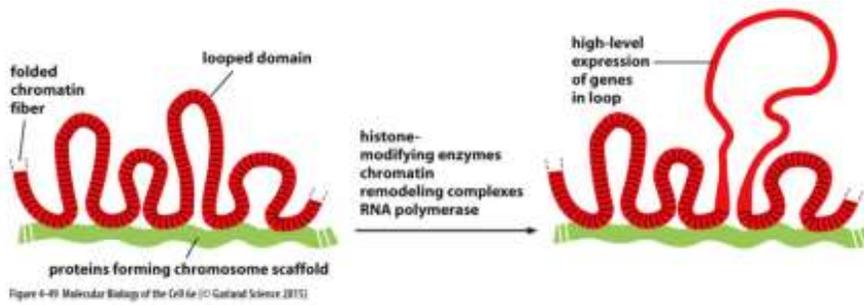
*Euchromatin: DNA ist aktiv wird zu Proteinen exprimiert
→ Kondensationsgrad Chromosom ist egal*

*Heterochromatin: hauptsächlich inaktive DNA
→ Strukturelle Funktion*

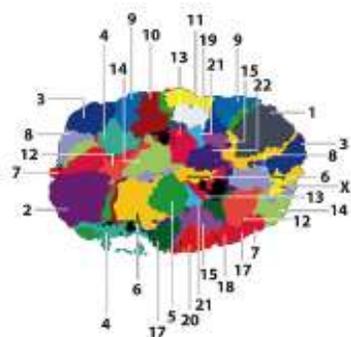
konstitutives Heterochromatin: nie exprimiert

facultatives Heterochromatin: manchmal exprimiert

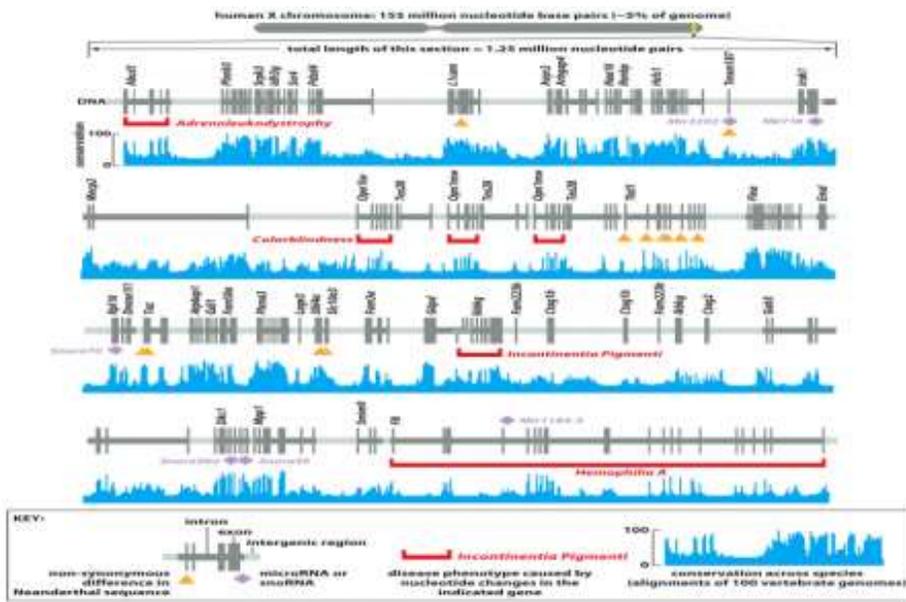
Transkription



Die Transkription passiert nicht in hoch kondensiertem Chromatin, lediglich in nicht so dichten Teilen des Chromatins (Loops).



Die Transkription passiert lokal, wie man an der Abbildung eines Nukleus links sehen kann. Dabei befinden sich die homologen Chromosomen nicht an derselben Stelle und werden aus diesem Grund auch nicht an derselben Stelle transkribiert.



Wie man an der Abbildung links (Humanes X Chromosom) sehen kann, gibt es verschiedene Gene (dunkelgraue Gruppen) mit verschiedenen Grössen und verschiedenen Längen von Introns.

Die Hellblaue Grafik gibt dabei an, wie konserviert die Gene in

Bezug auf Wirbeltiere sind. Dabei fällt auf, dass Exons immer sehr konserviert sind. Aber auch gewisse Introns sind sehr konserviert -> kann eine wichtige regulatorische Sequenz für die Genexpression sein.

Exon → kodieren Proteine

Wichtige RNAs die transkribiert werden:

1. **mRNA** Messenger RNA
2. **rRNA** Ribosomale RNA
3. **tRNA** Translation RNA
4. **snRNA** nur in Eukaryoten, wichtig für die Splicing Maschinerie
5. **snoRNA** hilft bei der chemischen Modifizierung von rRNA
6. **miRNA** nur in Eukaryoten, regulieren Genexpression
7. **siRNA** unterdrückt die Genexpression → verändert Struktur wenn weig kaputt geht
8. **piRNA** Schützt die Keimbahn vor transposablen Elementen
9. **lncRNA** Regulieren diverse Zellprozesse, inaktivieren ein X-Chromosom

small nuclear
micro

small
interfering

protein interacting → long noncoding

Proteine

- Ribosome

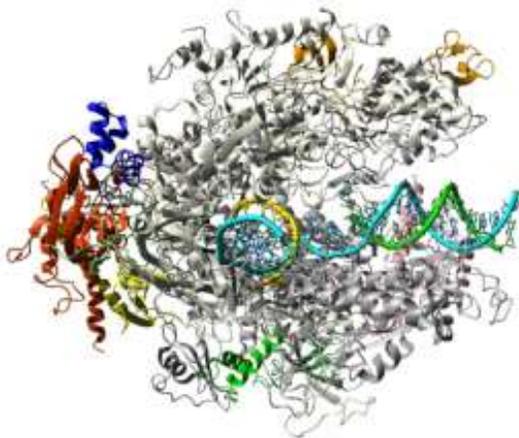
Die 3 RNA Polymerasen in eukaryotischen Zellen

- **RNA Polymerase I** transkribiert 5.8S, 18S und 28S rRNA Gene (die zahlenmässig häufigsten RNA in Eukaryotischen Zellen)
- **RNA Polymerase II** Transkribiert alle Protein-decodierenden Gene und alle oben genannten rRNAs ausser rRNA, tRNA Gene.
- **RNA Polymerase III** Transkribiert tRNA Gene, 5S rRNA Gene und einige snRNA Gene. Ausserdem Gene für andere kleine RNAs.

Ablagerung

Bemerkung: S bei rRNA = Sedimentationsrate, wie schnell sie sedimentieren in einer Ultrazentrifuge. Je grösser der S Wert, desto grösser die rRNA. Dies, um die rRNA zu unterscheiden.

Hefe Polymerase II

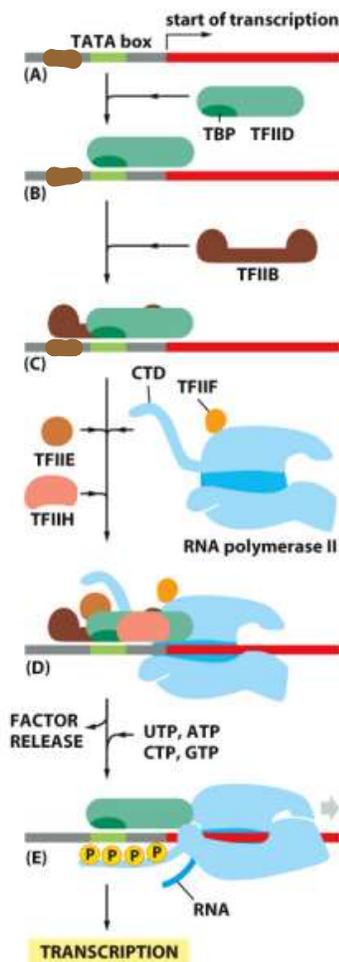
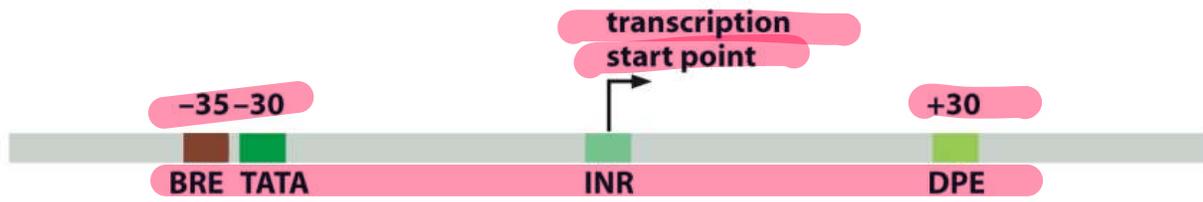


Die Hefe Polymerase II ist im Gegensatz zu der prokaryotischen Polymerase II etwas grösser (sie besteht aus der Prokaryotischen und zusätzlichen Strukturen). Ausserdem enthält sie 12 Subunits, nicht wie die Bakterielle 5.

Links ist der Pol II-mRNA-DNA Komplex in der Hefe. In der Mitte sieht man, wie die Polymerase die DNA in zwei Einzelstränge aufgeteilt hat. In Gelb sieht man die entstehende mRNA, welche mit ca. 8 BP mit des template Strangs der DNA gebunden ist und dann Stück für Stück seperiert wird.

An der Katalytischen Stelle wird eine komplementäre Base an den template Strang binden. 2 Magnesium Ionen an der Aktiven stelle sorgen dafür, dass das Triphosphat vom Sauerstoff angegriffen werden und so eine Phosphat-Sauerstoff Bindung entstehen kann (siehe Teil von N. Ban).

Transkription Initiation (mRNA)



Dass eine Transkription in der eukaryotischen Zelle stattfinden kann benötigt der Promotor die 4 oben gezeigten Elemente an genau den gezeigten Stellen.

Ein TFIID (12 Subunits mit Tatabox) Protein mit einer TBP (Tatabox Binding Protein) Subunit müssen die TATA Box (TBP) und die BRE Sequenz (TFIID) erkennen (A), dass überhaupt eine Transkription stattfinden kann. Diese Binden dann an der DNA (B). Dann wird ein TFIIB (1 Subunit) Protein dazukommen, welches das BRE Element erkennt und an dieser Stelle an die DNA Bindet (C). Wenn dieses Protein bindet, so wird TFIIF (3 Subunits) die RNA Polymerase II bringen und TFIIE (2 Subunits) sowie TFIIH (9 Subunits) kommen hinzu. Wenn alle diese Proteine anwesend sind (D), so wird der TFIIH die DNA am Startpunkt entwickeln und das Ser im CTD der RNA Polymerase II Phosphorylieren (E), die Transkription Faktoren werden sich lösen und die Transkription beginnt.

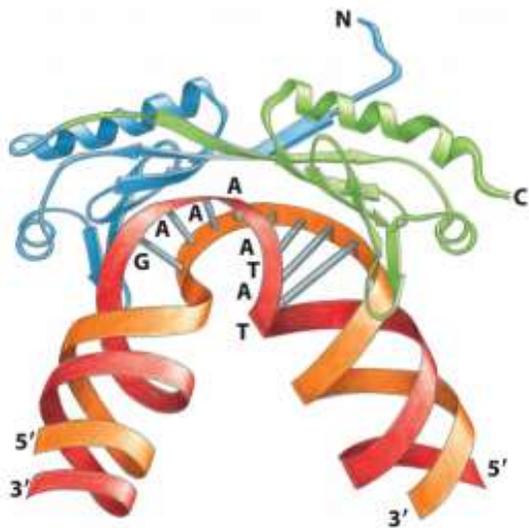
Spaltert Doppelhelix

Also die RNA Polymerase II kommt nicht zuerst, sondern gewisse Transcription Factors checken erst, ob es sich um einen Promotor handelt.

Der Abstand zwischen TATA Box und INR Element ist nötig, da zwischen der Stelle, wo sich die DNA befindet und der Aktiven Stelle von Pol II ca. 30 BP Länge befindet.

Es gibt auch noch einen TFIIA (2017 erst entdeckt).

Vorlesung 2



TATA - Binding protein

Die DNA wird durch das TBP geknickt, dies ist nur möglich, weil T und A besser geknickt werden können als C und G. Ausserdem gibt es **Aromatische Gruppen am TBP die diesen Knick ermöglichen.** Die Verbindung DNA zu TBP befindet sich im Minor Groove, was schwerer ist zum Binden.

Knick um richtig

Transkription Initiation ist Regulierte

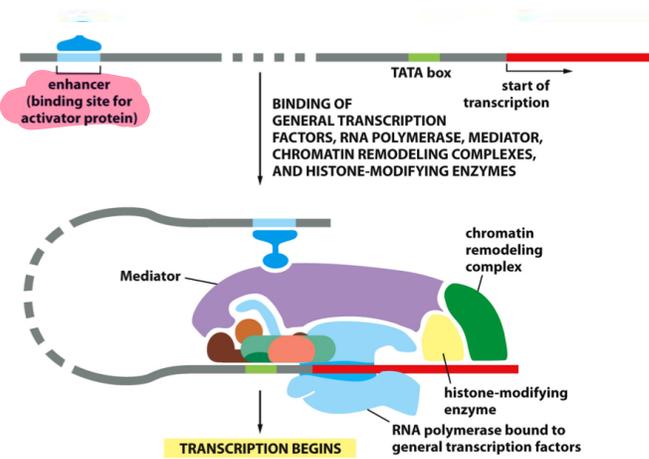


Figure 6-18 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

→ Immer gebraucht

Mediator: Grosser Proteinkomplex, welcher Proteine zur DNA Bindung oder **Modifikation beherbergt.** Diese Faktoren kontrollieren, ob und wie **Transkription stattfindet.**

Enhancer können sehr weit entfernt sein.

Transkription findet in Loops statt, wie man ihn auch auf der Abbildung links gut sehen kann.

Silencer : Gegenteil enhancer

Transkription variiert von Zelle zu Zelle

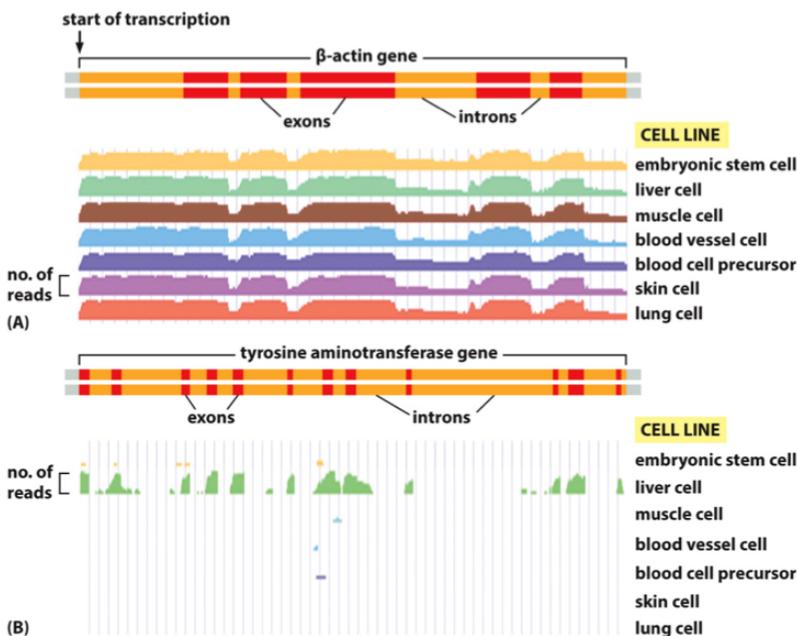
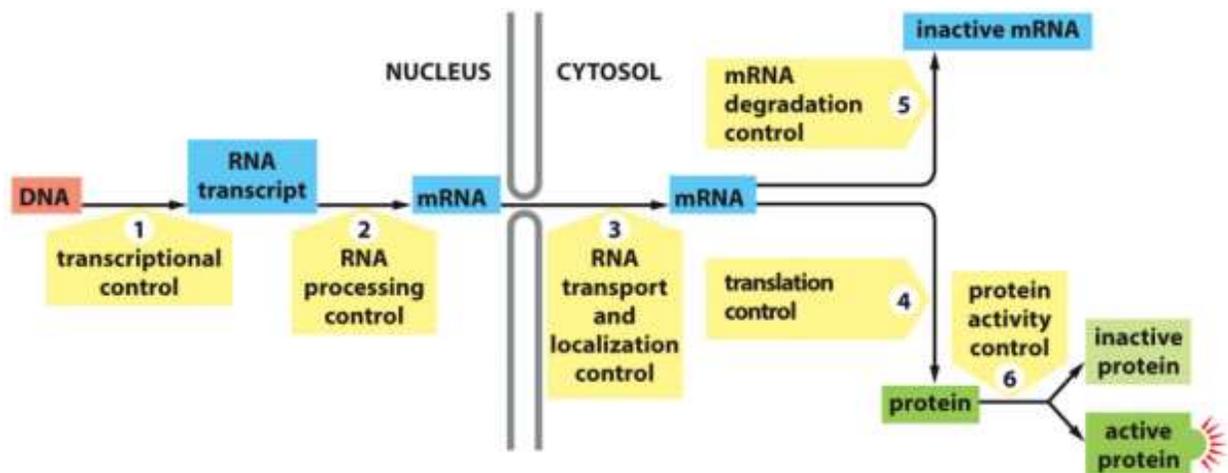


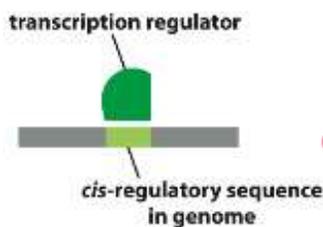
Figure 7-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Ein Gen (oben) wird von allen betrachteten Zellen gleichermassen exprimiert, ein Anderes (unten) nur von Leberzellen. Es gibt also **Transkriptionsfaktoren, die verhindern, dass das Gen in nicht-Leberzellen exprimiert wird.**

Transkriptions- und Posttranskriptionskontrollen Regeln Anzahl Proteine (Überblick)



Transkription Faktoren binden an DNA Sequenzspezifisch

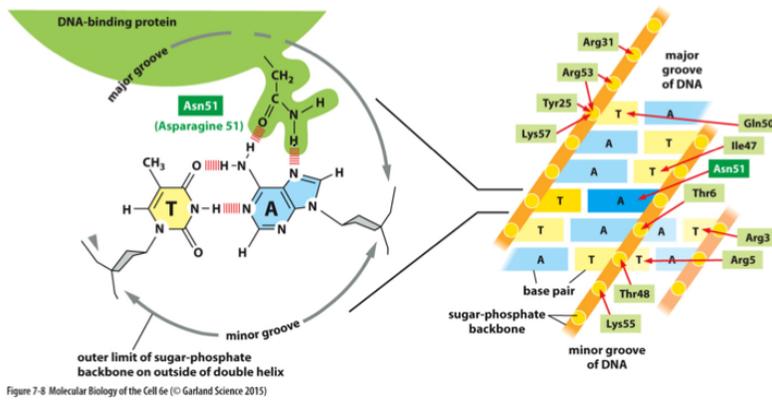


Bemerkung: Eine α -Helix passt perfekt in den major Groove der DNA.

Durch die Gruppen am minor/major Groove lassen sich Sequenzen erkennen, ohne die DNA aufspalten zu müssen. Vorallem am major Groove ist dies gut möglich, der minor Groove erlaubt weniger Erkennung.

→ TATA Box zum Knicken

Homeodomain Proteine



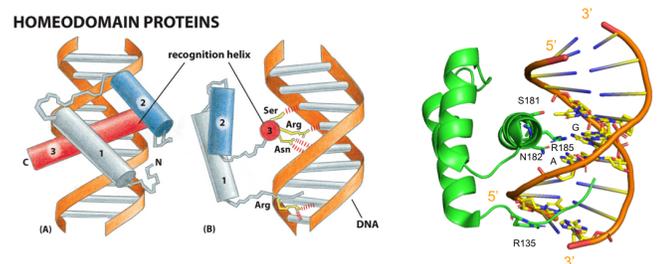
Eine Helix (Recognition Helix) eines DNA Bindungs Proteins passt perfekt in den Major Groove der DNA. Diese Helix besitzt 3 Seitenketten, welche dann ein AT oder TA Basenpaar «erkennen» können. Dies geschieht in der Reihenfolge TAA (oder TTA von der anderen Seite), das Protein kann dann (sequenzspezifisch) an dieser

Stelle an diese Sequenz binden durch Wasserstoffbrücken.

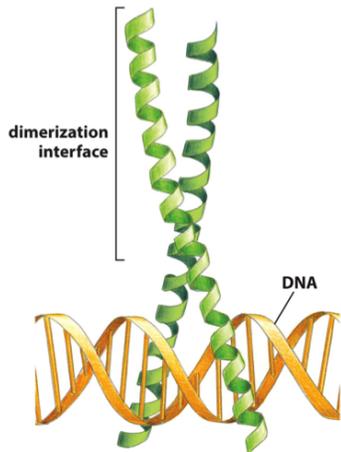
Dieses Protein kann dann einen Mediator rekrutieren und so zu der Initiation der Transkription führen.

Durch andere Aminosäuren an der Recognition Helix können auch andere Sequenzen erkannt werden.

Diese können auch Kombiniert werden, sodass die Erkennung spezifischer wird (TAA kommt im Genom etliche Male vor). Sie können durch α -Helices oder β -Faltblätter verbunden sein, benötigen aber in jedem Fall einen Abstand von 3.4 nm (einen Turn in der DNA).

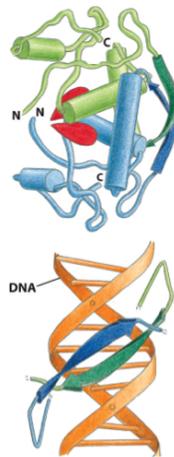


Andere Typen von DNA Bindungsmotiven

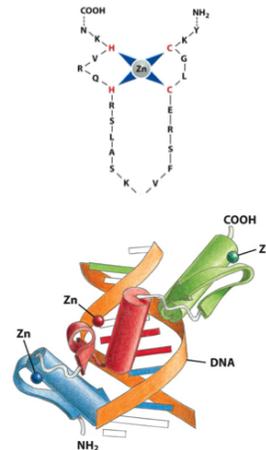


Panel 7-1 (part 3) Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

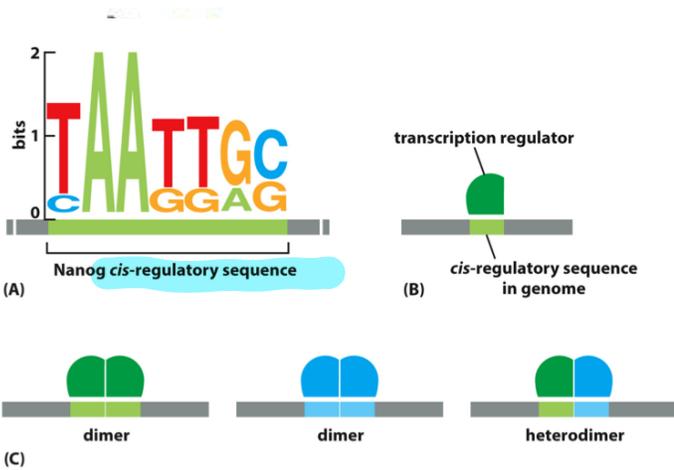
Leucine zipper



Betasheet insertion



CCHH zinc-finger



Cis-regulatory Sequenz: Sequenz zur Regulierung, die sich auf demselben Molekül wie das Gen befindet.

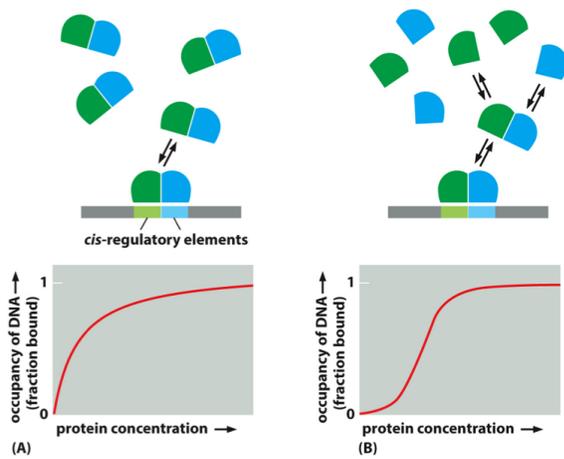
transkription

A: Die Sequenz kann aus Teilen bestehen, die **zwingend benötigt werden (grosse Buchstaben)** oder solchen, die **weniger dringend benötigt werden** und auch vom TF akzeptiert werden. Je **grösser die Buchstaben**, desto mehr werden sie benötigt.

Transkription Faktor

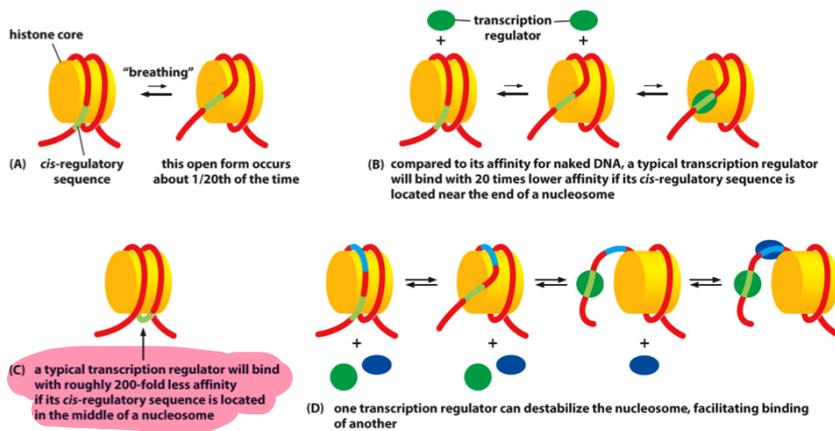
B: Der **Transcription Regulator** kann sich dann an die Sequenz im Genom binden. (Je länger die Sequenz, desto selektiver für genau die Stelle ist auch der Regulator)

C: Diese Regulatoren können auch für noch bessere Selektivität aus **Homodimeren (zwei gleiche Regulatoren)** oder **Heterodimeren (zwei unterschiedliche Regulatoren)** bestehen.



Gewisse dieser Heterodimere sind **von Beginn an aneinander gebunden** und dies garantiert, dass sie schon **bereits ab einer geringen Konzentration an Heterodimer stark an die cis-regulatory Sequenzen binden**. Andere können auch für sich alleine sein und müssen zuerst aneinander binden, dass sie an die cis-regulatory Sequenz binden können. Dies erlaubt ein **fine-tuning**, da wenn nur eines der beiden Proteine bindet, auch die Bindung an die DNA schwach ist. Das garantiert eine **graduellerer** Funktion der Bindung.

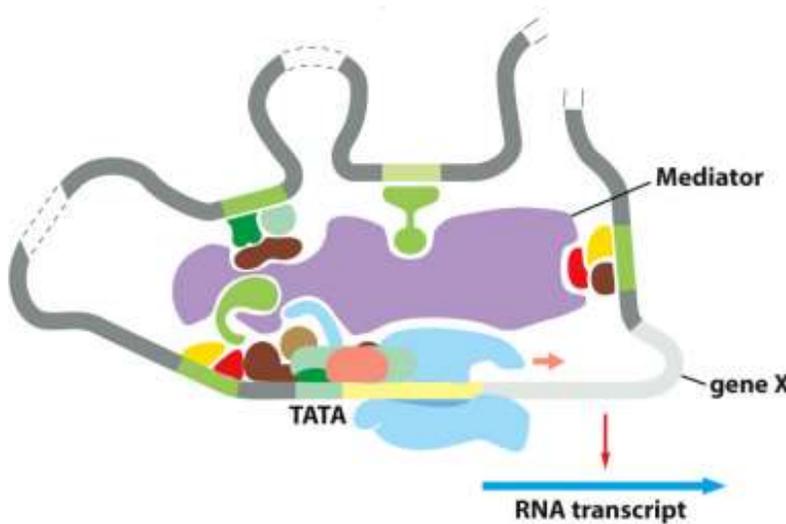
Nukleosom Struktur sind wichtig für die Bindung von Transkriptionfactors



Wo sich eine cis-regulatory Sequenz befindet beeinträchtigt die Affinität von Bindungsproteinen stark (je mehr geknickt die DNA, desto schlechter die Affinität). Durch «breathing» kann das Histone die Sequenz von sich wegschieben, und so die Bindung erleichtern (20-mal

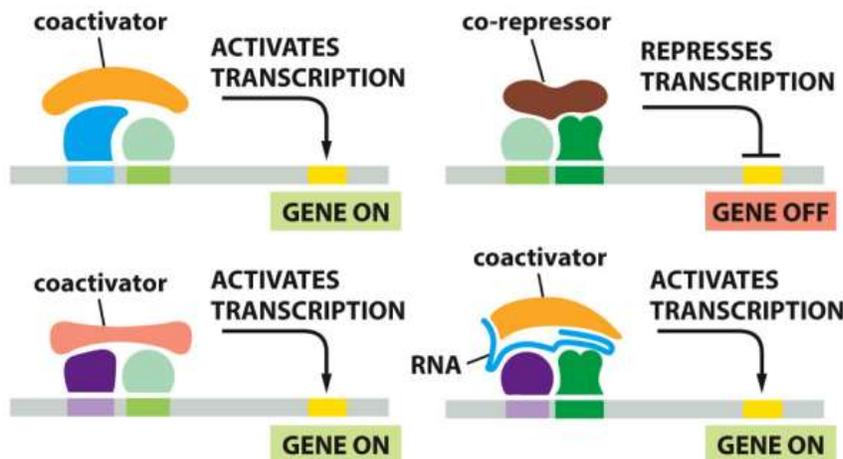
grössere Affinität, wenn sich Sequenz nicht in der Nähe des Nukleosoms befindet). Befindet sich die Sequenz im Nukleosom, ist die Affinität 200-mal kleiner. Ein Transkription Regulator kann das Nukleosom destabilisieren, und so die Bindung eines anderen erlauben.

Genregulierung durch spezielle cis-regulatory Sequenzen durch Transcription Regulatoren



Je mehr dieser Transkriptionsregulatoren binden, desto stärker ist auch die Transkription eines Gens.

Wichtig zu sehen: Anders in Bakterien, wo man dieses Set von Operons hat, die die menge an Transkription vorgeben, hat man in Eukaryoten diese Transkription Regulatoren. Je mehr dieser Regulatoren, desto mehr von einem Gen wird transkribiert.



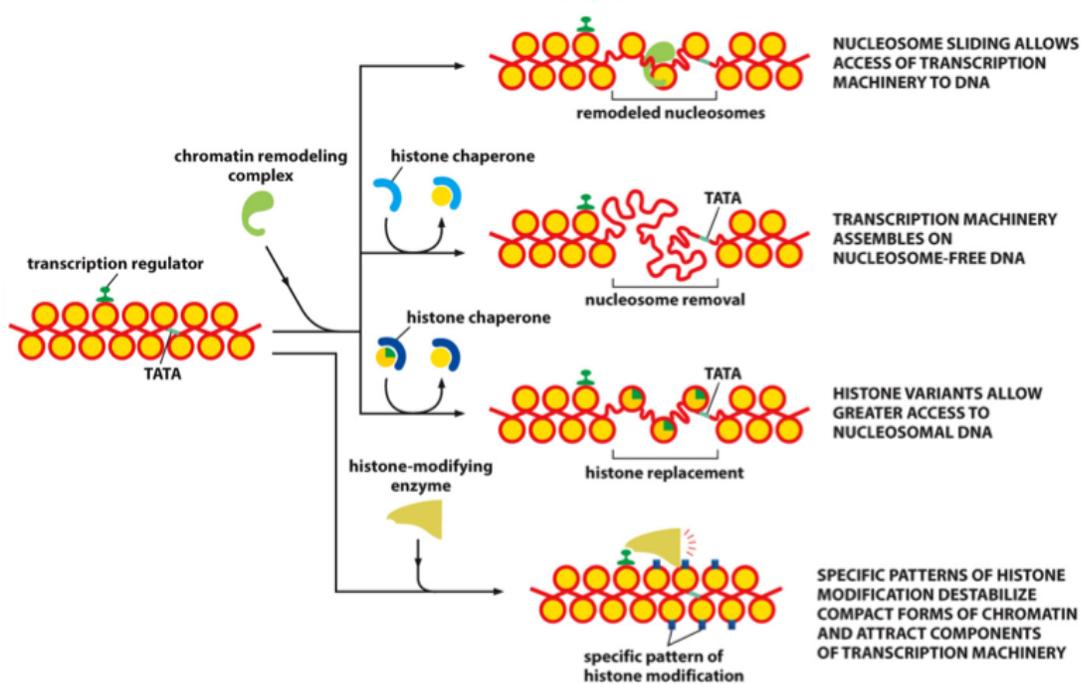
Einige Transkription Factors Arbeiten in Gruppen und zum Teil mit RNA um die Transkription fein zu tunen.

Coaktivatoren und Corepressoren binden nicht direkt an die DNA sondern an die an DNA gebundenen Transkriptionsregulatoren

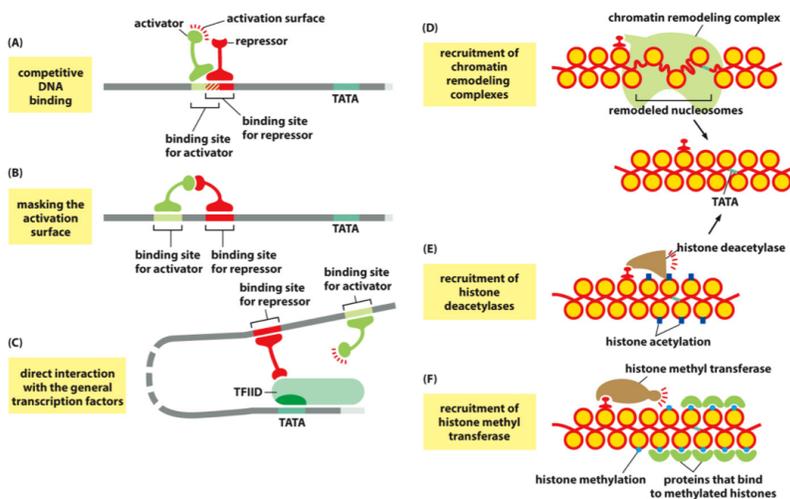
Diese Komplexe sorgen dann für die Aktivierung oder die Unterdrückung der Transkription.

→ gibt universelle und spezifische

Initiation Machinery und Transkription Faktors Kommunikation



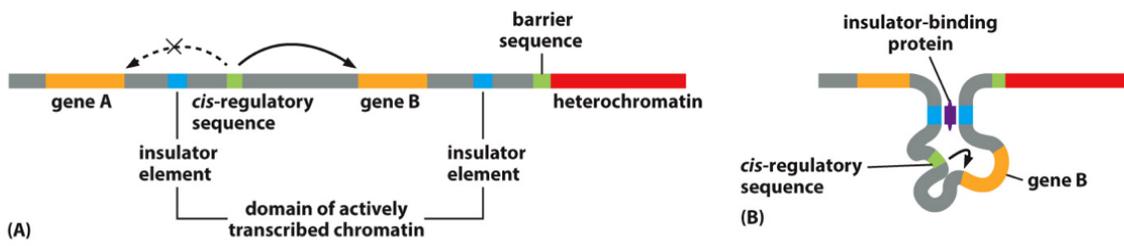
Funktionsweise von Transkription Repressoren



Es gibt 6 Möglichkeiten, die DNA Expression zu unterdrücken:

- A. Competition
- B. Aktivierungsstelle verdecken
- C. Direkte Interaktion mit Transkriptionsfaktor
- D. Rekrutierung von Chromatin Modeling Komplexen
- E. Rekrutierung von Histon Deacetylasen
- F. Rekrutierung von Histon Methyl Transferasen

Insulator

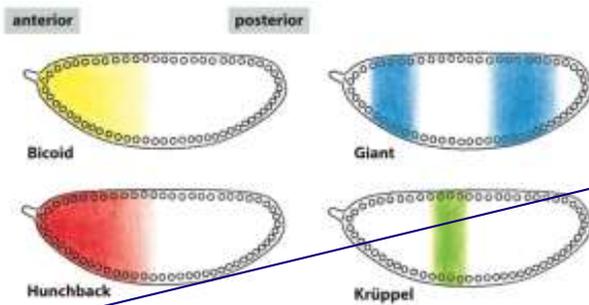


Ein Insulator sind zwei Sequenzen vor und nach einem Gen. Durch ein Protein Dimer (CTCF, Insulator Binding Protein) können die Beiden Sequenzen aneinandergelassen werden. Dadurch kann ein Gen (in unserem Beispiel das gene B) von einem anderen isoliert werden, mit dem Ziel, dass zum Beispiel

→ trennt Gene räumlich voneinander

eine cis-regulatory Sequenz nicht ein anderes Gen (in unserem Beispiel das gene A) beeinflusst. So können **Transkriptionseinheiten** geschaffen werden (Loops), die **unabhängig voneinander reguliert** werden können. Wie bei den DNA Bindungsmotiven besteht diese Sequenz aus zwingenden BP und aus weniger Zwingenden. Ein anderes Protein (**Cohesin**) bindet sich dann um die DNA an dieser Bindungsstelle um mehr Stabilität zu gewährleisten.

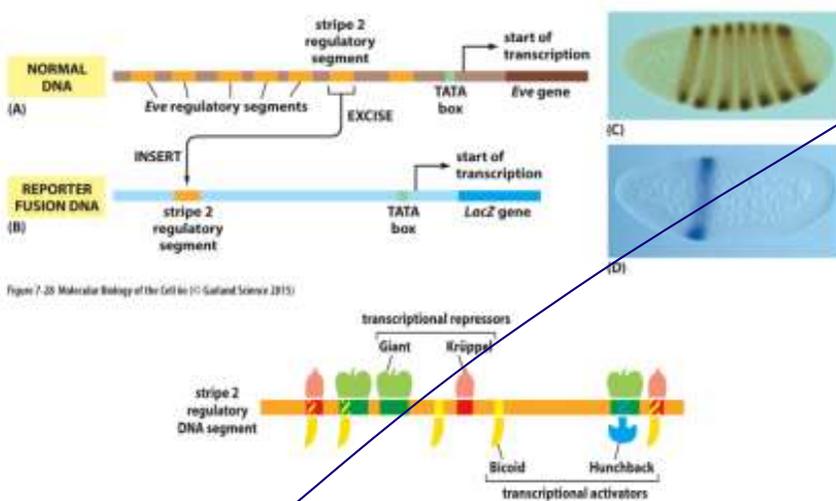
Transkriptionskontrolle ist wichtig für Zellteilung und Zellwachstum



Beispiel aus Drosophile (Fliegenart)

Der Embryo dieser Fliege besteht aus einer Zelle mit vielen Nuclei und lokal verteilten Transkriptionsfaktoren mit eigenen Namen (siehe Links).

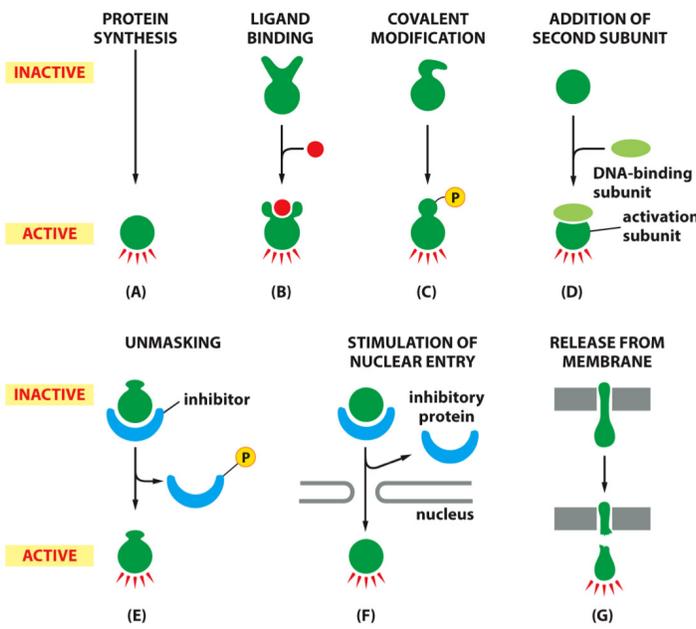
Dies ist wichtig, dass z.B. die Proteine für die Organe am richtigen Ort transkribiert werden.



In diesem Beispiel wurde das Eve 2 Gen (das Gen, welches den 2. Strich im Bild oben produziert) in eine Reporter DNA eingesetzt, welche einen Blauen Farbstoff exprimiert. Das Ergebnis ist ein blauer Strich am selben Ort, wo der Eve 2 Strich war. Grund dafür, dass dieser sich genau an dieser Stelle befindet ist, dass Giant und

Krüppel TF als Repressoren für dieses Gen und Bicoid und Hundback als Aktivatoren wirken (vergleichen mit Bild oben).

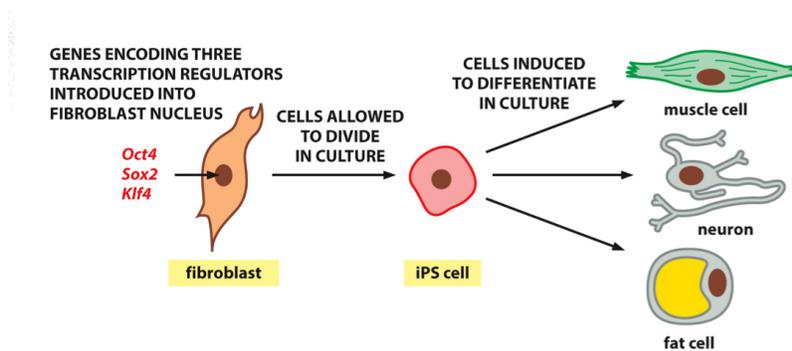
Aktivierung von Transkriptionsfaktoren



Möglichkeiten

- A. Direkt durch Proteinsynthese
- B. Ligandenbindung
- C. Kovalente Modifikation (z.B. Phosphorylierung)
- D. Anfügen einer zweiten Subunit
- E. Entfernung von Inhibitoren (z.B. durch Phosphorylierung)
- F. Entfernung von Inhibitoren an einer Membran (z.B. Nukleus Membran)
- G. Entfernung von der Membran *lösen*

Zellen Differenzierung



Es gibt in Eukaryoten 3 Master Transkriptionsfaktoren (Masterregulatoren):

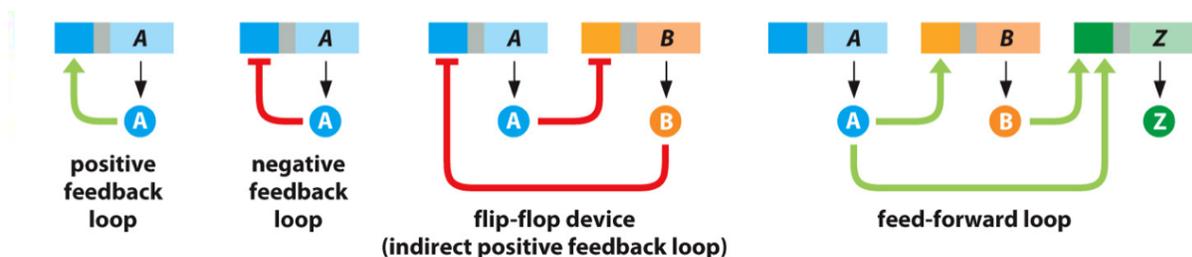
- Oct4
- Sox2
- Klf4

Diese sind an der Expression von extrem vielen Genen

beteiligt, können sich selbst oder einander Regulieren und können bestimmen, welche Zelle gebildet werden soll. Einige Gene werden auch durch 2 von diesen Faktoren und einige durch alle 3 exprimiert.

Stamm
Aus Zelle können mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren verschiedene Zellen entstehen
→ pluripotent
→ künstlich

Kreisläufe



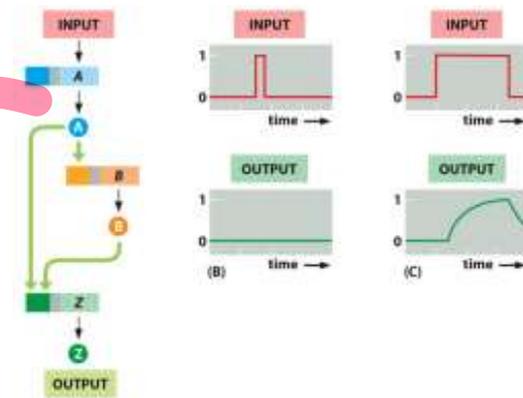
Die Faktoren werden «Memorisiert» durch einen positiven Feedbackloop: Dadurch, dass sie sich selbst regulieren können, gibt es Gene, die diese Transkriptionsfaktoren exprimieren und durch diese aktiviert werden. Dadurch werden auch die Tochterzellen die Transkriptionsfaktoren enthalten.

Der negative Feedbackloop sorgt dafür, dass die Konzentration an TF konstant gehalten wird.

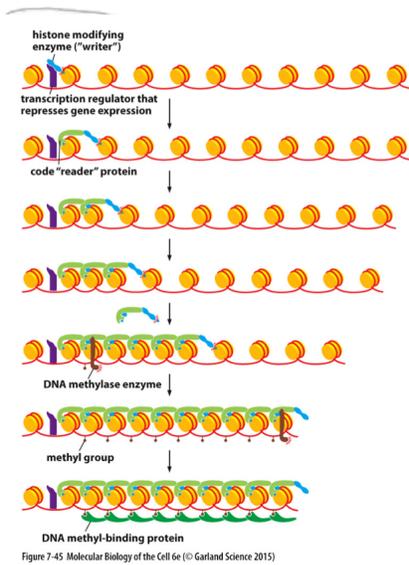
Das **Flip-Flop device** ist ein **indirekt positiver Feedbackloop** für A, da dessen Repressor (B) bei der Erhöhung an Konzentration von A unterdrückt wird.

Der Feed-Forward loop sorgt dafür, dass in unserem Beispiel durch einen kurzen Zeitraum von Input kein Output (Z) generiert wird. **Erst wenn der Input eine gewisse Zeit anhält, so wird langsam immer mehr Z exprimiert. Diese nimmt dann auch kontinuierlich wieder ab und nicht sofort.**

Durch diese Elemente können **komplexe Schaltkreise** in Eukaryoten entstehen.



DNA Methylierung als zusätzliche Genregulierung



DNA methylation provide an additional layer of gene regulation

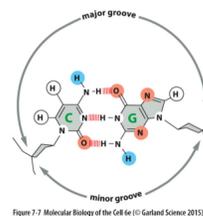


Figure 7-7 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

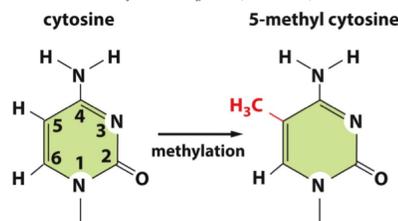
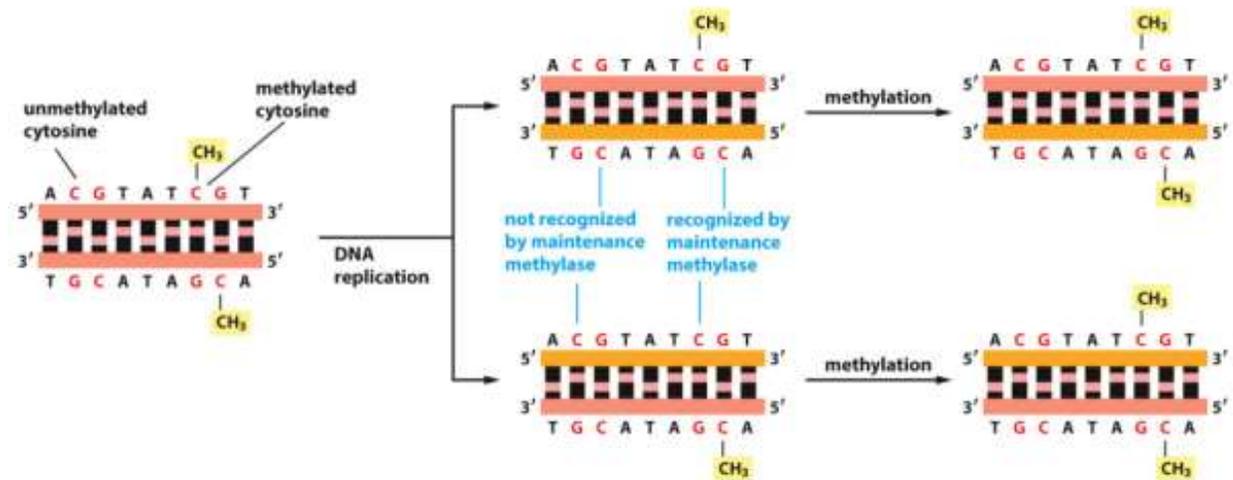


Figure 7-11 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Durch Methylierung (zum Beispiel von Cytosin oben an der 5. Stelle im Major Groove) wird das **Chromatin mehr komprimiert. Der Effekt: Exprimierung wird unterdrückt.** *⇒ Cytosin wird methyliert*

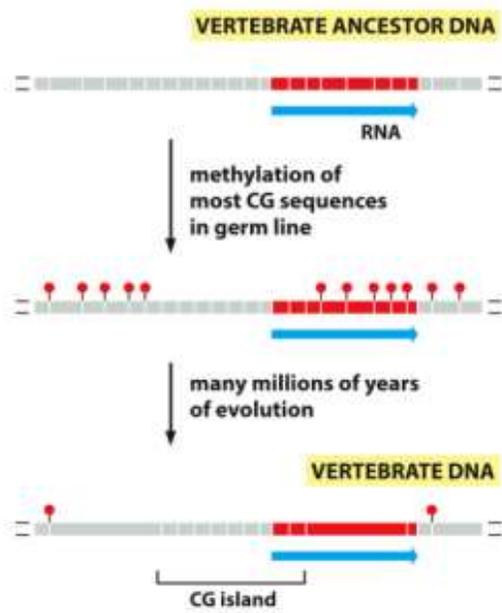


Methylierung findet immer an einem **CG Paar** am C statt. Wird die DNA repliziert, so wird die **Methylierung eines Strangs durch Maintenance Methylase erkannt und auch auf den anderen Strang übertragen. Bei einer Replikation besitzt dann wieder je einen Strang eine Methylierung.**

Bei Replikation übertragen

$\rightarrow \text{NCG}^+ \rightarrow \text{CG}$

DNA Methylierung als evolutionäre treibende Kraft



Durch Deaminierung kann ein methyliertes C leicht in ein T umgewandelt werden. Dadurch wird die Diversität erhöht.

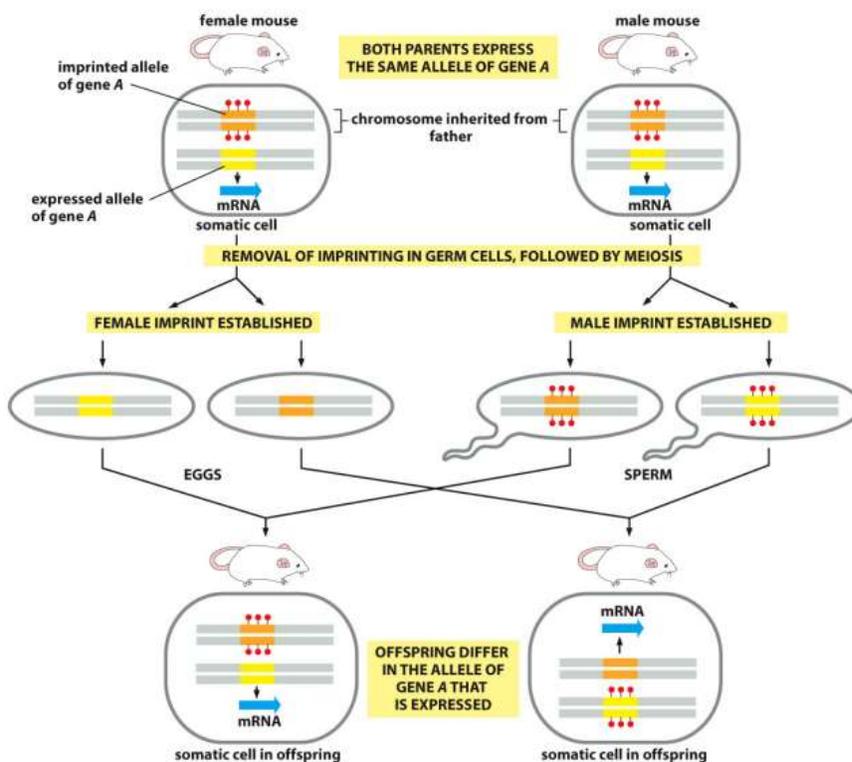
Im Laufe der Zeit entstand durch diese Deaminierung oft bei decodierten Genen weniger methylierbare C, diese befinden sich dann mehr in Promoter Sequenzen im sogenannten CG island.

\Rightarrow viele CG nebeneinander \rightarrow nicht alle methyliert

somatische Zellen: stellen keine Geschlechtszellen her

Keimbahn Zellen: stellen Keimzellen her

Genomische Prägung durch DNA Methylierung



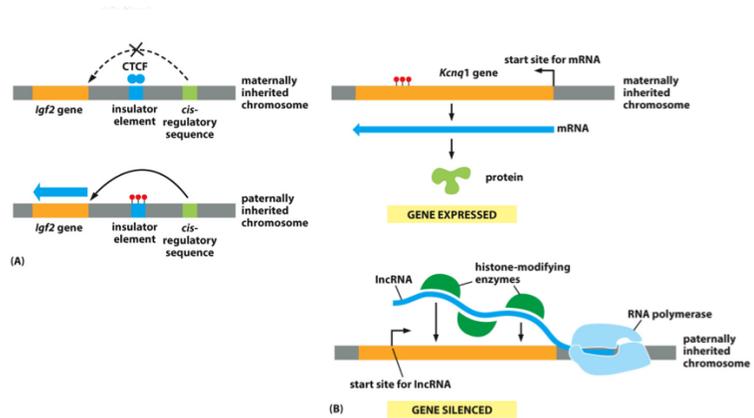
Im Beispiel links besitzen beide Mäuse in der somatischen Zelle (= Körperzelle, die keine Geschlechtszellen hervorbringen können) dasselbe Gen A, bei welchem dasselbe Allel exprimiert wird.

In der männlichen Keimzelle ist das Gen A väterlicher- sowie mütterlicherseits methyliert, in der Weiblichen nicht. Somit kann sich im Kind der beiden Mäuse das geprägte (und somit exprimierte) Gen ändern.

Die beiden Möglichkeiten besitzen somit dasselbe gen, aber die eine exprimiert das Gen des Grossvaters, die Andere das der Grossmutter (Phänotyp kann unterschiedlich sein, obwohl der Genotyp gleich ist).

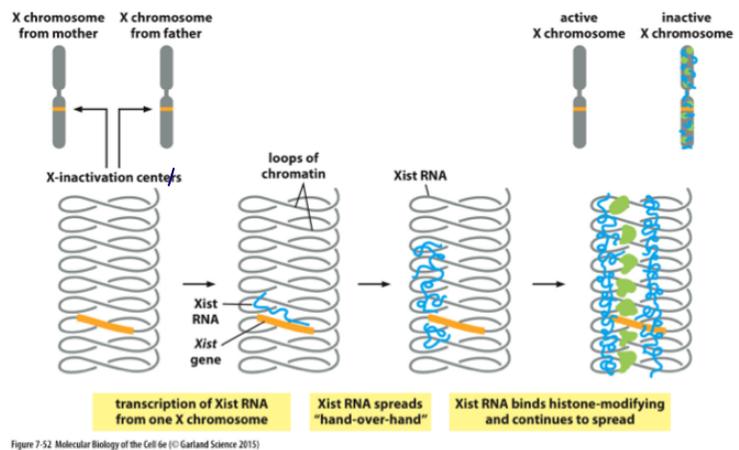
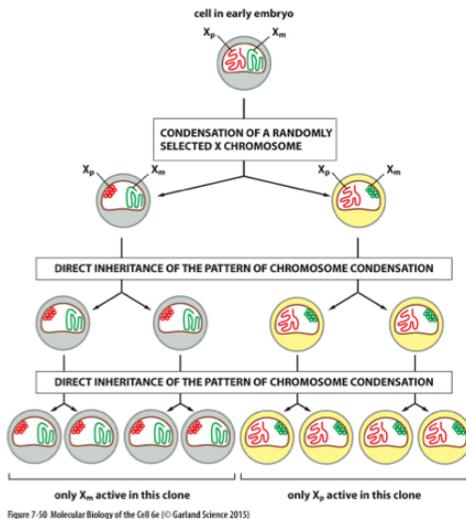
Aktivierung eines Gens durch Prägung

- Prägung kann auch dafür sorgen, dass ein Gen transkribiert wird, indem **zum Beispiel ein Insulator Element methyliert wird**
- Ein Teil des Open ReadingFrame (= Teil der DNA, der sich zwischen einem Start und einem Stopcodon befindet) eines Gens wird methyliert, **dadurch findet eine Transkription des Gens statt.** Ist der Teil nicht Methyliert, so wirkt er als Promoter für ein anderes Gen in die andere Richtung. Diese lncRNA wirkt dann als Repressor



Methylierung ändert Richtung

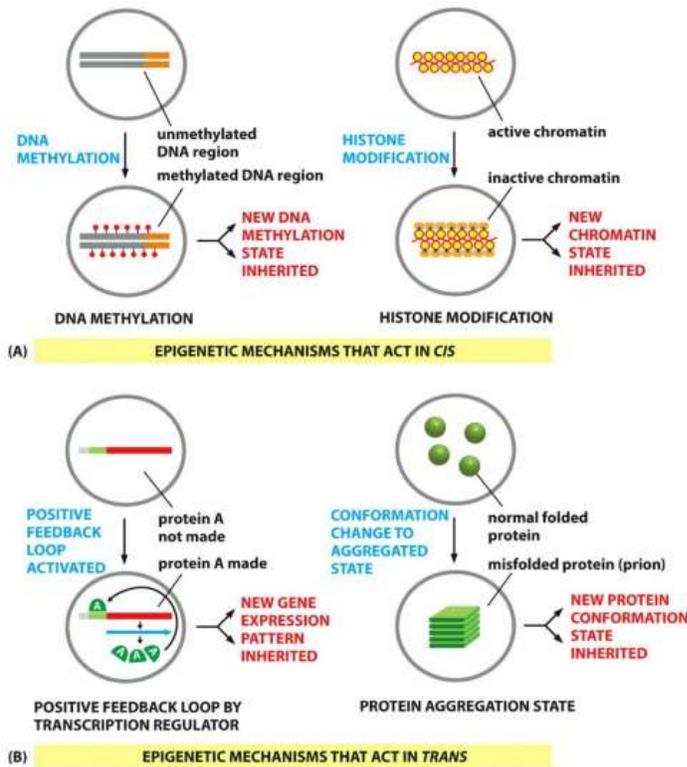
X Inaktivierung



Ein weibliches X-Chromosom muss ein X-Chromosom inaktivieren ~~wenden~~, da Frauen 2 X-Chromosomen haben. Dabei wird per Zufall ein X-Chromosom kondensiert und unterdrückt (silenced), nach einer gewissen Anzahl Zellteilungen.

Für die unterdrückung eines X Chromosoms wird ein auf dem Chromosom befindliches Gen für die **Xist RNA** exprimiert. Diese bindet an das Histon und verbreitet sich durch das ganze Chromosom und Rekrutiert Proteine, die das Chromosom dann zusammen inaktivieren. Nur noch an den Seiten, wo sich keine RNA und keine Proteine befindet kann noch ganz wenig Exprimierung stattfinden.

Vererbung von in der Zelle gespeicherten Informationen

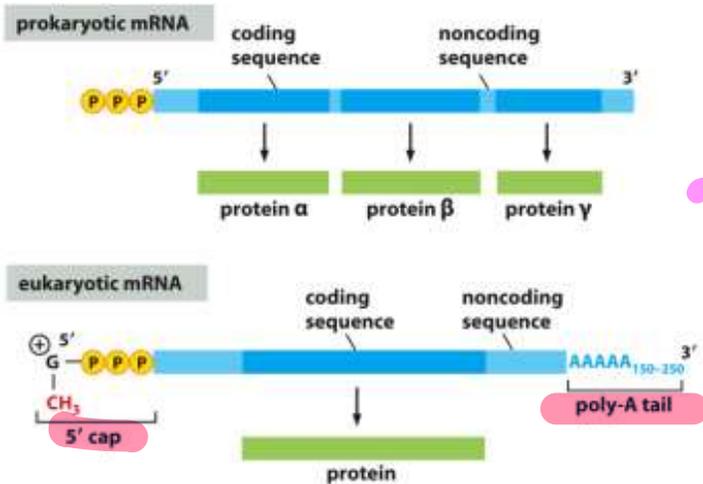


A: Wiedergabe von Informationen durch DNA Methylierung oder Histon Modifikation

B: Wiedergabe von Informationen durch Transkription Faktor Proteine und einen positiven Feedbackloop oder durch Konformationsänderung von Proteinen zu falsch gefalteten Proteinen (= Prione)

Vorlesung 3

Unterschiede von Genen in Prokaryoten und Eukaryoten

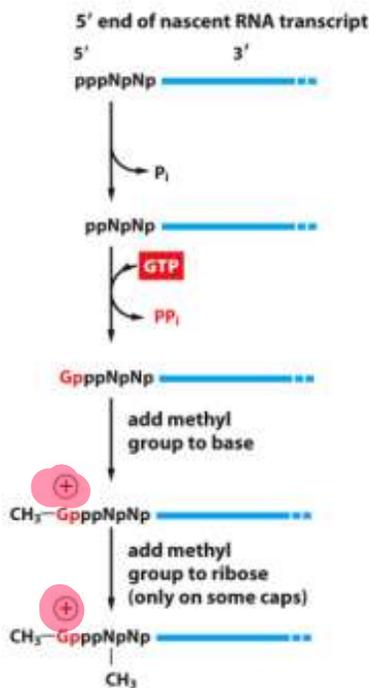
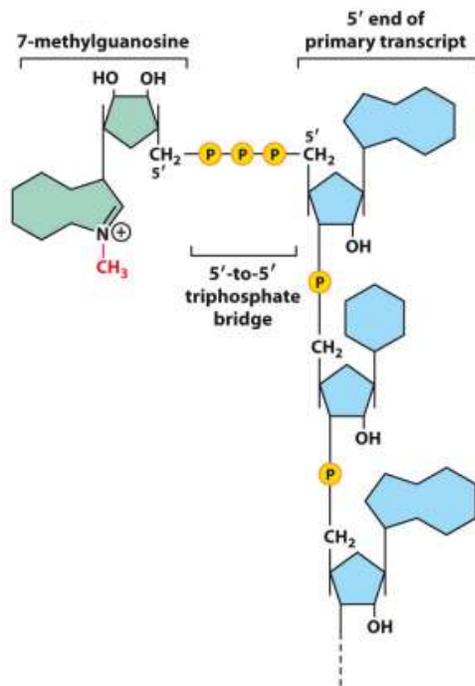


Anders als in Prokaryoten, wo sich die Codierung für mehrere Proteine auf einer mRNA befinden können, befinden sich auf Eukaryoten auf einer mRNA nur ein Protein. Ausserdem besitzt die eukaryotische mRNA eine 5' Cap und einen Poly-A-Tail.

↳ Adenosin

1 Start code pro Protein

Die 5' Cap und capping



Bei der 5' Cap handelt es sich um einen Zusatz am mRNA Transkript, welches sicherstellt, dass die RNA nicht degradiert (= Zersetzung der RNA in ihre Nukleotide) wird.

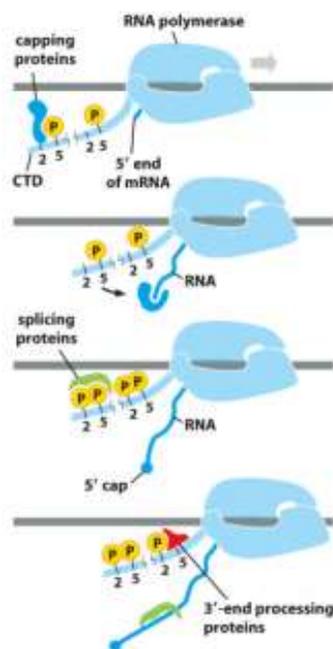
Die 5' Cap wird nach der Transkription an das 5' Ende der mRNA gebunden und besteht aus einer 5' zu 5' Phosphatbrücke (die als eine Bindung dient) und einem 7-Methylguanosin.

Auf dem linken Bild sieht man die Reaktion: An das

Triphosphat am 5' Ende des Transkripts (das erste Nukleotid wird ein Triphosphat besitzen) wird ein Guanin durch GTP Dephosphorylierung angehängt. Anschließend wird ein Enzym eine Methylgruppe an das Guanin hängen, wodurch dieses seine positive Ladung erhält. Bei manchen Caps wird die OH Gruppe des ersten Nukleotids durch eine Methylgruppe ersetzt.

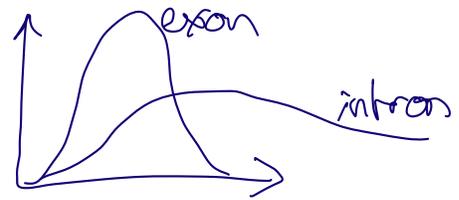
Danach wird das CBP20-CBP80 Protein an die Cap binden. Bei der Translation wird CBP20 durch eIF4E ausgewechselt, um diese zu starten. Auch gewisse Viren besitzen Cap Proteine (z.B. VP39) um ihre RNA zu schützen.

Die Rolle von CTD

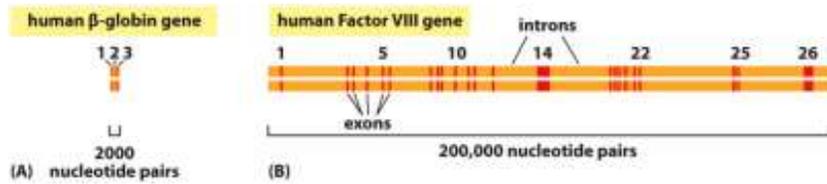


Schon während der Transkription wird die Cap an der RNA gebildet durch capping Proteins, die sich am CTD befinden. Die CTD enthält des Weiteren Splicing Proteine und 3' End Prozessierungsproteine, sie ist also eine Art «Plattform» für die bei der Transkription benötigten Proteine.

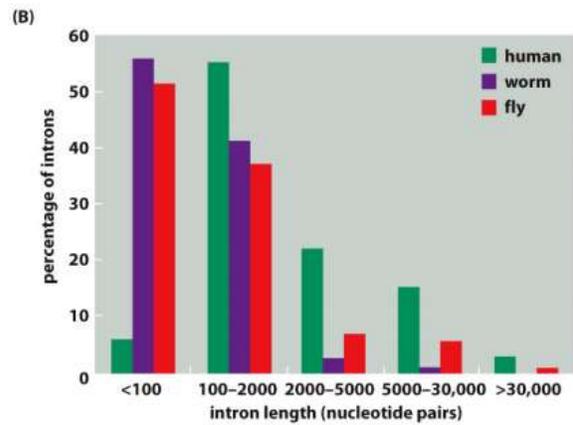
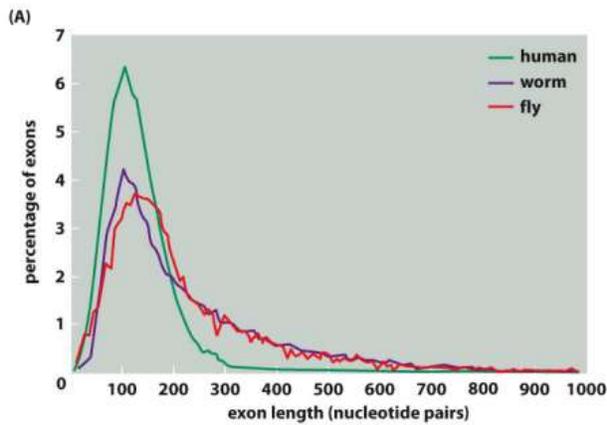
*Carboxy terminal
Acid*



Unterschiede zwischen Genen



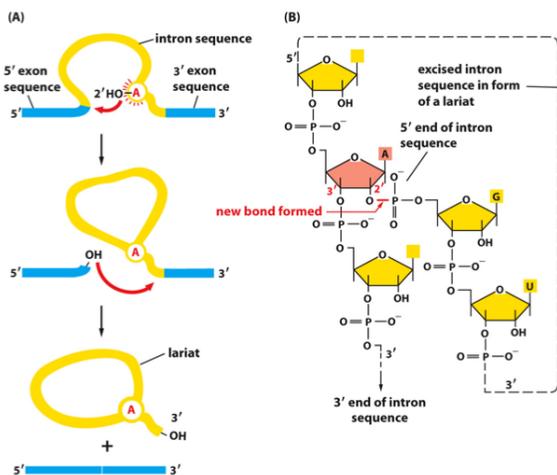
Gene in Eukaryoten haben extreme Unterschiede in ihrer Größe.



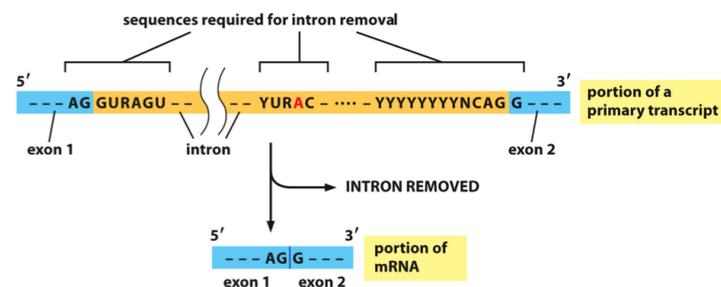
Das menschliche Gen besitzt, im Vergleich zu Insekten, kurze Introns im Vergleich zu dem Prozentsatz an Introns, kann aber auch sehr lange Introns besitzen mit einem kleinen Prozentsatz an Introns.

- mehr kürzere Exons
- größerer Varianz in Intronslänge

Pre mRNA Splicing



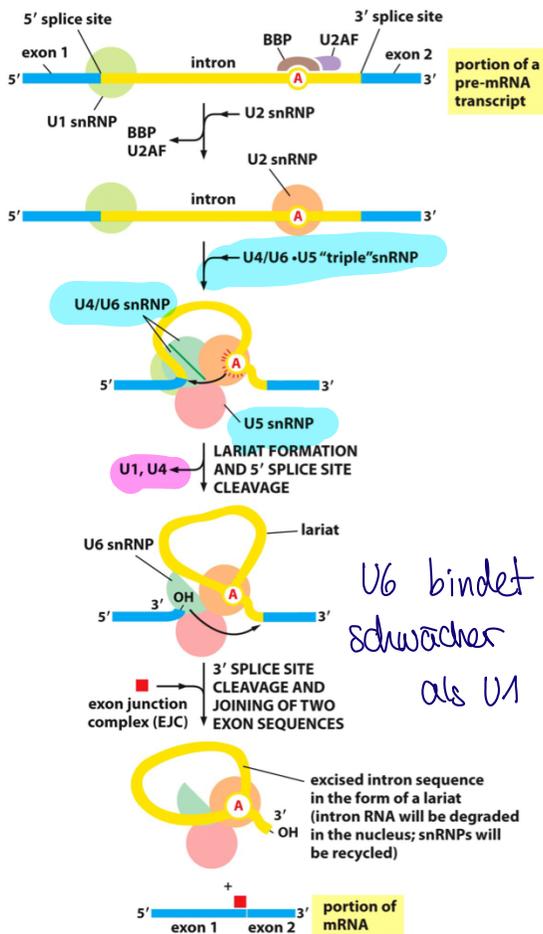
Introns können sich selbst herauspiclen. Bei diesem Vorgang wird ein Adenin, welches sich im Intron befindet das 5' Ende des Introns angreifen und ein Lariat bilden. Das 3' Ende des Exons kann dann das 5' Ende des Exons angreifen und sich so wieder verbinden. So wird das Intron von sich selbst herausgeschnitten.



Wichtig ist, wie das Intron das eigene Ende erkennt. Dabei sind nur einige ganz kleine Sequenzen am Anfang, in der Mitte mit einem A (welches dann Angreift) und am Ende des Introns sowie einige wenige Nukleotide der zwei Exons wichtig.

R = Purin, Y = Pyrimidin

Splicing Reaktion



The U1 snRNP forms base pairs with the 5' splice junction (see Figure 6-29) and the BBP (branch-point binding protein) and U2AF (U2 auxiliary factor) recognize the branch-point site.

The U2 snRNP displaces BBP and U2AF and forms base pairs with the branch-point site consensus sequence.

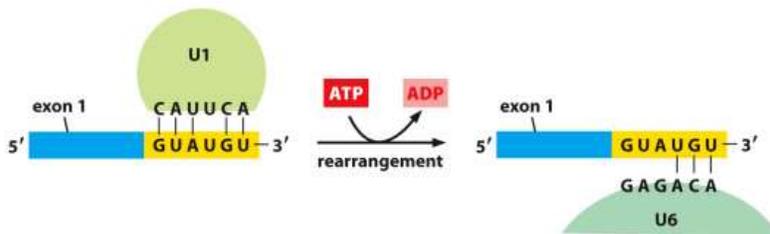
The U4/U6-U5 "triple" snRNP enters the reaction. In this triple snRNP, the U4 and U6 snRNAs are held firmly together by base-pair interactions. Subsequent rearrangements break apart the U4/U6 base pairs, allowing U6 to displace U1 at the 5' splice junction (see Figure 6-29). This creates the active site that catalyzes the first phosphoryl-transfer reaction.

Additional RNA-RNA rearrangements create the active site for the second phosphoryl-transfer reaction, which then completes the splice (see Figure 6-25A).

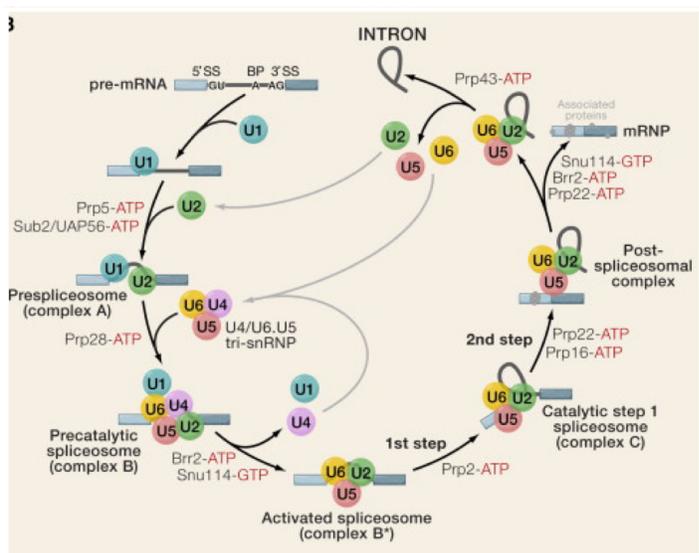
In diesem Beispiel handelt es sich nicht um die Autokatalytische Splicing Reaktion, sondern diese benötigt ein Spliceosom.

Zuerst wird U1 (alle Splicing Enzyme bestehen aus Proteinen und RNA) und U2 (nicht aber am angreifenden A) binden.

U2 wird dann U4, U5 und U6 rekrutieren, diese bilden mit U1 und U2 zusammen den Penta snRP. Dabei bildet sich ein Loop. U1 und U4 werden wieder entbinden und das A am Branch Point kann angreifen.



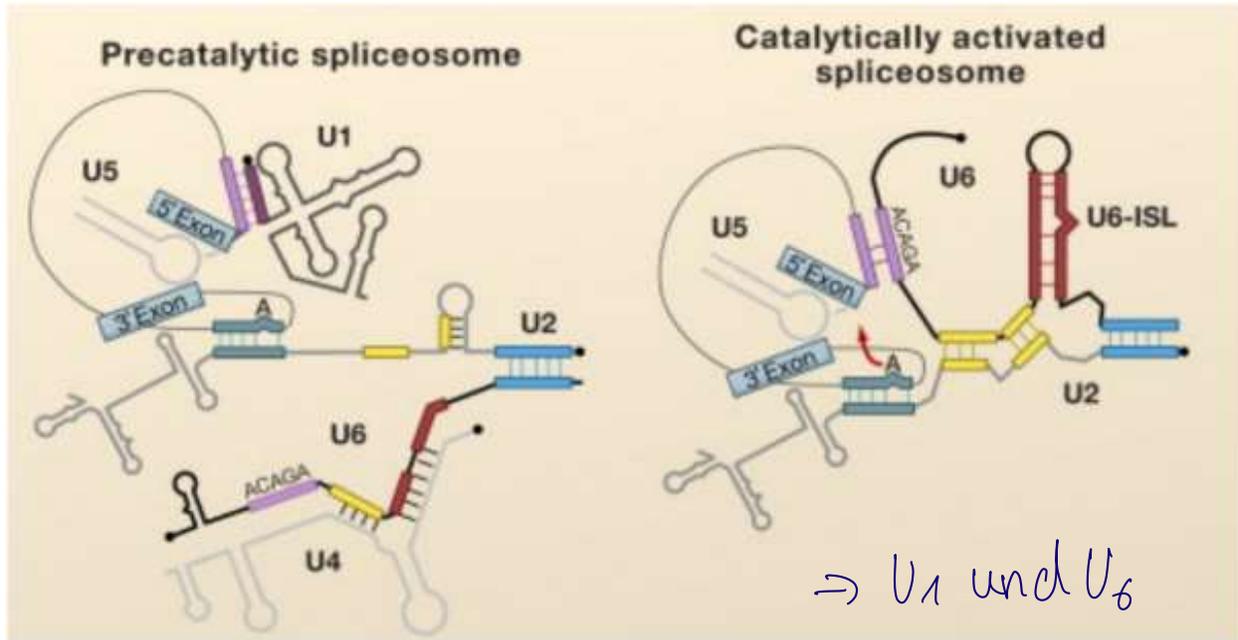
In diesem Bild links sieht man, dass U6 weniger bindet als U1 und dass U6 an derselben Stelle an der RNA bindet, wie U1 am Anfang.



Im Bild links ist der Pre-mRNA Splicing Zyklus nochmal dargestellt.

Bei den nächsten Bildern handelt es sich um die unteren Schritte des links abgebildeten Zyklus. Dabei handelt es sich um eine extreme räumliche Änderung der RNA (Bildung des Loops), welche nicht zufällig passiert, sondern durch viele Proteine realisiert wird..

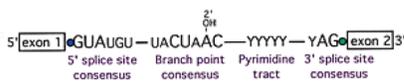
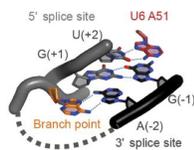
RNP: Ribonucleinprotein



Wichtige Proteine für die Stabilität: Prp8, Brr2, Snu114.

→ U₁ und U₆ müssen in Nähe gebracht werden, U₂ wird rausgezogen

Verknüpfung (Ligation)

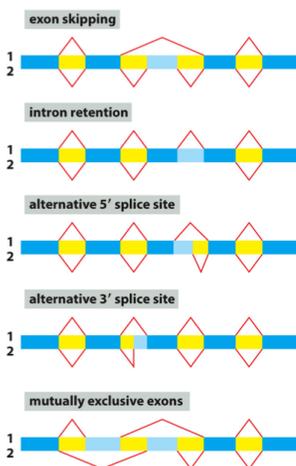


Aus dem Komplex C wird ein Komplex P (links abgebildet). Dabei kommen die drei konservierten Elemente (BP, ..., ...) in die Nähe voneinander und das GU von einem Ende kann mit dem AG vom anderen Ende binden.

Die **Katalytische Stelle der Spliceosoms** ist ähnlich wie die in selbstsplicenden Gruppe II Introns. Dabei sind Gruppe II Introns selbstkatalysierend (benötigen keine Proteine für das Splicing) und schaffen sich katalytische Stellen nur durch RNA.

Pre mRNA Regulierung

Wege, um das Splicing zu regulieren (Alternative Splicing)

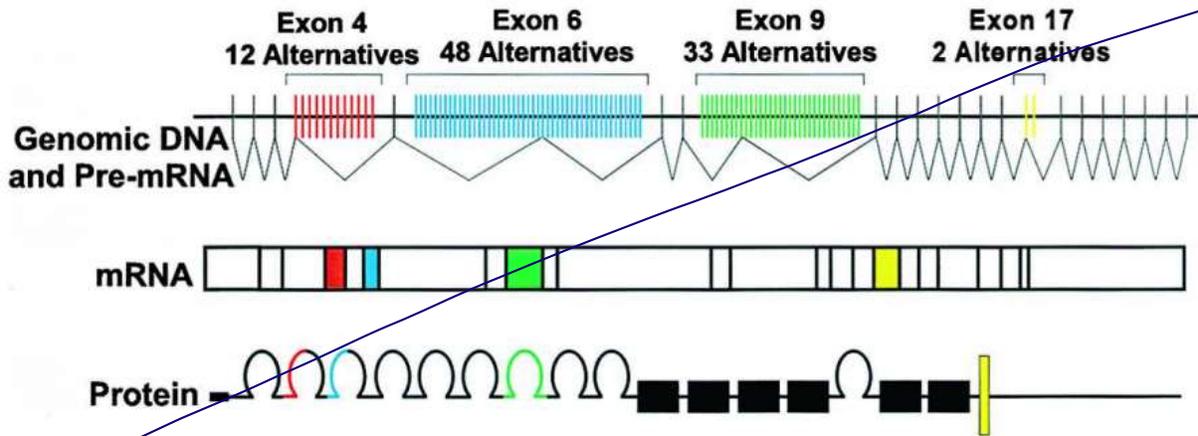


Links sind Bilder von prä-mRNA mit 4 Introns und 5 Exons. Dabei gibt es folgende Möglichkeiten zur Regulierung:

1. Exon überspringen
2. Intron beibehalten → neues Gen
3. Alternative 5' Splicing Stelle
4. Alternative 3' Splicing Stelle
5. Sich gegenseitig ausschliessende Exons (siehe nächste Seite)

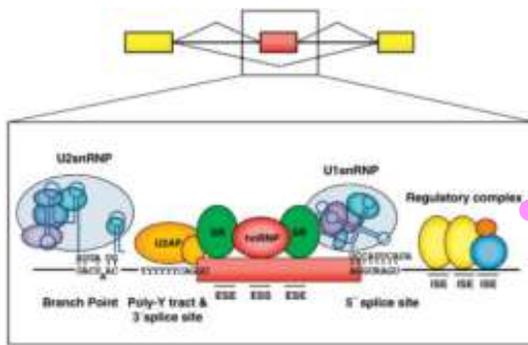
Die Exons, welche durch eine der obigen Aktionen reguliert werden können werden Alternative Exons genannt.

Beispiel für sich ausschliessende Exons: DASCAM Gen



Can produce up to **38016** different protein isoforms

Die Diversität von dem DASCAM Gen kontrolliert die Spezifität von neuralem Verkabeln.



Für das DASCAM Gen gibt es zwei verschiedene Proteinfaktoren (helfen den Spliceosomen) für das Exon (SR -> ESE inkludieren, hnRNP -> ESS skip) und zwei für das Intron (ISE), die diese Diversität erzeugen.

Viele Genkrankheiten im Menschen sind zurückzuführen auf einen Fehler im Splicing. Dabei können schon kleine Unterschiede in exprimierten Proteinen grossen Schaden andrichten.

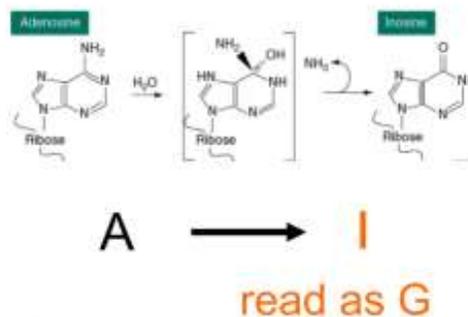
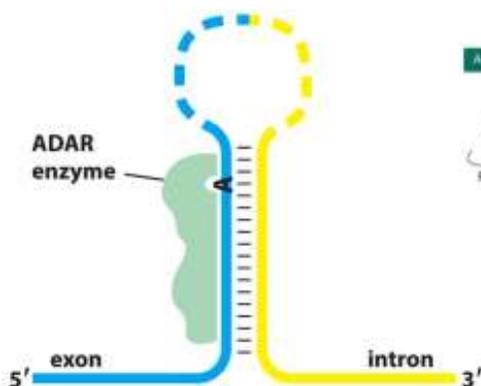
E = Exonic, I = Intronic, SE = Splicing Enhancer, SS = Splicing Silencer

Wichtig: Splicing Regulierung und Evolution hängen zusammen -> Grosse Treibende Kraft für die Evolution.

1 Gen kann je nach Splicing 38000 versch. Proteine herstellen

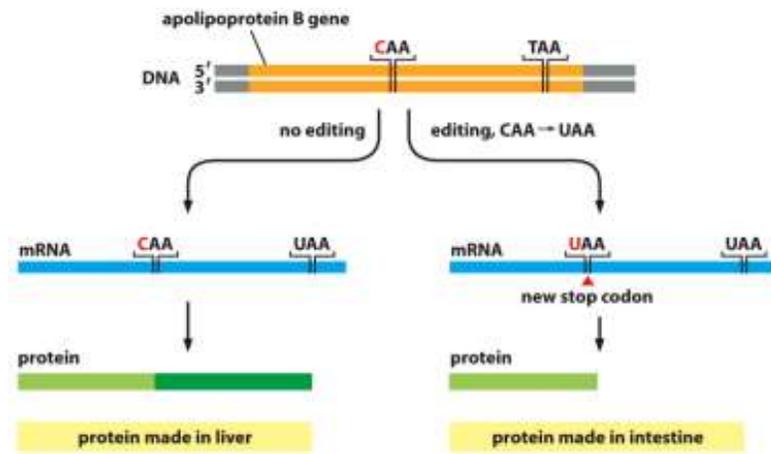
RNA Bearbeitung: **U Einfügung und A zu I veränderung**

U Einfügung Passiert in allen Eukaryoten. Dabei werden U in die prä RNA eingefügt. In Metazoa (Tieren) wird A zu I verändert, um eine zusätzliche Möglichkeit zur posttranskriptionalen Genkontrolle zu erzeugen.



Die Stellen links werden auch **RNA Editing Sites** genannt und sie sorgen vor allem mit den Alternativen Exons für eine extrem grosse Diversität (Isoforms).

Weitere Form der RNA Bearbeitung: C zu U Wechsel



Durch die Veränderung eines C zu einem U wird (in unserem Beispiel links) ein Stopcodon erzeugt. Dies führt zu einer weiteren Diversität.

UAA
UGA
UAG

Start: AUG

3' Ende Prozessierung

Poly A Teil → lang, ist reich

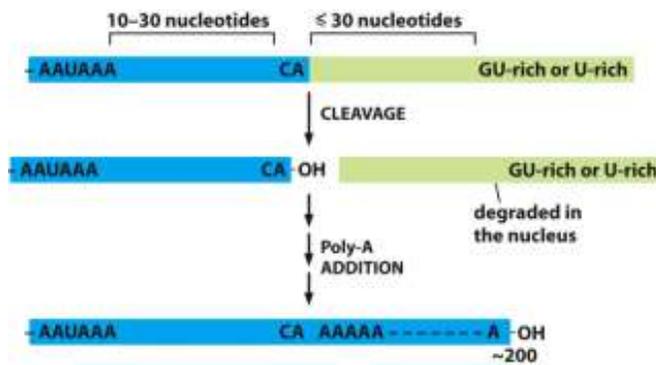
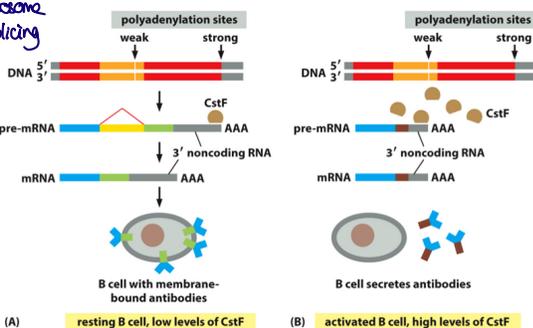
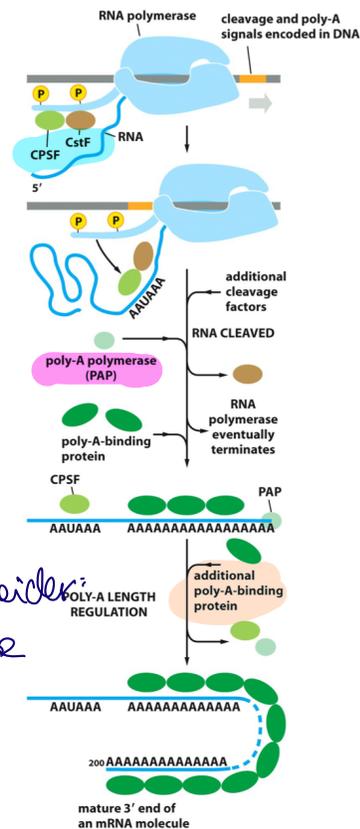


Bild links: Im letzten Schritt der mRNA Reifung (maturation) wird das 3' Ende abgespalten und der Poly A Tail wird an die mRNA angehängt.

besteht aus Adenin Nucleotiden

Bild rechts: Die Bildung des Poly A Tail: CPSF und CstF befindet sich am CTD der RNA Polymerase. CPSF erkennt die Schnittstelle der RNA und CstF macht den Schnitt.

Danach wird die Poly-A Polymerase (PAP) binden und viele A an die RNA hängen. Zum Schluss binden viele Poly-A Binding Proteine an dem Poly-A Tail binden, um zusätzliche Stabilität zu schaffen.

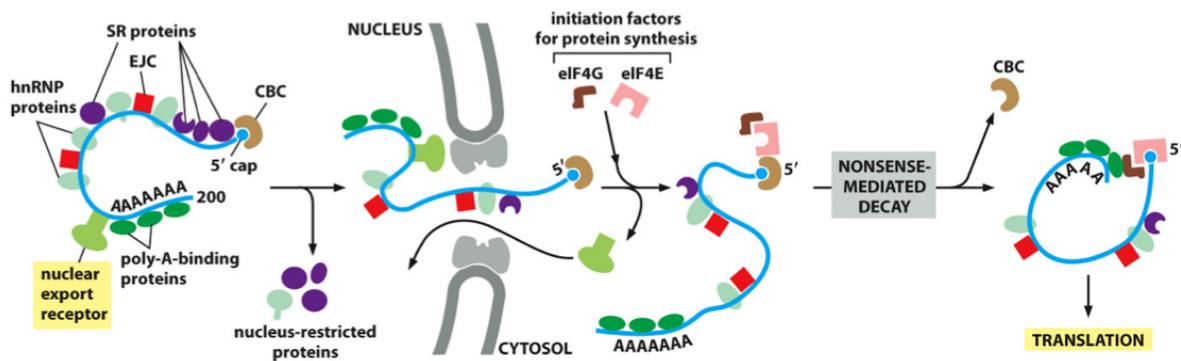


→ früher abschneiden: verliert hydrophobe Sequenz

Bild oben links: Dabei gibt es auch alternative Möglichkeiten der RNA: Ist viel CstF vorhanden, so wird bereits am schwachen cleavage Punkt der Poly-A Tail gebildet, wobei bei einer geringen Konzentration an CstF erst am starken cleavage Punkt der Poly-A Tail gebildet wird. Das Resultat: Zwei unterschiedlich lange mRNA, die unterschiedliche Proteine decodieren.

Carboxy-terminal domain
→ initiation DNA transcription
→ Capping RNA transport
→ attachment spliceosome of RNA splicing

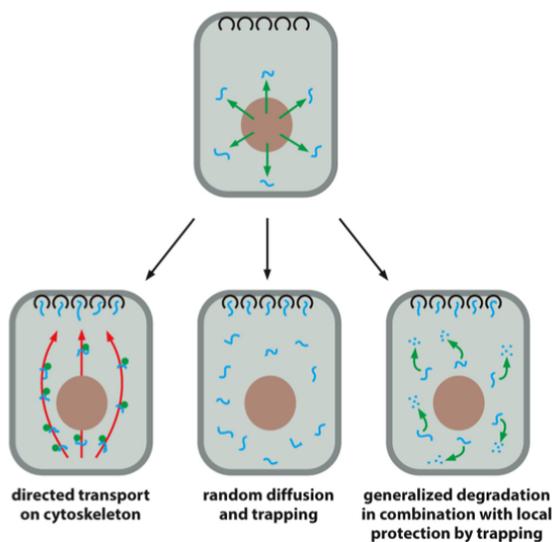
Nonsense mRNA Zerfall



Wenn die reife mRNA den Nucleus verlässt, so wird bei der ersten Translation geprüft, ob der open reading frame ein prä matures Stop Codon enthält oder nicht (nonsense mediated decay). Wird ein solches Stop Codon gefunden, so wird die RNA degradiert, ansonsten beginnt die Translation.

↳ Operon

RNA Lokalisierung im Zytoplasma

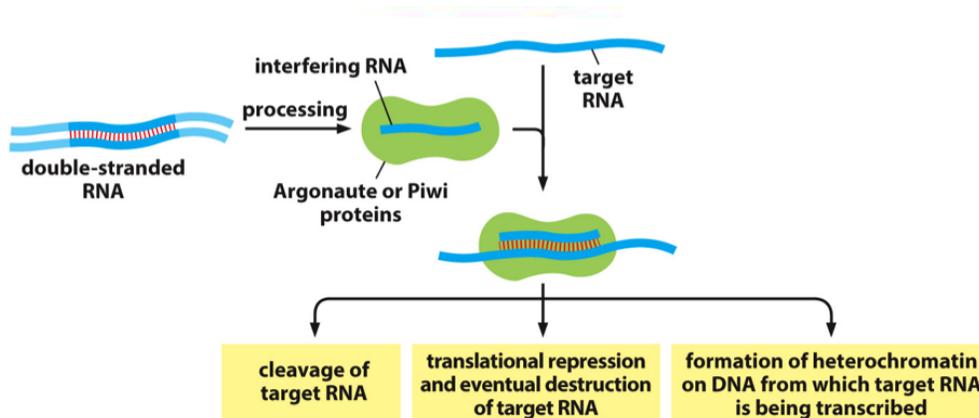


Die RNA kann im Zytoplasma an eine bestimmte Stelle gebracht werden. 3 Möglichkeiten dafür:

1. **Aktiver Transport** der RNA
2. **Zufällige Diffusion** und fangen der RNA
3. **Generelle Degradierung** in Kombination mit lokaler **Protektion** durch fangen der RNA

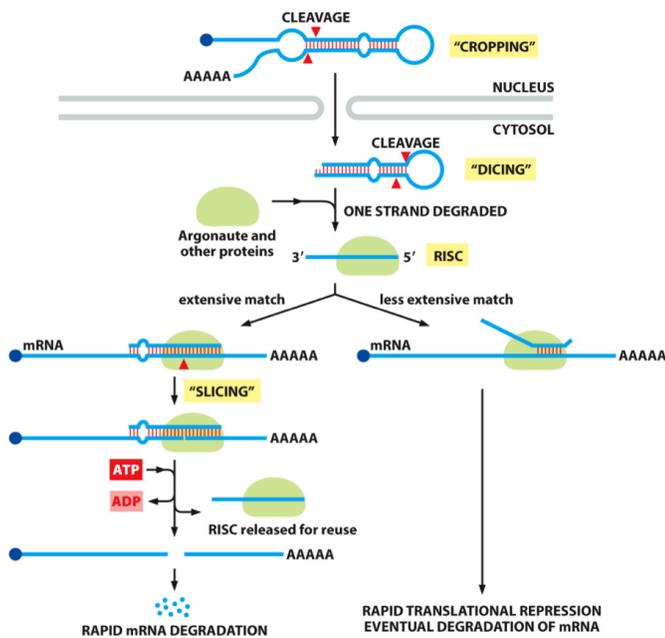
↳ Kaputtmachen von gelöster RNA am falschen Ort

miRNA (MikroRNA) Kontrolliert mRNA Lebenszeit, Transkription und Translation



Grundsätzlich ist miRNA kurze RNA Stücke, die von Protein gebunden werden und dieser Komplex kann dann bestimmte Funktionen mit hoher Spezifität (RNA muss komplementär sein) erfüllen.

miRNA im Zytoplasma



Die miRNA wird im Nukleus erstellt, bindet mit sich selbst und wird einmal geschnitten. Im Zytoplasma wird sie ein zweites Mal geschnitten, ein Strang wird degradiert und ein Protein bindet an die miRNA um den RISC Komplex zu binden.

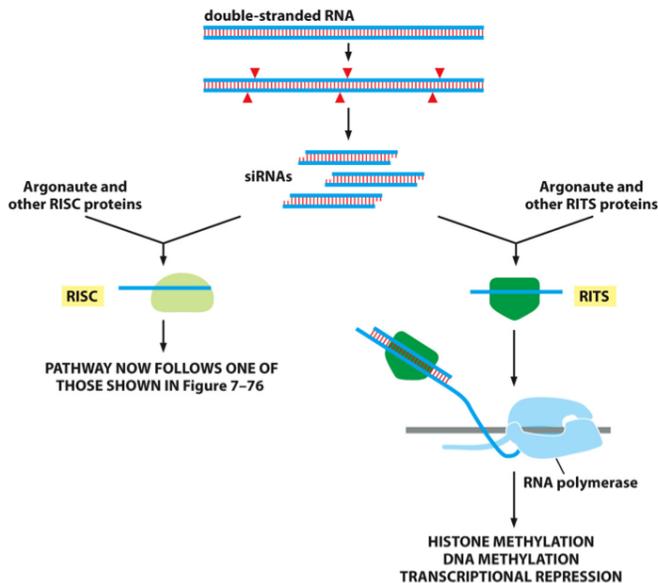
Eine mRNA, die perfekt Komplementär ist wird geschnitten und später dann degradiert.

Eine mRNA, die nicht perfekt Komplementär ist wird nicht geschnitten jedoch führt die Bindung des RISC Komplexes dazu, dass die Cap oder der Poly A Tail entfernt wird.

An der Aktiven Stelle befinden sich 2 Mg²⁺, an welchem der Schnitt durch Hydrolyse

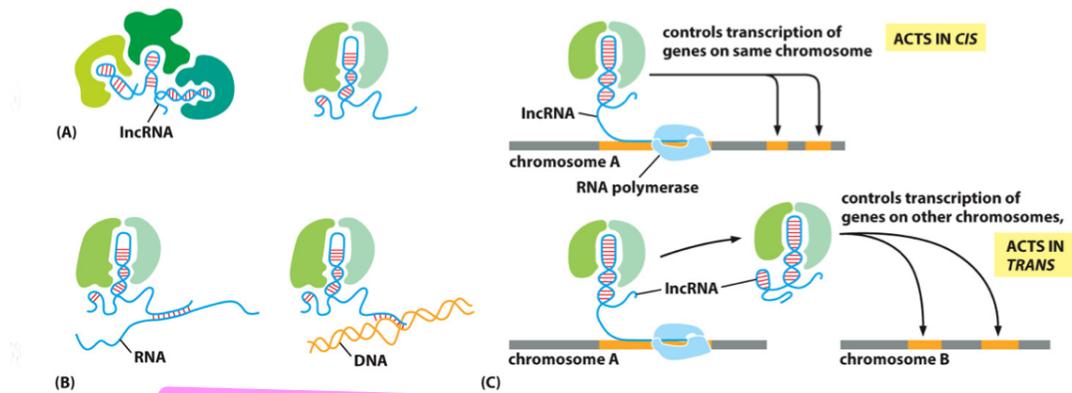
bindet → zerstört RNA

miRNA im Nukleus



Die Mikro RNA bindet im Nukleus an ein Protein und bildet damit den RITS Komplex. Dieser bindet an eine zu der miRNA Komplementäre Stelle der gerade Transkribierten RNA und rekrutiert dann Faktoren, um die Transkription zu kontrollieren (z.B. Histone Methylation Enzyme...).

lncRNA und Transkriptionskontrolle (lange nichtcodierte RNA)



A: Proteine können an die miRNA binden und lncRNA bilden

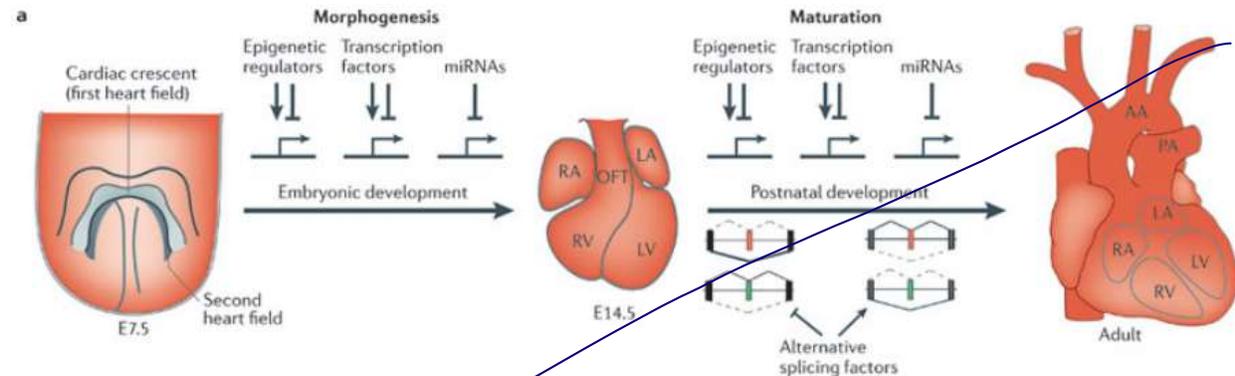
B: Diese Protein-lncRNA-Komplexe können dann mit RNA oder DNA interagieren

C: lncRNA kann an DNA binden und die Transkriptionsmaschinerie rekrutieren. Dies kann cis (auf demselben Chromosom) oder in trans (auf einem anderen Chromosom) passieren.

Transkriptionskontrolle und post Transkriptionskontrolle

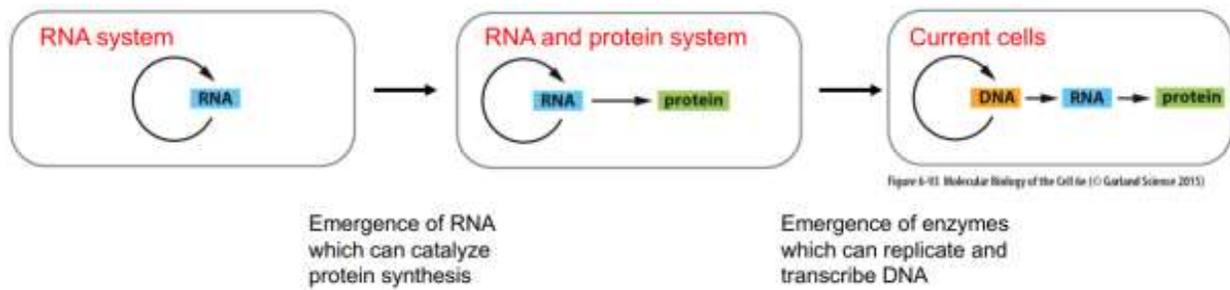
All dies oben führt zu einer grossen Komplexität der post Transkriptionalen Kontrolle, zusätzlich zu der extremen Komplexität der Transkriptionalen Kontrolle (Komplexes Netzwerk mit Schaltern).

Beispiel, dass diese beiden Kontrollen wichtig sind: Herz



In der Entstehung des Herzes sind die Epigenetischen Regulatoren, die Transkriptionsfaktoren und die miRNAs sehr wichtig für die Ausbildung des Herzes. In der weiteren Ausbildung (sobald es grob Gebaut wurde nach der Morphogenesis), sind diese zwar auch noch alle sehr wichtig, aber die Alternativen Splicing Faktoren bekommen zusätzlich eine wichtige Rolle. Sie erlauben also ein Fine Tuning.

Von RNA zu DNA: RNA Welt Hypothese



Ribosome (sind Ribozyme) sind ein gutes Indiz dafür, dass die Hypothese stimmen kann, da sie nur aus Proteinen und RNA bestehen, RNA als Katalytisches Center wirkt und sie für die Synthese tRNA benötigen (benötigen keine DNA).

Spliceosome (sind Ribozyme) benötigen ebenfalls keine DNA und die Ähnlichkeit zu Gruppe II Introns lassen darauf schließen, dass diese auch von diesen Gruppe II Introns abstammen.

Viren benötigen ebenfalls keine DNA, um sich ausbreiten zu können.

Indikatoren, dass RNA das erste genetische Material war

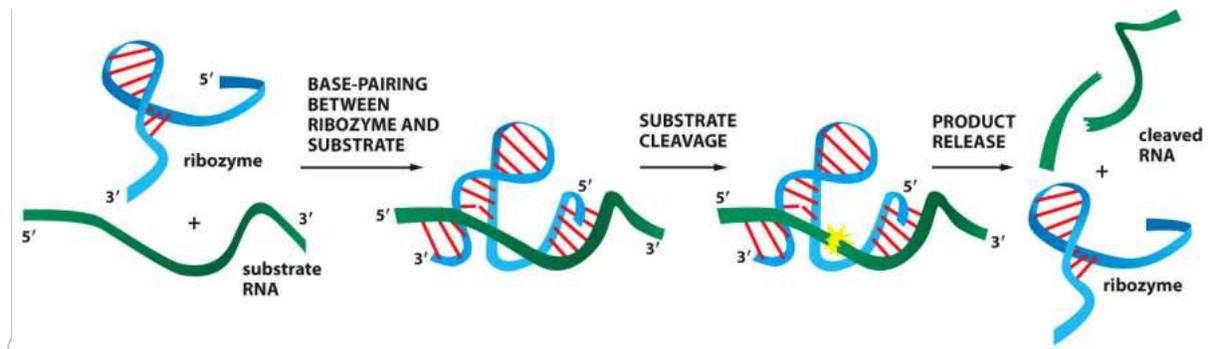
- Ribosome und Spliceosome
- Energieform der Zelle: ATP ist ein Ribonucleosid
- RNA kann sich evolvieren: Aktivität von RNA Enzymen können sich mit der Zeit erhöhen -> Mutationen haben RNA Moleküle selektiert, die gut für die Fitness waren

RNA ist fähig, viele Reaktionen zu katalysieren

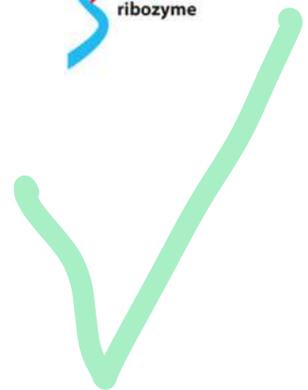
- Spaltung (cleavage) von Phosphodiester Bindungen
- Formung von Peptid Bindungen (z.B. Ribosomen)

Aber: Selbstreplikation von RNA?

Ribozyme (= katalytisch aktive RNA Moleküle)



Im obigen Bild wird gezeigt, wie ein Ribozym eine Spaltung von RNA durchführt.



E: Kompartimente und Proteinsortierung (I. Zemp und U. Kutay)

Zusammenfassung

(unbedingt Auswendig können)

Vorlesung 1 (I. Zemp): Übersicht der Kompartimente

	ER	Mitochondrien	Chloroplasten	Peroxisomen	Zell Nukleus
Hauptfunktion der Organelle	<ul style="list-style-type: none"> - Eingang zum Sekretorischen pathway, Proteinfaltung und Qualitätskontrolle - Lipid Biosynthese und Homeostase - Detoxifikation - Calcium Speicher 	<ul style="list-style-type: none"> - Zellen "Kraftwerk" - Zellatmung (-> ATP synthese) - β-Oxidation von Fettsäuren (nur in Tieren) - Lipid Synthese - <u>Apoptose</u> (= Programmierter Zelltod) 	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Photosynthese</u> (Lichtreaktionen -> ATP O₂) - <u>Dunkelreaktion</u> (-> C wird fixiert aus CO₂) - Fettsäure und Aminosäure Synthese, angeborene Immunantwort - Andere Funktionen für verschiedene Typen Plastide 	<ul style="list-style-type: none"> - Haus Oxidative Proz. - β-Oxidation von Fettsäuren zu acetyl-CoA (in Tieren, Pflanzen und Pilzen) - Biosynthese von <u>Plasmalogenen</u> (z.B. Myelin von Neuronen) - Photorespiration in Pflanzen - Glyoxylat Zyklus in Samen 	<ul style="list-style-type: none"> - DNA Aufbewahrung und Regulierung - DNA Replikation - DNA Transkription
Signal Sequenz	ER Signalsequenz, Hydrophober Kern	<u>MTS (Matrix Targeting Signal)</u> : <ul style="list-style-type: none"> - Lokalisiert am N Terminalen Ende - Gibt auch innenmembran Signalsequenzen - Amphipathische Helix 	- Signal Sequenz: Transit Peptid (N-terminal, Ser/Thr-reich) <ul style="list-style-type: none"> - <u>Thylakoid</u> (=Membranstysteme in den Chloroplasten) - Chloroplast Signal Sequenz 	- Import Signale: <u>PTS (Peroxisomal targeting signal)</u> : <u>PTS1</u> : Meist C-terminale SKL Sequenz <u>PTS2</u> : Nonapeptid-Konsensussequenz, meist N-terminal <ul style="list-style-type: none"> - mehr als 23 Faktoren sind im Import involviert, -> <u>Peroxine</u> - <u>mPTS</u> für Membranproteine 	- <u>NLS</u> : Nuclear Localization Signal (führen Proteine in den Nucleus, oft polar) - <u>NES</u> Nuclear Export Signal
Transport Modus	Meistens co- (Höhere Eukaryoten), kann aber auch post- translational sein	Post-translationale Translokation	Post-translationale Translokation	Post-translationale Translokation	Post-translationale Translokation
Faltungsstatus des Transport-substrats	ungefaltet	ungefaltet	ungefaltet	Gefaltet, sogar ganze Proteinkomplexe	Gefaltet, sogar ganze Proteinkomplexe
Erkennung der Signalsequenz	Signal recognition Particle (SRP) für co-translationalen transport	- Rezeptor Proteine z.B. im <u>TOC Komplex</u> - <u>Tom20, Tom70, Hsp70</u>	- Rezeptor Proteine z.B. im <u>TOC Komplex</u> - <u>Hsp70, Hsp90, Toc34, Toc159</u>	- <u>PEX5</u> für PTS1 - <u>PEX7</u> für PTS2 - <u>PEX19</u> für mPTS	RanGTP binding receptors: <ul style="list-style-type: none"> - Importin Rezeptor - Exportin Rezeptor - Andere Transporter Rezeptoren wie <u>NTF2, TAP</u>
Translokation / Transportkanal	<u>Sec61 Komplex</u>	Äussere M. Membran: <ul style="list-style-type: none"> - <u>Tom Komplex</u> - <u>SAM Komplex</u> Innere M. Membran: <ul style="list-style-type: none"> - <u>TIM22 Komplex</u> - <u>TIM23 Komplex</u> - <u>OXA Komplex</u> - Kontaktstellen 	Äussere Membran: <ul style="list-style-type: none"> - <u>TOC Komplex</u> Innere Membran: <ul style="list-style-type: none"> - <u>TIC Komplex</u> Thylakoidmembran: <ul style="list-style-type: none"> - Kontaktstellen 	Verschiedene Peroxisome	<u>NPCs</u> (nuclear pore complexes Nucleoporine
Energie Input in den Protein Transport	- Protein Synthese für co-translationalen Transport - <u>BiP</u> (Hsp70) für post translationalen Transport	- Funktionaler Zyklus von Cytosolischem Hsp70 benötigt ATP hydrolyse - Translokation der Signalsequenz in die Matrix benötigt Protonengradienten über innere Membran - Bindung/Release von Mitochondrialem Hsp70 zum kommenden Polypeptid benötigt ATP hydrolyse	Äussere Membran: <ul style="list-style-type: none"> - <u>TOC34, TOC159</u>: GTPase (benötigen GTP), GTP hydrolyse In Thylakoidmembran: <ul style="list-style-type: none"> - <u>Sec pathway</u> (benötigt ATP und H⁺ Gradient) - <u>Srp linked pathway</u> (benötigt ATP und H⁺ Gradient) - <u>TAT pathway</u> (benötigt ATP und H⁺ Gradient) - ATP Hydrolyse von Hsp70 	- bis jetzt unklar, aber einige Peroxine sind ATPasen	- Erleichterte Diffusion (Transport von Molekülen durch eine Biomembran über Kernporen) - Bei Transport gegen den Gradienten wird sich der RanGTP Gradient zu Nutzen gemacht, der mit Energie Aufrechterhalten wird
Abspaltung der Signalsequenz	Ja Signal Anker werden nicht abgeschnitten	Ja	Ja	Nein	nein
Andere Funktionen	- Translokation ist an Modifikation gelinkt (Disulfidbrücken, N-Glykosylierung) und Faltung - ER Qualitätskontrolle: <u>ERAD, UPR</u>	Chaperone spielen eine wichtige Rolle			

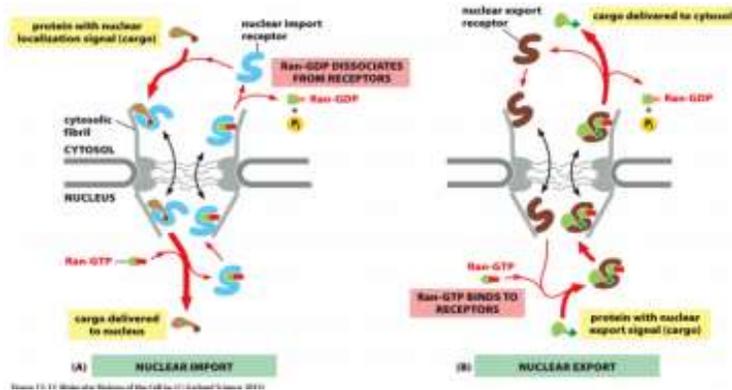
Nuklearer Transport

Nukleare Transport Rezeptoren (NTR):

Shutteln kontinuierlich zwischen Nukleus und Cytoplasma

Interagieren mit NPC (FG repeats) und können eigenen Import und Export durchführen.

RanGTP-bindung kontrolliert Transport Substrat assoziation/dissoziation



NTR gehören zu einer Protein Superfamilie

Transport ermöglicht durch Shuttling Nuclear Transport Receptors (Importins, Exportins)

Diese erkennen Spezifische Transportsignale (wie NLS, NES)

RanGTP Gradient bestimmt die Richtung des Transports

Interaktion von NRTs mit FG repeat Nucleoproteinen sorgen für NPC passage

NPC passage durch diffusion (keine NTP Hydrolyse, Energie unabhängig)

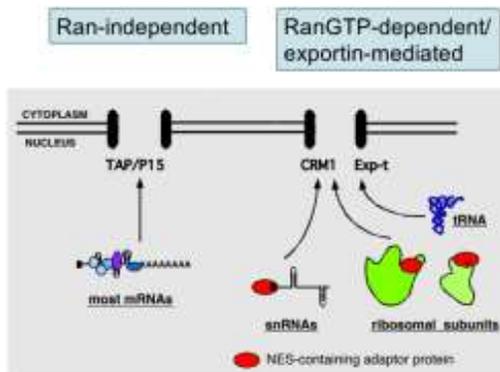
RanGTP Gradient stellt Energie für Transport gegen den Gradienten zur verfügung

Nuklearer Transport von vielen Frachten kann parallel reguliert werden

Übersicht: Komponenten des RanGTPase Systems

Factor	Interaction RanGTP/ GDP	Localization	Function
Ran	n.a.	Nuc/Cyt	Directionality of nuclear transport
Nuclear Transport Receptors	RanGTP	Nuc/ NPC/ Cyt	Translocation of macromolecules through the NPC
RanGAP	RanGTP	Cyt/ NPC	Stimulation of GTP hydrolysis on Ran
RanGEF (RCC1)	nucleotide-free form of Ran	Nuc	Nucleotide exchange
RanBP- family: RanBP1, RanBP2	RanGTP	Cyt NPC (cyt. side)	Export complex dissociation
NTF2	RanGDP	Cyt/ NPC	Nuclear import of Ran

4 Zelluläre RNA Exportwege



Export von tRNA durch Exportin-t (RanGTP abhängig)

Export von Ribosomalen Untereinheiten und snRNAs, markiert durch NES Adapterproteine durch CRM1 (RanGTP abhängig)

Export von (den meisten) mRNA mit mRNA Bindungsproteinen durch TAP/P15 (Ran unabhängig)

Lösliche ER Proteine

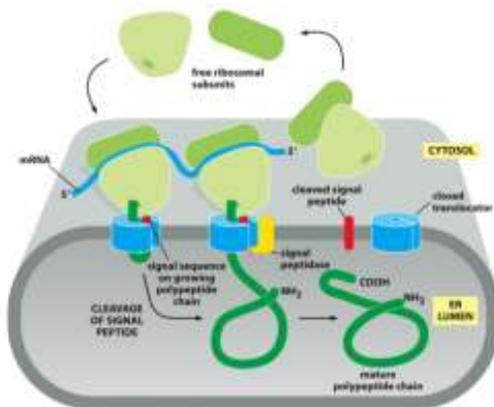
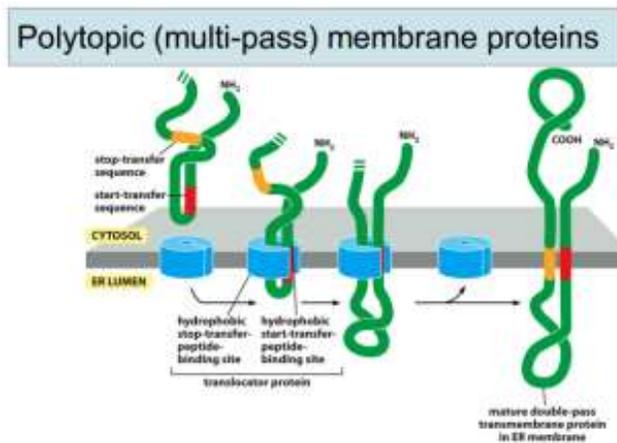
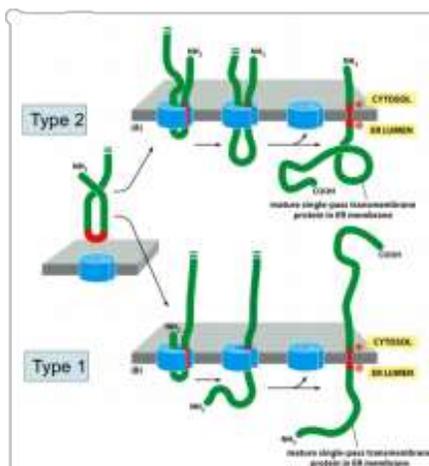


Figure 12-11 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

ER Proteine werden durch ein signal recognition particle (SRP, translation stoppt) aufgrund ihres Startsignals erkannt und zum SRP Rezeptor am ER geführt. Dann wird die Startsequenz am Translokator verankert (SRP wird vom SRP Rezeptor gelöst) und die Translation wird direkt ins ER fortgesetzt (über Translokator). Am Ende der Translation wird das Startsignal durch eine Signal Peptidase abgeschnitten und das fertige Protein ins ER Lumen entlassen. Neben der oben beschriebenen co-translationalen Translokation ist auch post-translationale Translokation möglich.

ER Membranproteine



Grundsätzlich gibt es 3 Typen von ER Membranproteinen (siehe oben). Diese werden gleich wie die löslichen ER Proteine zum ER geführt und im Translokator verankert. Durch Kombinationen von hydrophoben Start- und Stop Signalen (rot und gelb) sind mehrfach verankerte (polytope) Membranporoteine möglich.

Protein Prozessierung im ER

Disulfid Bindungs forming

N-gelinkte Glykosylierung

N-Glycan trimming und reglucosylierung

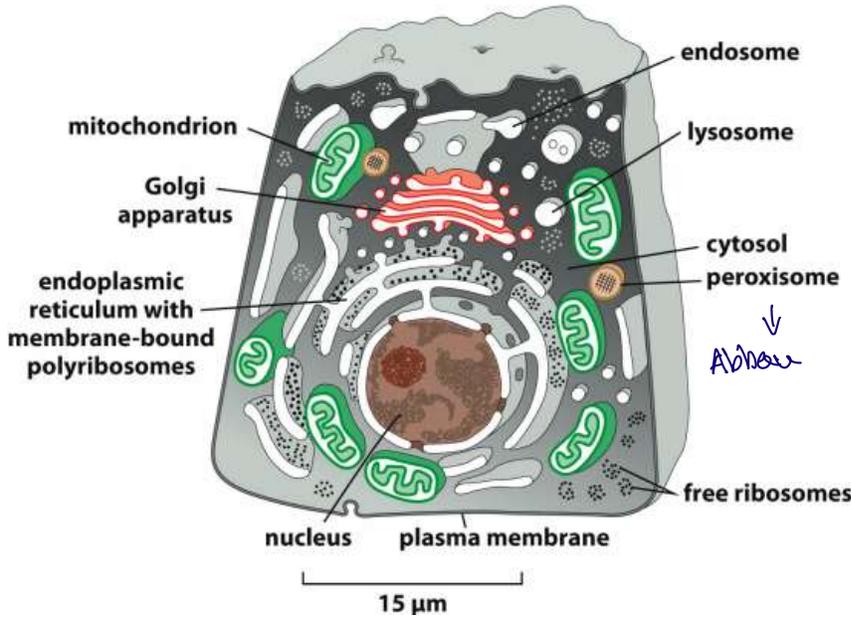
GPI Anker addition

Andere weniger verbreitete Modifikationen

Vorlesung 1

Die wichtigsten Organellen in tierischen Zellen

*Endosome
frühe → späte → Lysosome*



Links sieht man die wichtigsten Organellen einer Tierischen Zelle.

Diese Zelle ist sehr dicht bepackt mit Organellen und Proteinen.

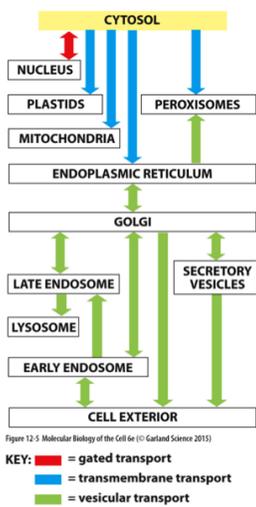
Entscheidend für diese Zelle ist, dass Proteine durch einen Proteintransport an ihren Bestimmungsort gebracht werden, sodass die Zelle funktionieren kann.

Abbau

Intracellular protein transport

1 Zelle über 1000 Proteine

freie Ribosome Proteine erst synthetisiert dann transportieren → in Zellkern oder über Translokation zu Chloroplasten

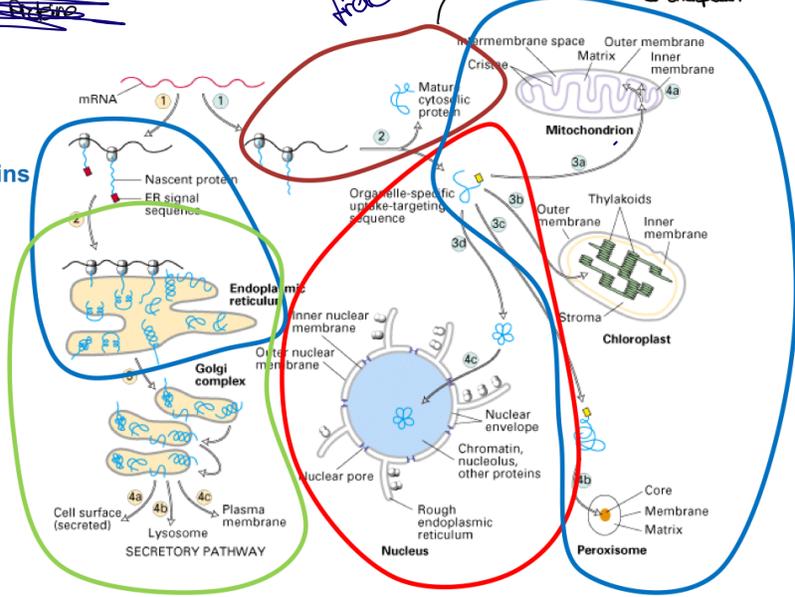


Gated transport

Translocation of proteins into organelles

→ frei

Vesicular transport



Oben sieht man eine Übersicht über die wichtigsten Transportvorgänge innerhalb einer Zelle. Dabei können gewisse Prozesse auch in beide Richtungen erfolgen (siehe Pfeile links). Dieser Transport kann Co-Translational erfolgen oder Post-Translational.

Benötigte Elemente für ein Protein Translokationssystem

- Ein Signal adressiert das Protein zu seinem Ziel Kompartiment
- Chaperoning und targeting factors auf der cis Seite der Membran, um das Protein in Transportform zu halten
- Eine Translokationsmaschinerie mit Rezeptoren und Kanälen
- Energieinput während der Translokation (oft Translokations Motor der durch die Hydrolyse von Nucleosid Triphosphaten angetrieben wird)
- Eine Proteinfaltung Maschinerie auf der trans Seite der Membran

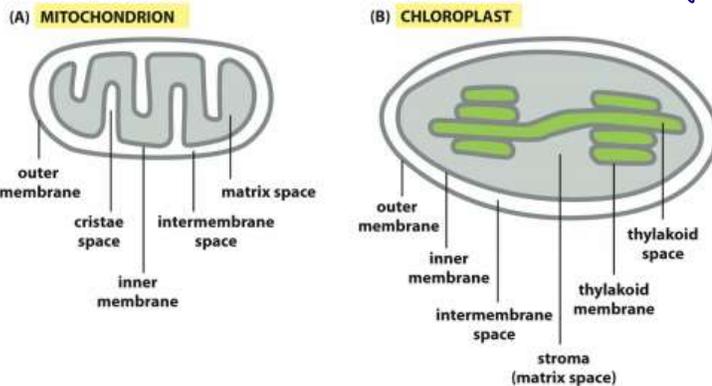
Arten von Signalen

Target Organelle	Location of Signal Sequence	Signal Removal	Nature of Signal
ER	N-terminal	yes	Hydrophobic core
Mitochondria	N-terminal	yes	Amphipathic helix
Chloroplasts	N-terminal	yes	rich in Ser and Thr
Peroxisome	C-terminal, N-terminal	no	-SKL; N-term. nonapeptide
Nucleus	Mostly internal	no	Diverse, e.g. classical basic NLS

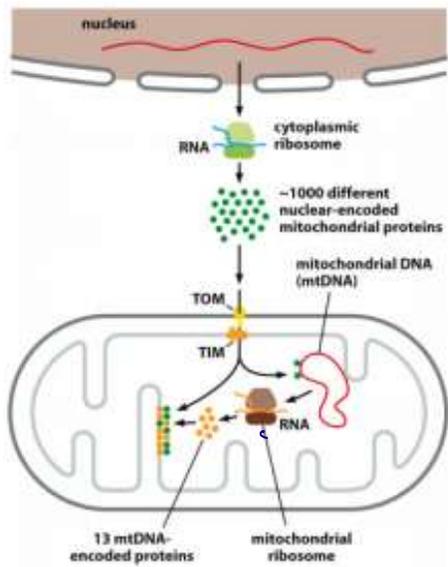
serin Threonin
gefährliche Sachen
zellkern
→ löst sich auf
bei Teilung
→ alles muss zurück

Mitochondrien und Chloroplasten Allgemein

- „Semiautonome“ Organellen (Wachstum und Teilung, enthalten eigene DNA und Translationssystem)
- von einer Doppelmembran umgeben
- Hauptfunktion: ATP-Synthese + Zuckersynthese für Chloroplast



Mitochondrien und Translokation (= Proteintransport)



Mitochondrien können ihre eigenen Proteine herstellen. Die allermeisten Proteine, die für die Mitochondrien bestimmt sind, werden jedoch im Nukleus transkribiert und im Cytoplasma translatiert.

Hauptfunktionen:

- Atmung (-> ATP-Synthese)
- β -Oxidation von Fettsäuren, Lipidsynthese,
- Apoptose (= Zelltod)

- Die Anzahl der Mitochondrien variiert zwischen den Zelltypen *Netzmaagen*
- Mitochondrien bilden ein hochdynamisches Retikulum (Fusion / Spaltung)
- Mitochondrien sind unterteilt (Kompartimierung), alle diese Kompartimente besitzen unterschiedliche Proteinzusammensetzungen und somit unterschiedliche Funktionen

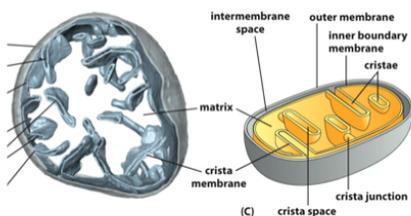


Figure 14-8 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Compartment	Proteins
Outer membrane	large, channel-forming proteins (porins; pore is permeable to molecules up to 5000 Da) enzymes for mitochondrial lipid synthesis
Inner membrane	proteins that carry out the oxidation reactions of the electron-transport chain ATP synthase transport proteins (passage of metabolites)
Matrix	enzymes for oxidation of pyruvate and fatty acids enzymes for for citric acid cycle
Intermembrane space	enzymes that use ATP to phosphorylate other nucleotides

Porine: Kanalformende Proteine, die dafür sorgen, dass Proteine ins Mitochondrium gelangen

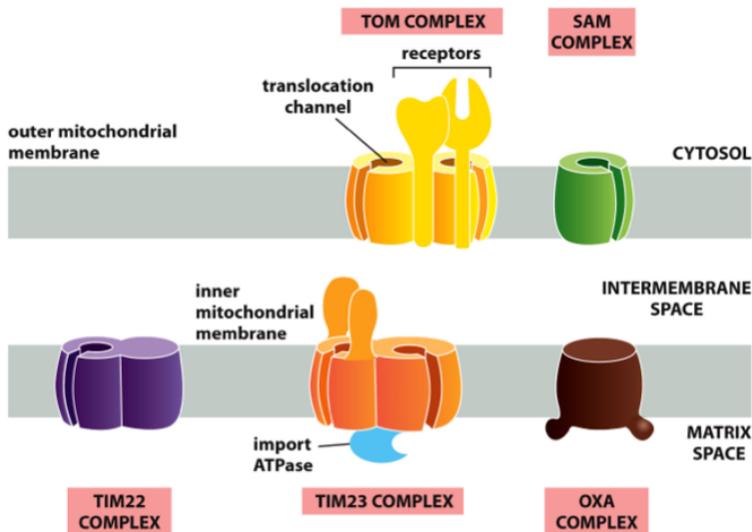


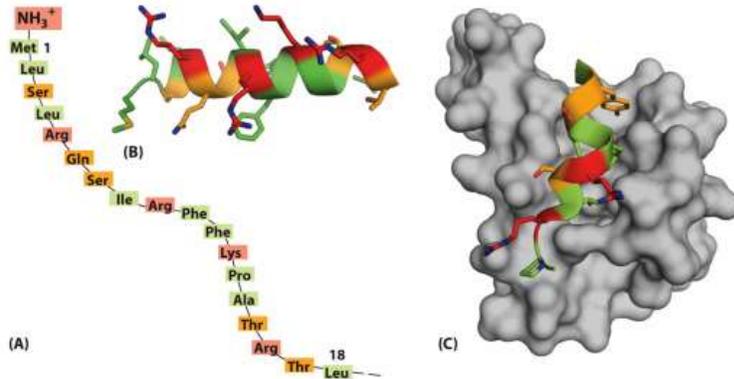
Figure 12-21 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Links sieht man einige Komplexe, die für den Transport von Proteinen in Mitochondrien benötigt werden.

-> enthalten Transportproteine und Rezeptoren

Signalproteine (Matrix Targeting Signal)

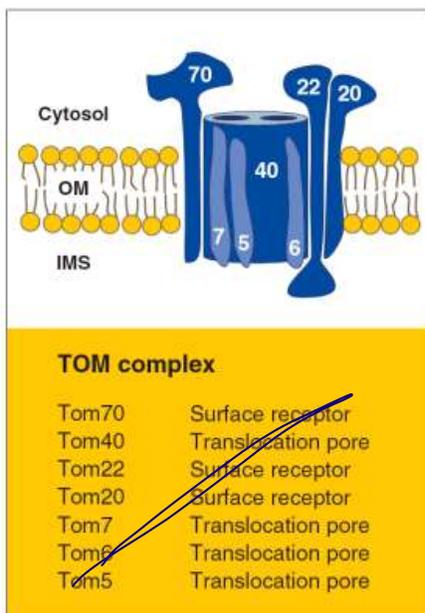
Bindungsrille bestehend aus hauptsächlich hydrophoben Aminosäureresten, hydrophilen Reste befinden sich auf der Gegenseite. Das Signal gibt dann nicht die AS Abfolge selbst sondern die spezielle 3D Struktur mit hydrophoben AS auf der einen Seite und Hydrophilen auf der anderen.



Das MTS-Peptid ist in einer helikalen Struktur gebunden, drei hydrophobe Reste (Leu) können dann am Rezeptor binden (C).

andere / zusätzliche Signalsequenzen für den Import von Proteinen durch die innere Membran usw.

Rezeptor (Signalerkennungskomplex): TOM Komplex

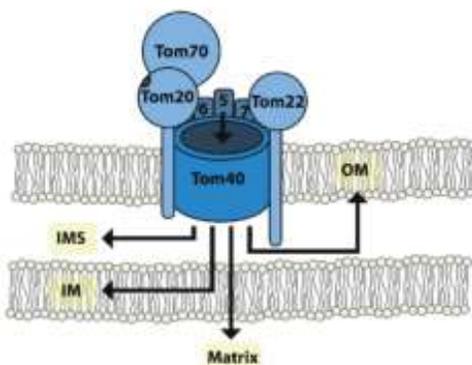


Dieser TOM Komplex kann aus verschiedenen Untereinheiten bestehen. Nur diese Untereinheiten lernen:

- Tom70 erkennt hauptsächlich interne Signalsequenzen des Imports von Substraten (nicht MTS)
- Tom20 bevorzugt das N-terminale Matrix-Targeting-Signal (z.B. MTS)

Sowohl Tom70 als auch Tom20 übertragen ihre Substrate auf Tom22, welches Präproteine an die proteinleitende Pore liefert

Modell: Bindungsstellen mit zunehmender Affinität (sodass der Prozess in eine Richtung gelenkt werden kann).

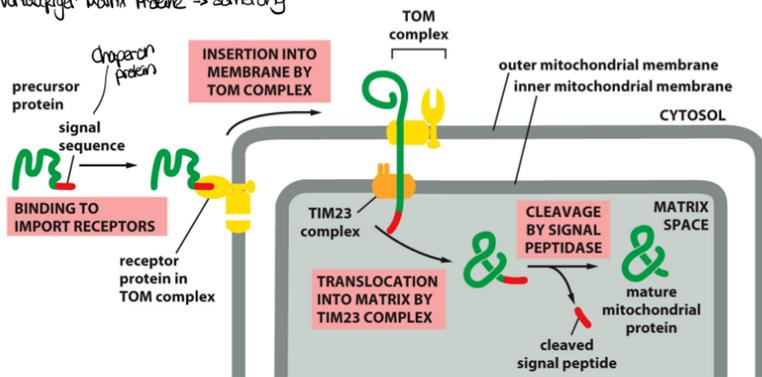


Nach dem TOM Komplex werden die Proteine an ihren Bestimmungsort gebracht. Dieser kann sein:

- IMS: Intermembranraum (Intermembrane space)
- OM: Äussere Membran
- IM: Innere Membran
- Matrix: Innerhalb der zweiten Membran

Protein in die Matrix überführen

1) Erkennen vorläufiger Matrix Adresse → Sättigung

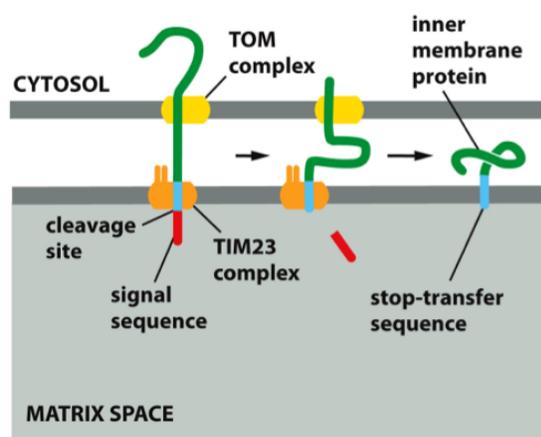


Um ein Protein in die Matrix überführen zu können, wird das durch Chaperone ungefaltete gehaltene Protein durch die N-Terminale MTS Sequenz vom TOM-Komplex erkannt und eingeschleust.

Nun bewegt sich der TOM-Komplex mit dem Protein über die Membran zu einem TIM23-Komplex, sodass das Protein

durch beide Komplexe gleichzeitig geschleust werden kann. In der Matrix wird das MTS durch eine Signalpeptidase abgebaut und das Protein kann sich falten.

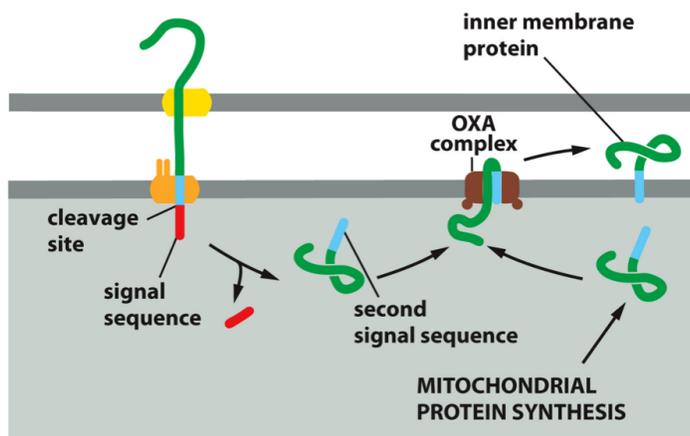
Translokation zur Inneren Membran 1: direkt



Zwischen den Membranen

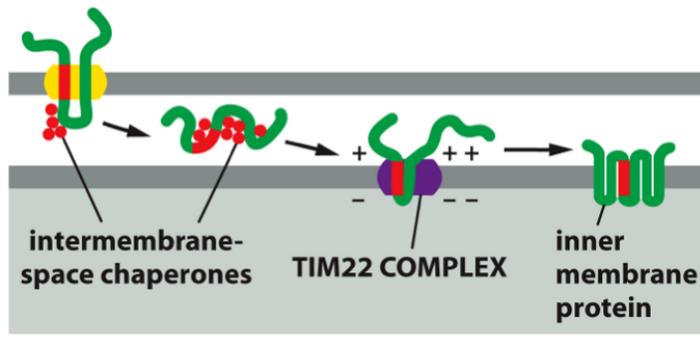
Proteine, die für die innere Membran bestimmt sind, besitzen neben dem MTS noch eine **Stop-Transfer Sequenz**. Der Transport des Proteins erfolgt gleich wie der Transport eines Proteins in die Matrix (MTS wird am Ende abgebaut). Sobald der **TIM23-Komplex** jedoch die **Stop-Transfer Sequenz** erkennt, wird die Translokation durch die innere Membran gestoppt. Mit der Zeit wird das Protein aus dem TIM23-Komplex **entlassen** und kann sich falten, um als Membranprotein seine Aufgabe zu erfüllen (in diesem Fall: N-Terminal verankertes Membranprotein).

Translokation zur Inneren Membran 2: via Matrix und OXA Komplex



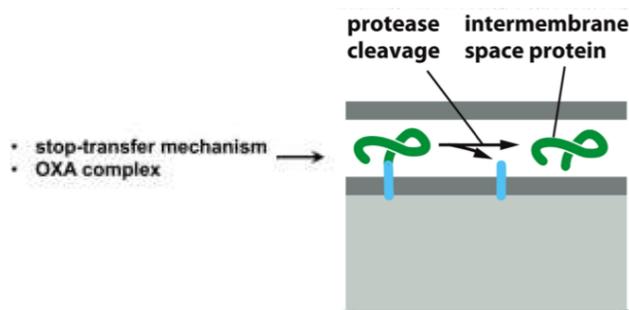
Ein Protein besitzt zwei Signalsequenzen, wobei das MTS (rot) nach dem Transfer durch TOM und TIM23-Komplex abgespalten und abgebaut wird. Die **zweite Sequenz** kann dann vom **OXA-Komplex** erkannt werden und das Membranprotein in die Membran eingebaut werden. Der **OXA-Komplex** kann so auch vom Mitochondrium selbst hergestellte Membranproteine in die Membran einbauen.

Translokation zur Inneren Membran 3: via TIM22 Komplex



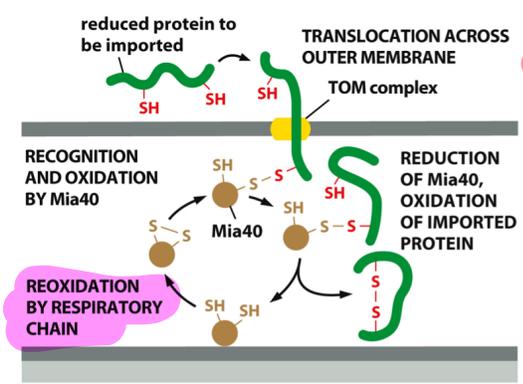
Proteine mit einer internen Signalsequenz werden vom TOM Komplex (Tom70) erkannt und in den Intermembranraum überführt und von Chaperonen abgefangen, welche das Protein zum TIM22 Komplex bringen. Dort wird das Protein dann als mehrfach membranspannendes Protein (z.B. Carrier Proteine).

Translokation in den Intermembranraum 1: Stopp-Transfer oder sekundäre Sequenz



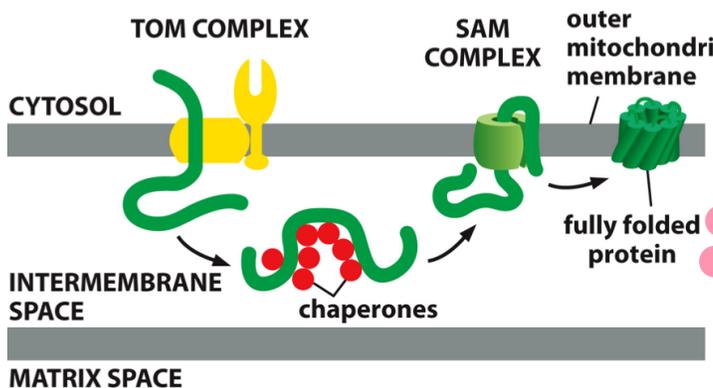
Bei Intermembranraum Proteinen wird entweder durch einen Stopp-Transfer Mechanismus oder durch den OXA Komplex ein Protein in die ^{den Intermembranraum} innere Membran transportiert. Dieses ist dann am Stopp-Transfer Signal oder am zweiten Transportsignal (OXA) an die Innere Membran gebunden. Durch Spaltung wird das Protein von dieser Sequenz getrennt.

Translokation in den Intermembranraum 2: IMS Proteine via MIA40 Weg



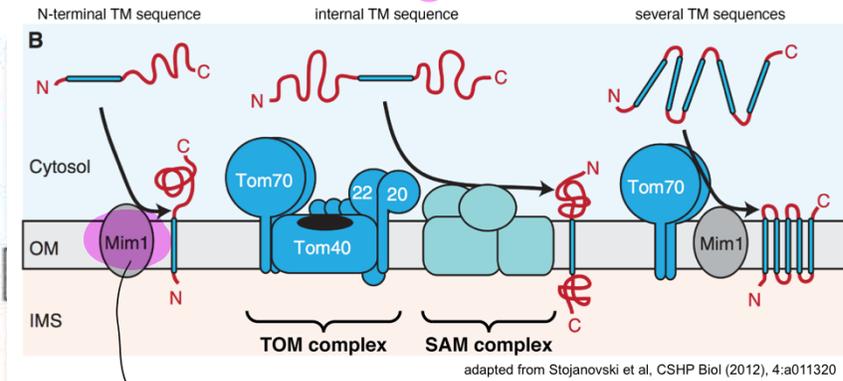
Wird für Proteine benötigt, die in ihrer nativen Struktur Disulfidbrücken (durch Oxidation von Cys) bilden. Nach dem Transport in den Intermembranraum durch den TOM Komplex werden diese Proteine vom Mia40 Komplex abgefangen. Dieser katalysiert die Oxidation von Cys für die Disulfidbrückenbildung und wird dabei reduziert. Dass der Komplex wieder funktionieren kann muss er dann wieder (durch die Elektronentransportkette) oxidiert werden.

Proteine der äusseren Membran: β -Barrel Proteine



Proteine für die äussere Membran führen auch durch den TOM Komplex, werden dann von Chaperonen abgefangen und zum SAM Komplex an der äusseren Membran geführt. Dieser baut das Protein dann ein. Insbesondere β -Barrel Proteine wie die Porine werden so transportiert und eingebaut.

Proteine der äusseren Membran: α -Helikale Proteine



Bei α -Helix Proteinen ist die Art des Signals wichtig:

Bei N-Terminalen Sequenzen ist das Mim1 OM Protein wichtig.

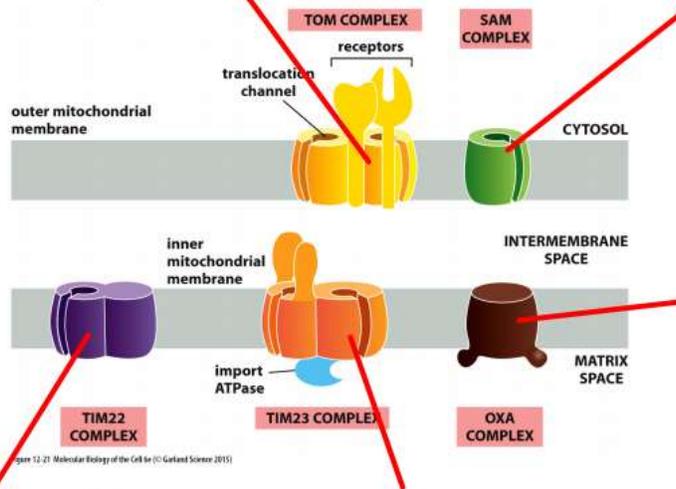
Interne Sequenzen werden durch TOM und SAM Komplex in die OM eingebaut.

Bei mehreren Sequenzen ist Tom70 und Mim1 wichtig.

→ Äquivalent zu SAM Komplex für β -barrel Proteine

Zusammenfassung Translokatoren

nearly all nuclear-encoded mitochondrial proteins



outer membrane proteins:
- β -barrel proteins
- α -helical proteins with internal signal sequences

inner membrane proteins (from matrix: imported proteins or mitochondria-encoded proteins)

multispan proteins of the inner membrane

- matrix proteins
- inner membrane proteins (stop-transfer mechanism)

Translokation: die 3 benötigten Energien

*TOM: Energie (ATP)
TIM: Protonengradient*

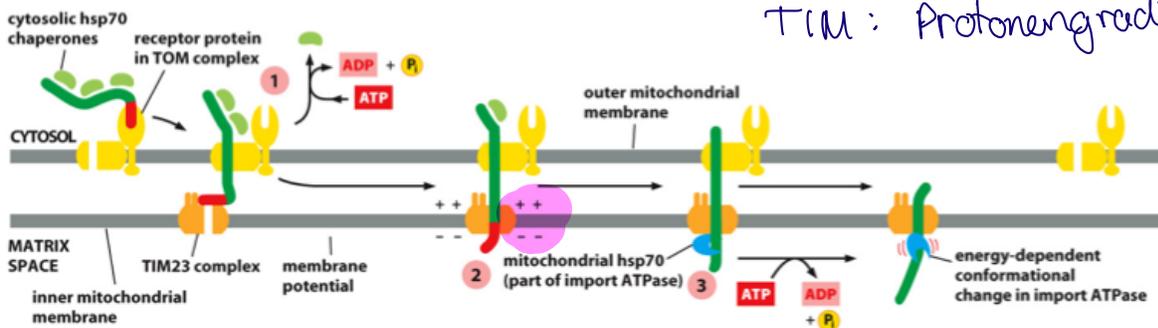
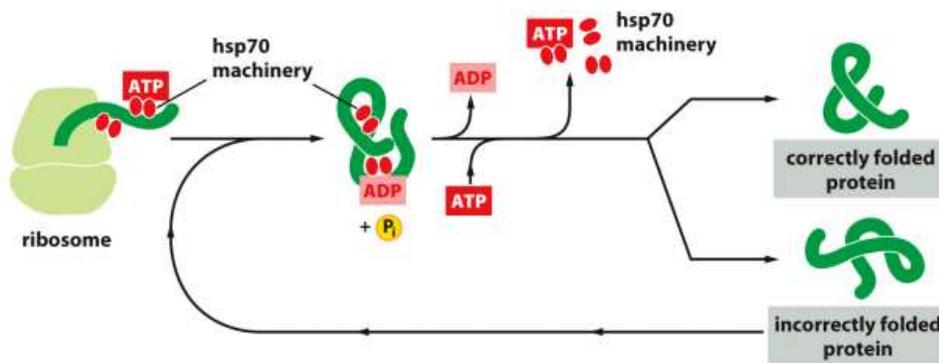


Figure 12-23 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Außen positiv, innen negativ!

- Der Funktionszyklus von cytosolischem hsp70 (Chaperonen im Zytosol) *-> benötigt ATP Hydrolyse*
- Die Translokation der Signalsequenz in die Matrix erfordert einen Protonengradienten in der inneren Membran. Da die Sequenz netto positiv geladen ist wird sie so durch den Komplex transportiert
- Die Bindung / Freisetzung von mitochondrialem hsp70 (Chaperonen in der Matrix) an das ankommende Polypeptid erfordert ATP Hydrolyse. Dabei gibt es zwei Theorien für die Wirkungsweise: Brownian ratchet (mtHsp70 bindet am Protein und verhindert zurückgleiten) und power stroke (Durch ATP Hydrolyse in mtHsp70 wird eine Konformationsänderung erzeugt, die das Protein in die Matrix zieht). Auch Kombination höchstwahrscheinlich möglich.

Hsp70 Chaperone im Cytosol



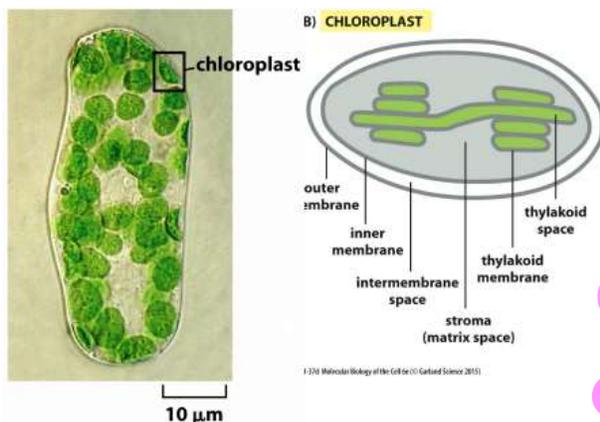
hsp70 erkennt kleine Abschnitte hydrophober Aminosäuren auf einer Proteinoberfläche.

- ATP-gebundenes hsp70 bindet an sein Zielprotein
- Die ATP Hydrolyse führt zu einer Konformationsänderung von hsp70, was zu einer starken Klammerung des hsp70 an sein Zielprotein führt
- Durch eine schnelle Bindung von ATP nachdem das ADP sich abgelöst hat führt zu einer Dissoziation von hsp70

Dieser Zyklus wiederholt sich immer wieder und gibt dem Protein so mehr Zeit, sich richtig zu falten (oder verzögert die Faltung in unserem Fall während dem Transport durch das Cytosol).

Chloroplasten

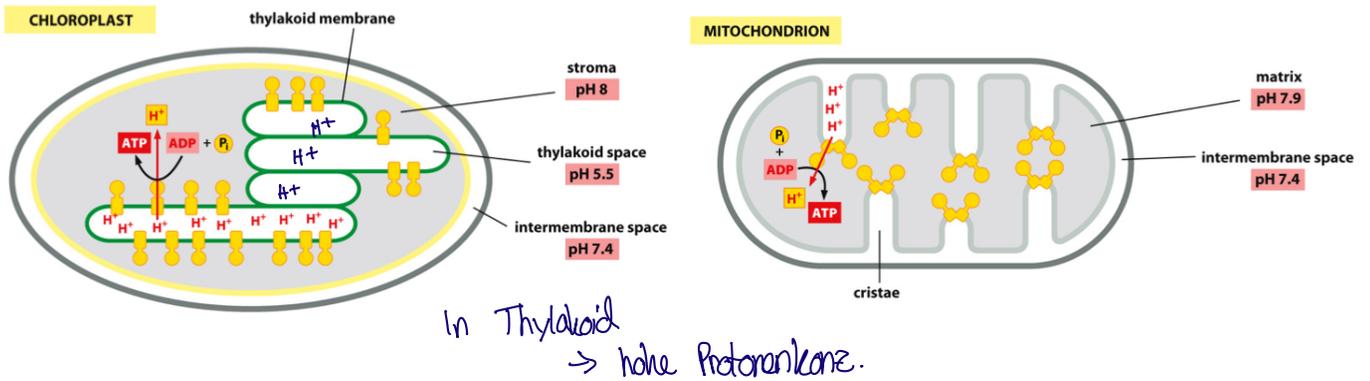
Struktur und Funktionen



Wichtigste Funktionen:

- Photosynthese (Licht- und Dunkelreaktion, ATP, Sauerstoff, Fixierung von CO₂) *-> Zucker*
- Fettsäure und Aminosäure Synthese, Initiation von Immunabwehr

Der Protonengradient wird über 3. Membran (= Thylakoide Membran) erzeugt. Dabei können wegen dem kleinen Raum sehr grosse pH Differenzen entstehen.



Translokation in Chloroplasten

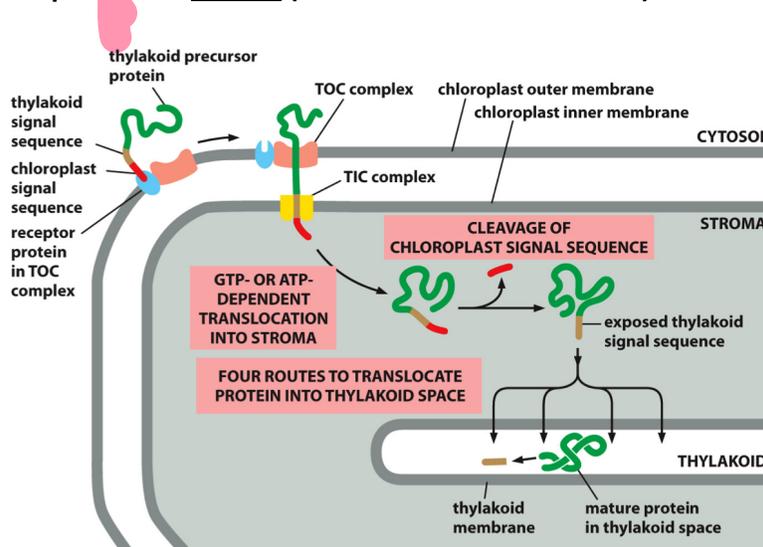
Ähnlichkeiten zum mitochondrialen Proteinimport:

- spaltbare Signalsequenz (in diesem Fall: Transitpeptid, reich an Ser / Thr Resten)
- posttranslationale Translokation ungefalteter Polypeptide *N-terminaal*
- Translokationsmaschinen in beiden Membranen
- Kontaktstellen
- energieabhängig (Hsp70, ATP)

Unterschiede:

- verschiedene Translokationskomplexe
- beinhaltet GTPasen, erfordert GTP-Hydrolyse
- kein elektrochemischer Gradient über die innere Membran

Transport in das Stroma (=innerhalb der 2. Membran)



Wie auch bei den Mitochondrien wird die Signalsequenz eines Proteins vom TOC Komplex (Besteht aus proteinen Toc34, Toc 159, welches GTPasen sind, also GTP für die Signalerkennung benötigen und aus Toc 75, welcher als Translokationskanal wirkt) erkannt, gehalten und über den TIC transportiert. Dort durchquert das Protein beide Komplexe und die Chloroplast Signal Sequenz wird abgespalten.

Auch Stopp-Transfer Sequenzen und Komplexe wie OXA Komplexe an Mitochondrien möglich.

Die Signalsequenz besteht aus N-Terminalen Transitpeptiden, die viel Ser und Thr enthalten.

Chaperone sind sehr wichtig für die Translokation. Diese sind ausserhalb der OM zu finden, im Intermembranraum sowie im Stroma.

Chaperone = Proteine, die neu synthetisierte Proteine bei Faltung unterstützen

Transport in das Thylakoid

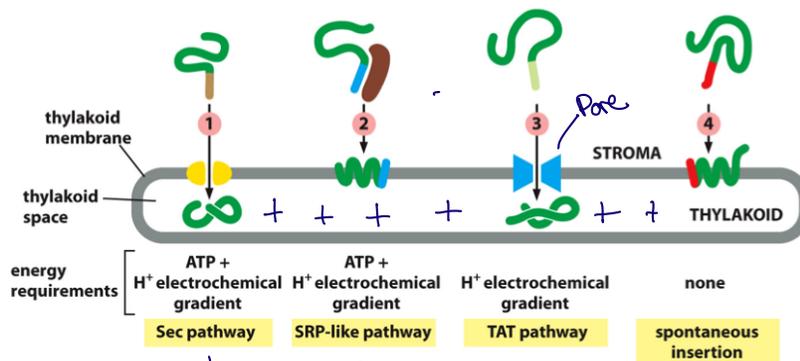
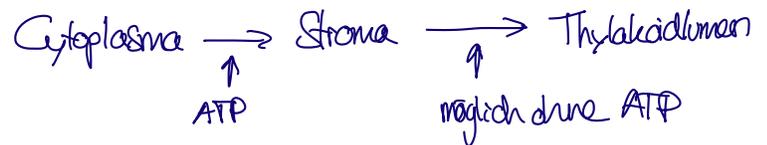


Figure 12-26b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Links sind die wichtigsten Aufnahmewege in das Thylakoid gezeigt.

Diese sind zum Teil nach anderen biologischen Systemen benannt, da sie Ähnlichkeiten zu ihnen besitzen.

Thylakoidlumen $\hat{=}$ Innenraum



Peroxisome

ins Lumen
in Membran

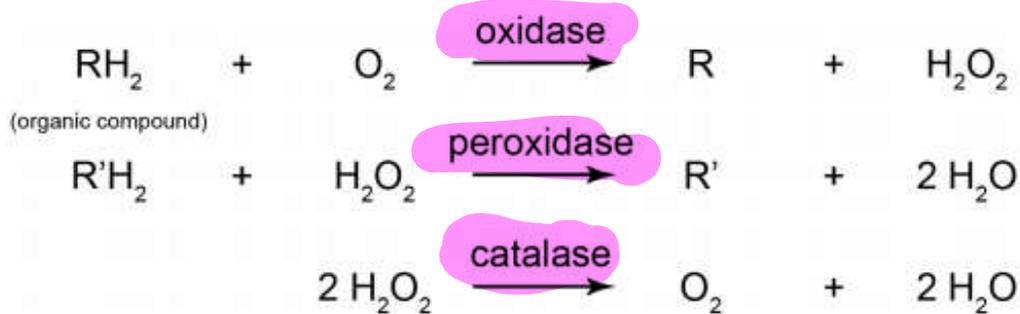
Struktur

- Einzelmembran
- bis zu 250 pro Zelle, 0,2-1,5 μm Durchmesser
- kommen von ER-Vesikeln, Wachstum durch Fusion oder Import von zytoplasmatischen Lipiden
- können gespalten werden
- enthalten keine DNA oder ein Translationssystem
- Alle peroxisomalen Proteine müssen importiert werden
- vielfältige Familie von Organellen
- enthalten oxidative Enzyme, die H_2O_2 verbrauchen und produzieren. Es ist für die Zelle sehr wichtig, dies in einem separaten Organell zu machen, da H_2O_2 für DNA sehr schädlich ist.

Funktionen

- Haus Oxidationsprozesse

Oxidoreduktasen



- β -Oxidation von Fettsäuren zu Acetyl-CoA (in Tieren auch zusätzlich in Mitochondrien)
- Biosynthese von Plasmalogenen (z.B. in Myelinscheiden von Nervenzellen)
- Photoatmung in Pflanzen \hookrightarrow Lipide
- Glyoxylat Zyklus in Samen

Protein Import in Peroxisome

- Post Translationaler Protein Import
- Proteine werden gefaltet transportiert und importiert auch als Oligomere (auch Proteinkomplexe können importiert werden)
- Import Signale: Peroxisomal targeting signals (PTS) aber (bei Oligomeren müssen nicht alle Protein ein targeting signal besitzen)
- Mehr als 23 Faktoren sind involviert (sogenannte Peroxine)

↳ Komponenten Peroxisomenmembran
 → Peroxisomenbiogenese

3 Peroxisomal targeting signals (PTS)

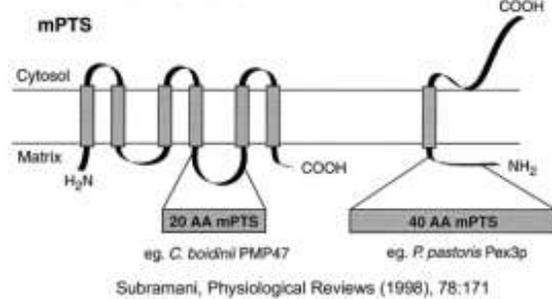
MATRIX PROTEINS

Peroxisomal targeting sequence	Receptor-cargo complex
PTS1 C-terminal: (S/A/C)-(K/R/L)-(L/M)	
PTS2 N-terminal: R-(L/V/I/Q)-X-X-(L/V/R/H)-(L/S/G/A)-X-(H/Q)-(L/A)	

Adapted from Francisco et al, Bioessays (2017) 39:1700047

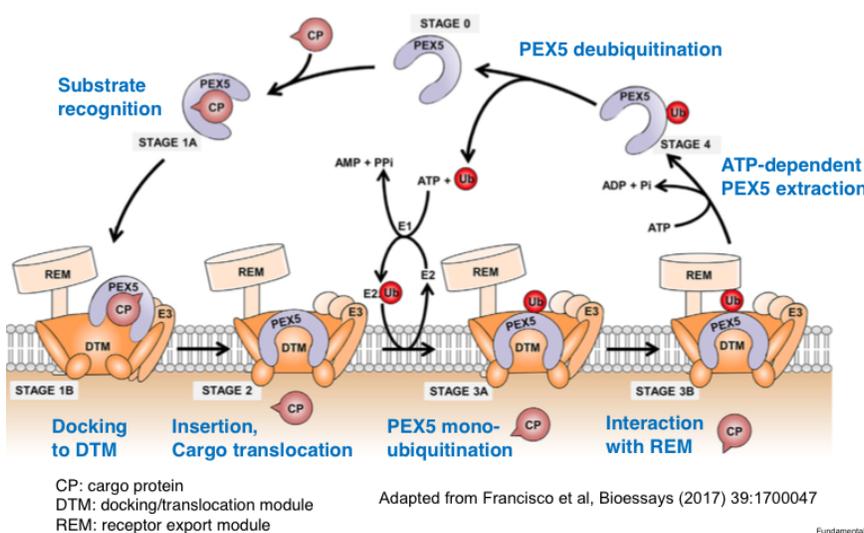
- PTS1: most often C-terminal SKL sequence
- PTS2: nonapeptide consensus sequence, mostly N-terminal

MEMBRANE PROTEINS



Subramani, Physiological Reviews (1998), 78:171

Import von peroxisomalen Matrix Proteinen



CP: cargo protein
 DTM: docking/translocation module
 REM: receptor export module

Adapted from Francisco et al, Bioessays (2017) 39:1700047

Fundamentals in Bioc

Ein Cargoprotein (CP) wird vom PEX5 erkannt und dieser Komplex dockt an das docking/translocation Module (DTM). Das CP wird dann auf der anderen Seite der Membran entlassen, wobei PEX5 auch ein Teil des Kanals bildet. Dann wird Das PEX5 für die Extraktion markiert (ein Ub wird angehängt). Dadurch kann dann das REM (Receptor extraction (!

module) das PEX5 wieder entfernen, dazu wird ATP hydrolysiert. Zum Schluss wird das Ub wieder entfernt und der Zyklus beginnt von vorn.

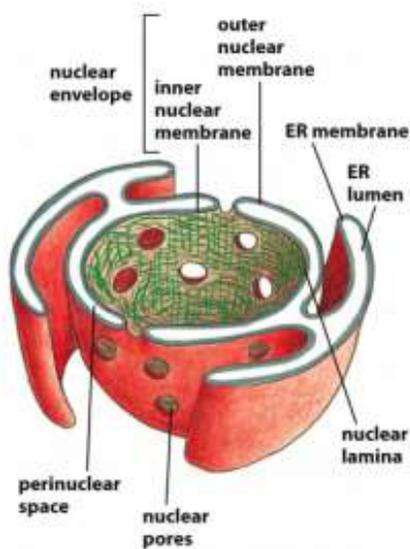
Peroxisom Membran Protein import

- Klasse-I-mPTS-Proteine: löslicher Rezeptor, der das Protein dann in die Membran einsetzt
- Klasse-II-mPTS-Proteine: Membraneinbau im ER, wird dann über Vesikel zu Peroxisomen transportiert

→ Vesikel verschmelzen

Gene von Peroxisomen als Grund für vererbare Krankheiten: Zellweger Syndrom, da in den Nervenzellen Myelinscheiden die Plasmalogen ~~nicht abgebaut~~ werden und die verringerte β -Oxidation von Fettsäuren die Nervenzellen zusätzlich angreift.

Zellkern (Nukleus)

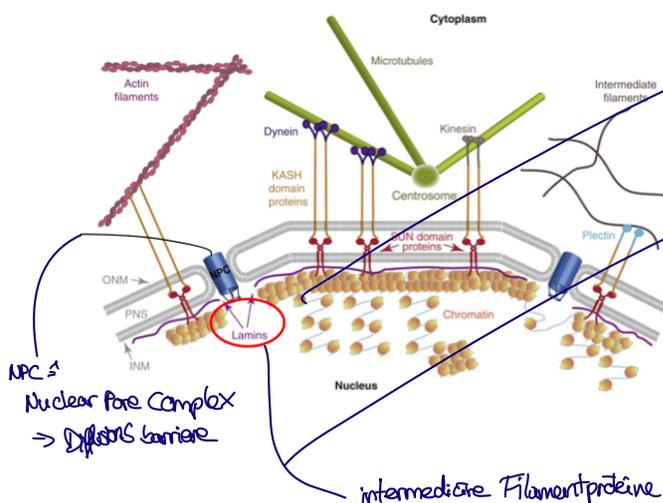


Der Zellkern besteht aus einer **Doppelmembran**, die mit dem ER verbunden ist. Diese enthält «Poren» welche aber eigentlich **Porenkomplexe** sind, die den **Stoffaustausch regulieren** können.

Das **Grüne Netzwerk** ist Das **nukleare Lamina**, welches den Kern innerlich stützt.

→ intermedia filamente

Membranen im Detail



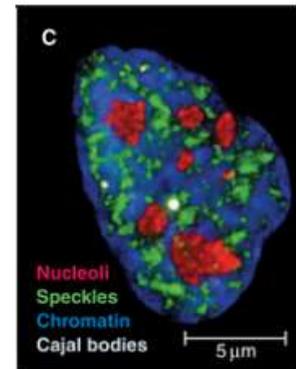
Die Membran vom ER ist eine Fortsetzung der Nuklearen Membran. Sie sind aber nicht gleich. Die innere nukleare Membran (INM) enthält spezifische **integrale Membranproteine**, die bei der Chromatinorganisation, dem Signaling, der Genexpression, der DNA-Reparatur, der Rekombination der Nuklearen Migration und der Verankerung helfen.

NPC = Nuclear Pore Complex
→ Diffusionsbarriere

intermediäre Filamentproteine

Kernkörper

- Kernkörper sind **Suborganellen des Kerns**
- **nicht Membran gebundene, hochdynamische Strukturen**
- strukturelle Integrität vermittelt durch Protein-Protein und Protein-RNA-Wechselwirkungen
- als unabhängige Domänen visualisiert durch Elektronenmikroskopie und / oder Immunfluoreszenzanalyse
- z.B. Cajal-Körper (RNA-Modifikation, RNP-Baugruppe)
- z.B. Kernflecken (Lagerorte für Spleiß Faktoren)

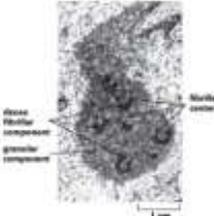


Nukleolus

haben keine Membran



adapted from Lechertier et al. JCS (2007), 120:265



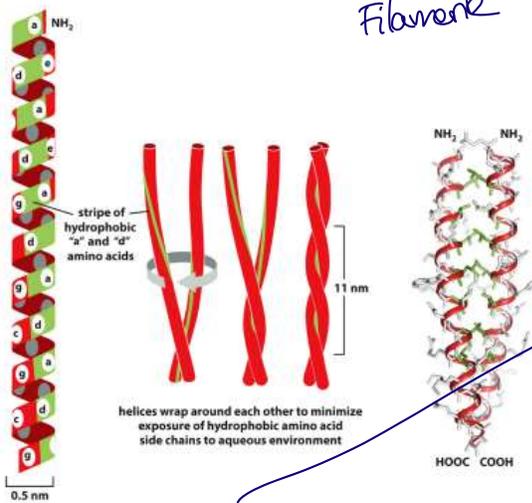
Die Nukleoli (normalerweise 1-4 pro Nukleus) Erkennt man gut an dem **Dunkelstellen** auf dem Bild links. Sie werden gebildet an verschiedenen **Chromosomen**, die rDNA Wiederholungen enthalten. In den Nukeoli findet auch die **rRNA** transkription statt.

Unter dem Elektronenmikroskop sieht man 3 verschiedene Komponenten:

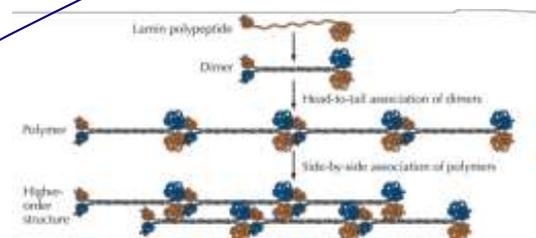
- Fibrillar centers (FC): Depot von aktiver rDNA
- Dense fibrillar components (DFC): Umgeben die FC. Die Transkription findet zwischen FC und DFC statt und in den DFC finden erste RNA Reifeprozesse statt.
- Granular component (GC): FC und DFC sind eingebettet in das GC, wo spätere Schritte der ribosomalen Subunit Herstellung stattfinden

Nukleare Lamina

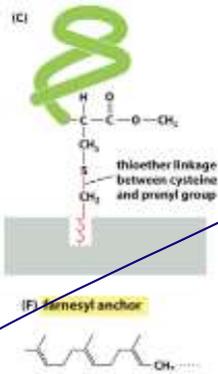
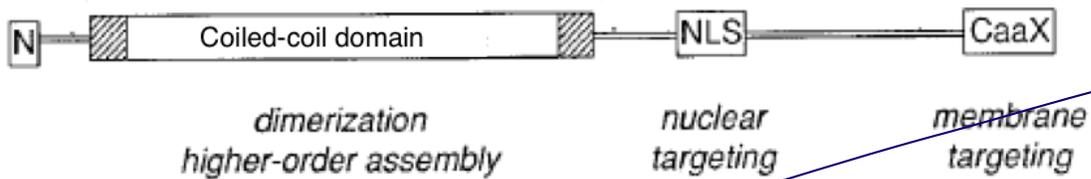
→ Intermediäre Fibrille



Wie beim MTS Signal handelt es sich bei den Proteinen für die Nukleare Lamina (Lamine) um **je zwei Proteinen mit α -helikalen Domänen** mit den **hydrophoben Resten in der Mitte**. Diese sind ziemlich lang und formen ein 2D Netzwerk und sind sowohl mit der INM und dem Chromatin verbunden. Sie lagern sich Kopf-Fuss an (siehe unten).



Lipid Modifikation von Laminen

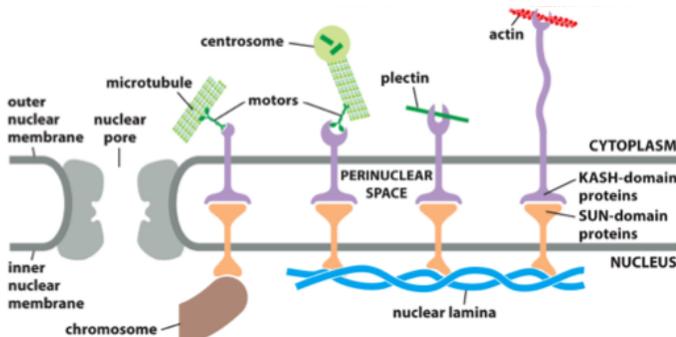


An der C-Terminalen CaaX Box findet eine Prenylierung statt: Dabei wird eine Prenyl Gruppe (z.B. Farnesyl) zum Cystein transferiert und gebunden sowie der C-terminus wird Methyliert. Dadurch wird die CaaX Box stark hydrophob und das Protein (das Lamin) kann in der Membran verankert werden.

Funktion Lamina

Sie führt zu **mechanischer Stabilität des Zellkerns**, ist wichtig für Prozesse wie Chromatin Organisation und Regulierung der Genexpression. Funktioniert sie nicht richtig, kann dies zu Krankheiten wie der Emery-Dreifuss Molekularen Dystrophy.

LINC Komplexe



Besteht aus Komplex aus zwei Proteinen: SUN (innerhalb) und KASH (außerhalb).

Physische Verbindung zwischen Chromosomen / Nuklearer Lamina und dem Zytoskell, die wichtig ist für z.B. Kernverankerung /-migration oder Meiose.

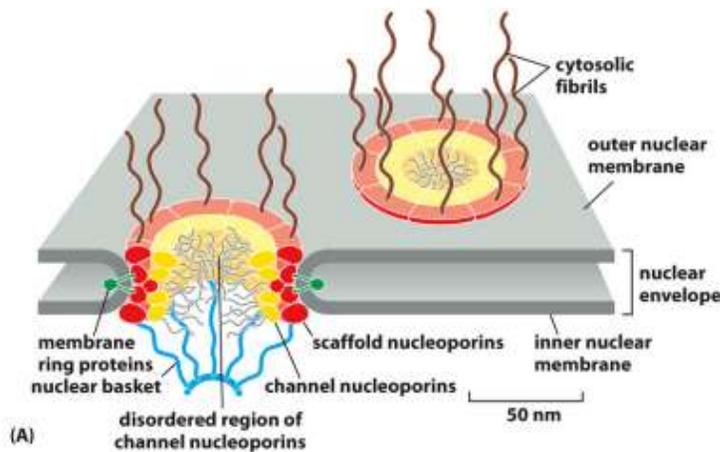
Vorlesung 2

NPCs

Organisation von Nuklear Poren Komplexen (NPCs)

Die NPCs bestehen aus riesigen Proteinkomplexen (100MDa), die aus 30 verschiedenen Proteinen (Nups = Nucleoporine) bestehen, die 8 Gruppen bilden.

Dabei gibt es 3 Typen von Nukleoporinen:



- Transmembrane Nukleoporine:

Sind in Membran eingelagert und bilden anheftungspunkt

↓ bindet

- Scaffold Nukleoporine: Strukturelle Nukleoporine, die die Ringförmigen Strukturen der Poren bilden

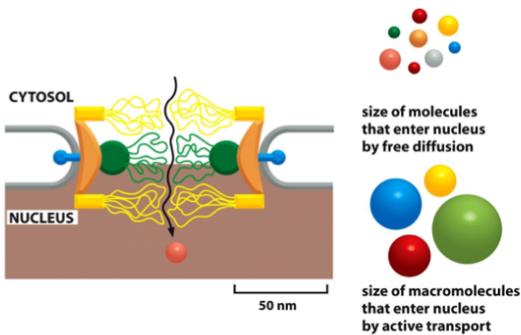
- FG Repeat Nukleoporine: Erstrecken sich innerhalb der Scaffold Pore und besitzen einen hohen Anteil an Phenylalanin und Glycin (F und G). Diese bilden Filamente (keine Helices oder Faltblätter)

Die FG Filamente haben zwei wichtige Aufgaben:

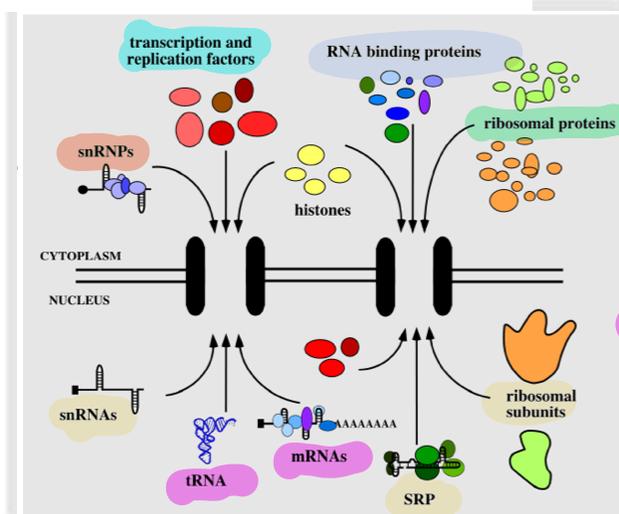
- **Bundungsstelle für Kerntransport Rezeptoren** (diese schaffen Fracht aus dem Zellkern)
- **Bestimmen permeable Charakteristik von der NPCs** (welche Substanzen können wie diffundieren)

Diffusionslimit von NPCs

1Da = Masse von 1H-Atom



- **Kleine Metaboliten < 30kDa (Ionen):** Passieren die NPC ohne Probleme
- **Makromoleküle grösser ≥ 30 kDa:** können nur noch mit Behinderung passiv durch die NPC diffundieren
- **Moleküle die grösser als 40 – 60 kDa (9 nm)** sind diffundieren nicht mehr durch die NPC



Import

- **DNA Replikations Proteine**
- **Transkriptions- u. Reifungsproteine**
- **Ribosomale Proteine**
- **Pre mRNA Splicing snRNPs**

Export

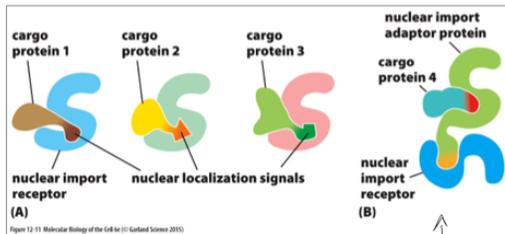
- **tRNA und microRNA (RNA)**
- **snRNA, mRNA, Ribosomale Subunits (RNP)**
- **Regulierungsproteine**

Nuklear Lokalisierungs Signal (NLS)

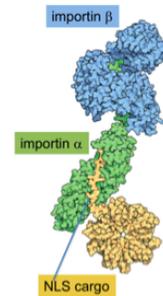
NLS befinden sich irgendwo im Protein muss aber **zwingend zugänglich sein** (Oberfläche von gefalteten Proteinen). Ausserdem wird es nicht gespalten wie z.B. bei Mitochondrien Signalen. Das «klassische» (zuerst entdeckte) NLS besteht aus Lys und Arg (somit hydrophil). Es gibt aber verschiedene Arten von Signalen. NES (Nuklear Export Signal) ist bis jetzt nur eines erforscht.

→ Protein mit nuklearem Importsignal wird nicht im Zellkern translatiert

Rezeptoren (nuclear transport receptors)



Hilfsbildung



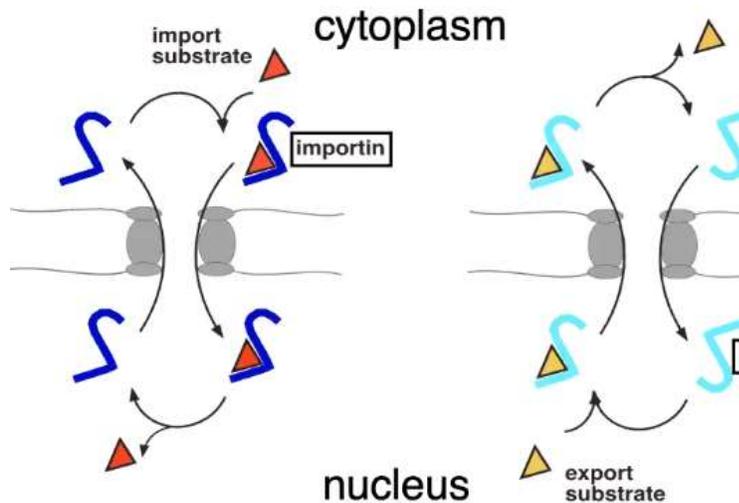
proteins with a classical NLS use importin α as an import adaptor and importin β as the import receptor

Gewisse Nukleare Import Rezeptoren erkennen ein Nukleares Signal **direkt**. Einige Rezeptoren benötigen aber ein **Adapter Protein** (das klassische NLS z.B. benötigt ein Adapter Protein zur Erkennung).

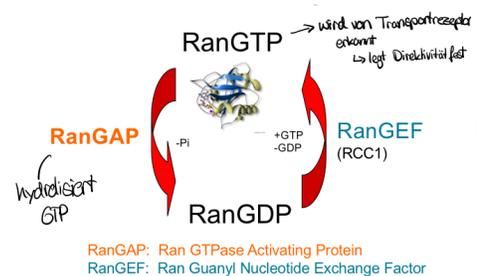
Als **Rezeptor Proteine** bezeichnet man die **Proteine, die mit den FG Proteinen der Nukleopore interagieren können**. Der zu Importierende Stoff wird mit dem Rezeptor (und ggf. Adapter) binden, wird zu einer Kernpore gebracht und kann die Pore mit dem Rezeptor durchdringen. Danach löst sich Stoff und Rezeptor gleich und der Rezeptor bewegt sich wieder durch die Pore zur anderen Seite. Der Stoff kann dann nicht mehr von sich selbst durch die Pore und ist im Nukleus gefangen.

NTR

Shuttling nuclear transport receptors: Importine und Exportine



Shuttling nuclear transport

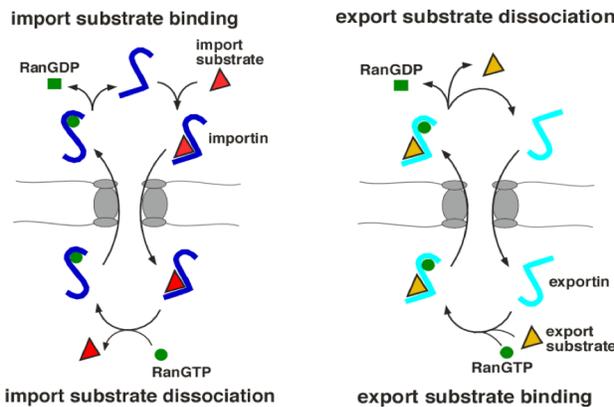


receptors bewegen sich zwischen den beiden Seiten einer Pore hin und her. Während **Importine** Substrat von aussen binden und in die

Pore bringen, binden **Exportine** Substrat aus dem Kerninneren und bringen es nach draussen. Dies ist möglich, da diese mit den FG Nulceoporen interagieren.

Das **RanGTPase (RanGTP) System**: Die RanGTPase und die RanGDPase besitzen eine unterschiedliche Konformation, reagieren nicht spontan ineinander über. Das RanGEF ist im Zellkern extrem viel häufiger als im Zytoplasma und phosphoryliert RanGDP zu RanGTP. Das RanGAP, welches RanGTP sehr schnell angreift und so RanGDP erzeugt, ist im Cytoplasma viel höher konzentriert. So kann die Zelle und die Proteine (also auch Importine und Exportine) zwischen dem Cytoplasma und dem Zellkern unterscheiden. Es gibt also eine asymmetrische Verteilung von RanGTP in der Zelle (Nukleus > Cytoplasma). Aber Wichtig: Was ausgelesen wird von den Transport Rezeptoren ist nur das RanGTP.

Cytoplasm: low [RanGTP] maintained by RanGAP



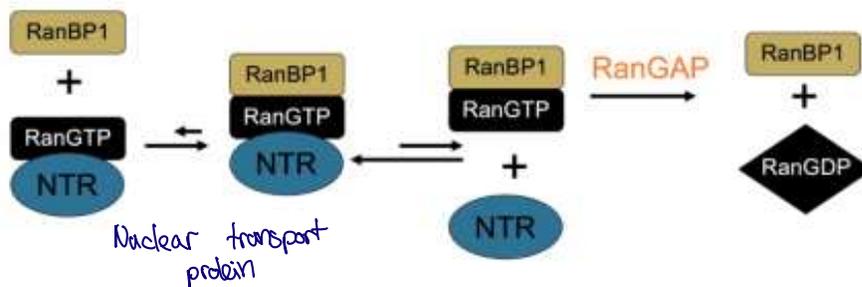
Importine besitzen eine **hohe Affinität** für **RanGTP**. Wird das **RanGTP** an dem **Importin** gebunden bewirkt das eine **Ablösung** vom **Substrat**.

Exportine besitzen eine **niedrige Affinität** für **RanGTP**. Das **Export Substrat** und das **RanGTP** **binden kooperativ** an das **Exportin**.

→ *Trimerer Komplex*

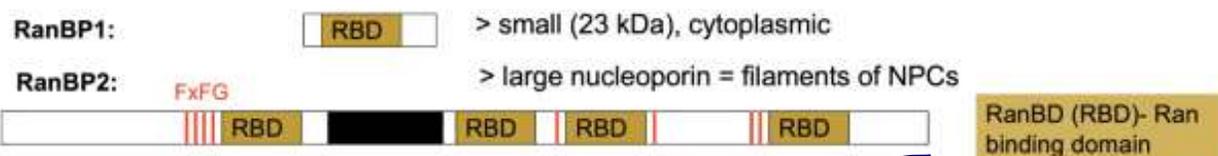
Nucleus: high [RanGTP] maintained by RanGEF

The Ran-binding protein family (RanBP1, RanBP2)



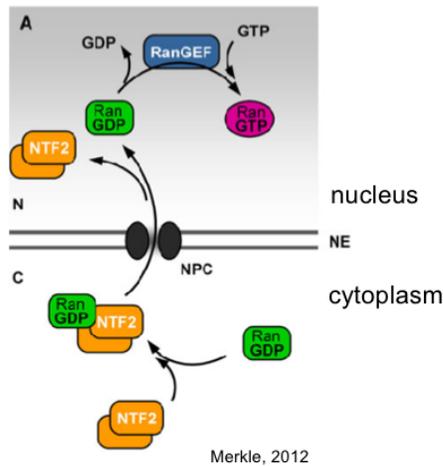
RanGTP wird durch folgenden Mechanismus von NTR entfernt: Das **RanGAP** kommt nicht an das **RanGTP**, da es mit dem **NTR** überlappt und es so nicht angreifen kann. Ein weiteres Protein, das **RanBP1**,

bindet an diesem dimeren Komplex und bildet einen nicht vollständig stabilen Komplex, der schneller in den RanBP1 RanGTP Dimer Komplex reagiert. Dieser Komplex macht das **RanGAP** sehr effizient und sorgt dafür, dass das RanGTP zu RanGDP umgesetzt werden kann. Das **RanGDP** kann weder an **RanBP1** noch an ein **NTR** binden.



In höheren **Eukaryoten** (z.B. **Säugetieren**) gibt es noch das **RanBP2**, welches insgesamt **4 RBD** enthält. Diese strukturierten Moleküle bilden die **zytoplasmatischen Fibrillen** und sorgen (zusätzlich mit **RanBP1** in freier Form) dafür, dass **NTP** gleich nach ihrem Durchgang von **RanGTP** befreit wird.

→ *Ran BP1 als "sicherheitsnetz"*



Um den **RanGTP Gradienten aufzubauen** (da durch den Transport ja ständig RanGTP vom Nucleus ins Cytoplasma entweicht) wird der NTF2 benötigt (= Nuclear transport factor 2). Dies gehört nicht zu der Importin / Exportin Familie und ist ein **Transport Rezeptor** (kann von alleine wieder in das Cytoplasma). Es ~~kann 2 RanGDP aufnehmen~~ und **somit pro Transportvorgang 2 RanGDP in den Nucleus befördern**. RanGTP bindet nicht an NTF2 (es benötigt also auch kein RanGTP für den Transport).

2 NTF2 für 1 Ran GDP

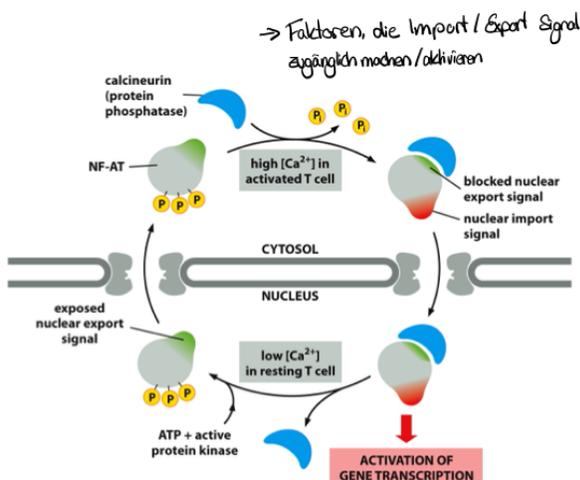
Energieverbrauch von Nuklearem Transport

Pro NPC werden etwa 100 Moleküle (bis max 1000) pro Sekunde transportiert. Ein Nucleus besitzt etwa 3000 – 4000 NPC. **Somit werden 300'000 – 400'000 Meleküle pro Nucleus pro Sekunde transportiert.**

Der Nukleare Transport ist eine **erleichterte Diffusion** (facilitated diffusion), da die NTR mit den Filamenten interagieren (ist also **Energieunabhängig**). Somit ist ein einziger Transportlauf nicht an Energie gekoppelt. Um aber mehrere Läufe durchführen zu können, wird ein RanGTP Gradient benötigt.

Nuklearer Transport Regulation

Die Regulierung passiert normalerweise durch **kontrollierten Zugang von Transport Cargo zur Transportmaschinerie**. Die **Regulierung läuft meist durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung**.



Beispiel: **NF-AT** (Nuklearer Faktor von aktivierten T Zellen): **Transkriptionsfaktor involviert in der cytokine exprimierung.**

In einer inaktiven T Zelle ist das NF-AT Import Signal phosphoryliert und inaktiv. Ein Leucin reiches Exportsignal ist aber aktiv und dadurch wird das Protein aus dem Nucleus gehalten.

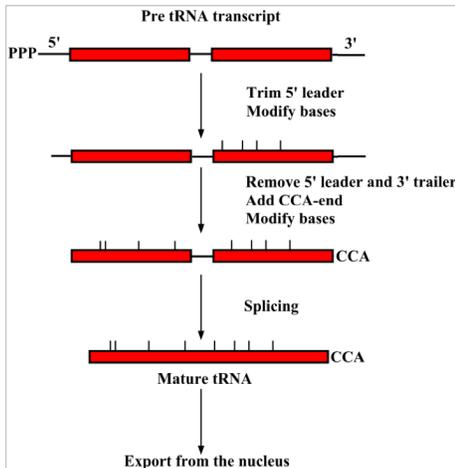
Wird eine T Zelle stimuliert (Einstrom von Ca^{2+}), so wird eine Ca abhängige Protein Phosphatase aktiviert, dephosphoryliert das NF-AT und bindet zusätzlich am Exportsignal von NF-AT.

Dadurch kann das Protein in den Kern transportiert werden und die Gen Exprimierung einleiten.

Mit der Zeit wird die Zelle das Ca^{2+} wieder aus sich pumpen, die Ca abhängige Protein Phosphatase wird sich vom Exportsignal lösen und das NF-AT wird von einer Protein Kinase Phosphoryliert. In diesem Zustand wird es wieder aus dem Nucleus geschaffen.

RNA Export Wege: tRNA, mRNA und ribosomale Subunits

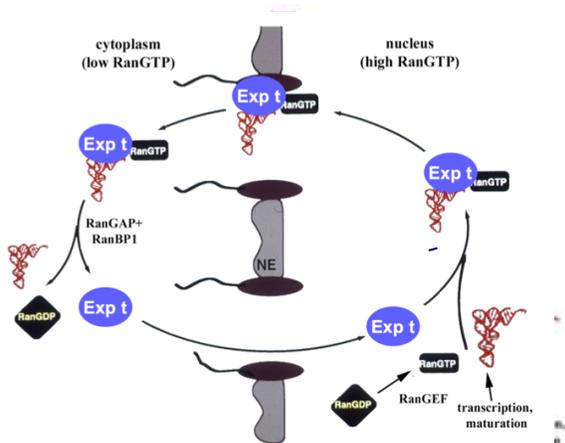
tRNA Export



! tRNA splicing differs from mRNA splicing !
it is nuclear in human cells and cytoplasmic in yeast

tRNA-Gene werden von der RNA-Polymerase III als Vorläufer transkribiert. Prä-tRNAs durchlaufen eine Reihe von RNA-Prozessierungs- und Modifikationsreaktionen (Trimmen der tRNA-Enden, Falten, Spleißen, Basenmodifikationen, CCA Addition).

Ausserdem gibt es viele ungewöhnliche Nukleotide in der tRNA.

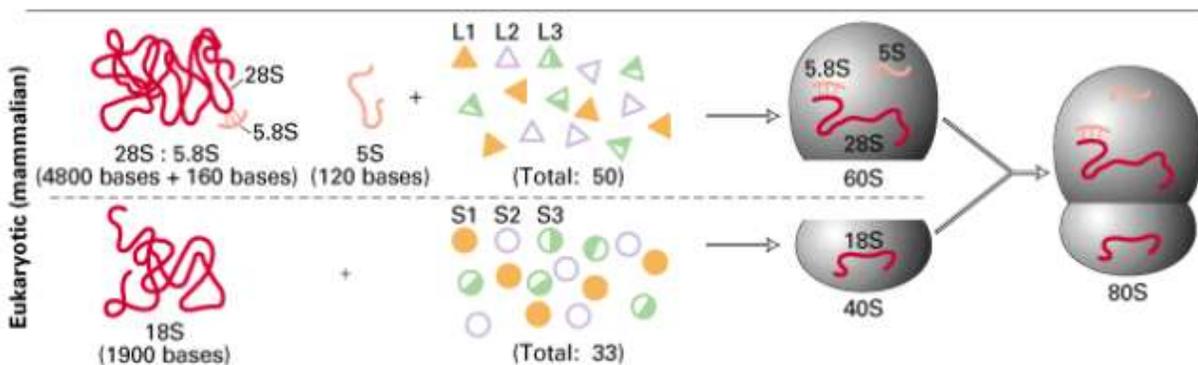


Institute of Biochemistry, D-Biol, ETH Zurich

Die tRNA wird durch das Exportin-t (=Exp-t) aus dem Nucleus gebracht. Dieser Export ist RanGTP abhängig und Exp-t bindet nur direkt an reife tRNA (prozessiert und gefaltet) und exportiert diese (Introns oder eine falsche Faltung der tRNA würde die Komplexbildung behindern, somit wird nur die reife tRNA exportiert. Ausnahme: Bei einigen Spezies wird ein Intron erst im Zytoplasma gespliced. Dieses Intron stört die Komplexbildung aber nicht.)

MicroRNA Export funktioniert ähnlich.

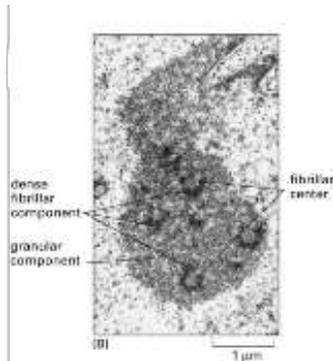
Ribosomale Subunits Export



Ribosome bestehen aus 2 Untereinheiten. Die Grosse (60S) besteht aus 50 Proteinen und 3 rRNA Stücken, die Kleine (40S) besteht aus 33 Proteinen und einem rRNA stück. Für dessen Synthese werden alle 3 Polymerasen gebraucht. (genauer?)

RNA Pol I, Pol II und Pol III synthetisieren prä-rRNA, mRNA und 5S rRNA

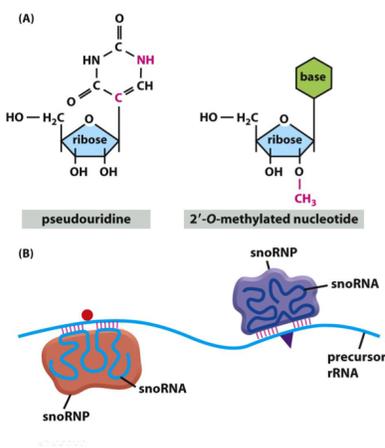
ribosomale DNA



In Nucleoli befindet sich die rDNA, die transkribiert wird. In den **dense fibrillar components** findet die RNA Synthese statt. Dort wird die rRNA gebildet und mit ribosomalen Proteinen belegt. Die eigentliche Assemblierung findet dann im **Granulären Teil des Nucleolus** statt.

↳ der einzelnen Untereinheiten
Die precursor RNA (45S) wird dafür gespalten und modifiziert. Die wichtigsten Modifikationen sind: Die Konversion von Uridinen zu Pseudouridinen und die Methylierung von spezifischen Resten an dem 2' -OH der Ribose (A).

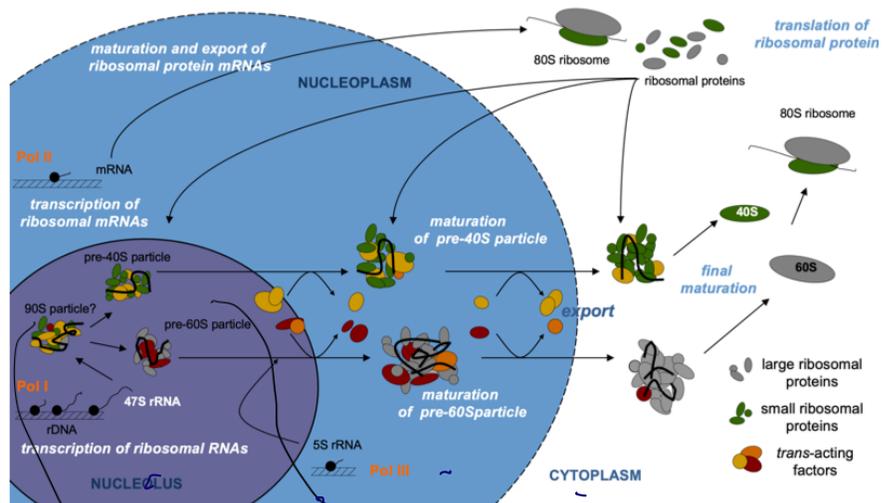
Die rRNA Modifikationen sind wichtig für die pre-rRNA Faltung, die Ribosom Funktion und die Interaktion von rRNA mit Liganden.



Dass diese **chemischen Modifikationen bei allen rRNAs genau an der gleichen Stelle sind**, werden **snoRNPs** verwendet.

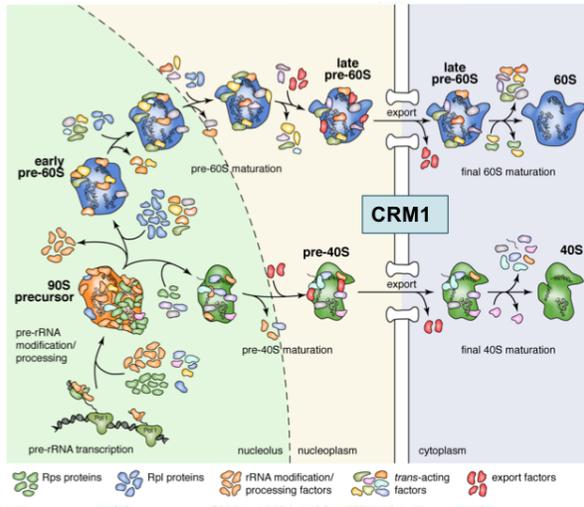
Diese bestehen aus Proteinen sowie **snoRNA** und können an genau den richtigen Stellen binden durch komplementäre Basenpaarung. Am Aktiven Center führen sie dann die Modifikation durch.

- Prä-rRNA-Transkription durch RNA Pol I.
- Modifikation und Verarbeitung von rRNAs
- Zusammenbau von ribosomalen Proteinen, aus dem Zytoplasma importiert, auf prerRNA im Nucleolus
- Trennung von Prä-40S und Prä-60S und Freisetzung in das Nucleoplasma
- Export als einzelne Untereinheiten
- Durch **NES (nuclear export signal) beinhaltende Adapter Proteine** können die Subunits den Zellkern verlassen



90s particle ist precursor → wird getrennt

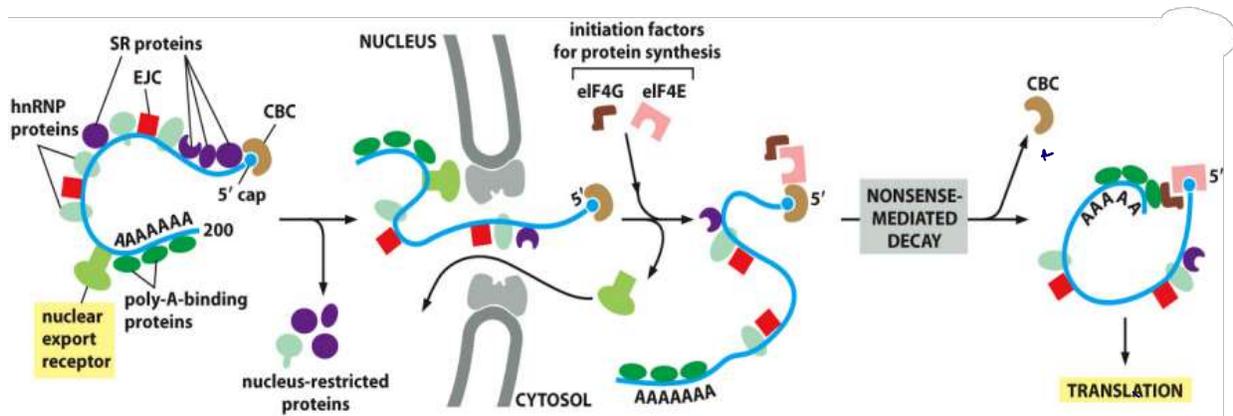
40s und 60s getrennt voneinander weitergereift & exportiert



- Die finale Maturation wird im Zytoplasma abgeschlossen

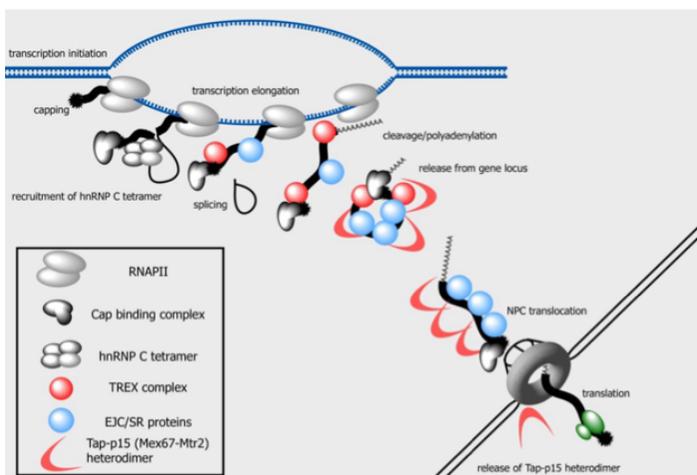
Links sieht man eine andere Darstellung dieses Vorgangs. CRM1 (Name) nicht lernen. Diese Untereinheiten sind schon sehr gross, wesswegen diese von mehreren Exportinen gebunden werden.

mRNP Export



Oben ein Schema von dem mRNP Export aus dem Nukleus (siehe Teil von I. Zemp). Der nuclear export receptor für mRNA ist ein spezielles Molekül.

Der mRNP-Export wird durch das TAP / p15 Heterodimer sichergestellt. Es gehört nicht zur Exportfamilie, RanGTP bindet nicht an dieses Protein. Das Protein ermöglicht die erleichterte Diffusion von mRNPs durch NPCs durch Bindung an FG-Wiederholungen (wie alle Transportrezeptoren). TAP / p15 wird durch Adapter Rekrutiert, welche auf der mRNA abgelegt werden während der Transkription. Ein solcher Adapter ist der Exon-Junction-Komplex (EJC).



EJC Ablegung: Eine RNA wird von RNA P II hergestellt und dabei werden Introns gespliced. Während diesem Splicing wird das Intron herausgeschnitten und das Exon wieder verbunden (Exon Ligation). Während dieser Exon Ligation werden Exon Junctions gebildet, auf welchen sich EJK Proteine ablagern und den EJK bilden. Dieser dient dann als Adapter für den mRNP Transport.

→ Exon liganden können binden
→ Export

Das Splicing erfüllt also zwei Funktionen:

zu exon-exon junctions

- Rekrutierung von Exportrezeptoren durch Ablegung des EJC an die mRNA
- Führt dazu, dass es von Faktoren, die sie im Nukleus behalten würden (Splicing Maschinerie)

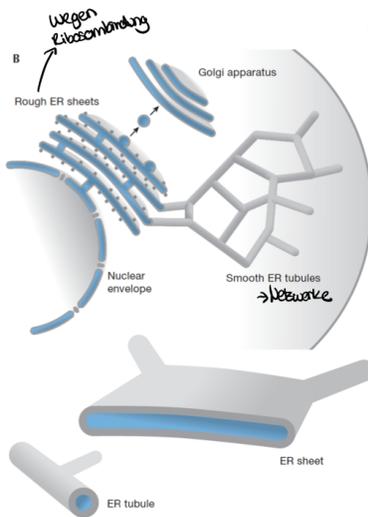
↳ ab gelöst werden

Dies führt also dazu, dass nur mRNA den Zellkern verlassen kann, die die Maturierungsprozesse durchlaufen haben.

mRNA

Vorlesung 3

Das Endoplasmatische Retikulum



Das ER bildet flache ER Sheets (Rough ER mit Ribosomen besetzt) und ER Tubes, welche eine röhrenförmige Struktur besitzen (Glattes ER, bildet Netzwerke, ohne Ribosomen).

Ausserdem ist das ER eine sehr dynamische Struktur (Verbindungen können gebrochen und neu gebildet werden).

→ gesamtes ER ist vernetzt
 ⇒ Proteine / Lipide (eingelagert)
 können diffundieren

Die 4 verbundenen Einheiten des ER:

- Raues ER (s.o.)
- Glattes ER (s.o.)
- Kernhülle (innere und äussere Membran setzt sich am ER fort)
- Transitionale Elemente, ER Exit sides (Membranbereiche für Vesikelformung und -transport)

↗ Richtung Golgi

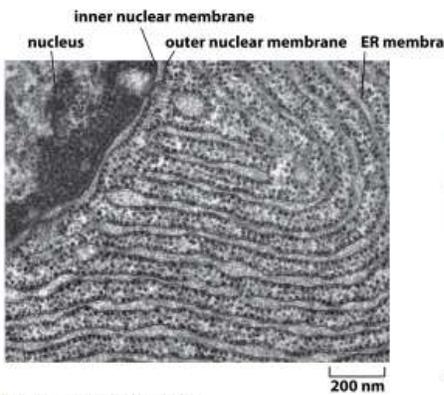


Figure 11.24 Molecular Biology of the Cell 6e © Garland Science 2015

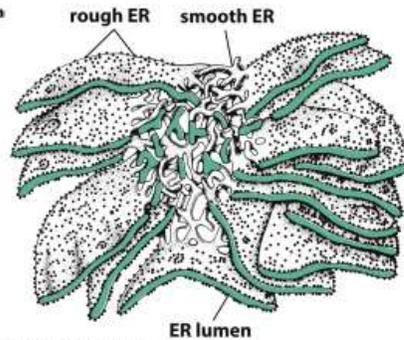
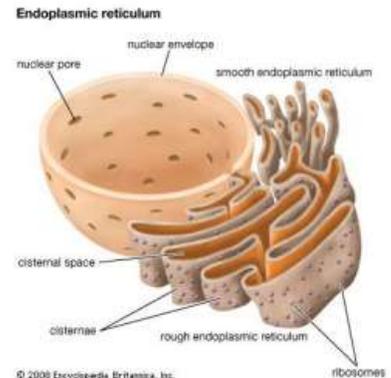


Figure 11.24 Molecular Biology of the Cell 6e © Garland Science 2015



© 2008 Encyclopædia Britannica, Inc.

Aufgaben von Rauem ER:

- Protein Translokation in dem ER
- Protein Modifikation, Faltung und Qualitätskontrolle

Ribosome

↳ stellen Proteine her

Aufgaben von Glattem ER:

- Lipid Synthese (Phospholipide, Steroide...)
- Produktion von Lipoproteinpartikeln
- Detoxifizierung

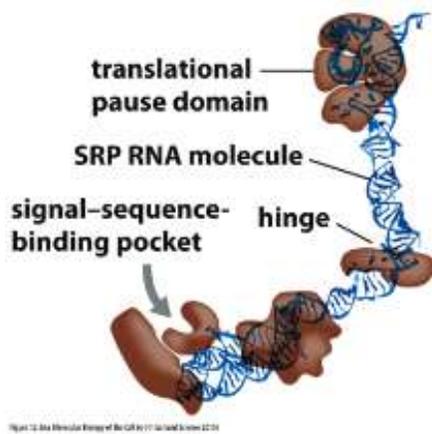
↳ Transportieren
 Lipide + Cholesterin

Ausserdem wichtige Funktionen:

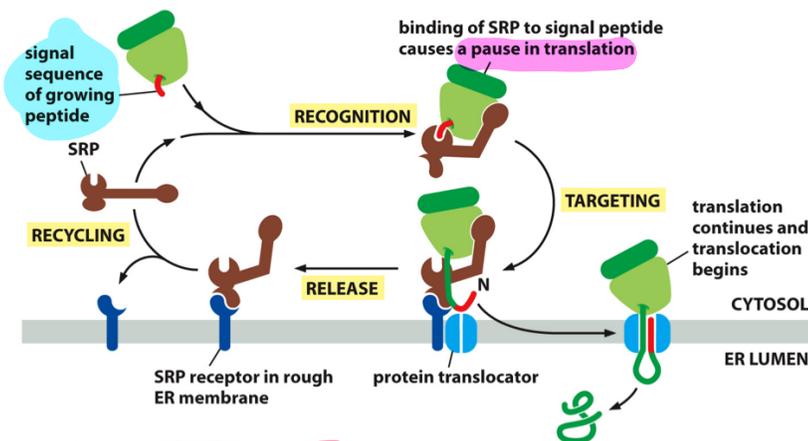
- Speicherort von Calciumionen (Ca ausfluss wird reguliert und kann Transporte in Gang setzen)
- Ausgangspunkt von anderen Organellen wie z.B. dem Peroxisomalen Kompartement (siehe I. Zemp)

Proteintransport ins ER (für Proteine fürs ER)

Zielsteuerung läuft **co-translational** durch **Signalsequenzen** von neu translatierten Proteinen (Siehe Teil von I. Zemp). Diese transportieren Proteine enthalten also **noch Ribosomen** und aus diesem Grund bildet sich die **«raue» Struktur des ER**. Diese Sequenzen haben nicht alle dieselben Sequenzen besitzen aber ähnliche Fähigkeiten (**8 oder mehr hydrophobe Reste am Zentrum**).

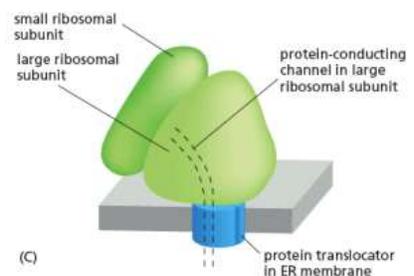


Das Signal wird vom **Signal Recognition Particle (SRP)**, (siehe auch Teil von N. Ban) erkannt. Das bakterielle SRP bringt Proteine zur **Plasmamembran**, das **eukaryotische SRP** bringt Proteine zum ER. Das eukaryotische SRP hat ein **RNA Gerüst** und **mehrere Polypeptide**, inklusive einer GTPase Untereinheit, welche an Signalpeptide binden. Sobald das SRP an die Signalsequenz bindet, kommt es aber zu einer **Verzögerung** oder sogar zu einem **Stopp der Translation** (das SRP hindert die Bindung von Translationsfaktoren an das Ribosom).

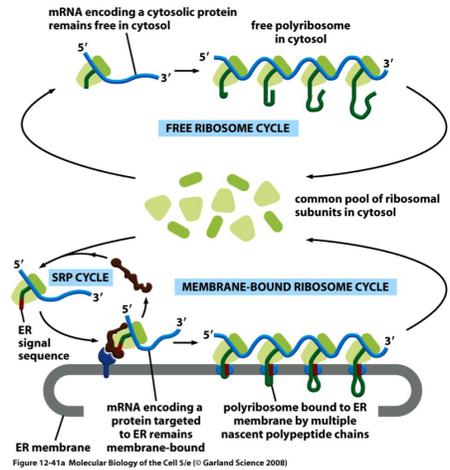


Das **SRP** bindet an die **Signalsequenz**, bringt das Ribosom und das Polypeptid zu einem **SRP Rezeptor** und bindet an ihn. Durch einen **Protein Translokator (= Translocon)** wird das Polypeptid Signal erkannt und gebunden und somit auch **das Ribosom**. SRP löst sich (die **Translation** läuft wieder). Das Polypeptid kann durch den

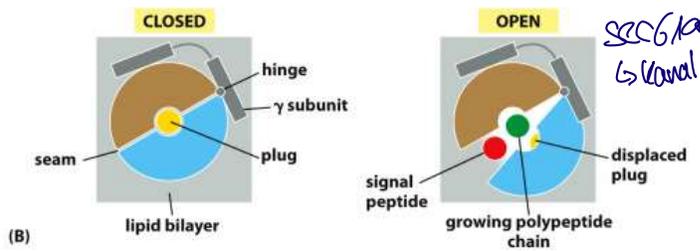
Kanal ins ER gelangen und SRP wird wieder vom **SRP Rezeptor** abgelöst und **rezykliert**. Die Signalsequenz wird also **zweimal** erkannt. Die Signalsequenz wird wie auf dem Bild gezeigt an das Translocon gebunden und das Polypeptid bildet eine Schlaufe. Am Ende der Translation wird **die Sequenz durch eine Signal Peptidase** abgeschnitten. Dabei entsteht ein **Kontinuierlicher Kanal** für die Polypeptidkette bis ins innere des ER.



Zwar ist das 1. Ribosom von der Polysomen Kette mit der Zeit wieder frei, die Folgenden werden dann aber gleich auch an die ER Membran anhaften und so ergibt sich diese Haftung der Polysome am ER. Es gibt aber keine speziellen ER Ribosomen, nach dessen Auftrag werden sie sich wieder in ihre Untereinheiten aufteilen und dem Ribosomen Pool zugeführt.



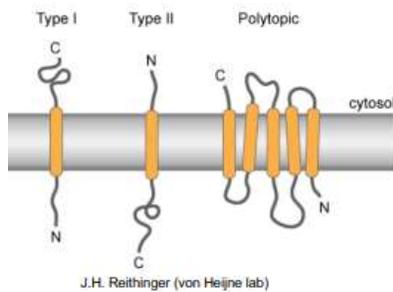
Der Translocon Kanal ist ein Trimerer Komplex. Bei Bakterien wird der SecY (Eine der drei Untereinheiten, 10 transmembrane Helices) in der Zellmembran durch das bakterielle SRP gefüttert, bei Eukaryoten stammt die Sec61α Untereinheit von der SecY Untereinheit ab (sehr konserviert), befindet sich aber im ER. Zytosolische Loops sorgen für die Bindungsstelle des Ribosoms.



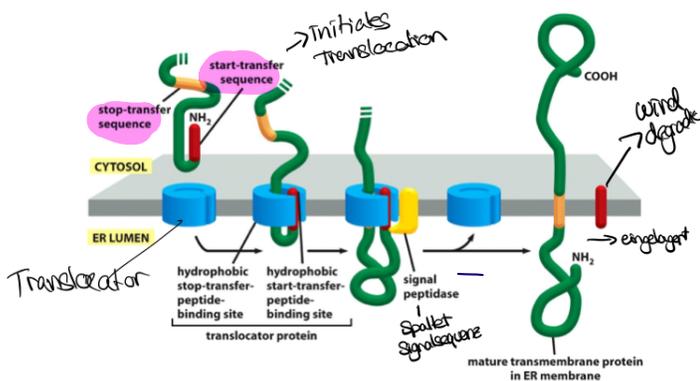
Dieser Kanal kann in zwei Zuständen vorkommen (zu/offen). Im normalen Zustand ist er geschlossen, er kann durch ein Signalpeptid (siehe Bild links) beidseitig geöffnet werden. Dadurch kann dann die Polypeptidkette passieren.

Wichtig: Im geschlossenen Zustand wird das Translocon durch einen Plug komplett geschlossen. Dies ist wichtig, um einen Ausfluss von Calciumionen (da im ER Ca Konzentration viel höher als im Cytosol) zu verhindern.

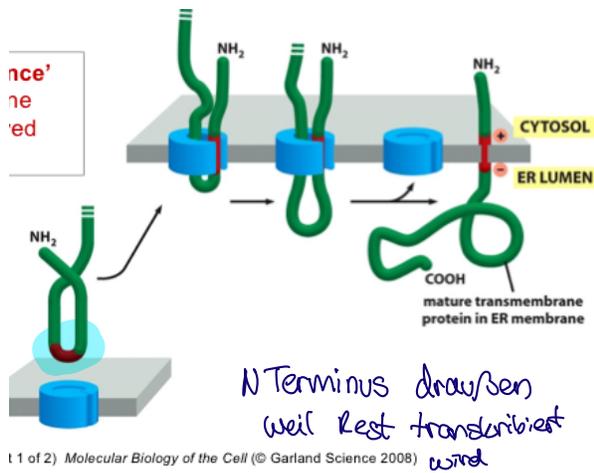
ER Membranproteine



Bei ER Membranproteinen gibt es verschiedene Typen (siehe links).



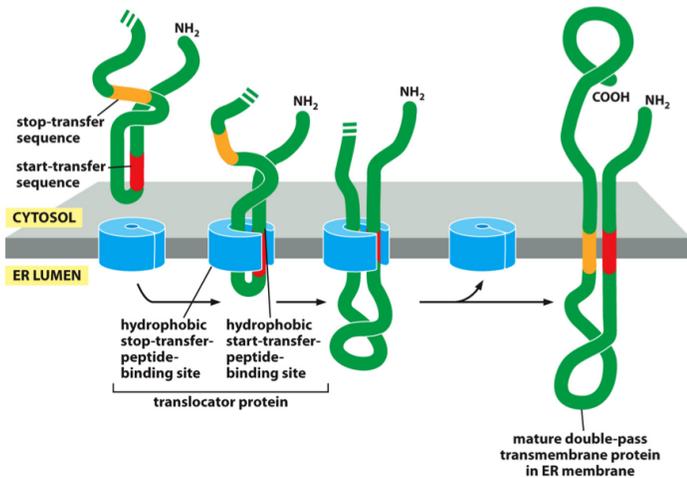
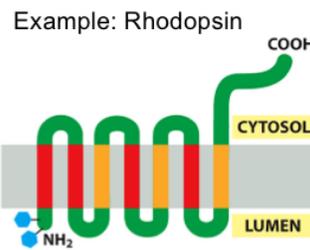
Bei Typ 1 Membranproteinen gibt es eine Start-Transfer Sequenz (rot), welche genau gleich funktioniert wie die ER Protein Sequenz (s.o.) und zusätzlich eine Stopp-Transfer Sequenz (orange). Das Protein wird wie ein ER Protein durch die ER Membran transportiert bis zur Stopp-Transfer Sequenz. Dann wird die Startsequenz abgeschnitten, das Kanalprotein entfernt sich und die Stopp-Transfer Sequenz dient dem Protein dann als Anker in der Membran.



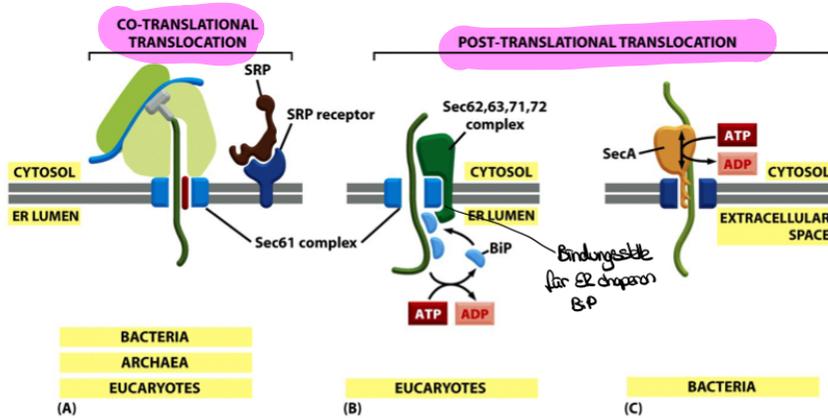
Typ 2 Membranproteine enthalten eine **Interne Signalsequenz**. Bei der Translation bildet sich erneut ein Loop. Aber nach der Translation wird die Signalsequenz nicht abgeschnitten und die interne Signalsequenz dient dem Protein als Anker.

Aber: Eine interne Signalsequenz kann bei einer bestimmten Ladungsverteilung auch zu einem Typ 1 Membranprotein führen! Also die Ladungsverteilung bestimmt die Orientierung (positive Ladung im Cytosol wie im Bild links)

Durch eine Kombination von Start-/ Stopp-Transfer Sequenzen können **polytropische** (= mehrfach verankerte) Stück für Stück Membranproteine ins ER eingelagert werden.



Co- oder post-transcriptional protein translocation und Energieversorgung



In **Wirbeltieren** laufen die meisten **Proteintransporte ins ER** **Co Translational**.

- A: Elongation der Kette schiebt sie ins ER
- B: BiP sind Chaperone (hsp70, siehe I. Zemp)
- Sec 62... nicht merken**
- C: ATPase (SecA, siehe N. Ban) schiebt die Proteinkette nach draussen (nur Bakterien)

Protein translation

ATP cycle of HSP70 (BiP) (molecular ratchet)

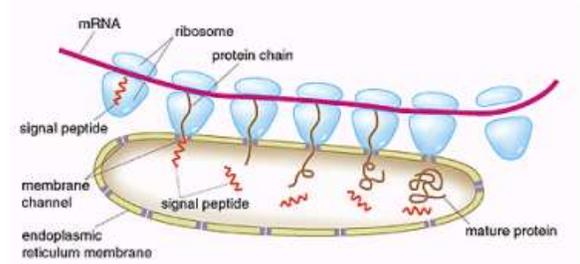
ATP hydrolysis by translocation component (SecA)

IOI, ETH Zurich

↓
häufiger

Proteinfaltung und Modifizierung im ER

- Die Translations- / Translokationsrate beträgt 3-5 Aminosäuren pro Sekunde
- Das Falten beginnt oft zusammen und endet posttranslational und -translokational
- beinhaltet kovalente Modifikationen (Signalpeptidspaltung, Kopplung von Kohlenhydrate, Bildung von Disulfidbindungen innerhalb und zwischen Ketten)
- Beinhaltet die Unterstützung durch „molekulare Chaperone“
- Ist mit einem effizienten Qualitätskontrollsystem verbunden, das das Verlassen von falsch gefalteten und nicht zusammengesetzten Proteinen verhindert
- Ist mit dem ER-assoziierten Degradationssystem (ERAD) verbunden, das benötigt wird, wenn das Protein sich dauerhaft falsch faltet
- Ist mit der „ungefalteten Proteinantwort“ (UPR) verbunden, die die Kapazität des ER zur Verarbeitung von Fracht reguliert



Faltenzyme und Chaperone im ER

- **Proteindisulfidisomerase (PDI) und ERp57 (ER-Protein 57).** Thiol Oxidoreduktasen. Verantwortlich für die korrekte Oxidation von Cysteinen zur Bildung Disulfidbindungen und zur Isomerisierung von Disulfidbindungen.
- **BiP / GRP78 (Bindungsprotein / Glucose-reguliertes Protein 78).** Hitzeschock Protein 70 (HSP70) Homolog. Bindet an freiliegende hydrophobe Sequenzelemente.
- **Calnexin und Calreticulin.** Lektine, die Faltung und Qualitäts Kontrolle von Glykoproteinen fördern. Bindung an monoglucosylierte N-verknüpfte Glykane.

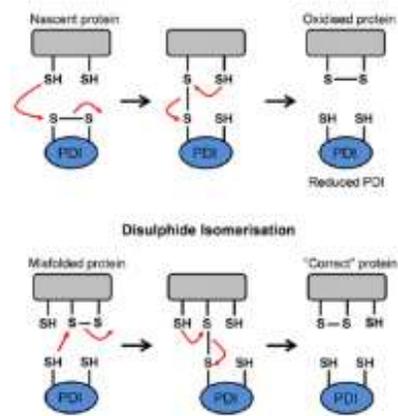
Kovalente Protein Modifikationen im ER

- Signal Peptid Abtrennung
- Bildung von Disulfidbrücken Bindungen
- Glykosylierung (N Verknüpft)
- N-Glycan «trimming» und Re-Glykosylierung
- GPI Anker Addition
- Andere weniger häufige Modifikationen

Signal Peptid Abtrennung

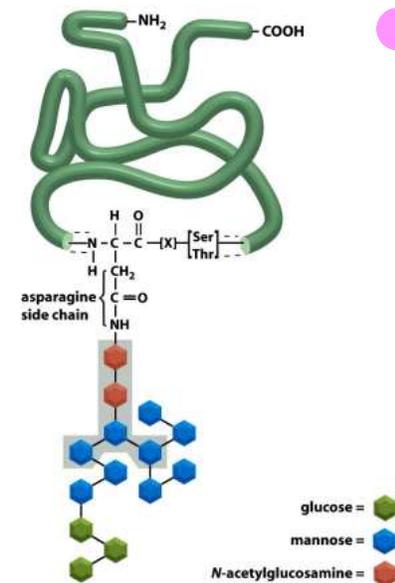
Durch eine Signalpeptidase wird das Signal Peptid abgetrennt.

Bildung von Disulfidbrücken Bindungen

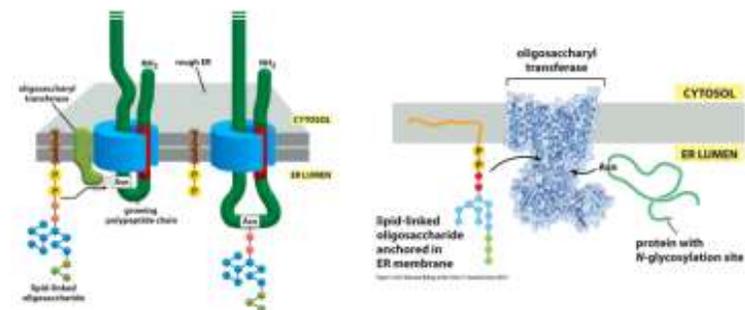


Verknüpfung von zwei Cystein Resten (SH Bindungen) durch Oxidation zu $H_2C-S-S-CH_2$. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten: **Intrachain Disulfidbrücken** (innerhalb des gleichen Proteins) oder **Interchain Disulfidbrücken** (zwischen zwei Proteinen z.B. in einem Proteinkomplex). Diese können auch wieder aufgetrennt werden (z.B. **Redox Chaperone**). Das **PDI (Protein Disulfide Isomerase)** Enzym **katalysiert** diese Bildung und wirkt als **Elektronenakzeptor**. Um wieder zu funktionieren, muss das PDI wieder regeneriert werden (H müssen entfernt werden). PDI hilft aber auch bei der richtigen Verknüpfung (Disulfid Isomerisation).

Glykosylierung (N Verknüpft)



Asparagin wird co-translokational Modifiziert, wenn eine bestimmte Sequenz (Asn-X-Ser/Thr, X = Beliebige AA ausser Proline) vorhanden ist. **An das N im Asparagin wird ein Zucker (Glykan = Polysaccharid) angehängt.**



oligosaccharyl transferase

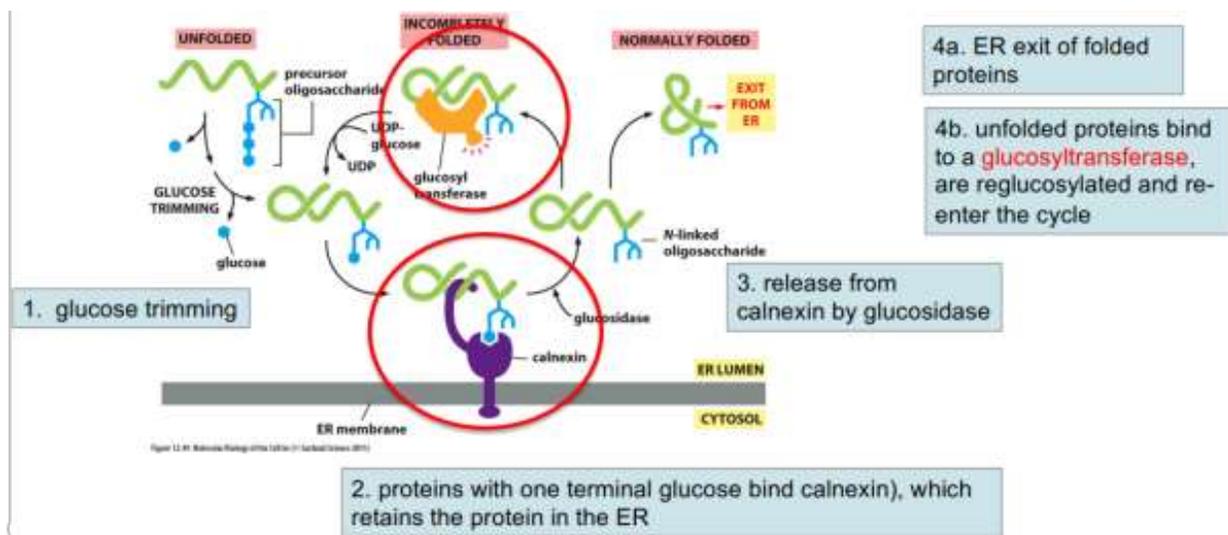
Eigenschaften dieser **N-Verknüpften Glykane**: Bilden zusammen mit der Phosphorylierung die meiste Kovalente Proteinmodifikation in tierischen Zellen. Meistens wird mehr als ein Glykan pro Protein angehängt (2 – 10) und sie befinden sich an **der Oberfläche von Proteinen in Turns oder Sekundärstrukturen breaks**. Die Polysaccharide ragen **>3nm** von der Oberfläche des Proteins ab. **Kern Glykane (core glycans)** werden stark Modifiziert während der Glycoprotein Reifung im ER und Golgi Komplex und unterliegen der **Heterogenität** (oder Mikroheterogenität, nicht alle diese Zucker werden gleich modifiziert).

Funktionen von N-Verknüpften Glykanen:

- **Faltung** vieler Glykoproteine im ER
- Wichtig als „**Erkennungs-Tags**“ für intra- und extrazelluläre Lektine
- Schützen Proteine vor **Denaturierung und Proteolyse** (=)
- **Feinabstimmung (fine tuning)** der physikalischen Eigenschaften von Proteinen, d. H. Verbesserung der Protein Löslichkeit
- Wirken **Aggregation und nicht produktiven Interaktionen** von Proteinen entgegen
- **Regulieren den turn over von Proteinen** (wie schnell Proteine abgebaut werden)
- Modulieren **Immunantworten** gegen Proteine

ER Protein Qualitätskontrolle

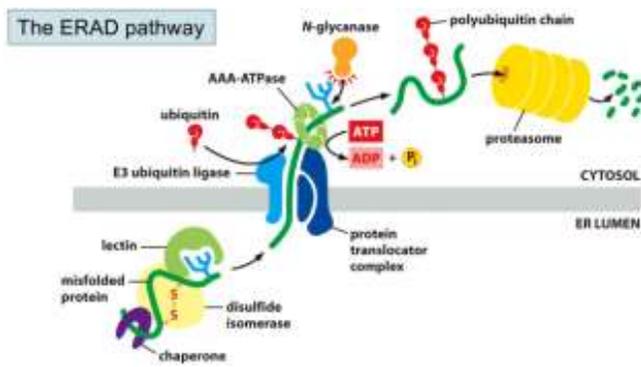
Der Faltungskomplex im ER ist nicht sehr effizient. Gewisse Proteine im ER sind zu 80% falsch gefaltet (falsche Faltung, nicht komplette Faltung...). Diese Proteine werden von **Faltungssensoren** erkannt und werden nicht zum Golgi Komplex (und weiter) transportiert, sondern nur richtig gefaltete. Dieser Prozess wird **ER Qualitätskontrolle** (N-Glycan «trimming» und Re-Glykosylierung spielt eine wichtige Rolle) genannt.



Falsch gefaltete Proteine können durch die ER Membran ins Cytosol zurück transportiert werden und dort degradiert werden (dies wird **ER associated degradation oder ERAD** genannt)

Das ER besitzt einen Rückkopplungsprozess zum Zellkern, um zu signalisieren, dass es zu viele ungefaltete Proteine enthält (**unfolded protein response oder UPR**). Dieser Prozess reduziert die Menge an neu translatierten Proteinen und erhöht die Transkription von ER Faltungsproteinen.

ERAD Weg



Falsch gefaltete, lösliche und Membranproteine werden durch einen Komplex ins Cytosol transportiert. An diese Proteine werden Poly-Ubiquitin Ketten angehängt, die als Extraktionshilfe (für ATPasen) und Degradierungssignal wirken. ATPasen ziehen die Polypeptidkette unter ATP Verbrauch aus dem ER Lumen. Im Cytosol wird die Polypeptidketten dann durch Proteasomen deglykosyliert und degradiert.

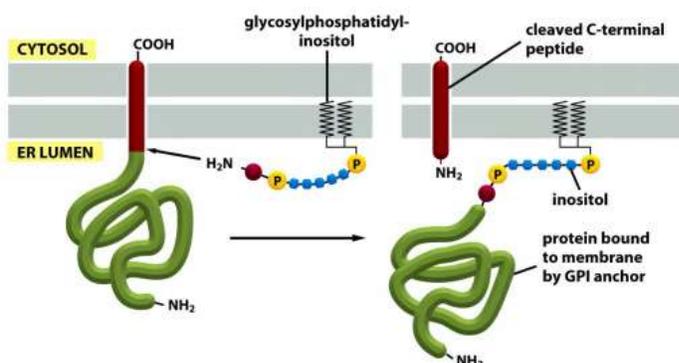
UPR (= Unfolded protein response)

Das ER besitzt unterschiedliche Membranproteine, welche als Sensoren für falsch gefaltete Proteine wirken und dann Transkriptions Regulierungsproteine ausschütten, die zum Kern gehen. Diese können Zellen sogar zum programmierten Zelltod führen.

Weitere Funktionen des ER

GPI Anker Addition

GPI = Glycosylphosphatidylinositol



Diese Proteine werden im ER Modifiziert, sind aber für die äussere Oberfläche der Zellmembran bestimmt. Der im ER angefügte GPI Anker verankert sich an bestimmten Stellen in der Zellmembran (lipid rafts) und kann sich durch die Phospholipasen bewegen, um so der Immunantwort vom Organismus zu entkommen.

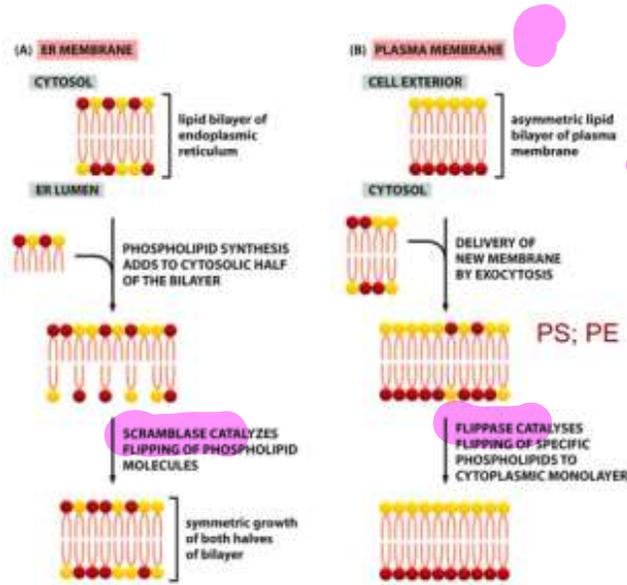
Lipid Biosynthese und Homöostase → Selbstregulation

Das ER stellt alle wichtigen Klassen von Lipiden her:

- Phospholipide
- Cholesterin / Cholesterin
- Ceramide

→ glattes ER

Dabei werden Fettsäuren zur ER Membran (Cytosolseite) gebracht und aktiviert. Danach können sie durch Enzyme zu Phospholipiden umgesetzt werden.



Da nur auf der Cytosol Seite der ER Membran Phospholipide hergestellt werden, können ATP unabhängige scramblases eine Verteilung zwischen beiden Seiten der Membran schaffen ohne Energie aufwenden zu müssen (Unordnung wird erhöht).

Allerdings in der Plasmamembran gibt es eine ganz spezifische Anordnung der Phospholipide. Da aber laufend neue Phospholipide zugeführt werden, wird Unordnung in der Plasmamembran geschafft. Durch ATP abhängige flippases kann unter ATP Verbrauch die Ordnung laufend wiederhergestellt werden.

↳ Ordnung braucht man in Plasmamembran

F: Vesikulärer Transport (U. Kutay)

Zusammenfassung

(unbedingt Auswendig können)

Bildung von Gecoateten Vesikeln

Transportvesikel entstehen in spezialisierten Regionen der Donormembran. Das Assembly der Coats hilft, spezifische Membran und lösliche Fracht Moleküle für den transport zu Sammeln und ist die treibende Kraft für die Formung von Vesikeln.

Lokale Synthese von Phosphoinositides (PIPs) erstellen Bindungsstellen, welche das Coat assembly und das Vesikel budding auslösen.

Es gibt verschiedene Typen von gecoateten Vesikeln. Die am besten charakterisierten sind die Clathrin-coated Vesikel, welche für den transport von der Plasma membran un dem trans-Golgi Network (TGN) verantwortlich sind.

COPI- und COPII-coated Vesikel sind verantwortlich für den Transport zwischen Golgi Zisternen und zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat. Die Rekrutierung des Coats wird durch die GTPasen Sar1 und Arf1 sichergestellt, die Coat assemblieren und disassemblieren.

Der Coat wird abgeworfen nach dem budding. Dadurch wird den Vesikeln ermöglicht, mit ihrem Zielkompartiment zu fusionieren.

Vesikuläres Targeting und Fusion

Eine grosse Familie von Rab Proteinen fungieren als Vesikel targeting GTPasen. Rab Proteine werden rekrutiert um Vesikel und Target Membranen zu transportieren. Das Assemblieren und Dissasemlieren von Rab Proteinen und dessen Effektoren in Spezialisierten Membrandomänen sind dynamisch kontrolliert durch GTP Bindung und Hydrolyse.

Aktive, GTP-gebundene Rab Proteine rekrutieren Rab Effektoren wie Filamentöse tethering Proteine, welche dabei helfen, dass Vesikel ihre Fracht nur zur richtigen Zielmembran befördern. Ausserdem werden Motorproteine rekrutiert, welche Vesikel auf Aktin Filamenten oder MT befördern.

Komplementäre v-SNARE Proteine auf Transportvesikeln und t-SNARE Proteine auf der Zielmembran formen stabile trans-SNARE Komplexe, welche die zwei Membranen zusammenzwingen, sodass dessen Lipid Bilayer fusionieren können.

Vom ER zum Golgi: ER verlassen

Korrekt gefaltete und assemblierte Proteine im ER werden in COPII gehüllte Transportvesikel gepackt, die dann von der ER Membran abgeschnürt werden.

Direkt danach werfen die Vesikel die Hülle ab und fusionieren miteinander zu Vesikular tubulären Clustern.

Die Kluster bewegen sich entlang dem MT zum Golgi-Apparat, wo sie miteinander fusionieren, um das cis-Golgi Netzwerk zu bilden.

ER residente Proteine, die das ER ebenfalls verlassen, sowie Cargo Rezeptoren und SNAREs werden von den Vesicular Tubulären Clustern durch COPI-gecoatete Vesikel zurück zum ER transportiert

Diese Rückführ pathways sind wichtig, um die Identität von Zellulären Kompartimenten aufrechtzuhalten.

Vom ER zum Golgi: Traffic im Golgi

Der Golgi-Apparat ist ein polarisiertes Organell, welches aus mehreren Stapeln von wie Disks geformten Zisternen, es gibt mindestens 3 funktional verschiedene Stapel, bestehend aus cis, medial und Trans Zisternen.

Cis und trans Zisternen sind beide verbunden zu spezialisierten Sortierstationen (Cis Golgi Network, CGN und Trans Golgi Network TGN)

Sekretorische Proteine und Lipide bewegen sich durch den Golgi Stapel von der Cis- zur trans- Seite.

Diese Bewegung könnte durch Vesikulären Transport passieren, oder durch progressive Reifung von der cis Zisterne zur medial und zum Schluss zur trans Zisterne (während laufend neue cis Zisternen gebildet werden). Vermutlich handelt es sich aber um eine Kombination aus beiden Mechanismen.

Kontinuierlicher retrograder Vesikulärer Transport (= von dort, wo die Enzyme herkommen), konzentriert vermutlich die Enzyme da, wo sie benötigt werden.

Fertiggestellte, neue Proteine enden im Trans Golgi Netzwerk, von wo sie in Transportvesikel gepackt werden und zu ihrem Zielort in der Zelle befördert werden.

Vom ER zum Golgi: Glykoprotein Prozessierung im Golgi

Im Golgi-Apparat werden Zucker Nukleotide durch Glycosyl Transferase an Proteinmoleküle angehängt.

Mannosen an den N-gelinkten Oligosacchariden, welche im ER an Proteine gehängt werden, werden sehr oft entfernt und andere Zucker können angehängt werden.

O-gelinkte Glycosylierung wird durchgeführt.

Glycosaminoglycan Ketten werden an Kernproteine angehängt um Proteoglykane zu formen.

Sulfatierung von Zucker in Proteoglykanen und von speziellen Tyrosinen an Proteinen passieren auch im späten Golgi Compartment.

Transportfracht wird sortiert für den Transport zu späteren Zielorten.

Vom TGN zum Lysosom und der Plasmamembran

Zellen sekretieren Moleküle durch Exozytose entweder Konstitutiv oder Regulativ. Regulierte pathways gibt es nur in spezialisierten sekretorischen Zellen, den Konstitutiven sekretorischen pathway gibt es in allen Eukaryotischen Zellen.

In den Regulierten pathways werden die Moleküle entweder in Sekretorischen Vesikeln oder in Synaptischen Vesikeln gelagert, welche nicht mit der Plasmamembran fusionieren, um ihre Ladung frei zu geben, bis sie ein spezielles Signal dazu erhalten.

Sekretorische Vesikel enthalten Proteine für die Sekretion vom TGN. Sekretorische Proteine wurden während der Vesikelbildung und -reifung aufkonzentriert in den Sekretorischen Vesikeln.

Synaptische Vesikel (Nervenzellen, einige Endokrine Zellen) werden durch Endozytische Vesikel und Endosomen geformt. Sie sorgen für die Regulierte Sekretion von kleinen Molekül Neurotransmittern.

Endozytose

Zellen nehmen Flüssigkeit, Makromoleküle und Partikel durch die Endozytose auf. Bei der Endozytose invaginieren lokale Regionen der Plasmamembran und werden abgeknipst um, Endozytische Vesikel zu formen.

Endozytose Passiert sowohl konstitutiv, als auch getriggert auf extrazelluläre Signale. Man unterscheidet Phagozytose und Pinozytose.

Rezeptoren und deren Liganden werden in Clathrin gecoateten Vesikeln abgepackt, bei einem Prozess, der rezeptor-mediated endocytosis genannt wird. Die gecoateten Vesikeln werden ihre Clathrinhülle schnell abwerfen und mit frühen Endosomen fusionieren.

Die meisten Liganden Dissozieren von ihren Rezeptoren in der aciden Umgebung der Endosomen. Rezeptoren können entweder zur PM geführt und so rezykliert werden, oder den Lysosomen für die Degradierung zugeführt werden.

Frühe Endosome reifen progressiv zu späten Endosomen, welche mit Lysosomen fusionieren.

Intermediate Filaments

Gibt es in Zellen und Geweben, die starker, mechanischer Belastung ausgesetzt sind.

Verhindern exzessives Strecken der Zellen und Geweben, erhöhen physische Stärke

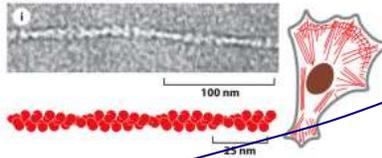
Verbinden Epithelzellen miteinander und zur extrazellulären Matrix durch Junctions (Desmosomen und Hemi-Desmosomen).

Formen ein Stabiles und nicht lösliches Netzwerk von Nanofibrillen (Nägel, Haare, Klauen, Schuppen und die äussere Hautschicht).

Vier verschiedene Molekülklassen (lamins, vimentins, keratins (epithelial) and neurofilament proteins (axonal)), unterschiedlich in verschiedenen Zelltypen (das Menschliche Genom encodiert 70 verschiedene Gene für durchschnittliche Filamentproteine).

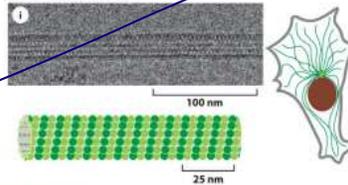
Actin, MT und IF Übersicht

ACTIN FILAMENTS



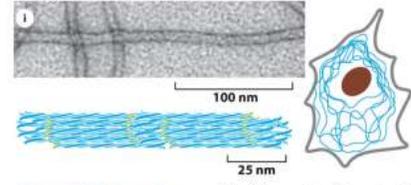
Actin filaments (also known as microfilaments) are helical polymers of the protein actin. They are flexible structures with a diameter of 8 nm that organize into a variety of linear bundles, two-dimensional networks, and three-dimensional gels. Although actin filaments are

MICROTUBULES



Microtubules are long, hollow cylinders made of the protein tubulin. With an outer diameter of 25 nm, they are much more rigid than actin filaments. Microtubules are long and straight and frequently have one end attached to a microtubule-organizing center (MTOC) called a

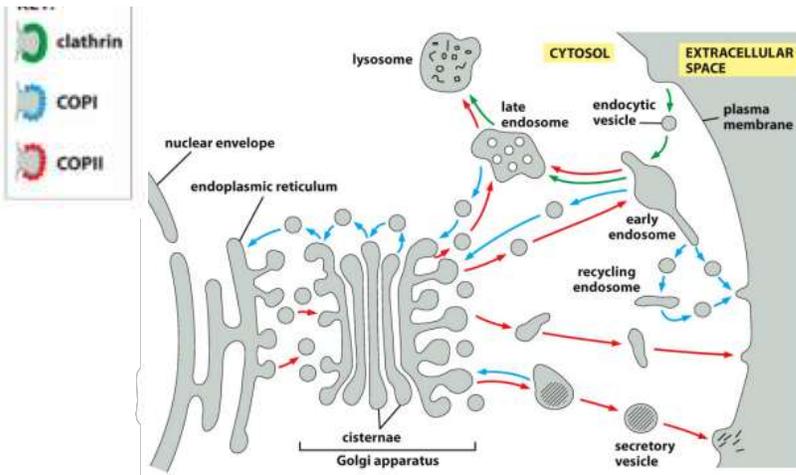
INTERMEDIATE FILAMENTS



Intermediate filaments are ropelike fibers with a diameter of about 10 nm; they are made of intermediate filament proteins, which constitute a large and heterogeneous family.

Vorlesung 1

Grundsätzlich sind Vesikel Transportwerkzeuge für die Zelle, die sich von bestimmten Kompartimenten (wie z.B. dem ER) abschnüren und wieder mit bestimmten Kompartimenten (wie z.B. dem Golgi-Apparat) fusionieren können. Dabei gibt es verschiedene Wege. Nachfolgend wird der Sekretorische Weg beschrieben.



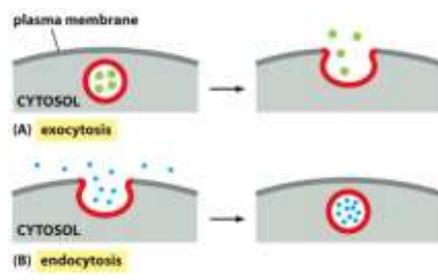
Endosome: Die Frühen Endosomen erhalten zuerst Fracht von aussen und sortieren diese. Die späten Endosomen können aus den frühen Endosomen entstehen und sind den Lysosomen vorgelagert.

Lysosome: Verdauen Stoffe

Exozytose: Abgabe → Endotatation
Endozytose: Aufnahme

Das Milieu in den Vesikeln ist dabei gleich, wie das, aus dem Kompartiment ab dem es abgeschnürt wurde.

→ Membranen wichtig, Recycling

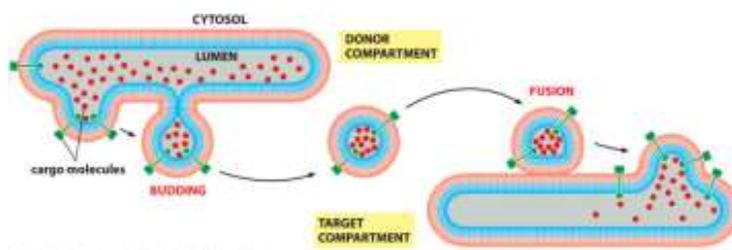


2 Formen vom Sekretorischen Weg:

Bei der **Exozytose** fusionieren die Vesikel am Ende mit der Plasmamembran und geben ihren Inhalt frei. Dabei wird die Membran des Vesikels Teil der Plasmamembran.

Bei der **Endozytose** werden Substanzen vom ausserhalb der Zelle in ein Vesikel abgepackt und ins Zellinnere gebracht.

Transport von einem Kompartiment zu einem Zielkompartiment durch Vesikel



Transportvesikel dienen als Transportcontainer für lösliche Proteine und Membranproteine, die durch den Sekretorischen Weg transportiert werden.

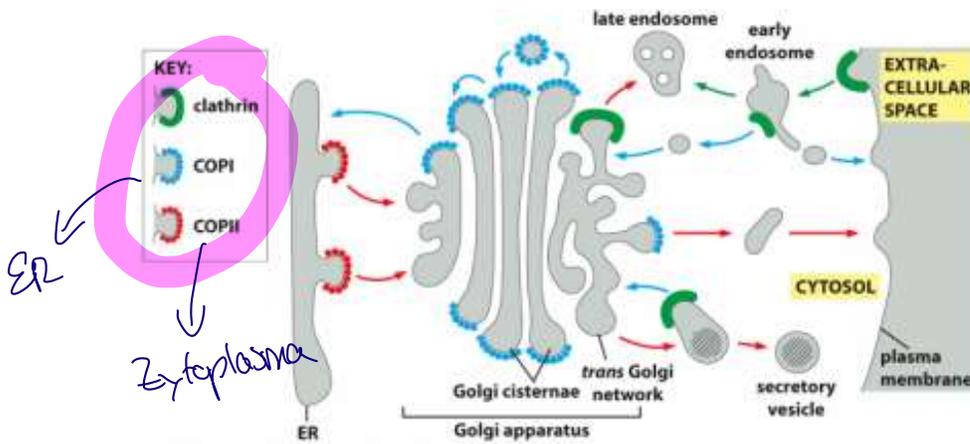
manchmal Rezeptoren

Vesikelhüllen

Vesikelformung benötigt Membranhüllenproteine mit zwei wichtigen Aufgaben:

1. Frachtmoleküle werden im Vesikel konzentriert
2. Helfen, das Vesikel zu Formen, und dass es die richtige Form bekommt (Kugeln)

Diese Hüllen werden dann später verloren, da das Vesikel nur ohne Hülle fusionieren kann.



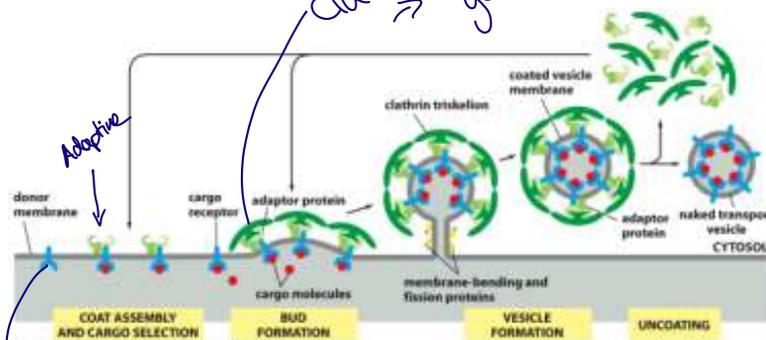
3 Arten von Vesikelhüllen:

- Clathrin: von der Plasmamembran zu Endosomen, zwischen Endosomen und Golgi, von TGN zu Endosomen
- COP1: Bilden sich am Golgi-Apparat für Vesikel innerhalb des Golgi-Apparats und für Vesikel vom Golgi-Apparat zu ER

- COP2: Bilden sich am ER und sind für abknospung von ER Vesikeln notwendig

Bildung und Entlassung von Hüllenvesikeln

Clathrin Vesikel Formung

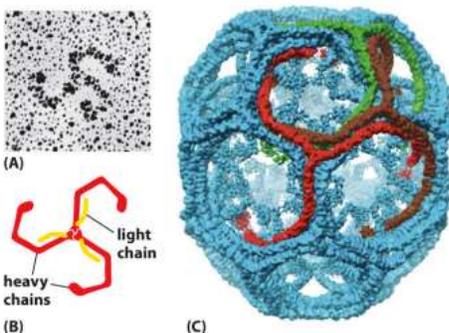


Clathrine zwingen membran zu vesikefformen

Die Formung von Adapterproteinen und dem Clathrin (2 Schichtig) auf der Cytosolseite der Membran generiert eine Kraft, die zur Bildung von Clathrin gehüllten Vesikeln führt.

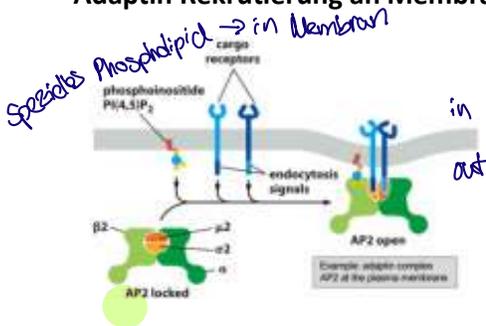
Adaptermoleküle (z.B. Adaptin, hellgrün) Rekrutieren Clathrin und sorgen auch für Fixierung der Fracht.

Clathrin Struktur



Clathrin besteht aus 3 grossen und 3 kleinen Subunits und hat die Struktur von drei gebogenen Ketten (= Triskelion). Viele Clathrine zusammen bilden eine Abwechselnde Struktur aus Hexagonen und Pentagonen (wie ein Fussball) und bilden dann eine Kugel.

Adaptin Rekrutierung an Membranen



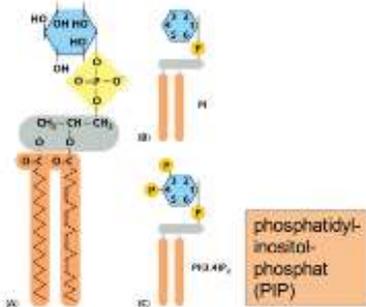
Adaptine interagieren mit Cargo Rezeptoren in der Membran. Phosphoinositide stimulieren die Bindung von Adaptinen zu Cargo Rezeptoren. Sobald das Phospholipid an eine Untereinheit des Adaptins bindet, so wird der AP2 (Adaptin) Komplex an die Membran rekrutiert und dessen Bindungsstelle für die Cargo Rezeptoren geöffnet. Coincidence detection: PIPs und Cargo Rezeptoren müssen präsent sein für die Bindung mit Adaptinen.

PIP

lipide ->

phosphatidyl-inositol (PI)

- can be phosphorylated at 3', 4' and 5 positions of the inositol sugar head groups



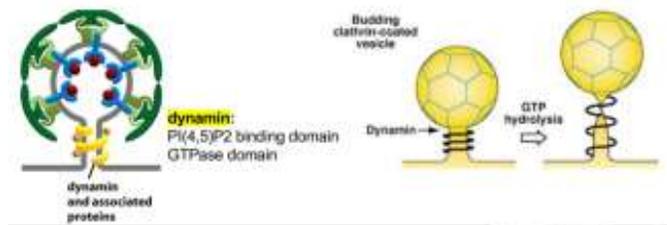
Ist ein Abkömmling von Phosphatidyl-inositol (PI). Dieses lässt sich an 3', 4' und 5' Positionen phosphorylieren, was die Möglichkeit bietet, verschiedene Formen des Phospholipids zu erzeugen.

PIP-Kinasen und -Phosphatasen sind hoch kompartementisiert (befinden sich an spezifischen Orten) und konvertieren diese PIP Spezies ineinander. Die Verteilung dieser Kinasen bestimmt dann, welches dieser PIP an welcher Membran gebildet wird.

PIP Bindungsproteine Regulieren Vesikel Formung und andere Transportprozesse.

Auch andere Membrankrümmungsproteine wie beispielsweise das leicht gekrümmte, positive Innenoberfläche besitzende BAR Dimer unterstützen zusätzlich die Vesikelbildung.

Abschnürung von Clathrin Vesikeln



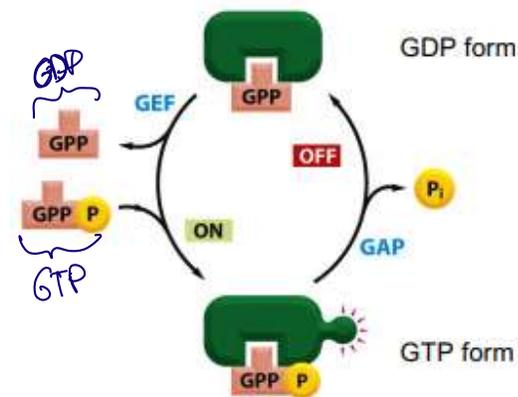
- schneuert ab
Dynamin ist eine Spiralförmige GTPase. Durch Hydrolysierung wird eine konformationelle Änderung des Proteins erzeugt, die zu einer Verlängerung der GTPase führt, die dann das Vesikel abschnürt. *wird durch Hydrolyse lang*

Danach wird die Proteinhülle (Clathrin) entfernt. Dazu muss zuerst Dynamin wieder phosphoryliert (durch Phosphatase) werden. Danach entfernen Hsp70 Chaperone die Hülle.

*↑
 Clathrinhülle
 Clathrine nur für Bildung*

COPI / COPII Vesikel Bildung

Kleine GTPasen



Kleine GTPasen befinden sich überall in der Zelle und fungieren als Schalter. Sie hydrolysieren GTP langsam, nur die GTP Form ist aktiv und sie benötigen:

- **GAP für die Aktivierung:** Dabei hydrolysiert GAP GTP nicht direkt. Es aktiviert nur die Funktion von der GTPase, GTP zu hydrolysieren
- **GEF, um das Produkt zu entfernen:** GPP wird entfernt. Da die Konzentration an GTP etwa 10 mal so hoch ist als die von GDP, wird automatisch ein GTP an die GTPase binden

GAP und GEF sind separiert, sodass die GTPase weiss, wo es sich befindet (ähnlich wie bei RanGTP)

Alle Vesikuläre Transportschritte involvieren kleine GTPasen, welche aktiv (mit GTP) membrangebunden (besitzen einen lipophilen Teil, der nur exponiert ist, wenn GTP gebunden ist) und inaktiv (mit GDP) gelöst sind.

Sar1 (for COPII):

ARFs (for COPI):

Rabs (for vesicle targeting):

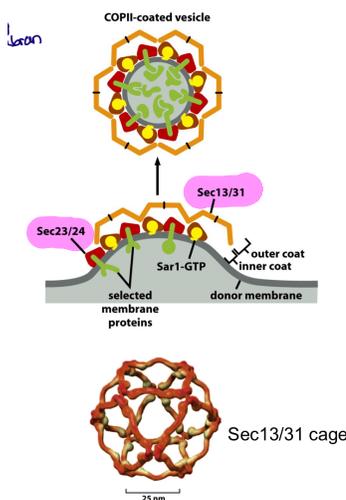
amphipathic helix

myristyl group at the N-terminus

prenyl group (geranylgeranyl) at the C-terminus

COPII Vesikel werfen ihre Hülle langsam ab, COPI Vesikel und Clathrin Vesikel werfen die Hülle sofort nach ihrer Abschnürung ab.

Sar1 GTPase



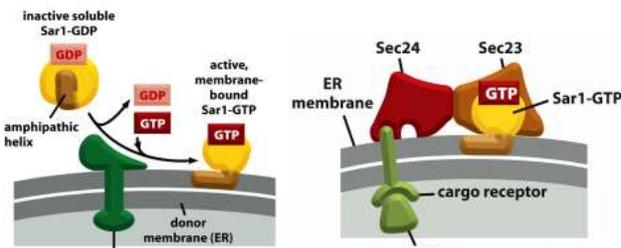
Ähnlich wie bei Clathrin besteht ein COPII gehülltes Vesikel (z.B. Sar1) auch aus einer inneren Hülle von Sec23 (interagiert mit Sar1-GTP) / Sec24 (interagiert mit Membranproteinen und Cargo Rezeptoren) Heterodimeren. Die äussere Hülle bildet ein Sec13 / Sec31 Käfig (ähnlich wie beim Clathrin).

Dabei helfen die Hüllenproteine die Fracht zu konzentrieren und die Hüllenformung führt zur Formung vom Vesikel (wie beim Clathrin).

→ wölbt sich, binden nacheinander

Wie die **GTPase Sar1** die treibende Kraft für die **COPII Hüllenformierung** ist

hydrolysiert

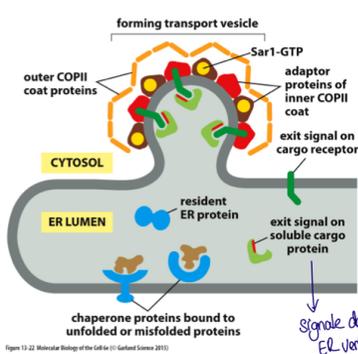


1. Aktivierung von Sar durch an Membran befindlichem Sar-GEF (Sec12). Dabei führt eine Konformationsänderung am Sar zu einer Anlagerung der amphipathischen Helix in die Membran.

2. Das Sar1 Rekrutiert COPII Komponenten Sec23/Sec24. Sec24 bindet an Cargo Rezeptor und an Lipide

3. Die äussere Vesikelhülle (Sec13/Sec31) werden rekrutiert. Dies führt zu einer Krümmung und dem Vesikel Budding. Später fusioniert die Membran und es kommt zu der Ablösung des Vesikels.
→ Cop löst sich anders als dadrin

Rekrutierung von Cargo in Vesikel



Membranprotein Fracht: Besitzt ein Exit Signal, welches direkt mit der Vesikelhülle interagiert.

Lösliche Fracht: Exit Signale werden von Cargo Rezeptoren erkannt
↳ bindet an Proteine

Bulkflow: ohne Exit Signale, passiert immer *→ mit Konzentrationsmassenstrom*
 Also: Die Vesikelhülle ist auch dazu da, Cargo aktiv in die Vesikelhülle einzuschliessen!
gefalte

Zielsteuerung von Vesikeln

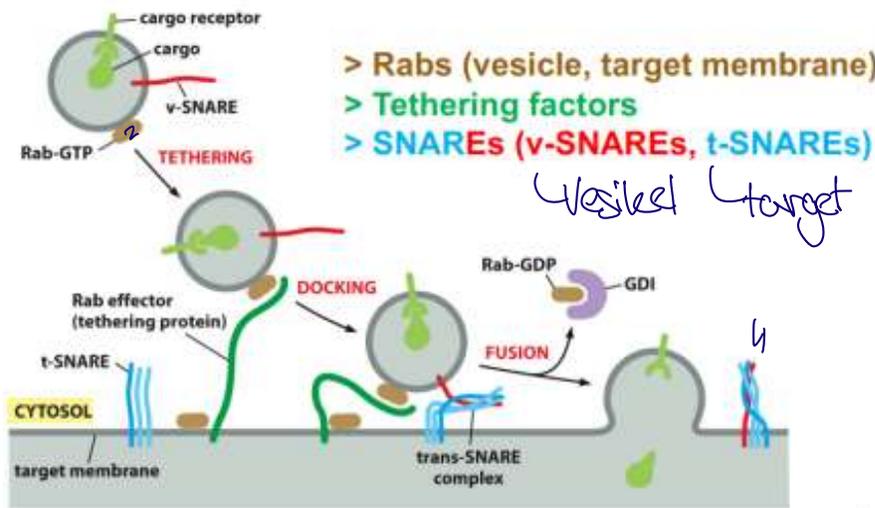
Zielsteuerung muss extrem genau sein, da gewisse Vesikel Fracht enthalten können, die in der falschen Umgebung toxisch sein können. Aus diesem Grund gibt es verschiedene Vesikel Zielsysteme, die wichtigsten 4 sind:

- 1 **PIPs** fungieren als Marker um bestimmte Membranen als Vesikelziel zu kennzeichnen
- 2 **Kleine GTPasen (Rabs)** können in ihrer aktiven form (GTP) in der Vesikelmembran und an der Akzeptorkompartiment Membran vorkommen *20-25 kDa*
- 3 **Extended tethering proteins** (langgestreckte Anheftproteine) befinden sich auf der Oberfläche von Kompartimenten und dienen dazu, Kompartimente wie Angeln einzufangen
- 4 **SNARE Proteine** als v-SNARE in Vesikeln und t-SNARE an der Zielfmembran: Diese müssen passen, um die Membranfusion zu ermöglichen

Übersicht über 3 der 4 Systeme

Rab-GDP : löslich

Rab-GTP : nicht löslich



Rab-GTPase

Spezifische Rab-GTPasen werden von tethering Proteins der Zielmembran erkannt.

Die GDP form ist inaktiv, die GTP form ist aktiv, GEFs und GAPs sind wichtig für de-/aktivierung (siehe oben).

In der aktiven Form klappt ein Geranyl-Geranyl Rest

am C Terminus aus, welcher die Membranbindung erlaubt. In dieser Form können sie auf Vesikel- und Zielmembranen vorkommen. Einige Membranen besitzen mehr als nur ein spezifisches Rab.

Effektoren (gegenstück von RanGTP) regulieren die Targeting- und Dockingmaschinerie und sorgen so für korrektes Tethering / Docking am richtigen Zielort. Ein Rab kann mit multiplen Effektor Molekülen binden, die z.B. Tethering Factors, SNAREs, Enzyme, Motorproteine oder andere sein können.

Die Hauptfunktion der Rab-GTPase ist sicherzustellen, dass das Vesikel an die korrekte Zielmembran andockt durch interagieren mit tethering Proteinen, das Dockingevent organisiert und die Fusion anregt.

Im Cytosol ist die GDP Form an Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors (GDIs) gebunden, welches dafür sorgt, dass die Geranyl-Geranyl Gruppe abgedeckt wird, dass das Molekül löslich bleibt.

Rab Zyklus

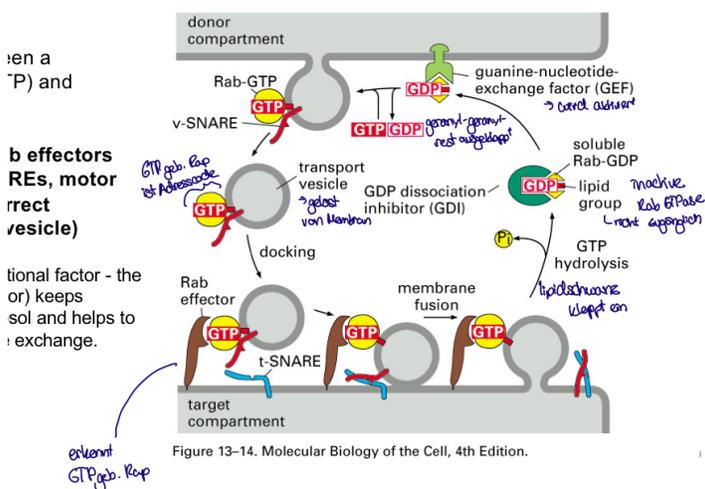


Figure 13-14. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

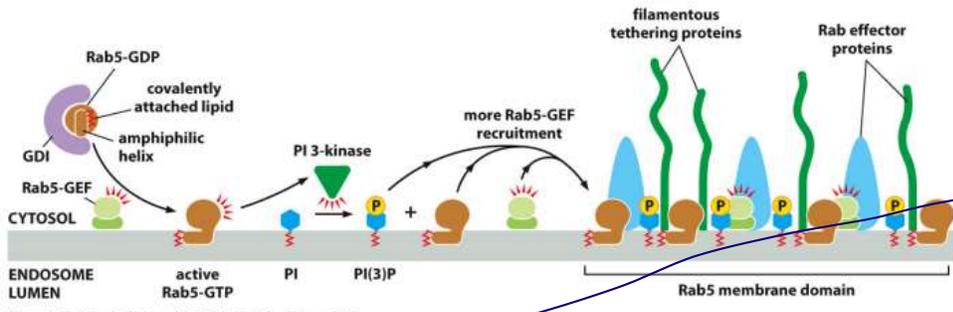
Die GTPase bewegt sich in der Membrangebundenen form (GTP) und der gelösten Form (GDP) hin und her.

RabGTP interagiert mit Rab Effektoren.

GDI sorgt dafür, dass RabGDP löslich bleibt und hilft, dass kein ungewollter Nukleotidwechsel stattfindet.

RabGTPasen an der Zielmembran organisieren Tethering Proteine

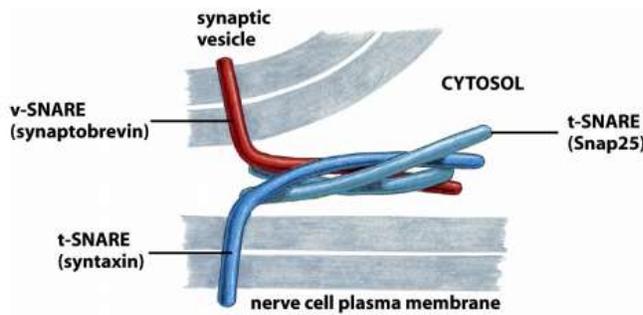
*Kooperativer Prozess
→ steigert sich selbst*



Die Frühen Endosomen sind die ersten Zielorte für endozytose Vesikel. RabGTPasen bilden Rab5 domänen (erstes Ziel).

Das Rab5-GDP wird durch ein Rab5-GEF an der Membran aktiviert. Das aktivierte Rab5-GTP rekrutiert eine PI3-Kinase, die ein PI an 3' Position phosphoryliert. Dieses kann dann Rab Effektoren (wie Tethering Proteine) rekrutieren sowie weiteres Rab5-GEF, sodass mehr Rab5-GTP entstehen kann und immer so weiter. -> Kooperativer Prozess, bei dem grosse, spezifische Membranbereiche entstehen.

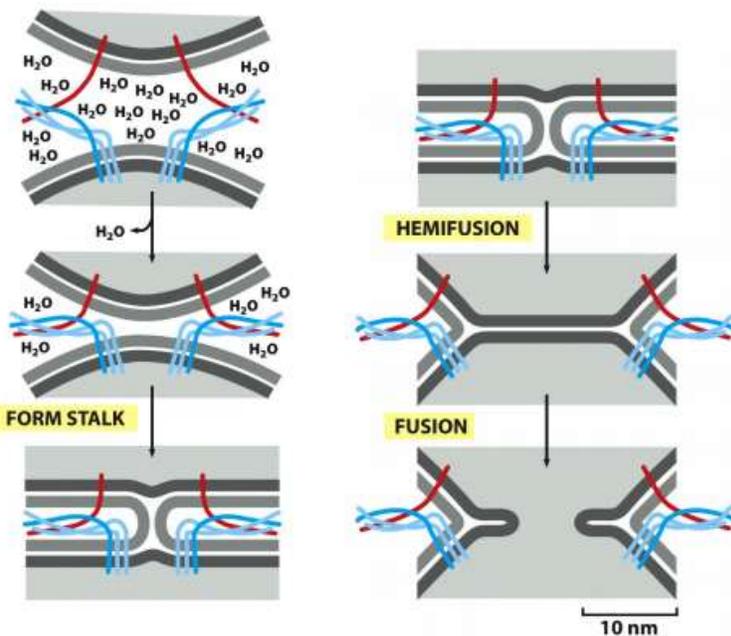
SNAREs



Komplementäre Sets von 1 v-SNARE und 3 t-SNAREs können ein 4 Helix Bündel bilden.

Einmal aneinandergelassen, werden die beiden Membranen durch die SNAREs 1.5nm aneinandergelassen, wodurch dann ein Phospholipidaustausch der zwei Membranen stattfinden kann und die Fusion passiert. Dazu muss aber das Wasser, dass sich zwischen den Membranen befindet, verdrängt werden. Dies passiert durch die SNAREs. Die Bildung von trans-SNARE Komplexen sorgt ausserdem dafür, dass die Energiebarriere (2 geladene Membranen treffen aufeinander) überwunden werden kann.

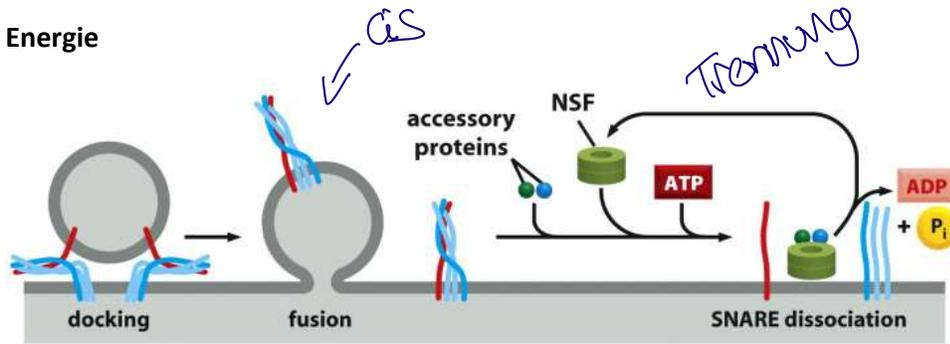
Einmal aneinandergelassen, werden die beiden Membranen durch die SNAREs 1.5nm aneinandergelassen, wodurch dann ein Phospholipidaustausch der zwei Membranen stattfinden kann und die Fusion passiert. Dazu muss aber das Wasser, dass sich zwischen den Membranen befindet, verdrängt werden. Dies passiert durch die SNAREs. Die Bildung von trans-SNARE Komplexen sorgt ausserdem dafür, dass die Energiebarriere (2 geladene Membranen treffen aufeinander) überwunden werden kann.



Durch aufwinden der SNAREs und aneinander ziehen der beiden Membranen wird das Wasser verdrängt und zuerst fusionieren nur die äusseren Leaflets der Membranen (Hemifusion). Durch weiteres aufwinden der SNAREs kann dann auch die Fusion der inneren Leaflets der Membranen stattfinden.

→ drücken, aneinander Membranen

Energie



Die Energie für die Annäherung wird dabei durch das aufwinden der SNAREs geliefert. Ist die Fusion abgeschlossen, bleiben die SNAREs

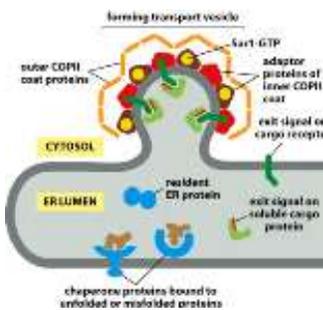
ineinander gewickelt (cis Position, da an nur einer Membran). Die Zelle muss dann Energie in Form von ATP aufwenden, um diese wieder zu lösen. Der AAA+ ATPase NSF (AAA+ = ATPases Associated with diverse cellular Activities) Komplex ist dafür zuständig.

Vorlesung 2

Verlassen von Fracht am ER

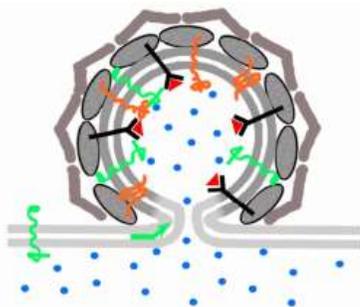
ER → Golgi

ER Exit Sites (oder transitional ER): Sind spezialisierte Bereiche des glatten ER, an welchen die Vesikel das ER verlassen.



Stoffe verlassen das ER durch COPII-gehüllte Transportvesikeln. Ungefaltete Proteine oder Subunit Proteine, die noch nicht zusammengesetzt wurden werden im ER zurückgehalten. Ausserdem werden auch ER Proteine zurückgehalten, da diese grosse Proteinnetzwerke bilden.

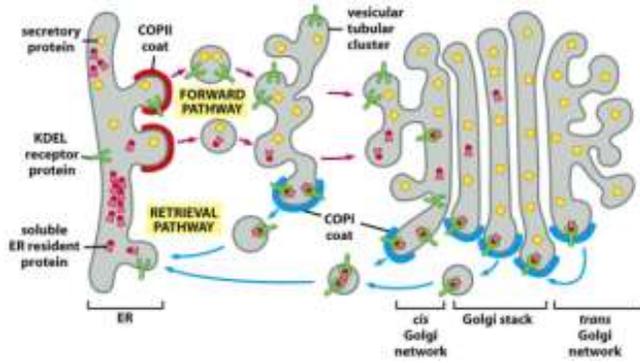
Bulkflow: ist der default Pathway, findet ständig statt. Alle Proteine, die sich im ER Lumen befinden, werden im Vesikel eingeschlossen, ohne interaktion mit der Vesikel Hülle. Dies passiert nicht mit den aktiv zurückgehaltenen Proteinen sowie mit den Proteinen von grossen Netzwerken.



Key	
• Soluble cargo transported by bulk flow	Membrane cargo proteins equipped with export signal in their cytosolic tails
◀ Soluble cargo captured by receptors	Membrane cargo protein that enters budding vesicle by partitioning
◐ Adaptor proteins of the inner layer of the coat	Cage-forming proteins of the outer layer of the coat
	◐ Cargo receptor

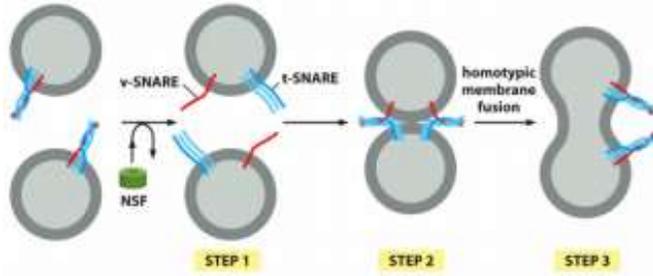
Wie man am Bild links sehen kann, gelangen alle löslichen Proteine im ER durch Bulkflow ins Vesikel. Jedoch werden nur die (roten) Proteine mit Signalen auch angereichert. Der Eintritt von Fracht ins Vesikel passiert also automatisch, kann aber ein selektiver Prozess sein.

von ER zu Golgi



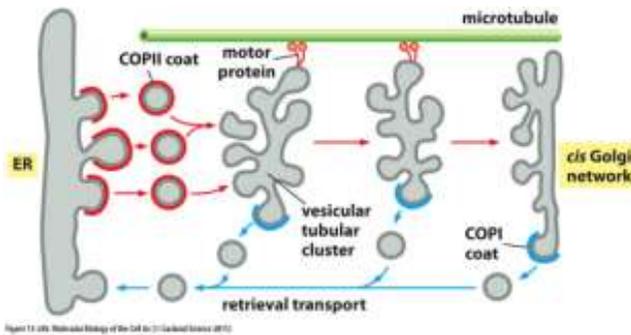
Nachdem die COPII umhüllten Vesikel ihre Hülle verloren haben können sie miteinander fusionieren (homotypische Fusion) und bilden Vesicular tubular clusters (VTCs)

↳ Zwischenmembranbildung
→ nicht beständig



Diese homotypische Fusion benötigt ein Set von zueinander passenden SNAREs. Die Interaktionen sind Symmetrisch.

VTCs (Vesicular Tubular Cluster)

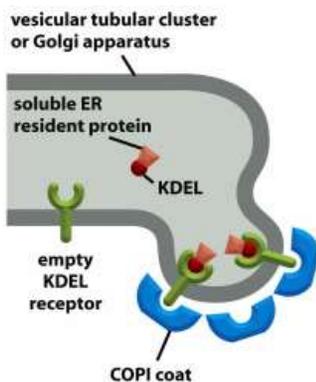


- besitzen ein neues Kompartement, das getrennt vom ER ist
- Sind Transportcontainer (ER -> Golgi)
- **Bewegen sich entlang Microtubules zum Golgi-Apparat** → Zytoskelett
- **Formen COPII gehüllte Vesikel, um Fracht zum ER zurück zu überführen**

COPI : Golgi → ER
COPII : ER → Golgi

Rücktransport von Golgi zum ER

COPI Vesikel gehen vom Golgi zum ER und enthalten ER Proteine, Cargo Rezeptoren und SNAREs, die **rezykliert** werden. Diese Proteine besitzen Signale, die sie ins ER zurückbringen. Dieser Rücktransport ist essenziell, um den sekretorischen Weg aufrecht zu erhalten.



Der KDEL Weg

→ alles zurück wo es herkommt

ER Protein Retrieval Signal (nur lösliche Proteine): **C-terminales KDEL motif** → KDEL Rezeptor

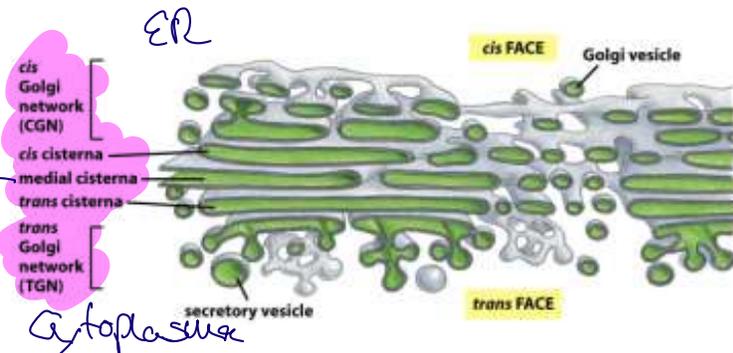
Membranebundene Retrieval Signal Rezeptoren: **KDEL Rezeptor**

Bindung und Ablösung von KDEL Proteinen an den Rezeptor ist **pH reguliert** (pH Wert im ER ist höher als der im Golgi-Apparat).

Der Golgi Komplex

→ cis, trans und medial sind ununterscheidbar (pt)

Besteht aus einem Stapel von Membran Kompartimenten (Zisternen), Tubulären Elementen und Vesikeln. Besonders ausgeprägt ist er in Zellen, die in der Sekretion spezialisiert sind.

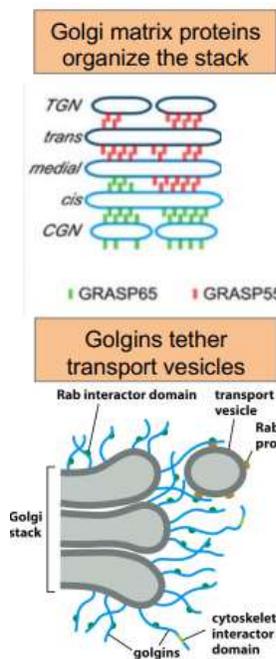


Ein Golgi Stapel besteht im Normalfall aus 4-6 Zisternen. Ein oder mehrere Stapel (bis zu 100) sind tubulär verbunden. Sekretorische Fracht bewegt sich direkt von cis zu trans (polare Organelle). Er befindet sich in der Nähe des Nukleus (Zentrosoms).

Das CGN ist die Sortierungsseite, bei welcher die Vesikel vom ER ankommen.

Das TGN ist die Sortierungsseite, bei welcher der Zielort von Fracht bestimmt wird.

Organisation des Golgi-Apparats



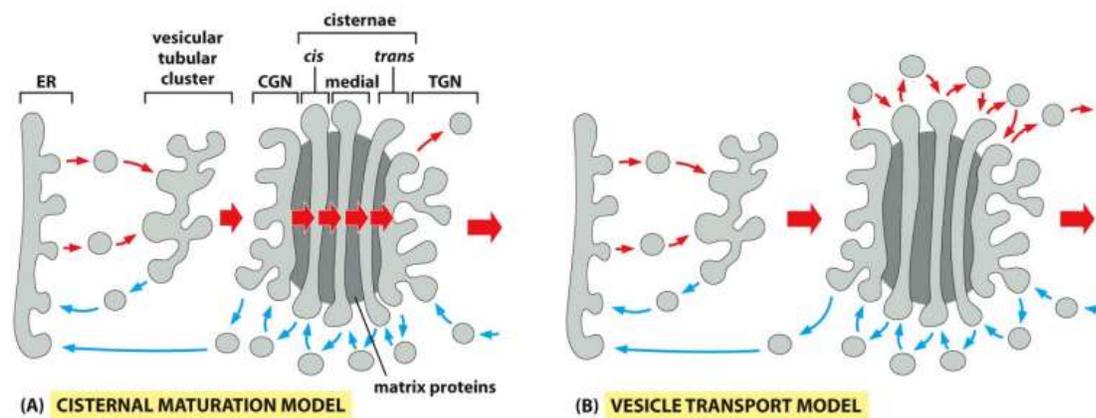
Golgi Matrix Proteine formen ein Gerüst zwischen den Zisternen.

Golgins sind Tether Proteine (siehe vorherige Vorlesung), die Transportvesikel in der Nähe halten. → viele auf einmal ausgeschüttet

Enzyme im Golgi-Apparat sind unterschiedlich im TGN, dem medialen Teil (Mitte) und dem CGN.

Platten: cisternen

Wie funktioniert Traffic durch den Golgi-Apparat



Es gibt zwei Modelle:

Zisternen Reifung Modell

Transport passiert durch Zisternen Reifung
 VTC bringt Fracht zu Golgi, bildet neue Zisterne
 Am TGN lösen sich Zisternen wieder auf
 Exp.: Grosse Moleküle Transport ohne Vesikel
 Und: In Hefe: Zisternen können Enzyme ändern

Wirklichkeit: Mischen

Vesikel Transport Modell

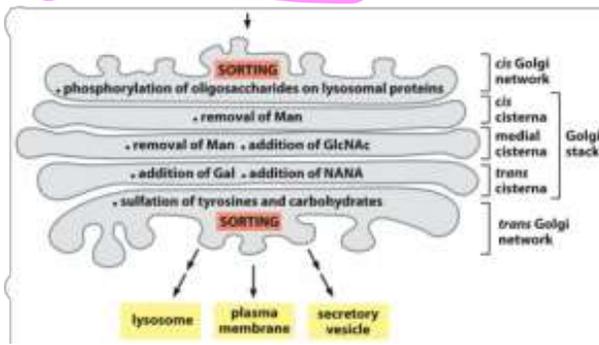
VTC bringt Fracht zum CGN
 Aller Transport dann passiert mit Transportvesikeln
 Exp.: Vesikel legen lange Distanzen zurück
 Und: Aggregierte Golgi Membranen bleiben an Platz

Weitere Funktionen des Golgi-Apparats

Glycoproteine: keine Zucker

- Kohlenhydrat synthese und Prozessing → Veränderung von Proteinen nach Synthese
 - N-linked Zucker: trimming und terminale Glykosylierung (siehe E Vorlesung 3) an AA mit Rest mit N
 - O-linked Zucker: Synthese von Glycosaminoglycanen und bildung von Proteoglycan mit OH-Gruppe
 - Synthese von Mannose-6-Phosphat (siehe Vorlesung TGN)
- Aminosäuren Modifikation
- Synthese von Sphingomyelin und Sphingoglycolipiden von Sphingosin (wird später noch erklärt)
- Proteocyclischer Prozessierung von Proteinen wie z.B. Pro-Hormone
- Sortierung und Packung von Fracht zu verschiedenen zellulären Zielorten

Enzyme im Golgi-Apparat



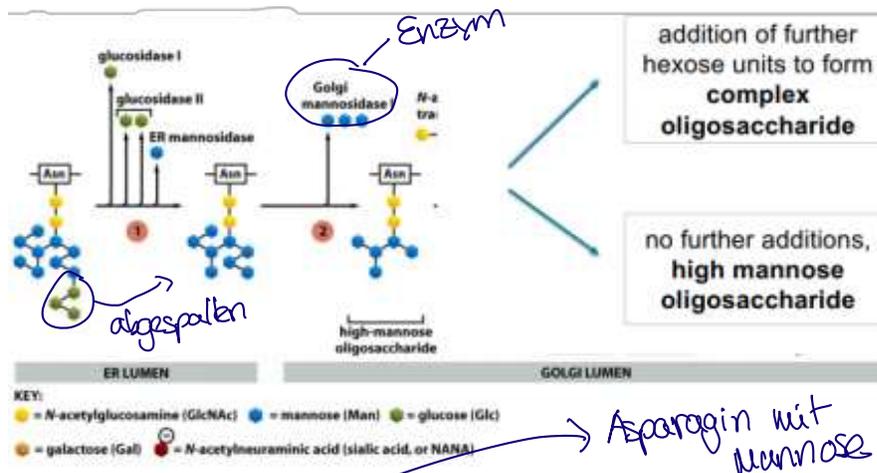
- **Glycosidasen:** Verkürzen Zuckerketten
- **Glycosyltransferasen:** Verlängern Zuckerketten
- **Transporter:** Transportieren aktive Zucker (verknüpft an Nukleotid) vom Cytosol in den Golgi-Apparat
- **Convertase Enzyme:** Proteolytische Prozessierung von Proteinen (Zerschneiden Proteine um sie zu aktivieren)

- **Sulfo-transferasen:** Fügen Sulfatgruppen an Proteine und an Zucker

Diese Proteine sind alle Membrangebunden (nicht wie im ER) und viele befinden sich in Multi-Enzym Komplexen. Golgi Glycosidasen und Glycosyl Transferasen sind einfach Membranspannende Proteine (Typ 2 (N-Terminus im Cytosol, C-Terminus im Lumen, kurze 15 aa Membrananker)). All diese Eigenschaften sorgen vermutlich dafür, dass die Enzyme im Golgi bleiben und um dessen Sekretion zu verhindern. (Anker sind zu kurz, um in Vesikel Membran verpackt zu werden).

Prozessierung von N-Linked Kohlenhydraten im Golgi-Apparat

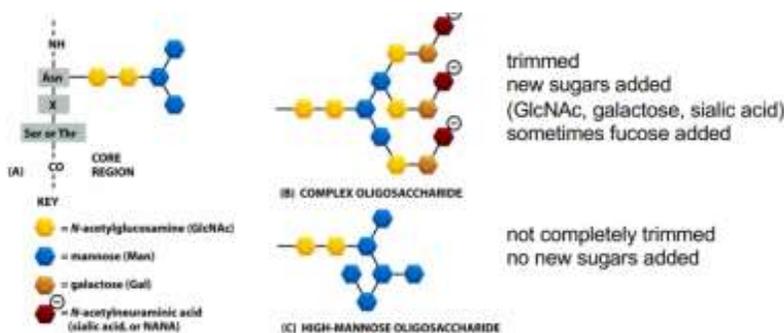
→ meist Asparagin



Ein Oligosaccharide («Zuckerbaum») wird im ER an ein Protein angehängt und, sofern das Protein genügend Prozessiert wurde, noch im ER bearbeitet. Dann verlässt das Protein das ER und wird zum Golgi-Apparat transportiert. Im Cis-Golgi treffen sie auf die Golgi Mannosidase I

und stellen das High-Mannose Oligosaccharide her. Von da an gibt es zwei Möglichkeiten:

- Das Zuckerbäumchen wird zu einem Komplexen Oligosaccharide verändert *→ polares (neg. Ladung) (lost sich in H₂O)*
- Keine weiteren Veränderungen und das Zuckerbäumchen bleibt im Golgi und im weiteren Transport durch die Zelle unverändert



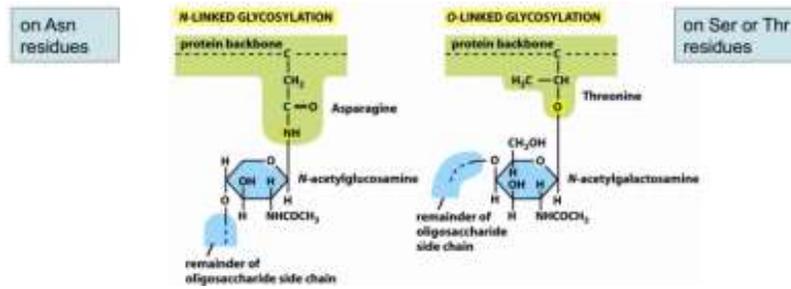
Die links abgebildeten zwei Oligosaccharide können also generiert werden.

Die negative Ladung führt dazu, dass die Zucker noch Hydrophiler und in Wasser löslicher werden.

Figure 13-30 Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)

Synthese von O-linked Glykosylierung

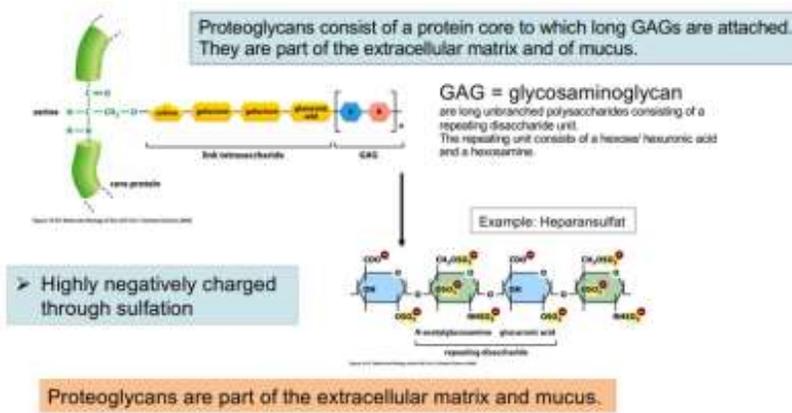
OH-Gruppe



Diese Synthese findet nur im Golgi-Apparat statt und findet an einem Sauerstoff statt (Ser, Thr).

Auch hier können sehr lange Zuckerketten gebildet werden, aber der erste Zucker ist ein N-acetylgalactosamine.

oder N-acetylglucosamin

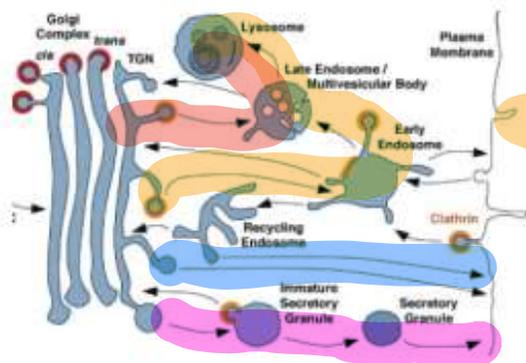


Die Proteoglykane werden ebenfalls an ein Ser gehängt. Diese bestehen aus einem Proteinkern und langen Ketten aus abwechselnden GAGs. Diese sind stark negativ geladen. Aus diesem Grund können sie viel Wasser anziehen und hochelastisch werden.

Aminosäuren Modifikation

PAPS ist ein Sulfat Donor für Protein und Zucker Sulfation

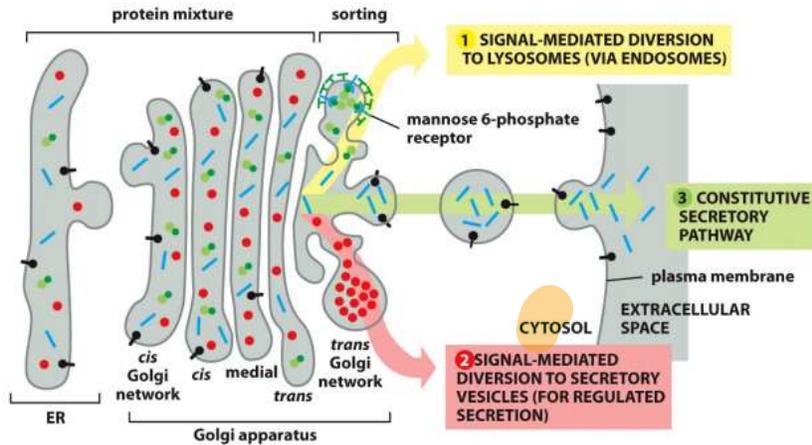
Wie Frachtmoleküle das Trans Golgi Netzwerk verlassen



Vom Trans Golgi Netzwerk (links) können...

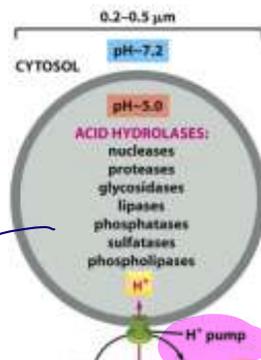
- Stoffe zum späten Endosom dann zum Lysosom
- Stoffe zuerst zum frühen dann zum späten Endosom dann zum Lysosom
- Stoffe direkt zur Plasmamembran
- Stoffe durch den regulierten Weg zur Plasmamembran

...gelangen.



Lysosomen

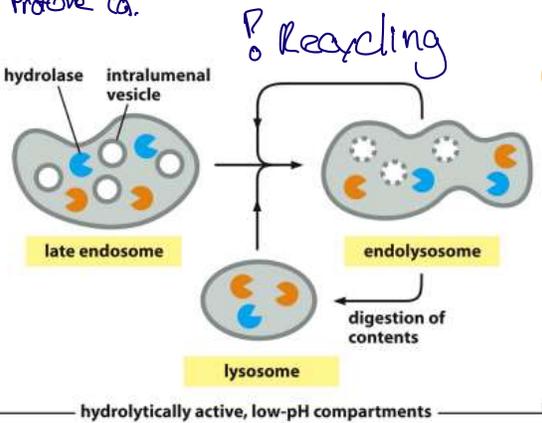
Mittlerer einer Zelle



insg 40 Proteine ca.

Der Name Lysosom leitet sich von den griechischen Wörtern Lyse, was zu trennen bedeutet und Soma, was Körper bedeutet, ab. Lysosomen sind membranumschlossene Kompartimente gefüllt mit löslichen **hydrolytischen Enzymen, die Abfallstoffe und Zellrümpfer auflösen**. Sie kommen **in allen eukaryotischen Zellen** vor. Lysosomen werden in tierischen Zellen so genannt, während in Hefe und Pflanzen die **lytischen Vakuolen** dessen Aufgabe übernehmen. Lysosomen enthalten etwa 40 Arten von Hydrolyse Enzyme. Die Größe der Lysosomen variiert zwischen 0,1 und 1,2 µm. Sie haben ein **saures Lumen (pH 4,5 - 5,0)**, welches durch eine **H+ Pumpe** erreicht wird.

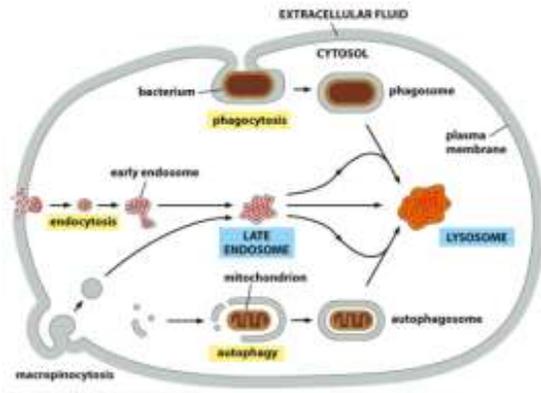
Viele Hydrolasen → funktionieren nur bei dem pH *↳ ATP abhängig*



Endolysosomen entstehen, wenn **späte Endosomen** mit **Lysosomen** fusionieren (durch **SNAREs**). Wenn das Material fast vollständig Verdaut ist, handelt es sich wieder um ein klassisches **Lysosom**. Also: Lysosome reifen aus Endolysosomen. Dies erklärt auch die **Heterogenität der Lysosomalen Morphologie**, die anders ist, je nach Material, welches zur Organelle geliefert wurde und dem Reifegrad.

↳ lysosom = viel verdaut

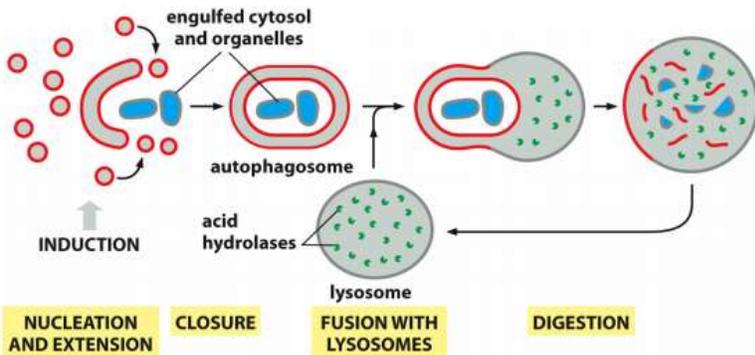
Möglichkeiten, Lysosomen Material zuzuführen



- **Endocytose** (von ausserhalb der Zelle)
- Grössere Partikel und Mikroorganismen werden durch **Phagocytose** aufgenommen (eine spezielle Form der Endocytose)
- Intrazelluläres Material wird durch **Autophagie** übergeben

*↓
eigenes Zellzeug
auffressen*

Autophagie (self-eating) *weil der Hunger kommt*



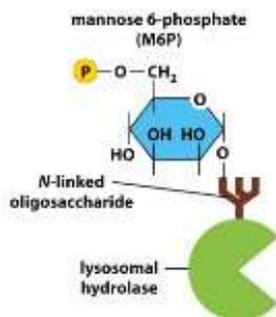
Membran bilden sich um Verdauungsmaterial und bildet Autophagosom. Dieses fusioniert mit Lysosom. (äußere Membran fusioniert, innere Membran und Material wird verdaut)

Dieser Vorgang muss stark reguliert werden, kann selektiv oder nicht sein und wird bei

Zellwachstum- und Änderung, bei Infektion oder Zellhunger benötigt.

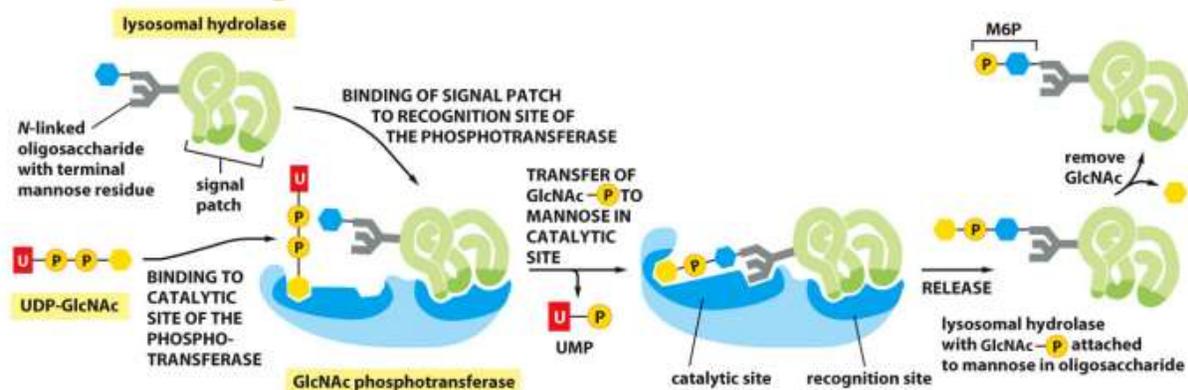
Transport von hydrolytischen Enzymen ins Lysosom

In Golgi synthetisiert gefährlich wenn außerhalb



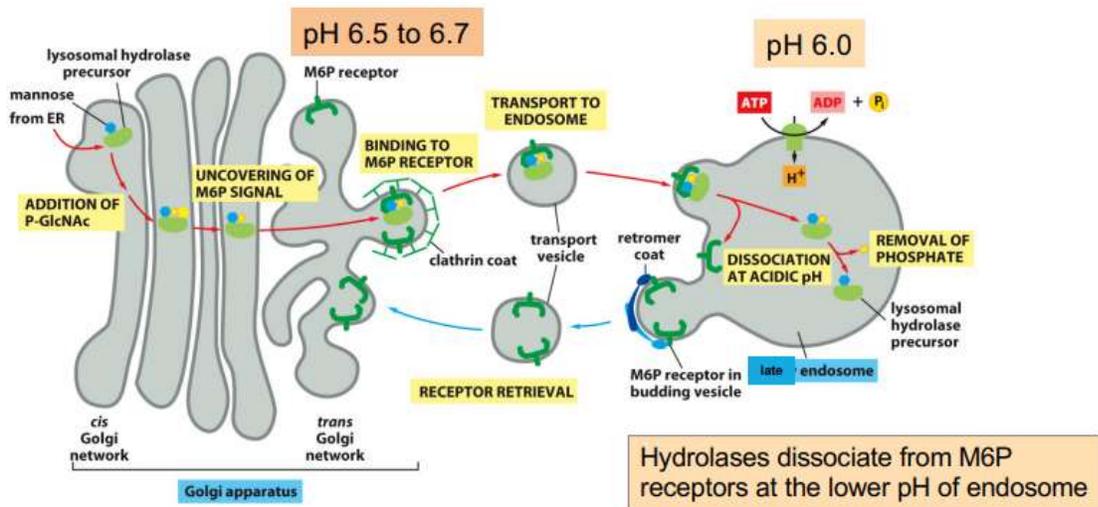
Das **Mannose-6-Phosphat** ist ein Signal (Zucker), welches als **Sortierungssignal** fungiert und Enzyme, die für das Lysosom bestimmt sind markiert. Diese Enzyme werden ins ER transportiert, dann zum Golgi-Apparat.

Das **N-linked Glycan** wird im ER an das Enzym gehängt. Das Mannose-6-Phosphat an dem N-linked Glycan **wird im cis-Golgi gestartet und endet im trans-Golgi**. Der Rezeptor (Vesikel vom Golgi weg) heisst **M6PR, Mannose-6-Phosphat Rezeptor**.



GlcNAc Phosphotransferase erkennt signal patch an Hydrolase und transferiert GlcNAc-Phosphat von UDP-GlcNAc auf die terminale Mannose. Danach wird die Hydrolase entlassen und GlcNAc wird entfernt (terminale Mannose ist nun Phosphoryliert).

VL 10



Durch tieferen pH Wert wird die Hydrolase vom Rezeptor abgelöst im Endosom.

Krankheiten von GlcNAc Phosphotransferase: Lysosomale Speicherkrankheiten

Hydrolasen kommen nicht in lysosom

Defekt in der GlcNAc-Phosphotransferase: Schwerer Sortierdefekt der Hydrolasen I-Zell-Krankheit (Einschlusszellkrankheit): abnormale Mengen von Kohlenhydrate und Lipide reichern sich in den Zellen an; frühe Organfunktionsstörung, geistige Behinderung, früher Tod.

Defekte in bestimmten Hydrolasen (z. B. Morbus Hurler; Glycosaminoglycan) Ketten sammeln sich an; Organschaden)

Vorlesung 3

Sekretion

→ Kontrolle → raus → autotransportierendes etwas

Bei der Exozytose wird Cargo von der Zelle in die Umgebung abgegeben. Die folgenden Substanzen können von Zellen sekretiert werden:

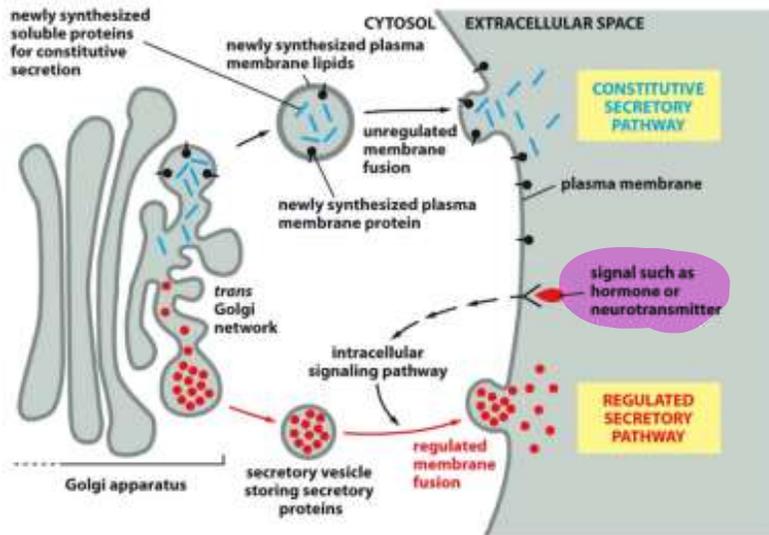
- Hormone, Wachstumsfaktoren, Cytokine
- Carriers von Nährstoffen, Lipoproteine, Vitamine
- Moleküle, welche für die Verteidigung benötigt werden (Antikörper, Interferone)
- Extrazelluläre Matrix (EMC) Komponente (Collagene, Mucine)
- Enzyme
- Serum Bestandteile
- Komplexe Kohlenhydrate (Glycosaminoglycane = GAGs)
- Neurotransmitter
- Toxine, Viren...

Einige Zellen haben als Hauptaufgaben die Sekretion von Stoffen.

↳ Darmepithelzellen

Konstitutive und Regulierte Sekretion

mit Konz. gefüllt



Die **Konstitutive Sekretion** existiert in allen eukaryotischen Zellen und wird benötigt, um Homeostase (Gleichgewicht) der Plasmamembran aufrecht zu erhalten). Konstitutive Sekretion kann aber auch von spezialisierten Zellen benutzt werden, um nur einen bestimmten Stoff zu sekretieren (z.B. Fibroblasten).

Die **Regulierte Sekretion** werden Produkte in **Sekretionsvesikeln** (=Sekretorische Granule, dense-core Vesikel, besitzen hohe

Elektronendichte) gespeichert. Diese Vesikel werden am TGN gebildet. Die Sekretionsvesikel entlassen ihren Inhalt durch Exozytose an der Plasmamembran, nach einem Stimulus.

Maturierung von Sekretionsvesikeln

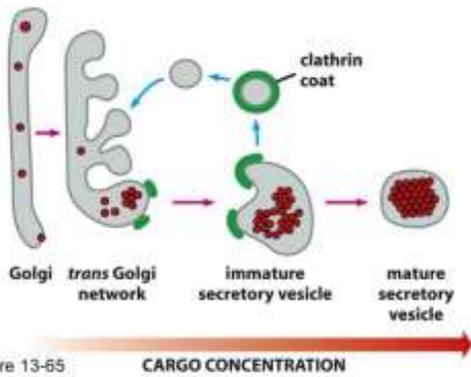
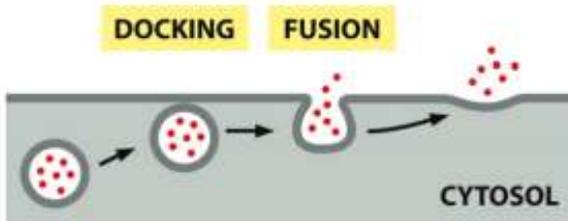


Figure 13-65

Sekretionsvesikel bilden sich am TGN. Durch Aggregation ist die Konzentration an Cargo in diesen schon am Anfang hoch. Mit der Zeit werden Clathrin Vesikel gebildet, die für die Membranrückgewinnung sorgen. Ausserdem wird das Vesikel immer saurer. Am Ende bleibt ein extrem dichtes Vesikel zurück, dass man auch unter dem EM als sehr dunklen Punkt wahrnehmen kann.

Regulierte Exocytose (Regulierte Entlassung der Fracht an der Plasmamembran)

Release of insulin from pancreatic beta cell



Die Sekretionsvesikel warten zum Teil sogar noch eine weile an der Plasmamembran. Der Trigger, der sie dazu bringt, mit der Plasmamembran zu verschmelzen ist ein Chemischer Messenger, der zu einer Erhöhung der Ca²⁺ Konzentration führt.

Einige Beispiele für Regulierte Sekretion:

- Pankreas (Insulin, Verdauungsenzyme)
- Mastzellen (Histamine)
- Neurone (Neuropeptide, Neurotransmitter)

→ Protein abbauend

2 Typen Proteasen:

Proteolytische Prozessierung von Proteinen in Sekretorischen Vesikeln

- Pre-Pro-Proteine werden im ER hergestellt, pre-Sequenz ist Signalsequenz
- Die Pro-Sequenz lässt das Protein inaktiv
- Prozessierung zu reifen Proteinen durch Pro-Protein Convertasen (PPCs)
- Dies ist wichtig: Aktive Peptide sind zum Teil sehr kurz, sodass ihre aktive Translokation ins ER nicht möglich ist. Ausserdem ist die Prozessierung wichtig, dass die Enzyme nicht die Herstellerzelle gefährden.

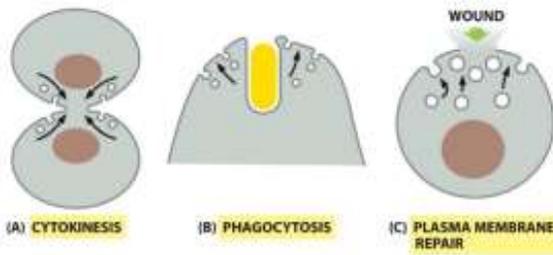
1 - schneiden an Ende
2 - schneiden in Mitte → gefährlich

↳ nicht zu früh aktiv

→ über Sequenz oder pH

Regulierte Exozytose zur Vergrößerung der Membranoberfläche

→ allg. Veränderung Membranen



A. Bei der Zellteilung wird Exozytose verwendet, um Membranmaterial zu liefern

B. Grosse Partikel können in die Zelle aufgenommen werden, da muss die Membran vergrössert werden

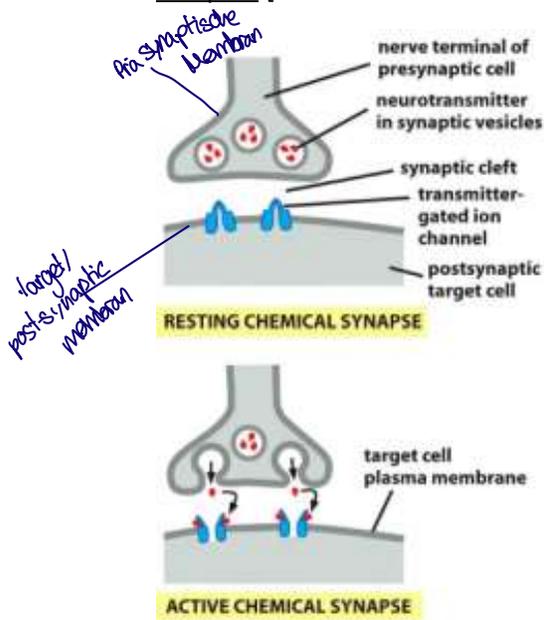
C. Wenn Zellen verwundet werden, benötigt die Zelle wieder neues Material zur Regenerierung

Synaptischer Vesikel Transport

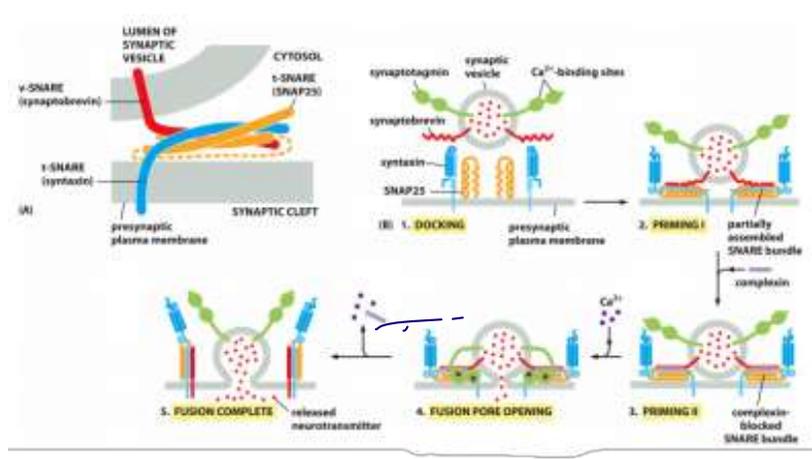
Nervenzellen besitzen zwei verschiedene Typen von Sekretorischen Vesikeln:

- **Dense Core Granule** (für Neurotransmitter)
- **Spezialisierte Synaptische Vesikel für Neurotransmitter release** (z.B. Acetylcholin, Glutamat, Glycin, GABA)

Diese Vesikel sind sehr klein, besitzen v-SNAREs, eine ATP Protonenpumpe (zur Aufrechterhaltung von einer hohen H⁺ Konzentration im Vesikel -> Ladung von Neurotransmittern z.B. Glutamat per Antiport [= ein H⁺ verlässt das Vesikel, ein Glutamat kommt ins Vesikel]).



Synaptische Vesikel bilden sich in der prä-synaptischen Zelle, müssen den Synaptischen Spalt überwinden und fusionieren mit der Plasmamembran der Zielzelle. So können Signale übertragen werden. Dieser Vorgang muss sehr schnell gehen.



• SNAREs verschmelzen mit Membran durch Ca²⁺

→ Vesikel an Präsynaptischer Membran

Aus diesem Grund werden synaptische Vesikel «primed» an der prä-synaptischen Membran. Sie werden also mithilfe von halb aufgewundenen SNARE Proteinen, die mit einem Komplexin fixiert werden an der Membran gehalten und warten so auf ein Signal. Kommt es zu einer Potentialänderung in der Zelle werden Kalziumkanäle geöffnet. Die erhöhte Kalziumkonzentration wird von Kalzium Rezeptoren (=Synaptotagmin) erkannt, führt zu einer Konformationsänderung an diesem und entfernt so das Komplexin. Dadurch kommt es zu einem schnellen Transmitter Release in den Synaptischen Spalt und zur Zielzelle.

Endozytose: Plasmamembran

Plasmamembran Funktionen

- Definiert äussere Grenze der Zelle, ist eine schützende Barriere
- Vermittelt Influx und Efflux von Substanzen und Informationen → Influx: Einströmen Ionen/Molekülen in Zelle rein
- Vermittelt Kontakte mit anderen Zellen und externen Strukturen
- Formt eine Vielfalt von Verbindungen (Junctions), z.B. Tight Junctions, Desmosome, Hemidesmosome (nächstes Semester)
- Dient als Startpunkt für Signal Transduktionswege (nächstes Semester)
- Spielt eine zentrale Rolle während der Zellteilung, Zellfusion, Fertilisation
- Wichtig für Zell Bewegungen
- Bildet spezialisierte Strukturen wie Cilien, Mikrovilli, Synapsen
- Dient als Plattform für die Synthese der Zellwand (Pflanzen und Pilze)
- Interagiert mit Pathogenen und Viren um die Zelle davor zu schützen
- Beeinflusst mechanische Eigenschaften der Zelle
- ...

Die 4 Teile der Plasmamembran

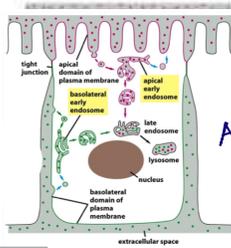
→ Signal

außen
↓
innen

- **Extrazelluläre Matrix:** Netzwerk aus Proteinen und Kohlenhydraten, die aus der Zelle sekretiert wurden
- **Glykocalyx:** Glykoproteine, Proteoglykane, Glykolipide, die an die äussere Oberfläche der Plasmamembran angehängt sind
- **Membran Bilayer:** Lipide und Membranproteine
- **Cell Cortex:** Netzwerk von Proteinen, welches an die innere Oberfläche der Plasmamembran angehängt ist.

Membrandomänen

Apical and basolateral membrane domains in epithelial and endothelial cells

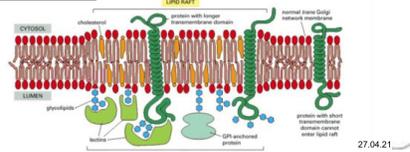


Aufnahme (A)
Abgabe (B)

In einigen Zellen gibt es verschiedene Domänen mit unterschiedlichen Strukturen und Funktionen:

- Es gibt kleine (lipid rafts) oder grosse (apical and basolateral membrane domains of epithelial cells) Domänen
- Einige sind Permanent, andere transient (= temporär)
- Einige sind stabilisiert durch interne Strukturen wie Mikrotubuli, Cilia, Actin Filamenten...)

Lipid rafts



tight junctions trennen Membrandomänen um in zelle gerichteten Transport zu ermöglichen

→ durch Cholesterin oder Cytoskelett stabilisiert

Endozytose: Wirkungsweise

Definitionen

Endozytose: Die Internalisierung von Substanzen und Partikeln vom extrazellulären Raum durch Invagination (= Einstülpung) der Zellmembran. → meist Vesikel

Phagozytose: «cell eating»: Grosse Partikel werden durch spezialisierte Zellen aufgenommen. Dies wird aber nicht primär für die Nahrungsaufnahme verwendet.

Pinozytose «cell drinking»: Die meisten Zellen nehmen Flüssigkeiten und darin gelöste Stoffe auf.

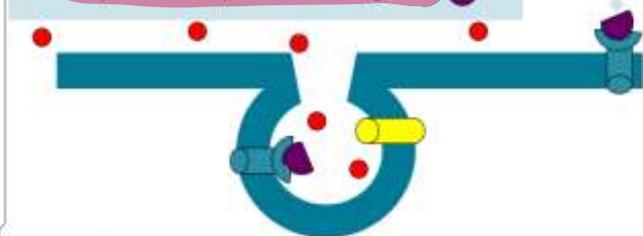
- Flüssigkeitsaufnahme (Pinozytose und Makropinozytose)
- Rezeptor vermittelte Endozytose (Extrazelluläre Stoffe in Klathrin gehüllten Vesikeln)
- Caveolae / Raft vermittelte Endozytose

Transzytose: Übergang von Substanzen durch eine Zelle zwischen apikalen und basolateralen Oberflächen in z.B. Epithelzellen

Aufnahme B Abgabe

Endozytisches Vesikel

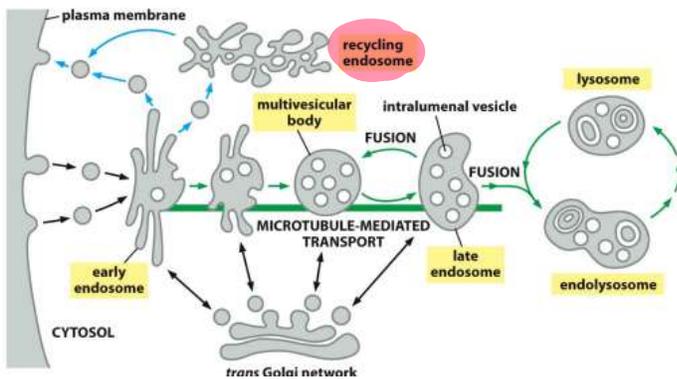
- Bulk fluid and solutes
- Bulk membrane components
- Selected membrane components
- Receptor-bound proteins and ligands



Grundprinzipien sind ähnlich, wie bei COPII Vesikeln. Gemäss ihrer Konzentration werden alle Stoffe ausserhalb der Zelle in ein Vesikel abgepackt, jedoch nicht angereichert. Die gewollten Stoffe werden dann z.B. durch Rezeptoren an der Membran im Vesikel aufkonzentriert (siehe COPII Vesikel).

→ von ER → Golgi

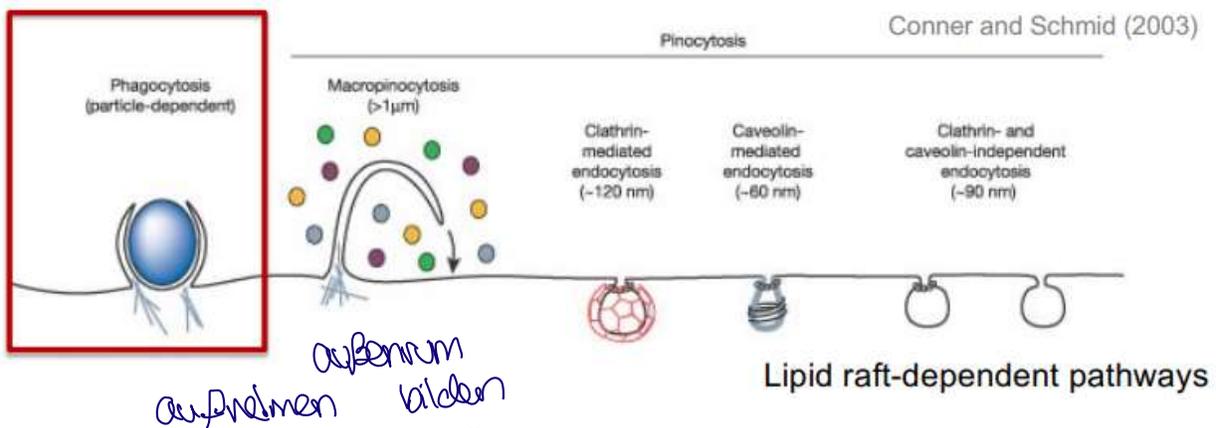
Der Endozytische Weg



Frühe Endosome sind die Erste Anlaufstelle für Stoffe von ausserhalb der Zelle im Endozytischen Weg. Dort werden die Stoffe sortiert und entweder Rückgeführt (direkt über Transportvesikel oder über Recycling Endosome), durch ein Lysosom verdaut (siehe vorherige Vorlesung) oder ans TGN an den Golgi-Apparat übergeben.

→ alles außer Lysosom bindet auch golgi

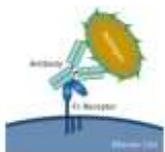
Übersicht Endozytose: Typen und Funktionen



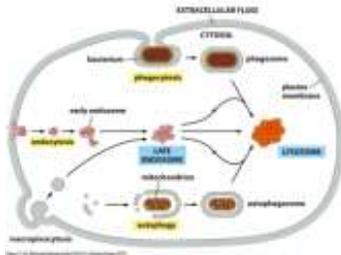
aufnehmen bilden

Grundsätzlich wird die Endozytose zur Überführung von Partikeln, Flüssigkeiten und Liganden von ausserhalb der Zelle ins innere verwendet. Aber auch um die Membranrezeptoren herunter zu regulieren und die Lipid Komposition zu ändern. Die Endozytose kontrolliert also die PM Komposition und fine-tuned dessen Funktion durch Selektive Internalisierung von Komponenten.

Phagozytose

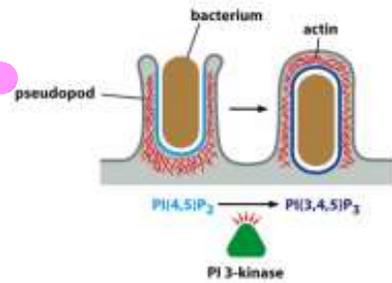


Grundsätzlich: Aufnahme von grossen Partikeln (tote Zellen, Pathogene...) durch spezialisierte Zellen. Diese muss ausgelöst werden durch Zellenoberflächen Rezeptoren. Phagozytische Vesikel können sehr gross sein und werden durch Phagolysosome (Fusion von Phagosom mit Lysosom) verdaut.



Mechanismus:

Durch multiple Bindungen an Multiple Rezeptor an das ganze Partikel (Zipper Mechanismus) wird nur wenig Flüssigkeit eingeschlossen. Signal Prozesse und Actin Filament Änderungen auf der Zytosolseite (Getriggert Prozess) ermöglichen den Prozess. Durch die Genenrierung eines phagozytischen Kelchs und anschließender Schliessung dieses Kelchs erfolgt dann die Internalisierung in das Phagosom. Die geregelte Bildung und Konsumation von PIPs regelt die Schritte in diesem Prozess (siehe rechts unten).



- formation of PI(4,5)P₂ is needed for actin reorganization to drive the formation of the phagocytic cup
- conversion of PI(4,5)P₂ by PI(3)kinase to PI(3,4,5)P₃ drives closure of the vacuole, and its internalization

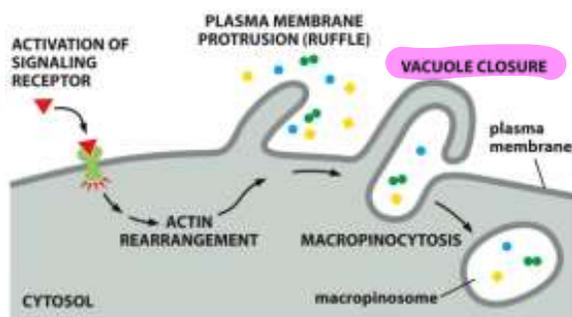
Beispiele: Macrophagen essen tote rote Blutkörperchen durch Erkennung von Apoptose (= Programmierter Zelltod). Sie erkennen Phosphatidylserin (PS) an dessen Oberfläche, was als «eat me» Signal gilt (tote Zellen haben keine Flipasen). Neutrophile essen Bakterien.

→ keine definitve Formierung

Pinozytose

Findet in allen Zellen mit kleinen uniformen Vesikeln statt und kann enormes Volumen transportieren. Das meiste Volumen und Membran wird rezykliert durch gekoppelte Endozytose/Exozytose Prozesse, die somit die Zelloberfläche und -volumen regeln.

Pinozytose: Makropinozytose



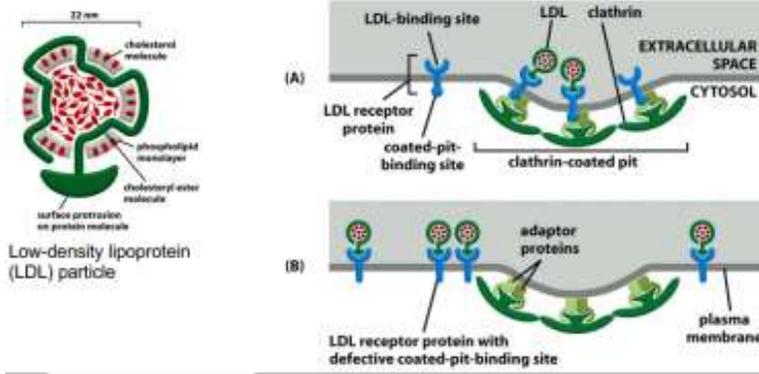
Nicht Klathrin, sondern Actin Zytoskelett abhängiger Weg, der nicht Konstitutiv (=muss induziert werden) ist. Durch Aktivierung von Rezeptoren durch ein Signal wird die Actin veränderung ausgelöst. Dadurch wird eine Ausstülpung geformt, die dann Flüssigkeiten und Stoffe abschnürt und in die Zelle bringt. Diese werden dann den Lysosomen zugeführt und degradiert.

Pinozytose: Klathrin abhängige Endozytose

(siehe Klathrin Geformte Vesikel)

Bei der Klathrin abhängigen Endozytose werden bestimmte Stoffe als Signale benötigt, die von Rezeptor Proteinen an der Plasmamembran erkannt werden und dann die Endozytose auslösen. Diese Stoffe können, Nährstoffe, Vitamine, Hormone, Wachstumsfaktoren, Antigene, Extrazelluläre Matrix Komponenten, Serumproteine, Asialo-Glycoproteine (alte Glykoproteine aus dem Golgi-Apparat), Rezeptorgebundene Viren und Toxine und noch viele weitere Ligand-Rezeptor Komplexe.

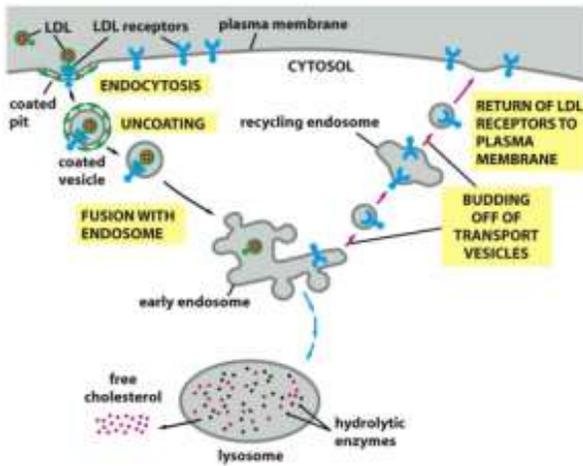
Klathrin



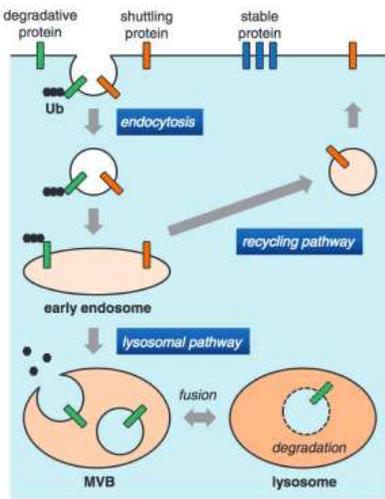
Beispiel: Aufnahme von Cholesterin in unsere Zellen.

LDL (= Low Density Lipoprotein) Partikel werden in der Leber hergestellt. Diese werden vom LDL Rezeptor an Zellen erkannt und so angereichert und durch ein Klathrin gehülltes Vesikel in die Zelle gebracht.

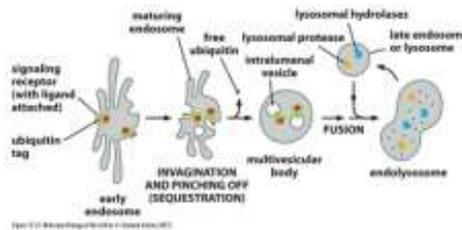
Einige Menschen haben eine LDL Rezeptor Mutation, die dazu führt, dass sie sich nicht mit der Klathrin Hülle verbinden können (B).



Nachdem das Klathrin gehüllte Vesikel gebildet und die Hülle entfernt wurde, fusioniert dieses mit einem frühen Endosom (durch niedrigeren pH werden die LDL Partikel von den Rezeptoren getrennt), die Rezeptoren können zurückgeführt werden und das Endosom mit dem Cholesterin reift zu einem Lysosom. Dieses verdaut dann die Proteinbestandteile und setzt das Cholesterin aus Cholesterin Estern frei und führt diese der Zelle zu.

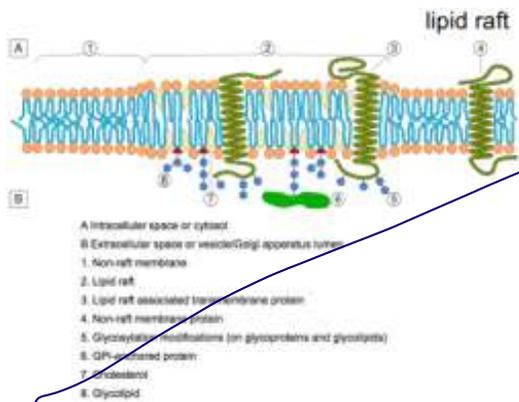


Ähnlich wie der oben beschriebene LDL Weg werden auch andere Nährstoffe (z.B. Eisen durch Transferrin Rezeptoren) aufgenommen. Diese Rezeptoren werden hauptsächlich rezykliert. Es gibt aber auch Signalrezeptoren (z.B. Rezeptor Tyrosin Kinase – RTKs) werden downreguliert (der Verdauung zugeführt). Dies dient dann dazu einen Signal Transduktionsweg abzuschalten. Dazu müssen diese Rezeptoren durch ein Ubiquitin (ubiquitinierung) bereits an der Membran markiert werden.



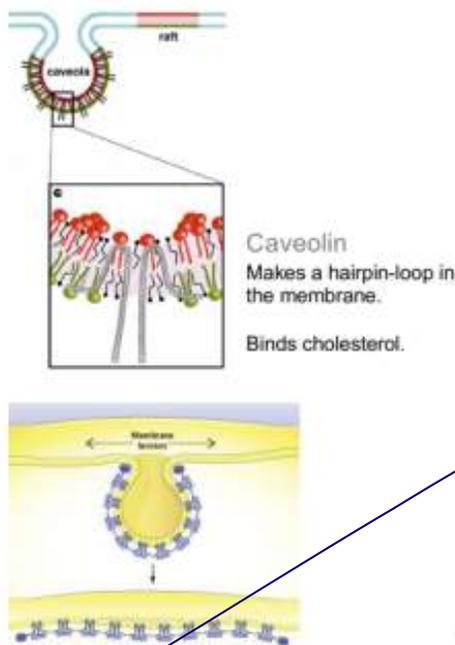
Ubiquitiniert => abgebaut

Pinozytose: Caveolae abhängige Endozytose



Caveole sind kolbenförmige, statische Strukturen, von denen nur wenige (5%) Endozytose betreiben. Sie Formen Lipid Rafts Mikrodomänen in der PM. Diese Lipid Rafts besitzen viel Cholesterin, Glycosphingolipide und GPI-verankerte Proteine. Die Fracht wird in den Lipid Rafts angereichert.

→ Separation



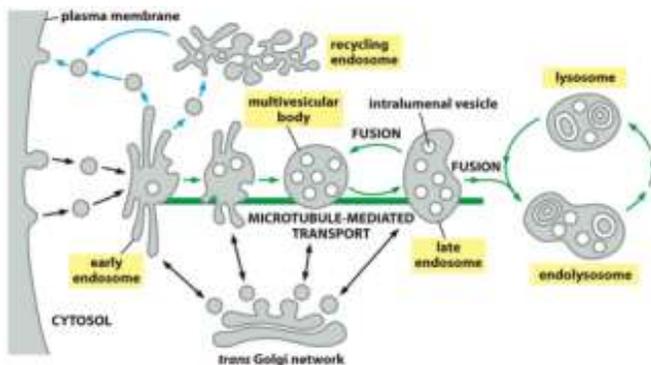
Das Protein, welches diese Lipid Rafts formt heisst Caveolin. Es ist Haarnadelförmig und wölbt die Membran. Cavine befinden sich auf dem Caveolin und stabilisieren diese Wölbung zusätzlich.

Hauptsächlich wird die Caveolae abhängige Endozytose für die Transzytose (= Serum Komponenten z.B. vom Blut in die Endothelen Zellen befördern) verwendet.

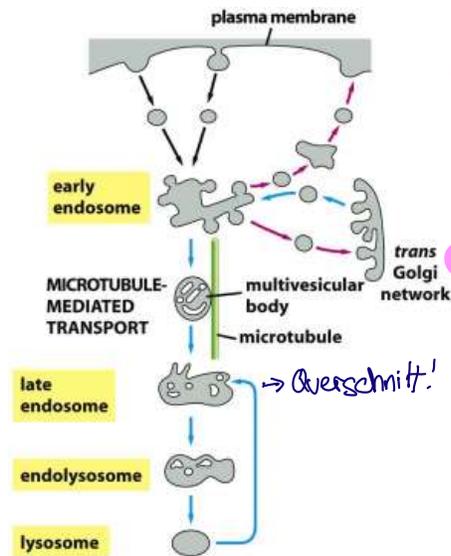
Auch die Cholesterin Regulierung und die Signaltransduktion werden von der Caveolae abhängigen Endozytose reguliert.

Sie bilden ausserdem ein «Membran Reservoir», benötigt die Zelle mehr Membran, so können sich diese Einstülpungen auflösen und so der Zelle mehr Membran zur Verfügung stellen.

Vorlesung 4
Endozytischer Weg



Frühe Endosome formen Späte Endosome durch Endosom Reifung. Jeder Schritt dieser Reifung ist Verbunden durch bidirektionale Vesikeltransport Wege zum TGN für die Materialzufuhr oder für Rezyklierungsprozesse.



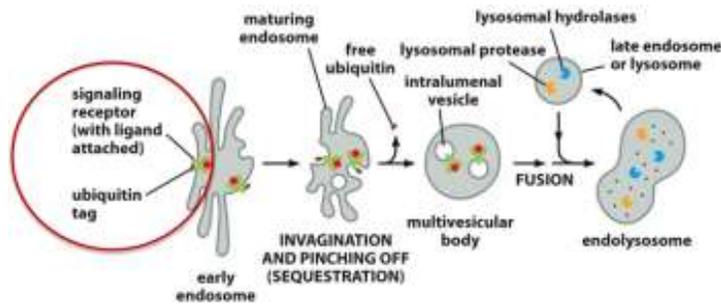
Frühe und späte Endosome haben unterschiedliche Protein- und Lipidkompositionen, Erscheinung und Lokalisierung. Viele Moleküle werden rezykliert in frühen Endosomen, sie besitzen tubuläre Regionen, wo Vesikel abgeschnürt werden. Diese Regionen werden im Reifeprozess zu späten Endosomen verloren. Die Reifung erfolgt durch die Formung von MVBs (multivesicular bodies).

Die Reifung dieser MVBs geschieht durch Einstülpung von frühen Endosomen, sodass sich im Innern lumenale Vesikel bilden.

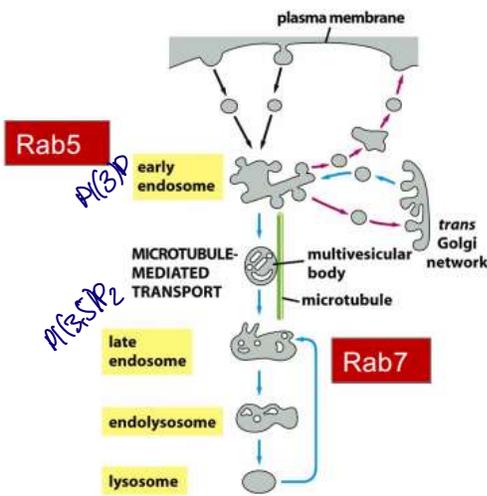
↳ helle Flecken

Der oben beschriebene Prozess führt dazu, dass selektive Verdauung von Rezeptoren und Liganden in Lysosomen möglich ist.

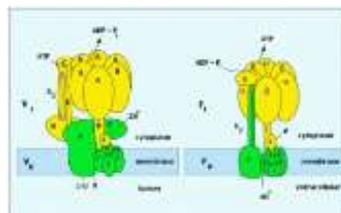
↳ nehmen Membran auf



Rezeptoren, die verdaut werden sollen besitzen Ubiquitin. Dieses sorgt für eine Einwölbung (durch ESCRT-III Proteine, siehe Teil W.Hardt) der Membran vom frühen Endosom. Zum Schluss wird es entfernt. Das Ergebnis ist ein lumenales Vesikel mit dem zu verdauenden Rezeptor in der Membran.



MVBs bewegen sich entlang dem Mikrotubuli zum Zellzentrum. Sie wechseln, sobald sie zum späten Endosom wurden, ihre PIPs von PI(3)P zu PI(3,5)P2. Das Lumen von Endosomen ist sauer (pH ca. 6), sie werden während der Reifung immer Saurer, durch die Aktivität von V-ATPase. Diese sieht ähnlich aus wie die Mitochondriale ATPase, ist aber nicht dazu da, einen



Protonengradient zu nutzen, um ATP zu generieren, sondern um mit ATP einen Protonenüberschuss im Innern zu generieren.

Späte Endosomen senden keine Vesikel mehr an die PM. Ausserdem sind sie mit einer anderen Rab GTPase ausgestattet (Rab7). ↳ damit Membranen nicht mischen

*Widerstands-
fähigkeit → Pflanzenzellen*

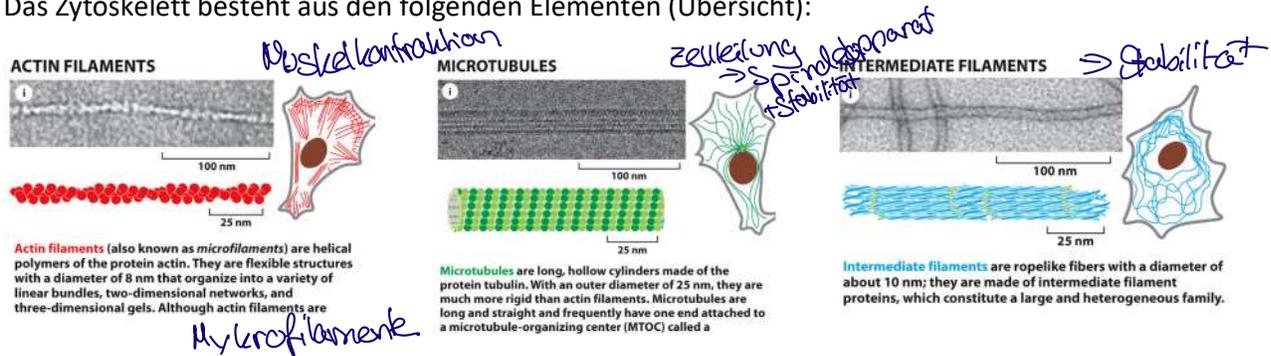
Das Zytoskelett

*weniger Zytoskelett für Form
weil haben Zellwand*

Besitzt folgende Funktionen:

- Zellform
- Mechanische Resilienz (=)
- Bewegung, Zellmigration
- Intrazelluläre Organisation
- Transport innerhalb der Zelle
- Zellteilung
- Zell Oberflächen Fortsätzen (Cilien, Flagellen, Mikrovilli...)
- Zell Polarität
- ...

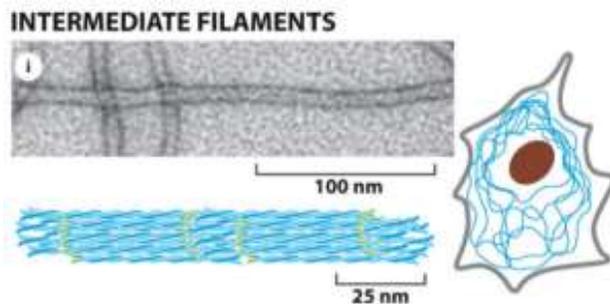
Das Zytoskelett besteht aus den folgenden Elementen (Übersicht):



Gemeinsamkeiten

- Die drei Hauptfilamenttypen assoziieren mit Hunderten anderen Proteinen
- Dazu gehören Motorproteine, die sich entlang Mikrotubuli und Actin bewegen (Mikrofilamente)
- Die Filament Typen interagieren auch miteinander
- Zytoskelett Filamente sind dynamisch und anpassungsfähig (z. B. Zellteilung; Migration)
- Das Zytoskelett kann auch stabile Strukturen bilden (z. B. Zilien, Mikrovilli, Stereozilien).
- Jede Art von Zytoskelett Struktur besteht aus kleineren Proteinuntereinheiten, die durch schwache nichtkovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden
- Filamente bestehen aus mehreren Protofilamenten und besitzen daher bessere mechanische Stabilität

Intermediär Filamente

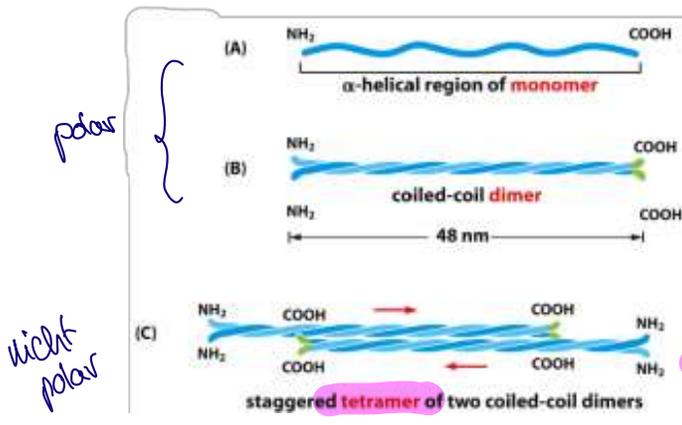


Sind seilartige Strukturen, die das innere der Zellen durchspannen. Sie befinden sich meist im Zytoplasma, aber die Kernlamina (existieren z.B. in Wirbeltieren) ist der inneren Kernmembran unterlegt. Diese kommen nur in Zellen vor, die von innen mechanisch unterstützt werden müssen (z.B. in Pflanzen wird dies durch die Zellwand erledigt).

→ in Pflanzen nicht

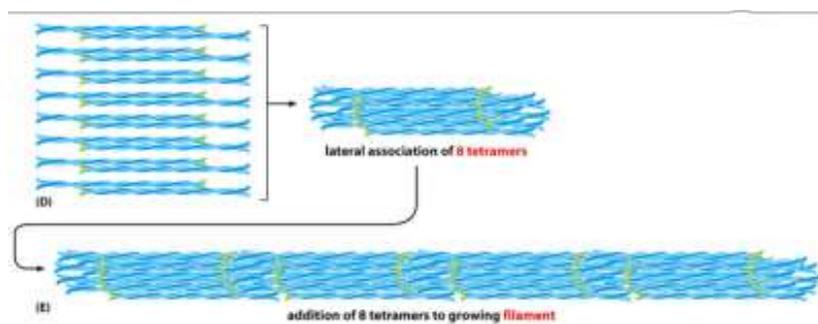
kann man auseinanderziehen diese Wirkung

Formung von Intermediärfilamenten



IF Proteine sind lange Proteine. Alle besitzen hydrophobe Seitenketten in der richtigen Anordnung, dass sie sich zu gecoilten Dimeren formen können (= heptat Profile). Diese Dimere formen antiparallele versetzte Tetramere. Diese Tetramere sind dann **symmetrisch und nicht polar**, sie bilden die Grundbausteine von den Intermediärfilamenten.

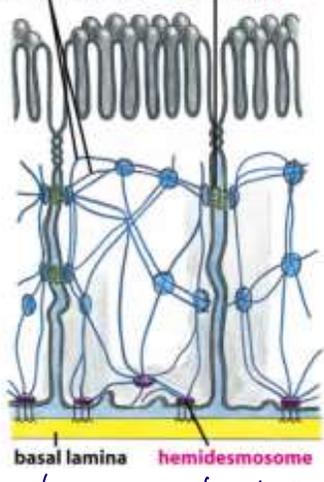
8 dieser Tetramere formen sich dann lateral und addieren sich zu einer Seilartigen Struktur.



Da die Tetramere symmetrisch sind, kann auf ihnen auch **kein Transport** stattfinden (**Anfang und Ende** von diesen seilartigen Strukturen haben **keinen unterschied** und das Motorprotein wüsste nicht, in welche Richtung es Fracht transportieren muss).

Diese lateralen Verbindungen zwischen den Tetrameren sorgt dafür, dass die Intermediärfilamente sehr **widerstandsfähig und auch dehnbar** sind (Seilartig). Es gibt 4 Typen von Intermediärfilamenten.

in Zelle
keratin filaments *Verb. zw. Zellen*
desmosome



Intermediärfilamente werden aus einem löslichen Pool von Tetramer Bausteinen assembliert. Die meisten Tetramere befinden sich aber in den Intermediärfilamenten, nur ein kleiner Teil im pool (nur ca. 1-5%). Während der Mitose führt die Phosphorylierung durch CDK1/Cyclin Kinase Komplexe zu einer zersetzung von Nuklearen Laminen und Vimentin Filamenten aber nicht von anderen Arten von IF.

IF Proteine befinden sich auf dem IF und sorgen für die Bildung, Verbinden sie mit anderen Zytoskelett Filamenten oder sorgen für die Assoziierung mit Desmosomen und Hemidesmosomen.

So bilden sich Keratine: Filamente von einer Zelle sind indirekt Verbunden mit denen der Nachbarzellen **durch Desmosomen**. Diese geben z.B. Epithelengewebe, Nägeln, Haare... ihre Stabilität.

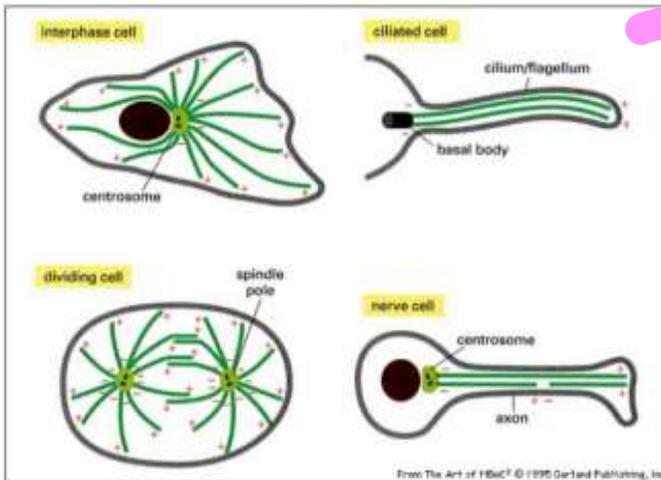
Mutationen in Keratinen (z.B. **Schmetterlingshaut**): N oder C Terminale Domänen fehlen an Keratinen, dadurch können keine stabilen, seilartigen Filamente gebaut werden. Dadurch haben Patienten **eine sehr instabile Haut**.

Neurofilamente

Nervenzellen

Befinden sich in **hohen Konzentrationen in Axonen** von Wirbeltierischen Neuronen. Es gibt 3 Typen von NF Proteinen: NF-L, NF-M und NF-H, diese formen Hetero Polymere. Sie sorgen so **für die Axon Stabilität und kontrollieren den Axon Durchmesser**. Diese werden nicht disassembliert.

Mikrotubuli (MT)



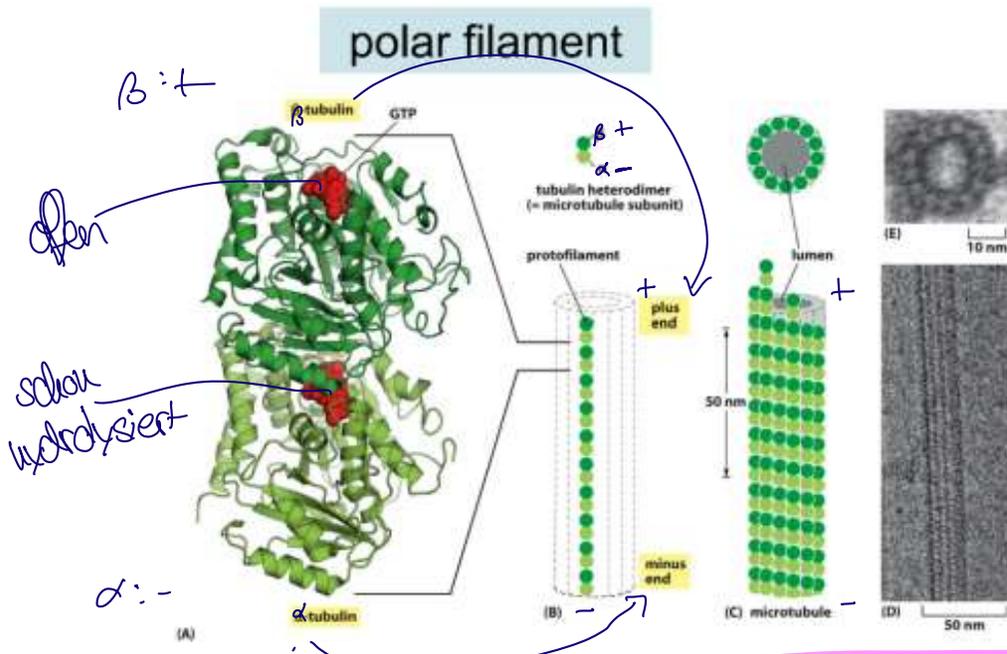
Mikrotubuli ist Teil der Mitotischen Spindel befindet sich meist von dem Zellzentrum am Zentrosom aus radial zur PM. Es kann aber auch Teil von Cilien oder Nervenzellen sein.

Es wird für die räumliche Organisation von Organellen im Zytosol und den **geregelten Transport von Vesikeln und Organellen** benötigt.

Mikrotubuli hilft bei der Spindelformierung während der Zellteilung.

Bildungseinheiten: siehe Part von W. Hardt, Alpha-Tubulin und Beta Tubulin. Tubulin Dimere mit GTP gebundenem Beta Tubulin sind stärker an das MT gebunden als die, mit GDP.

Struktur



MTs sind hohle Zylinder aus 13 Parallelen Protofilamenten aus **kopffuss angelagerten Alpha- und Beta Dimeren, die lateral leicht verschoben sind**. Untereinheiten können diese Anordnung nur an den Enden verlassen oder zugefügt werden. Längs- und Lateralbindungen stabilisieren zusätzlich. Sie sind nur sehr schwer zu trennen.

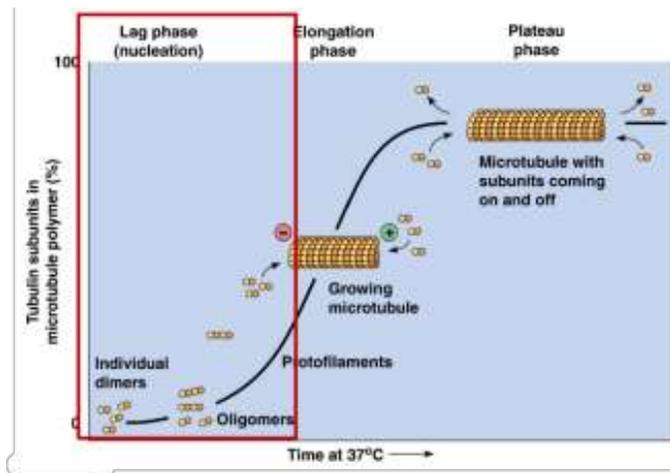
GTP Dimere sind stabiler gebunden als GDP (siehe

oben) und aus diesem Grund weniger flexibel. **Das Filament hat eine strukturelle Polarität: Minus (α) und Plus (β) Enden.**

nicht so flexibel

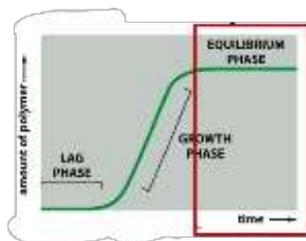
Wachstum

3 Phasen der Filament Polymerisierung: Lag Phase



Es gibt am Anfang nur sehr wenige Kontakte. Erst wenn viele und vor allem laterale Kontakte zwischen den Untereinheiten gebildet werden, so bildet sich langsam ein Filament. Dieses ist aber in seinem Wachstum nur genug stabil, wenn sich die **13 Protofilament Struktur** bildet. (in vitro erreicht man dies nur mit sehr hohen Konzentrationen).

→ erst ab bestimmter Konz. Growth Phase



Nach der Lag Phase folgt die growth Phase, in welcher sich das Filament beginnt zu verlängern. An einem Bestimmten Punkt ist ein Gleichgewicht zwischen verlassenden Untereinheiten und neu dazukommenden Untereinheiten erreicht. Dieser Punkt wird **Kritische Konzentration von Freien Tubulin Dimeren** genannt.

↳ kommen & gehen gleich

At this equilibrium,

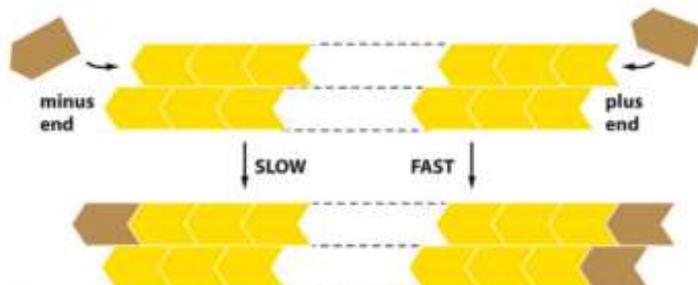
$$k_{on} C = k_{off}$$

so that

$$C_c = \frac{k_{off}}{k_{on}} = K_d$$

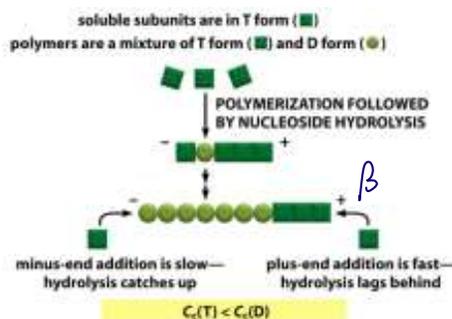
(where K_d is the dissociation constant; see Figure 3-44).

Die Ablagerung ist dabei nur abhängig von dem spezifischen k Wert der Reaktion. Die Anlagerung aber ist nicht nur abhängig von diesem k Wert, sondern auch von der Konzentration an freien Subunits.



Aufgrund der unterschiedlichen Konformation der Untereinheiten bildet sich auf der einen Seite ein Ende (plus) an welches neue Einheiten angefügt wird, auf der anderen ein Ende (minus) an welchem Einheiten abgehen.

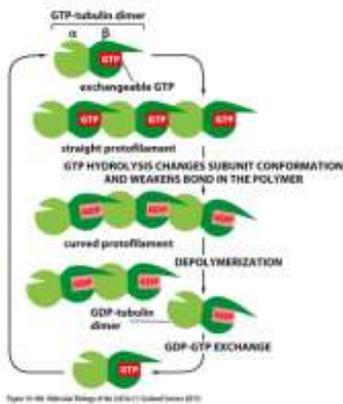
→ Mikrotubuli sind Polariserte Polymere, an welche neue Subunits mit unterschiedlichen Raten an beiden Seiten angehängt werden.



Da die C_c Werte der beiden Enden unterschiedlich sind, «wächst» das Mikrotubuli auf der einen Seite (plus) und «schrumpft» auf der anderen (minus). Da GTP Beta-Tubulin Dimere eher die Eigenschaften haben, zu polymerisieren, und GDP zu depolymerisieren, bildet sich auf auf der + Seite eine «GTP Kappe» mit einigen GTP Dimeren.

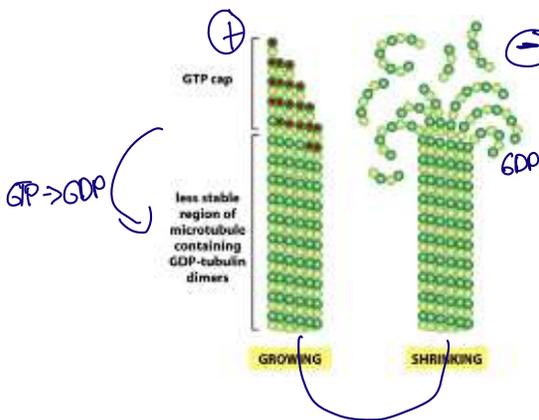
Abbau von GDP

Dynamische Instabilität



Wenn die Konzentration an freien Dimeren nahe der kritischen Konzentration liegt, kann das + Ende noch wachsen. Mit der Zeit wird dann die Konzentration kleiner und die GDP Kette kann aufholen. Dann ist GDP B Tubulin Exponiert, dann schrumpft das MT schnell (= Katastrophe), es werden mehr Dimere freigesetzt, die wieder zu GTP umgesetzt werden

können und die GTP Cap kann sich wieder bilden und das MT kann wieder wachsen (=Rescue).

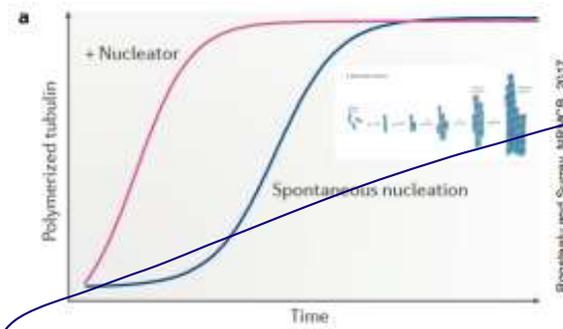


Die GTP Kappe sorgt auch dafür, dass das Ende des Mikrotubuli stabil ist (links). Das rechte Bild zeigt die Katastrophe. Funktion dieser Instabilität: Gibt dem MT räumliche und zeitliche Flexibilität (z.B. bei der Zellteilung kann das Zytoskelett schnell zu einer Spindel umorientieren).

räumliche Struktur mit GDP : \cap
" GTP : \rightarrow

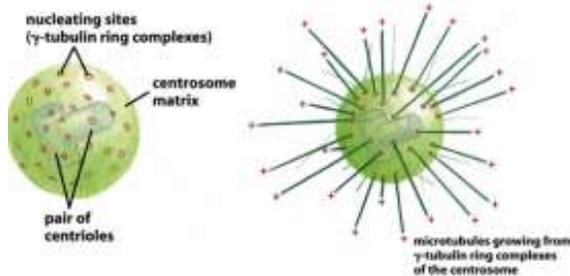
\rightarrow z.B. fast wenn an Zentrosom \rightarrow kein Abbau

Filament Polymerisierung



In vitro benötigt man sehr eine hohe Konzentration um die Lag Phase zu überwinden. Dies wäre für die Zelle sehr ineffizient und aus diesem Grund verwendet sie Keime (= Nucleator). Damit geht die Lag Phase schneller vorbei / ist fast nicht vorhanden.

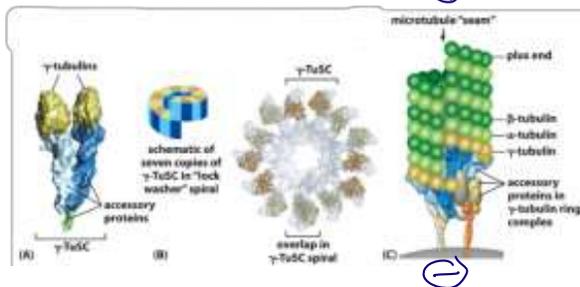
Mikrotubuli Organisierende Center (MTOC) oder Zentrosom



Die Zentriolen (kurze, Modifizierte Triplets aus MT, 9 davon bilden ein Zentriol) sind zwei Zylinderförmige Strukturen, die in einem Rechten Winkel zueinander stehen. Sie sind durch eine Zentrosommatrix eingeschlossen, auf welcher sich die Nucleatoren befinden.

\hookrightarrow am Zentrosom mit \ominus Ende befestigt

γ Tubulin

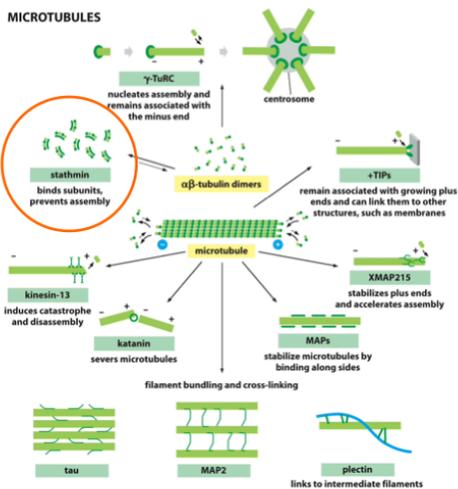


*Asom Komplex festmachen
→ kann an - Ende nicht wehr schrauben*

γ Tubulin (γ-TuSc) Komplexe bestehen aus 2 γ Tubulinen, sind an der Zentrosommatrix verankert und 7 von diesen Komplexen bilden einen Ringkomplex (γ-TuRC). Dieser besteht also aus 14 Untereinheiten, davon sind 13 exponiert. Die Untereinheiten sind negativ geladen und bilden den Startpunkt für das MT. Somit kann das MT von diesem Startpunkt aus in alle richtungen der Zelle zur PM Wachsen und verkürzt werden aber nicht am Startpunkt.

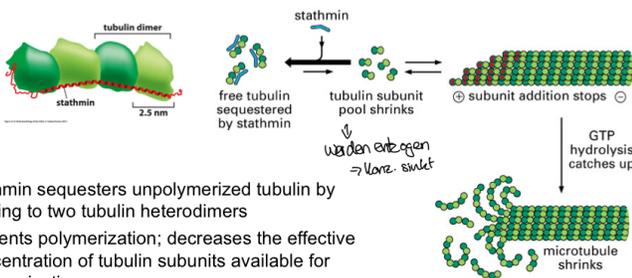
Mikrotubuli Assoziierte Proteine (MAPs)

Funktionen Übersicht



- Destabilizing (e.g. stathmin, catastrophe kinesin-13)
- Stabilizing (e.g. XMAP215, Tau)
- Bundling
- Severing (durchtrennen) (e.g. katanin)
- Linking (e.g. CLIP-170, recruits dynactin to the plus end of MTs and to endosomes; plectin: links to IFs)
- Motors (dyneins and kinesins)

Stathmin (Destabilisierung)

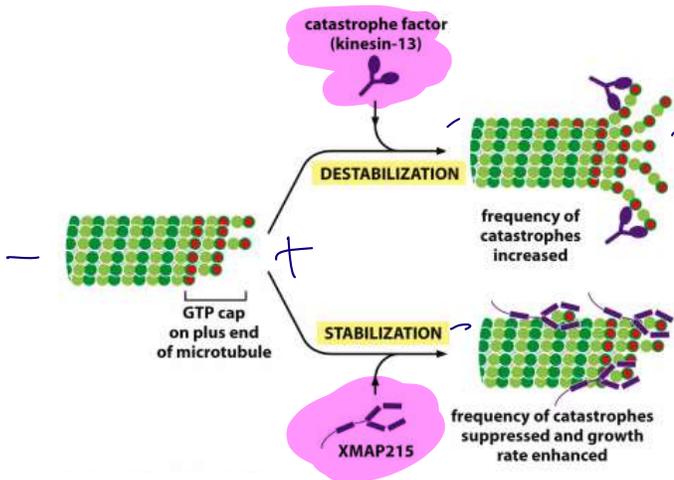


stathmin sequesters unpolymerized tubulin by binding to two tubulin heterodimers prevents polymerization; decreases the effective concentration of tubulin subunits available for polymerization
can be inhibited by phosphorylation

Stathmin bindet an 2 MT Dimeren und verhindert dann die anlagerung an das MT. Dadurch wird der Pool an freien Dimeren gesenkt und so wird das Wachstum blockiert und die Abnahme des MT wird begünstigt. Dies kann durch Phosphorylierung verhindert werden.

Vorlesung 5

MAPs die mit dem + Ende interagieren, um das MT zu destabilisieren



Der **Kinesin-13** Katastrophenfaktor entfernt die Tubulin GTP Cap durch Entfernung von Tubulin Heterodimeren -> Destabilisierung.

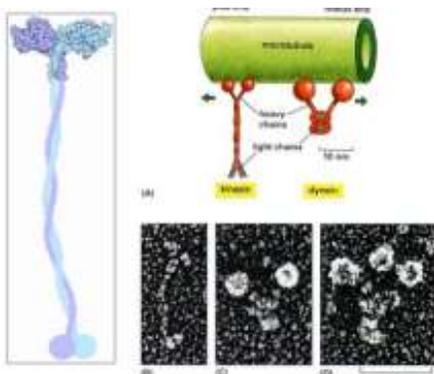
XMAP215 bindet freie Tubulin Heterodimere und bringt sie zum Plus Ende. Es erhöht somit die Polymerisierung und wirkt dem Katastrophenfaktor entgegen (wird z.B. während der Mitose inaktiviert).

Tretmühleneffekt

+TIP Bindungsproteine

+TIP Bindungsproteine assoziieren stabil und kontinuierlich (im Gegensatz zu den vorherigen Faktoren) mit dem + Ende vom MT. Einige kontrollieren MT Dynamik, andere verbinden das MT zu Aktinfilamenten, die Zellmembran, Organellen oder Chromosomen in der Mitose.

MT abhängige Motorproteine



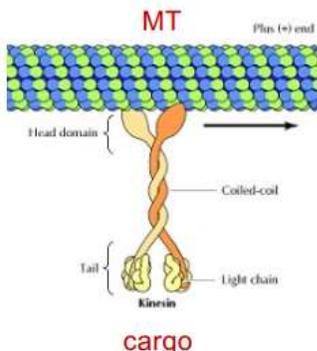
Molekulare Motoren sind biologische molekulare Maschinen, die die wesentlichen Wirkstoffe von sind Bewegung in lebenden Organismen. Im Allgemeinen kann ein **Motor** als ein Gerät definiert werden, das Energie verbraucht und Energie in Bewegung oder mechanische Arbeit umwandelt.

Es gibt 2 Arten von MT Motoren:

binden Vesikel/ Organellen

- **Kinesine** bewegen sich zum Plus Ende des MT, also zur PM hin
 - **Dyneine** bewegen sich zum Minus Ende des MT, also zum Zentrosom hin
- meistens*

=> wichtig dass MT polar sind

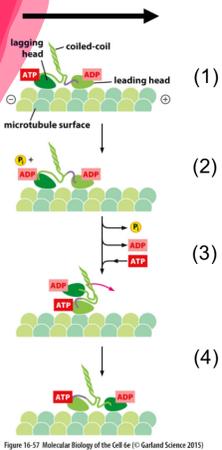


➤ Dynamic association/dissociation between the **neck linkers** and the **motor (ATPase) domains** governed by their ATPase cycles drive movement of kinesins along MTs



Kinesin Bewegung

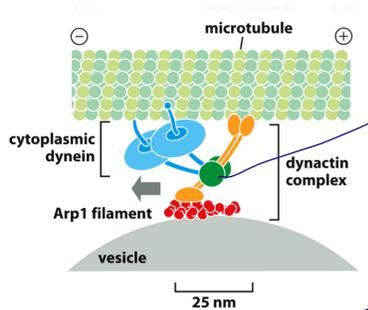
ATP: fest ADP: locker



- 1: Der hintere Kopf ist fest an das MT gebunden
Der vordere Kopf ist lose an das MT an ADP gebunden
 - 2: Der hintere Kopf hydrolysiert ATP und erhält so eine schwache MT Bindung
 - 3: Phosphatabspaltung führt zu einer Ablösung des Neck Linkers vom hinteren Kopf. Der vordere Kopf lässt ADP frei, ATP bindet und der Neck Linker wird fest an den vorderen Kopf gebunden.
 - 4: Dadurch wird der hintere Kopf, der nun nicht mehr fest gebunden ist nach vorne geschleudert. Dieser Prozess wird immer wieder wiederholt.
- ATP und ADP regulieren also die Bindung dieses Necklinkers an die Kopfteile und ausserdem die «nach vorne Schleudering» der Köpfe. So kann eine Bewegung in eine bestimmte Richtung generiert werden.

Dynein Bewegung

→ wissen nicht genau wie funktioniert

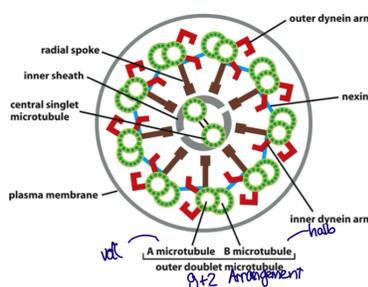


Der Dynein Motor bewegt sich von der + zur - Seite des MT. Es ist grösser als das Kinesin und besteht aus 12 Subunits. 2 heavy Chains mit ATP Aktivität, 2 intermediate Chains für die Cargo Bindung und additional kleine Chains.

Der Powerstroke wird durch die Entlassung von Phosphat und ATP generiert, was zu einer Rotation des ATPase Rings und des Stiels führt.

Der Dynactin Komplex ist ein Multi-Subunit Komplex, der dem Intrazellulären Transport hilft, indem er an Dynein bindet. Dynein und seine Bewegung sind nicht gut verstanden.

Cilien und Flagellen



MT und Dynein sind wichtige Bestandteile von Cilien und Flagellen.

Die Grundstruktur, die die Cilien füllt wird Axonem genannt (links abgebildet, ohne PM). Sie besteht aus 9 + 2 Arrangements aus MT. Ausserdem enthält sie Dynein, die die Bewegung ermöglichen. MT werden von einem Basalkörperchen aus polymerisiert.

Verankerungsstellen im Cytoplasma

Wichtig: bei Prokaryoten und Eukaryoten Flagellen und Cilien wird die Bewegung durch einen anderen Mechanismus erzeugt.

Das Prinzip beruht darauf, dass die Motordomäne des Dyneins auf einem MT sitzt und die Fracht dieser Dyneine ist ein zweites MT. Dabei würden sich die zwei MT Stränge einfach parallel aneinander vorbei bewegen. Da aber die MT Stränge miteinander verbunden sind (im Bild links blaue Proteine), entsteht eine Beugung der beiden MT.

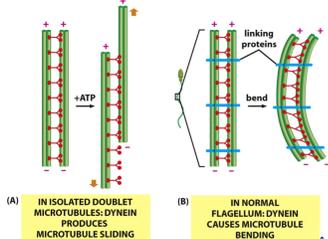
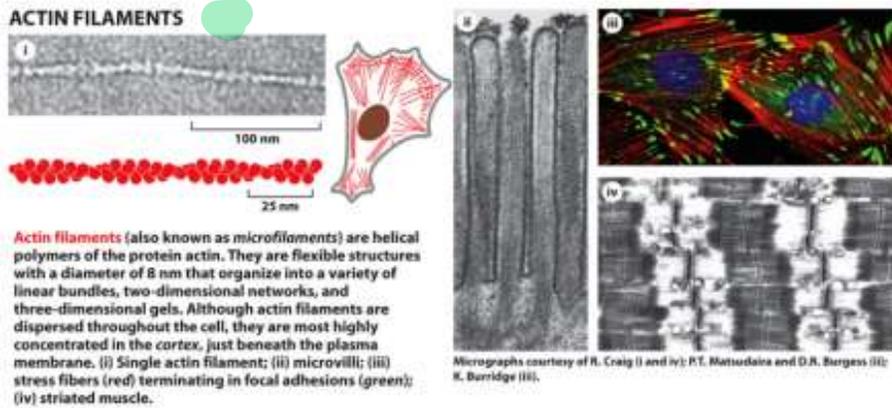


Figure 16-83 Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)

Wellenartige Bewegung (chemotaktisch)

↳ Nexin verbindet

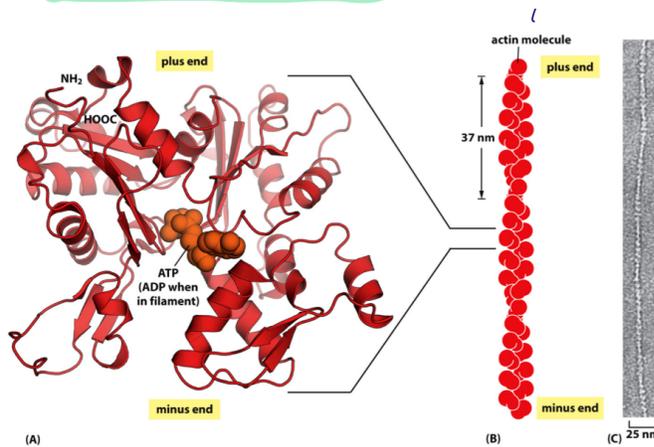
Actin Filamente



Actin Moleküleigenschaften

Actin ist abundant (=), monomer und cytosolisch und ist verwandt mit actinähnlichen Proteinen in Bakterien und Archaeen (z.B. FtsA). Es bindet und Hydrolysiert ATP. Es gibt zwei Formen:

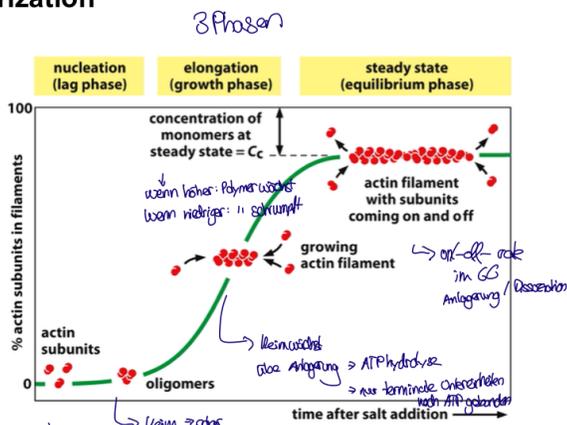
- Monomer → - G Actin ist löslich
 - Polymer → - F actin ist filamentrös (in nicht Muskelzellen ist das G und F Verhältnis 50:50) *Zusammengelagert zu Filament*
- G Actin Konzentration ist hoch aber das meiste ist an Thymosin gebunden, dass die Assemblierung verhindert. Actin trimere dienen als Keim für die Polymerisierung. Diese Polymerisierung erfolgt in der ATP Form (ähnlich wie bei MT). *Regulation*



Das Actin Molekül ist ein globuläres, asymmetrisches Molekül (polar). Die ATP Bindungsstelle befindet sich (im Gegensatz zu der bei den MT Filamenten) eher an dem Minus Ende, nicht am Plus Ende.

Actin besteht aus weniger Protofilamenten (2 Stück) als das MT, die eine rechtsgängige Helix bilden. Sie sind flexibler als MT.

Polymerization

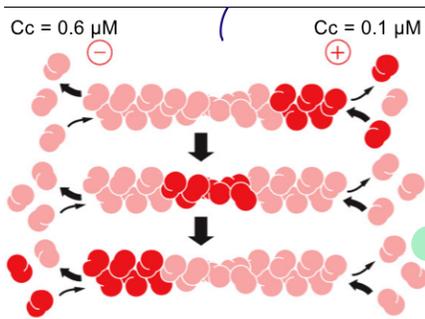


Es gibt wieder wie beim MT drei Phasen (links).

Wie beim MT muss sich zuerst ein Keim von ATP bindenden Actinmolekülen bilden. Dieser wächst dann schnell so lange, bis die Kritische Konzentration erreicht ist (es verlassen gleich viele Moleküle das Polymer, wie dazu kommen), die Länge bleibt gleich. Wie auch beim MT wird, wenn genügend Moleküle gebunden sind, ATP langsam zu ADP hydrolysiert (Es bildet sich ATP Cap). Das + Ende wird 10-mal so schnell polymerisiert wie das - Ende (Konformationsbedingt).

Handwritten note: neues Polymer abhängen

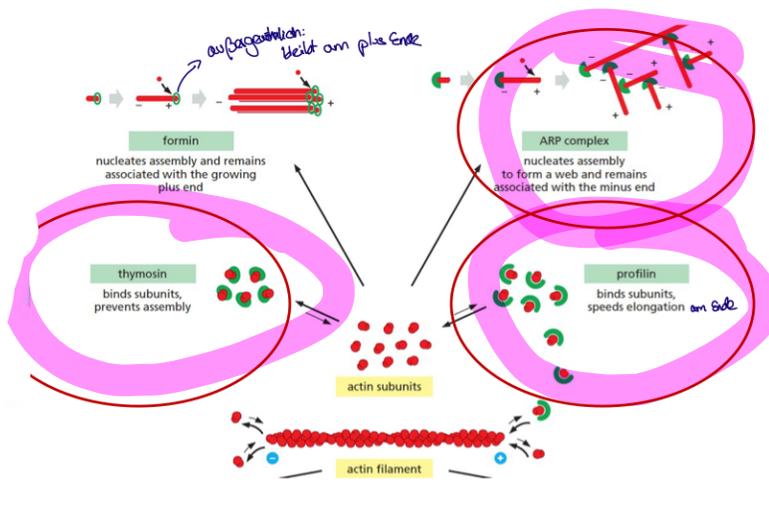
Dynamik



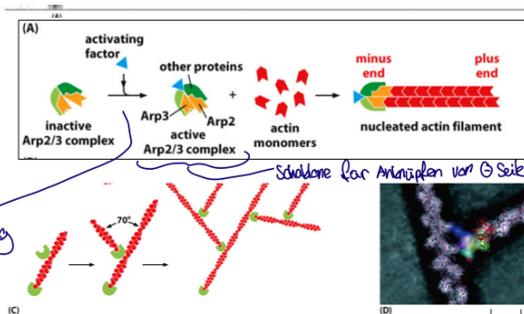
Ähnlich wie beim MT gibt es auch bei Actin eine Dynamik. Die ADP Form ist auch hier ⁱⁿ instabiler. Da das + Ende eine viel geringere Kritische Konzentration als das – Ende hat, wird auf der Einen Seite extrem Schnell Polymerisiert, auf der anderen extrem schnell depolymerisiert. Dies führt zu einem Netto durchfluss von Polymeren aber die Länge bleibt gleich. Dies wird auch **Tretmühleneffekt** genannt. Dieser scheint wichtig für die Dynamik und für actin-basierte Bewegungen zu sein.

Im Gegensatz zum MT, bei welchem die Polymerisation am Zentrosom beginnt, beginnt die Actin Polymerisation mit Keimen im Cytosol. Die Actin polymerisierung und der Tretmühleneffekt kann verwendet werden, um Bewegungen oder Kräfte zu generieren.

Actin Bindungsproteine

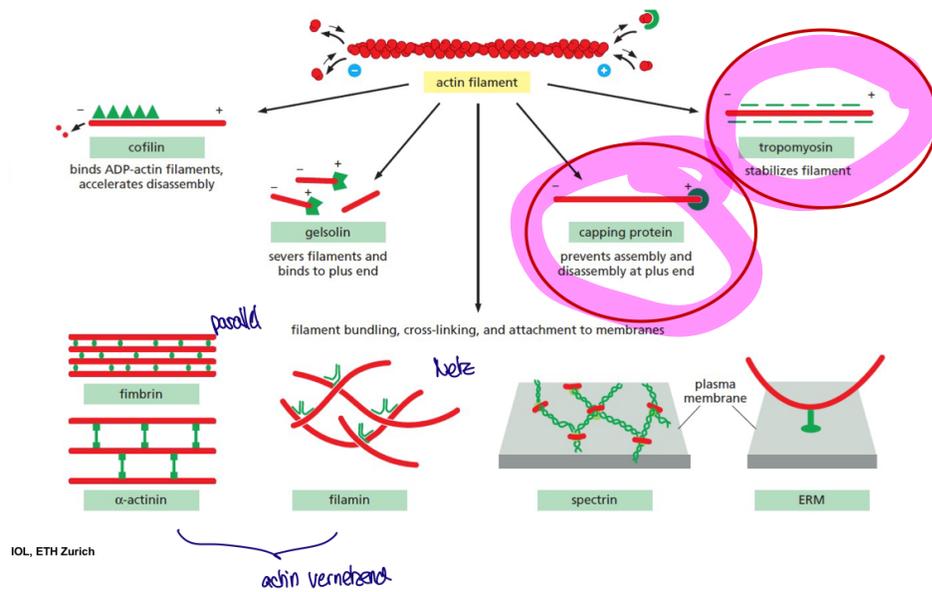


Arp2/3 Komplex



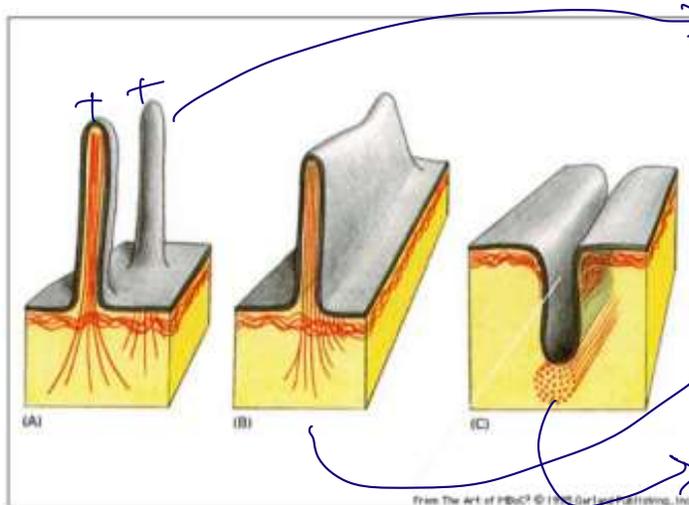
Arp 2 und Arp 3 Moleküle sind zu 45% identisch wie das Actin Molekül. Sie bilden zusammen den Arp2/3 Komplex. Durch aktivierende Faktoren wirkt dieser wie ein Keim, um eine Polymerisation beginnen zu können. Ausserdem kann er sich in einem Winkel von 70° an bestehende Filamente anlagern und von dort aus eine neue Polymerisation (als – Ende) ermöglichen. Dies ermöglicht die Entstehung von Actin Netzwerken.

gezielte Konformationsänderung



↳ wichtig für Zellausstülpungen

Durch bestimmte Proteine können Netzwerke gebildet werden, um bestimmte Strukturen zu formen.

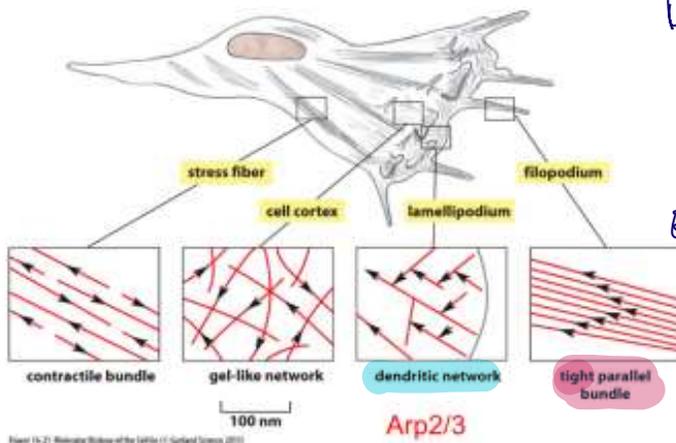


A: **Mikrovilli** (z.B. in Darmzellen zur Oberflächenvergrößerung). Das + Ende ist an der Spitze verankert und die Actinstränge sind parallel ausgerichtet und miteinander verbunden

B: **Stereocilien**: Ähnlich wie Mikrovilli treten aber in Clustern auf. Verwendet um Signale aufzunehmen (z.B. Innenohr für Gleichgewicht und Gehör)

C: **Kontraktile Ringe**: Werden durch Actin und Molekulare Motoren geschaffen und helfen der Zelle bei der Zellteilung.

→ nach innen gezogen



D: **Filopodien**: Fingerartige Strukturen, die ebenfalls Actin enthalten. Sie haben aber auch eine Signalwirkung (für Zellmigration, Zellen-Zellen Interaktionen...)

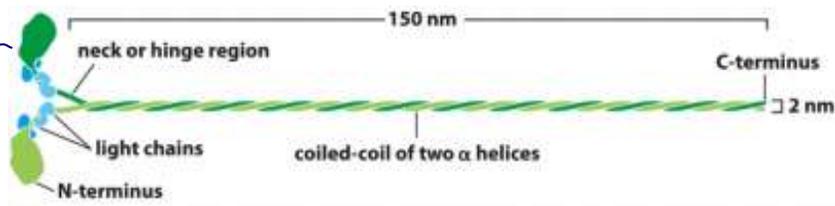
E: **Lamellipodien**: Sehr dünne, aber breite, dynamische Strukturen. Besitzen Actin Filament Netzwerke. Das Vorwärtswachstum passiert durch Wachstum von Actin Filamenten, die an die Plasmamembran angelagert sind.

Myosine

Sind Motorproteine in Eukaryotischen Zellen, die verantwortlich sind für Actin basierten Transport.

Myosin II → Muskelkontraktion, ATP abhängig

neck

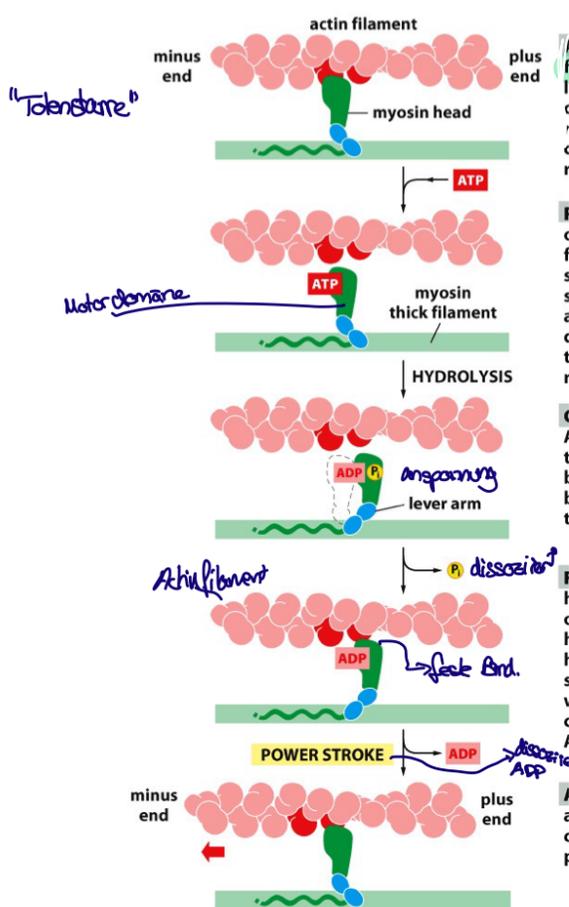


Das Myosin II ist ein Dimer, bestehend aus 2 langen gecoilten Monomeren mit je einem Motorkopf (ATP asen) und 4 leichten Seitenketten. Die Köpfe binden und folgen

den Actin Filamenten in Richtung + Ende. Die langen, gewickelten C-terminalen Tails überführen Myosin II in bipolare, dicke Filamente (siehe rechts und weiter unten).



Kraftschlag Zyklus



von oben nach unten: Es ist kein ATP oder ADP an das Myosin gebunden. Der Myosin Kopf bindet fest an das Actin. Durch ATP aufnahme des Myosin Kopfs wird die Actin Myosin Bindung weniger stark. Durch Hydrolisierung findet eine Konfirmationsänderung statt. Durch ADP Entlassung findet der Power Stroke statt (das Myosin wird nach vorne geschleudert). Nun befindet sich das Myosin wieder im Anfangszustand. Dieser Vorgang kann immer wieder wiederholt werden, um eine Vorwärtsbewegung zum + Ende des Actins zu erreichen.

→ brauchst auch Energie
um Muskeln zu lösen

Figure 16-29 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 201

Skelettmuskeln

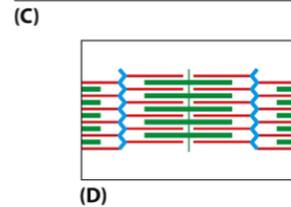
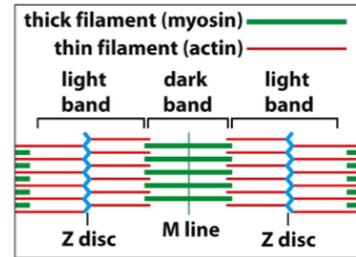
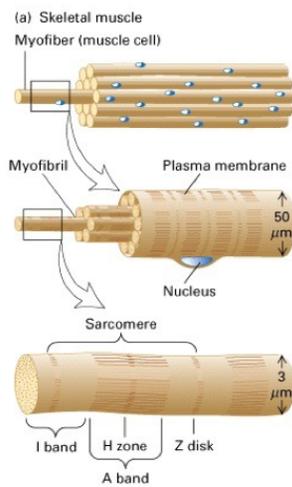
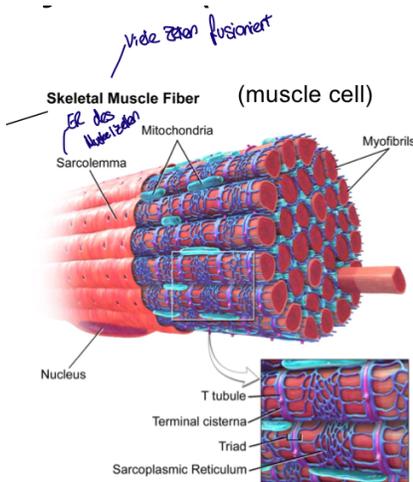
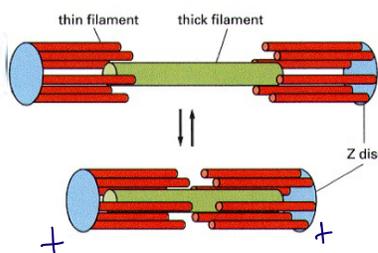


Figure 16-32d Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Blausen.com staff

Sarcomer

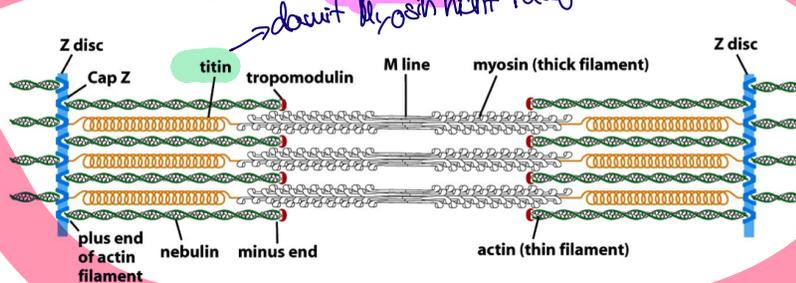


Bei der Muskelkontraktion wird das dicke Filament (das Myosin) sich auf beiden Seiten entlang dem dünnen Filament (Aktin) aufeinander zubewegen.

Die Z Scheiben werden dann zueinander geführt und dies passiert in der gesamten Fibrille.

Thin filament - actin - light bands
Thick filament - myosin - dark band

Molekulare Organisation Sarcomer

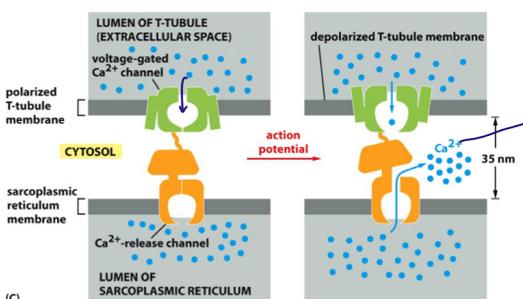


Da brauchst ATP um Myosin wieder zu lösen

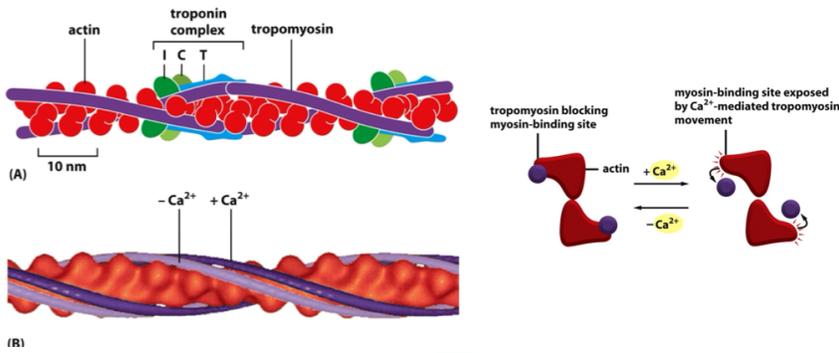
Wie im Bild links gezeigt sind die Actin Filamente an der Z Scheibe befestigt (plus Ende) und durch Cap Z gestützt. Das Protein Tropomodulin befindet sich an den minus Enden des Actins. Diese beiden Proteine

sorgen auch dafür, dass diese Filamente im Muskel stabil bleiben und nicht depolymerisieren.

Nebulin ist ein Protein mit 35 Aminosäuren repeats, welches an das Actin gebunden ist. Es definiert die Länge des dünnen Filaments. Titin faltet und entfaltet sich und hält die dicken Filamente in der Mitte des Sarcomers. Ausserdem erlaubt es die Rückführung nach einer Streckung.



Wenn ein Aktionspotential von der sich an der Muskelzelle befindlichen Nervenzelle ausgeht, so wird dieses durch die PM und durch Transvers Tubuli durch die ganze Muskelzelle weitergeleitet. Dieses Signal führt zu einer Öffnung der Ca^{2+} Kanäle des Sarcoplasmatischen Reticulums, wodurch viel Ca^{2+} in das Cytosol gelangt.



Tropomyosin ist ein Protein, das um den Aktin groove gewickelt ist und verhindert die Myosin-Bewegung. Am Ende dieses Proteins ist der Troponin Komplex (= Trimer aus Tropomyosin T, Calcium Binding C und Inhibitor I) angehängt. C macht den Komplex

Kalziumsensitiv. Ist viel Kalzium vorhanden, so löst sich das Tropomyosin also von den Myosin-Bindungsstellen und das Myosin kann dem Aktin entlangwandern, der Muskel zieht sich zusammen.

Soll der Muskel sich wieder entspannen, wird das Kalzium durch eine Kalziumpumpe aus dem Cytosol gepumpt. Das Tropomyosin bindet wieder und das dünne Filament wird wieder mithilfe von Titin in seine Ausgangsposition überführt (= Relaxion).

G: Membranlose Kompartimente (K. Weiss)

Zusammenfassung

(Unbedingt können!)

Vorlesung 1

Membranlos

	Ribosomen & andere 'klassische' Komplexe	P-Granules & andere Kondensate
Grösse	Definiert / Fix	Variabel (> 100x grösser als Ribosomen)
Komposition	Definiert / Fix	Dynamisch
Stöcheometrie	Definiert, interaktionen zwischen AA	Nicht Definiert über gesamtes Volumen
Dynamik	Variert	Flüssig, sehr dynamisch
Form	Definiert durch Architektur der Komponenten	Definiert durch Oberflächenspannung
Viskosität und Elastizität	'fest', Rigid Bodies	'flüssig', keine Elastizität

Membrangebundene Organellen	P-Granules und andere Kondensate
Langzeitstabilität, <i> feste Membran</i>	Schnelle Diffusion (Import & Export)
Nicht de novo formbar	De novo formbar
Selektiv	Selektiv
Kann Barriers auch für kleine Moleküle formen (wie Ionen, H+...)	Kleine Moleküle können ohne Probleme rein- und rausdiffundieren
	Dynamisch -> keine strikte Barriere

Vorlesung 2

Genetik (Phänotyp)	Biochemie (Assay)
'Unvoreingenommen', Alle Gene können gesampled werden	Mechanistische Details aufzeigen
Probleme: - Mutanten können indirekte Effekte haben - <u>Redundanz</u> (z.B. Multiple, parallele pathways)	Kann 'voreingenommen' sein (nicht alles kann Purifiziert werden)
	Simplifizierte Assays ausserhalb von Zellen möglich (in vitro) -> kann zu <u>artifacts</u> führen (etwas, was in vitro anders abläuft als in vivo)
Oft ist eine Kombination von beiden Herangehensweisen notwendig	

Vorlesung 1

Aktiver Transport (Energieinput)

- Transport durch Membranen (gegen einen Konzentrationsgradient)
- Direkter Transport: Motorproteine

Passiver Transport (kein Energieinput, hauptsächlich durch K. Weiss diskutiert)

- Freie Diffusion / Brownian Motion
- Erleichterte Diffusion (z.B. Ionenkanäle)

↳ durch Membranen

Membranlose Organellen (Membrless organelles, MLOs)

Assemblieren sich selbst und werden aufgrund bestimmter biophysikalischer Prinzipien (siehe später in dieser Vorlesung) auch als biologische Kondensate bezeichnet.

Dynamik von P Granuls

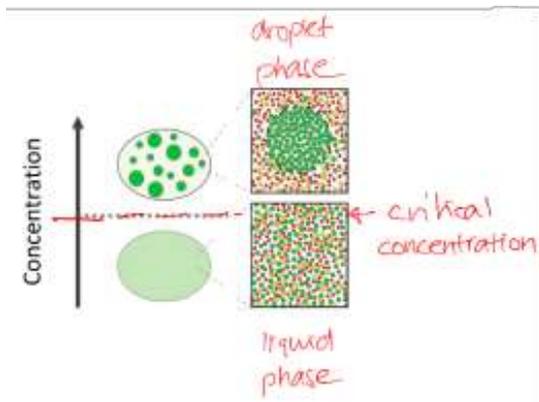
Um die Dynamik von P Granuls zu bestimmen, wurden Würmer püriert, die P Granuls fluoreszent markiert und unter dem Mikroskop angeschaut. Dabei wurde festgestellt, dass diese P Granuls sich wie flüssige Tröpfchen verhalten -> Sie haben sich fusioniert, haben sich zu Tröpfchen relaiert, sie flossen frei und deformierten sich und sie konnten sich auch spalten (fision). Diese Granuls verhielten sich also wie flüssige Tröpfchen, nicht so wie die Konzepte, die man von z.B. Organellen wie Mitochondrien kennt (wie Feststoffe).

z.B. Mischung von Essig und Öl führt zu Tröpfchen. Dies es Phänomen wird als Liquid-Liquid Phase Seperation (LLPS) bezeichnet.

Folgende Organellen verhalten sich nach obigen Prinzip (MLOs):

- P Body (= P Granuls) } bekannt
- Stress Granule
- Germi Granule
- Nuclear Speckles (Splicing Faktoren anreicherung)
- Nucleolus -> bekannt
- Cajal Body

Thermodynamik von LLPS



Ab einer bestimmten Kritischen Konzentration wird die Löslichkeitsfähigkeit von z.B. Essig in Öl überschritten und es bilden sich diese Tröpfchen.

Dies passiert so weil: Gibbs Freie Energie wird bestimmt durch die folgende Gleichung:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

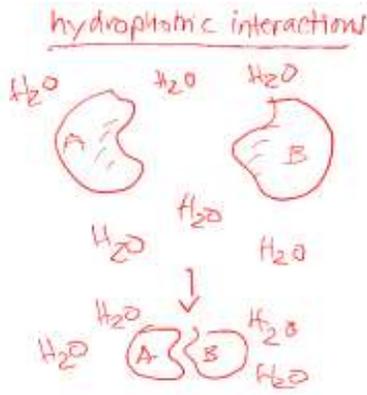
-> ein großes Tröpfchen besser als viele kleine weil weniger Wassermoleküle drumherum anliegen

-> freier beweglich

Enthalpie ist z.B. bei einer Protein-Protein Wechselwirkung abhängig von

- Ionischen Interaktionen
- Wasserstoffbrücken
- Van der Waals Kräften

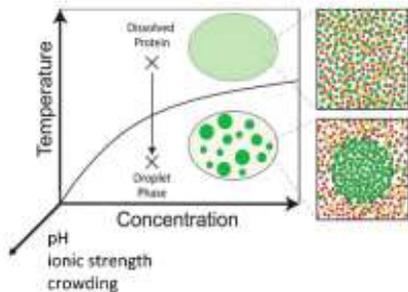
Alle die oben genannten Faktoren tragen dazu bei, ob und wie Viel Wärme bei einer Reaktion abgegeben wird.



Wenn sich diese Tröpfchen formen, so wird das Mass der Unordnung erniedrigt und so arbeitet man gegen die Entropie. Dies wird aber ausgeglichen, indem die Freiheit (die Entropie) des Wassers erhöht, wird z.B. durch hydrophobische Interaktionen.

Wird die kritische Konzentration überschritten, ist die Entropische und Enthalpische "Strafe" des Wassers so gross, dass Proteine aneinander überführt werden.

(Sobald das Gleichgewicht der Tröpfchen erreicht ist gibt es keinen Net Flux mehr (Tröpfchengrösse ändert sich nicht, Teilchen schon).)

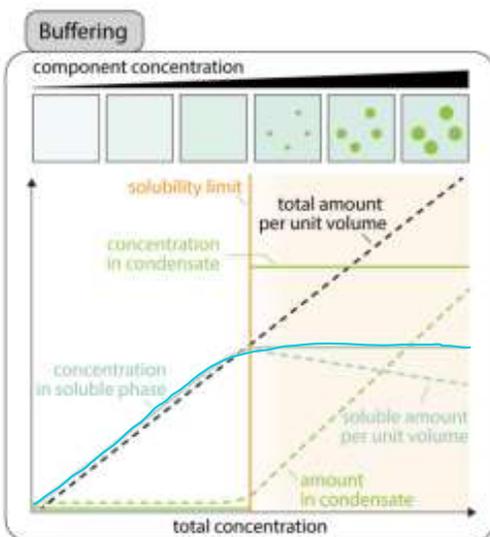


Wichtige Faktoren, ob Tröpfchen gebildet werden (kritische Konzentration wird beeinflusst):

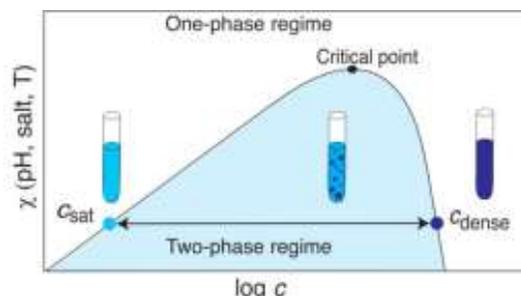
- Temperatur
- pH-Wert
- Ionische Stärke
- Crowding

Tröpfchenform

Tröpfchen sind rund, da es eine Surface tension (=Laplace pressure) gibt (hydrophobe Teilchen wollen so wenig wie möglich mit dem Wasser in kontakt kommen). Durch eine Kugel kommen so wenig Teilchen wie möglich mit dem Wasser in kontakt. Gibt es viele kleine Kugeln, werden diese fusionieren (möglichst grosses Volumen bei möglichst kleiner Oberfläche (Reifung)).



In der Grafik links sieht man, dass sich ab einem bestimmten Level an Konzentration eines löslichen Stoffes bei weiterer Zugabe die freie Konzentration dieses Stoffes nicht mehr ändert, sondern in Tröpfchen "abgespeichert" wird. Der LLPS hat also einen Puffereffekt.



Wenn man immer mehr Stoff zugibt, so bilden sich mit der Zeit immer mehr und immer Grössere Tröpfchen, aber ab einer bestimmten Konzentration wird dieser stoff dann die lösliche Phase (Bild oben rechts).

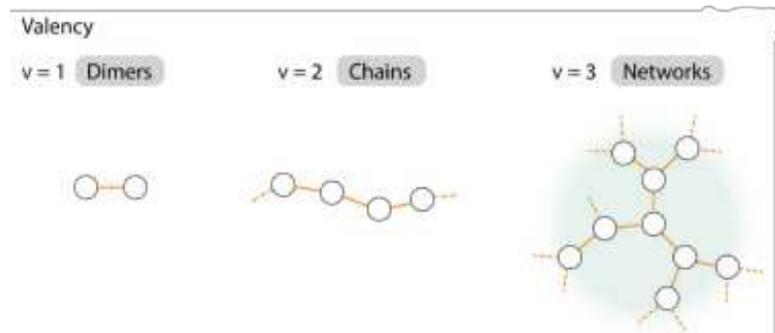
FRAP

Hat man ein fluoreszierendes Tröpfchen und bleicht dieses, so beobachtet man, dass die Oberfläche schnell wieder fluoreszierend wird (austausch zwischen Cytoplasma ist schnell). Bis das ganze Tröpfchen wieder fluoreszierend wird dauert aber sehr lange.

→ Viel schneller austausch, aber nicht alles wird ausgetauscht

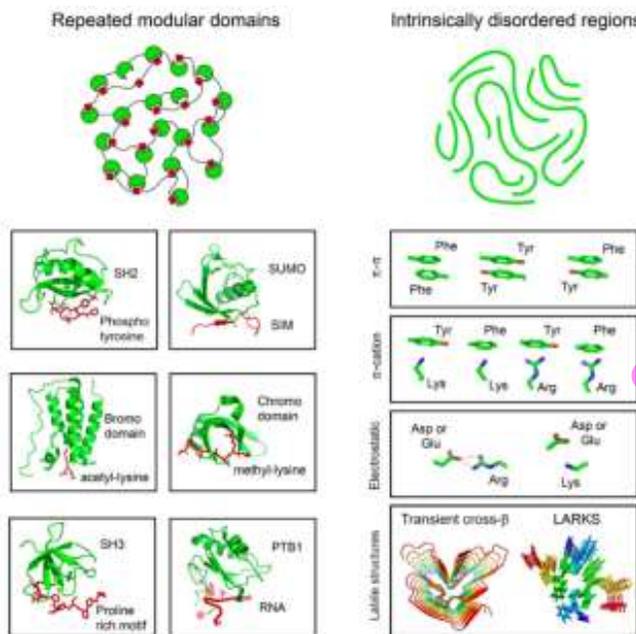
Kompartimente können zwischen flüssig und Gelartig wechseln, können aber auch in solid übergehen. Dabei ist kein Austausch zwischen Cytosol mehr möglich. Dies führt zu Krankheiten.

Molekular



Bei Protein Valenz von 1 können Dimere gebildet werden, bei Valenz 2 können Ketten gebildet werden und ab einer Valenz von 3 können Netzwerke gebildet werden. LLPS benötigt also mindestens eine Valenz von 3 von Proteinen und RNA, um Netzwerke bilden zu können.

Interaktionstypen benötigt für LLPS

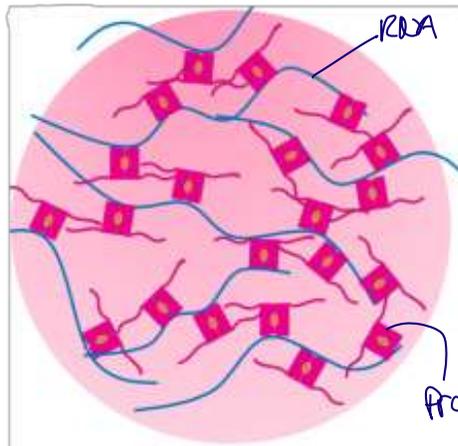


Es gibt 2 verschiedene Interaktionen:

- Auf **repetierenden strukturierten Proteindomänen** z.B. RNA Bindungsmodule, von welchen ein Protein mehrere besitzt, die miteinander Binden können
- Auf **Intrinsisch Ungeordnete Regionen (IDR, sehr geringe Sequenzkomplexität = nicht Teil von Domänen)** z.B. **homotypische Interaktionen** bei welchen das Protein mit sich selbst interagiert und **heterotypische Interaktionen** in welchen das Protein mit anderen Proteinen interagiert. Dies können z.B. Aromatische AA mit sich selbst oder mit Lys und Arg sein, die sich aneinander Lagern, um sich dem Wasser zu entziehen oder Interaktionen zwischen + und - AA

Wichtig: Da die Valenz extrem gross ist müssen obige Interaktionen **extrem schwach** sein, sonst würden die Proteine ihren flüssigen Status verlieren.

Repetierende Strukturierte Proteindomänen

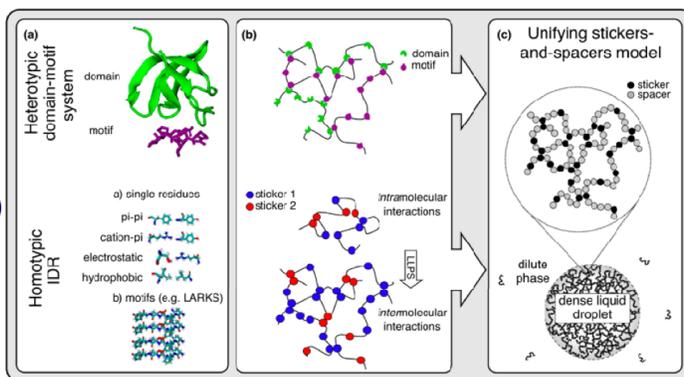


Proteine binden aufgrund von bestimmten Domänen (z.B. RNA Bindungsmodulen) aneinander. Diese Interaktionen sind extrem schwach (sonst wäre das Protein aufgrund hoher Valenz fest) aber genug stark, um eine Phasentrennung zu bewirken. Ein Tröpfchen bildet sich.

→ RNA ~~an~~ in Flüssigkeit (blau)
→ Protein bindet

Protein
mit DEAD-box
ATPase ⇒ ATP benötigt

Intrinsisch Ungeordnete Regionen



Beim **Sticker** and **Spacer** Modell (Teile des Proteins die aneinander "kleben" und Teile, die dies nicht tun) stellt man sich die Sticker Regionen als klebende Stücke vor, die sich immer wieder schwach aneinander binden und wieder lösen. Je mehr Sticker Regionen und je größer die Bindungsstärke dieser sowie je kürzer die Spacer Regionen, desto dichter werden auch die Komplexe.

Je nach Stärke obiger Interaktionen werden folgende Proteinkomplexformen gebildet:

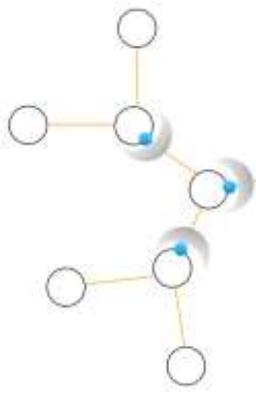
- Flüssig → gelöst, kein Kondensat
- Gel («Molekulare Kondensate», bilden die MLOs)
- Fest (Aggregate, passiert in der Zelle eigentlich nicht)
↳ nicht gut

Regulierung von Kondensation

Die Kondensation ist abhängig von den folgenden Faktoren (siehe oben):

- pH-Wert (fast konstant)
- Ionische Stärke (fast konstant)
- Crowding (fast konstant)

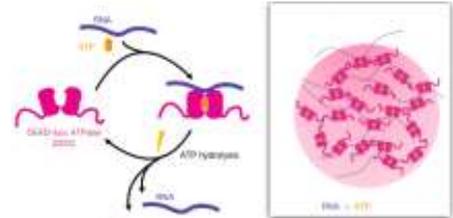
Aber die Phasentrennung kann auch durch die **Valenz von Proteinen** reguliert werden. Dies wird in der Zelle erreicht durch:



- **Post Translational Modifications** (PTM, z.B. Phosphorylierung durch Kinasen z.B. pos. Serine in neg. Phosphoserine)
- **pH** verändert Oberflächenladung von Proteinen
- **Shielding / Adapterprotein** (linke, graue Proteine) → bindet an Protein, verhindert Interaktion
- **Allosterische Interaktionen** durch z.B. Bindung eines kleinen Moleküls an ein Protein wird dessen Struktur verändert und ermöglicht oder verhindert Bindung

→ Extra Zentrum, verändert aktives Zentrum

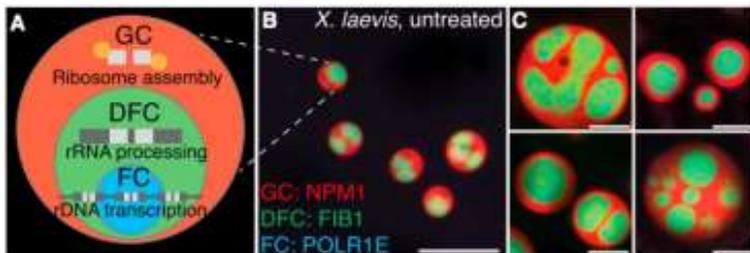
Ein weiteres Beispiel ist die **DEAD-Box ATPase (DDX)**. Diese hat in der ATP Form eine gute Affinität für Protein Bindungsregionen. Wird das DDX hydrolisiert, ist die Affinität viel schlechter. So kann die Zelle durch Hydrolisierung und Phosphorylierung von DDX die Kondensation Regulieren. Vermutlich wird die Energie verwendet um Ordnung zu schaffen.



→ Ordnung schaffen mit Energie

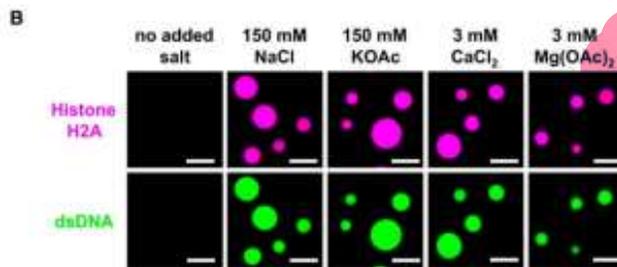
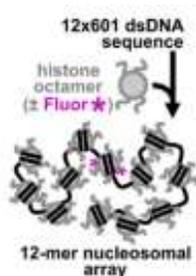
Hypothese: Verschiedene DDX Proteine könnten bestimmte Proteine an einem bestimmten Ort in einem membranlosen Kompartiment sammeln. So könnte ein "Weg" für die RNA Prozessierung geschaffen werden. Dabei können sie auf 2 Arten reifen: die 2 Arten wie beim Golgi-Apparat.

Beispiel Zelluläre Kondensate: Nukleolus



Der Nukleolus formt ein Multi Phasen Kondensat aus 3 Phasen (Namen der Proteine sind nicht wichtig). Er enthält «Tröpfchen in Tröpfchen». Diese bilden sich auch in vitro. → Hetero- und Euchromatin

Beispiel Zelluläre Kondensate: Chromatin



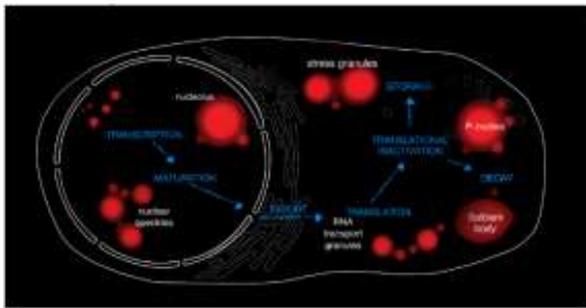
Auch Chromatin bildet in vitro Phasentrennung.

Es leistet also auch seinen Beitrag dazu, die Struktur des Nukleus zu formen.

→ weil Histone und DNA bilden Tropfen

→ Histone (Proteine) bestimmen Kondensation → dicht gepackt = stark kondensiert

Beispiel Zelluläre Kondensate: RNA Prozessierung



Auch die RNA Prozessierung findet in vielen phasen Getrennten Kompartimenten statt. (siehe auch DDX Proteine weiter oben)

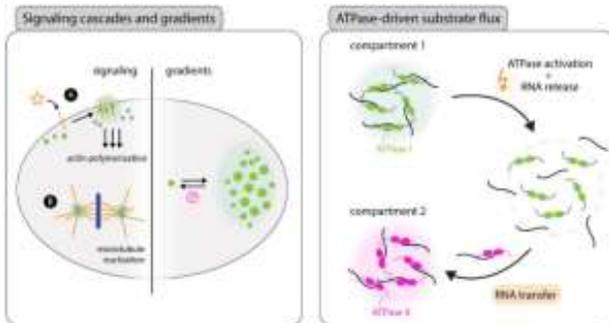
→ Post-translationale Modifikation

Vorlesung 2

Funktion von Molekularen Kondensaten

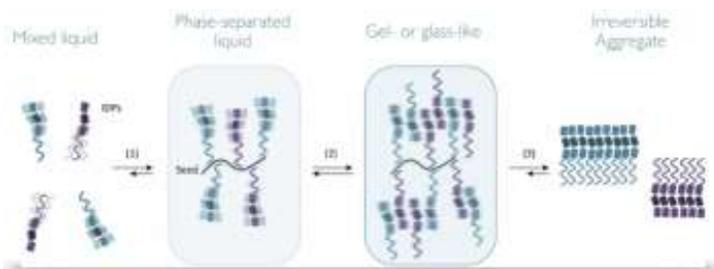
- **Organisational Hub:** Proteine werden in eine hohe Konzentration z.B. in dem Nukleolus gebracht, dadurch werden die Transkriptions Reaktionen beschleunigt oder Signaltransduktionsprozessen im Cytoplasma, dass Substrate schnell und an einer bestimmten Punkt verarbeitet werden können → Kondensat kann sich bilden und wieder lösen
- **Jail & Storage Facility:** Gewisse Enzyme sind gezielt lokalisiert, um zu verhindern, dass sie Schaden in der Zelle anrichten. Z.B.: RNA Degradierungs Enzyme (in P-Bodies) oder mRNA Lagerung (in Stress Granuals)
- **Puffer:** Wenn ein gewisses Konzentrationslimit überschritten ist, so wird sich die Konzentration an Proteinen oder RNA in der flüssigen Phase nicht mehr erhöhen. Lediglich die Konzentration von Kondensaten dieses Stoffes. So entsteht ein Puffer dieses Stoffes (siehe Membranlose Kompartimente Vorlesung 1).

Kondensate als Aktive Flüssigkeiten



Kondensate können zum einen durch z.B. DDX Proteine Ordnung schaffen (und gegen ein Thermodynamisches Gleichgewicht ankämpfen) oder sie können Signalkaskaden oder Gradienten aufbauen. Dadurch, dass Energie aufgewendet wird um die Kondensate aufzubauen können sie auch Arbeit verrichten.

Kondensate und Krankheiten



Mit der Zeit können irreversible Aggregate entstehen. Diese können zu folgenden Krankheiten führen:

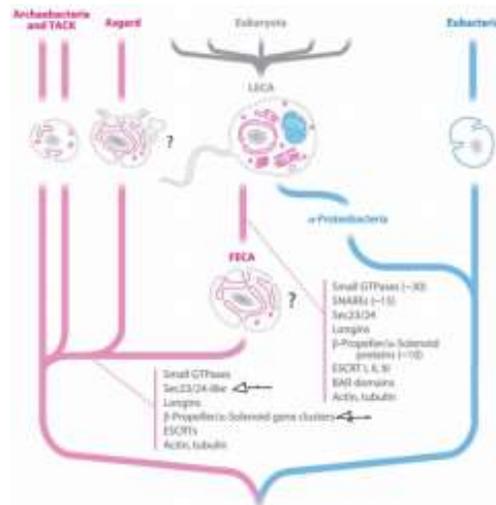
- Neurodegenerative Krankheiten
- Diabetes
- Augenkrankheiten
- Krebs

→ fest

Die Zelle hat Proteine, die diese **irreversiblen Aggregate unter Energieaufwand verhindern**, funktionieren diese nicht richtig, so kann dies zu obigen Krankheiten führen.

Evolution von Biomolekularer Kondensation und membranlosen Kompartimenten

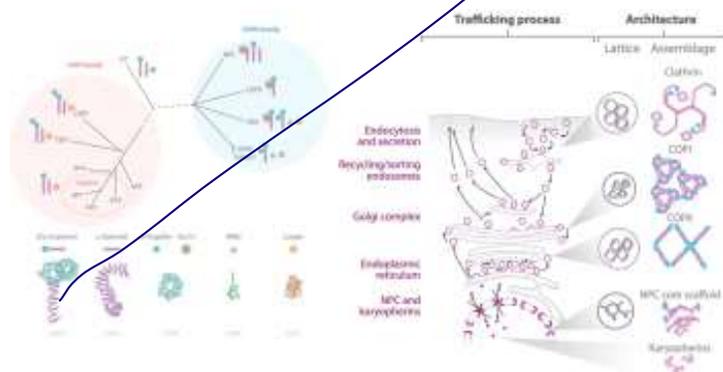
Es ist möglich, dass die **ersten Lebensformen Membranlos gewesen sein könnten**.



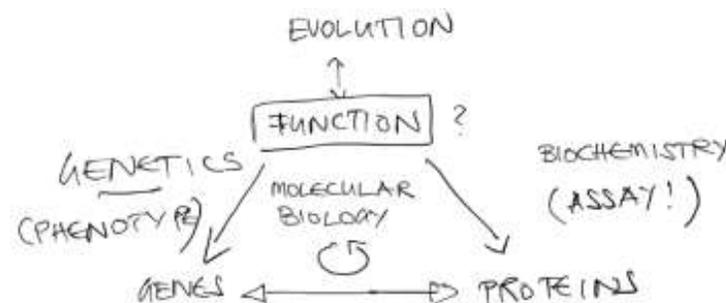
Gewisse Proteinfamilien sind in **Asgard** (Archaeen, die eine intrazelluläre Organisation und Endomembransysteme besitzen) und in Eukaryoten ähnlich (Kleine GTPasen, Sec23/24 ähnliche Proteine...).

Es könnte sein, dass es sehr früh einen Komplex gab, der für die Invaginierung der Plasmamembran verantwortlich war, welcher die Kernporen geschaffen hat.

Auch **Kernsignale** (positiv geladen) könnten früher als DNA und RNA (negativ geladen) Bindungsproteine gedient haben und sich später erst als Signale weiterentwickelt hatten.



Experimentelle Grundlagen



Es gibt zwei Möglichkeiten Biologische Funktionen zu erforschen:

- **Genetik** (Phenotyp Beobachtungen)
- **Biochemie** (Assay durchführen)

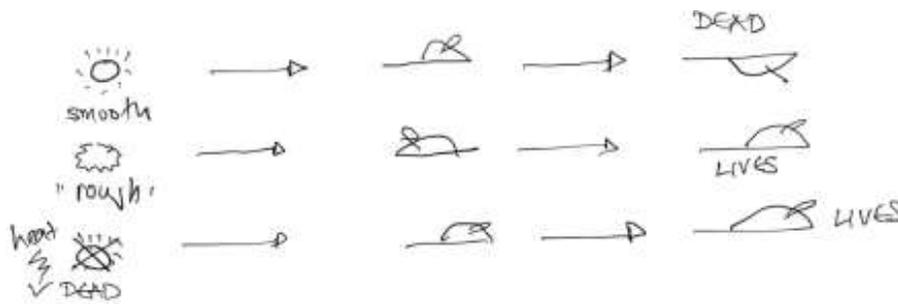
Am Ende sollten sich diese Pfade treffen. Dies wird durch die **Molekularbiologie** gemacht.

Um eine Hypothese zu testen benötigt man:

1. Einfacher Assay (darf nicht zu lange dauern)
2. Kontrolle (um die Hypothese zu festigen)
3. Glücklicher Zufall

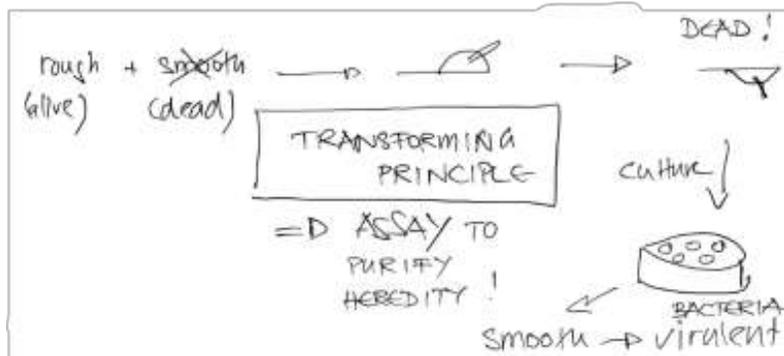
Frederick Griffith Experiment

War der erste, der versuchte, Vererbungen biochemisch zu reinigen.



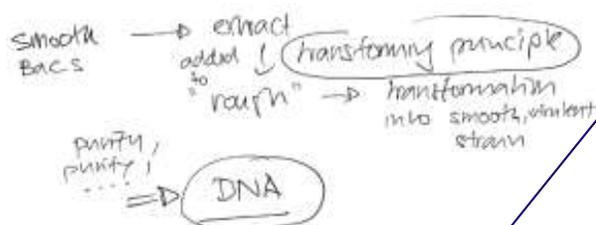
Während der Spanischen Grippe wollte er die Krankheit eindämmen, indem er Menschen gegen den Erreger von Lungenentzündung (von Pneumokokken) immun macht.

Glatte Pneumokokken sind tödlich für Mäuse. Raue Pneumokokken können sehr gut vom Immunsystem bekämpft werden. Er hat dann herausgefunden, dass er glatte Pneumokokken durch Hitze abtöten oder abschwächen kann, wodurch die infizierten Mäuse ebenfalls überleben.



Als er tote, glatte Bakterien zusammen mit lebenden, rauhen Bakterien in die Mäuse injizierte, starben sie ebenfalls. Er erfand das **Transforming Prinzip**, Bakterien können sich durch Kontakt zu anderen Stämmen verändern.

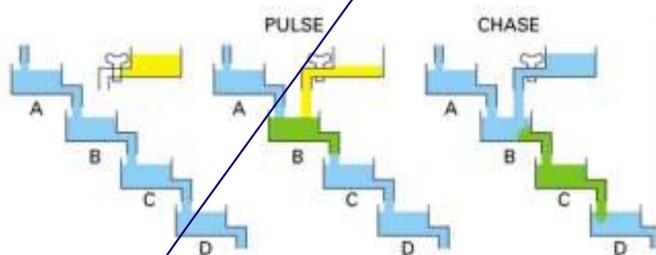
Avery-MacLeod-McCarty Experiment



Aufgrund von Griffiths Experiment: Haben ein richtiges biochemisches Assay mit glatten Bakterien gemacht, und das Extrakt zu rauhen Bakterien gegeben und herausgefunden, dass **DNA** für das Transforming Prinzip verantwortlich war.

George Palade

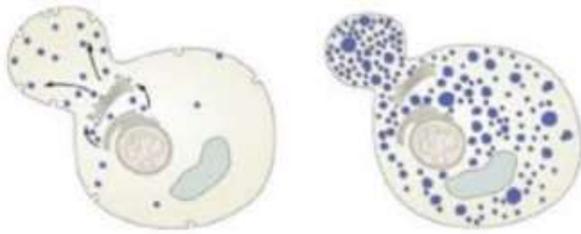
Hat Methoden entwickelt, wie er Zellen fixieren kann und mit einem Mikroskop begutachten kann und hat Palade Partikel (= Raues ER) entdeckt.



Er hat ausserdem das **Pulse-Chase Experiment** durchgeführt: Dafür hat er für einen kurzen Zeitpunkt eine radioaktiv markierte AA in eine Pankreas Zelle gegeben und dann gleich eine grosse Menge an AA überschuss (nicht radioaktiv). Danach hat er mit dem Mikroskop den Weg

der Radioaktivität verfolgt. So hat er herausgefunden, dass die Radioaktivität von Ribosom zu ER, dann Golgi, dann in Sekretorischen Granuals und zum Schluss ausserhalb der Zelle. Er konnte so Zelltransportprozesse aufzeigen.

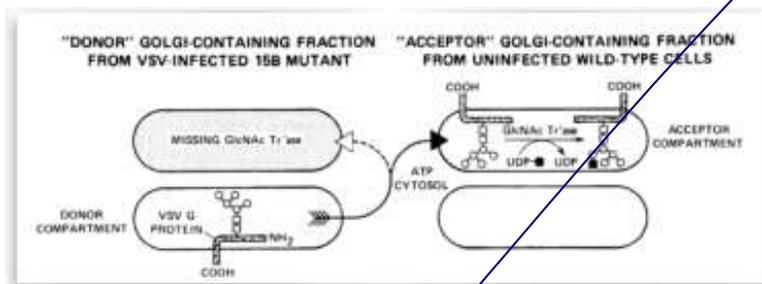
Randy W. Schekman



Führte ein genetisches Assay durch, in welchem er einen konditionalen Mutanten (Sekretionsenzyme werden durch hohe Temperaturen nicht mehr funktional) mit einer Hefezelle bei normaler Temperatur verglich. Seine Hypothese: ohne Sekretionsmöglichkeit werden die Zellen dichter (mehr Vesikel).

Durch Zentrifugation hat er die zwei verschiedenen Hefezellen Typen voneinander getrennt. Er hat sie dann durch einen Enzymatischen Test (Invertase aktivität) voneinander unterschieden. Er hat so insgesamt 23 Mutanten gefunden, die Proteine in verschiedenen Kompartimenten anlagerten.

James E. Rothmann



Führte ein Biochemisches Assay durch. Eine Wildtypzelle wurde mit einem Virus infiziert, welches G-Protein mit einem Zucker modifiziert. Eine mutierte zelle wurde ebenfalls mit diesem Virus infiziert, jedoch modifiziert das Virus das G-Protein nicht.

Als nächstes hat er die mutante Zelle aufgebrochen und mit der Wildtypzelle inkubiert. Ist also das Protein Modifiziert, muss ein Transport von Donor Kompartiment zu Akzeptor Kompartiment stattgefunden haben.

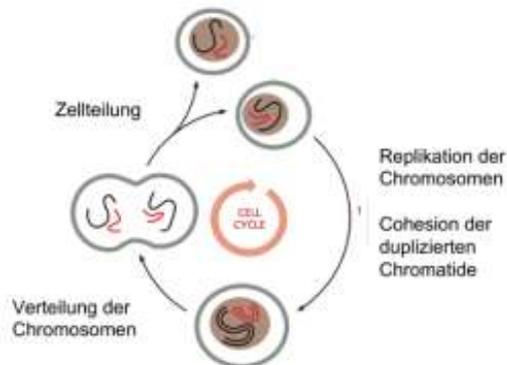
Dabei hat er die folgenden 4 Faktoren aufgereinigt:

- NSF
- SNARE (Soluble NSF attachment Protein Rezeptor)
- COP I
- SNAP (Soluble NSF attachment Protein)

H: Zellteilung (M. Peter)

Vorlesung 1

Überblick Zellzyklus

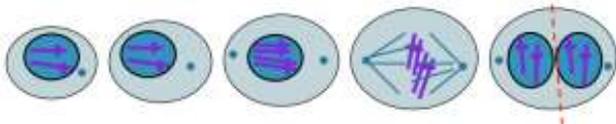


Eine Zelle reproduziert sich in einer geordneten Abfolge von Ereignissen, in welchen sich alle Bestandteile der Zelle verdoppeln und auf 2 Tochterzellen aufteilen. Diese Abfolge wird Zellzyklus bezeichnet und ist die Grundlage der Reproduktion aller Lebewesen.

Dazu muss das genetische Material repliziert werden. Replizierte Chromosomen werden miteinander verbunden und bis zur Zellteilung zusammengehalten.

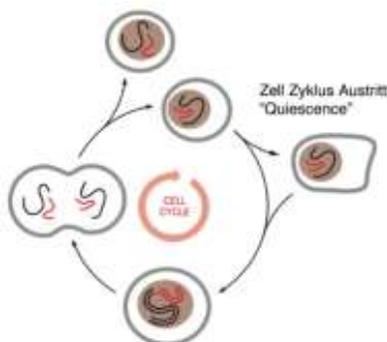
Das Zellwachstum erlaubt die Verdopplung aller zellulären Bestandteile. Die Zellteilung und Zellwachstum müssen an die Umgebung angepasst sein.

Die wichtigsten Schritte des Zellzyklus



- **Commitment zur Zellteilung** Ist Zellteilung möglich? → *signale*
- **Verdopplung der zellulären Bestandteile**
- **Aufteilung der Bestandteile in Tochterzellen** durch den Aufbau einer Teilungsmaschinerie
- **Zeitliche Koordination aller Schritte** z.B. keine Zellteilung vor der Replikation
- **Koordination mit Zellwachstum und externen Signalen** Teilung für Organismus nötig?

Menschliche Körperzellen

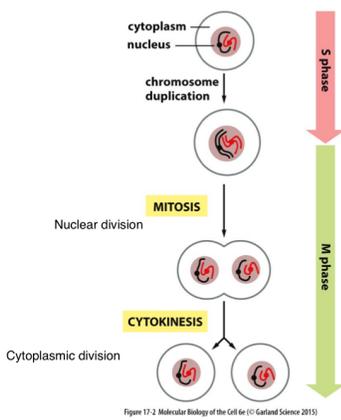


Die meisten Zellen im menschlichen Körper teilen sich nicht mehr. Dabei findet ein (vorübergehender) Austritt aus dem Zellzyklus statt, welcher eine Gewebe-homöostase und/oder eine Differenzierung (ausbildung verschiedener Zelltypen) erlaubt.

Diese können bei z.B. Verletzung aber wieder in den Zellzyklus übergehen und sich wieder teilen.

Homöostase: Aufrechterhaltung

S (= Synthese) und M (= Mitose) Phase



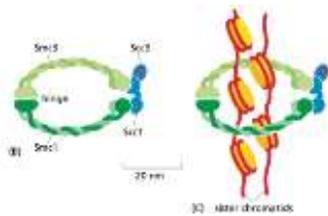
S Phase

Bei der Semi-Konservativen Replikation (S Phase, siehe N. Ban) wird die Hälfte der ursprünglichen DNA und die Hälfte der neu replizierten DNA jeweils auf zwei Tochterzellen verteilt. Sie hat eine leichte morphologische Änderung zur Folge.

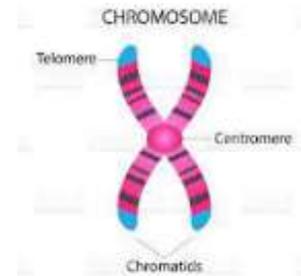
↳ Gestalt/Form

M Phase

Fehlerfreie Segregation (= Trennung) der replizierten Chromosomen in zwei Tochterzellen. Sie ist gekennzeichnet durch eine starke morphologische Änderung.



Nach der Synthese werden die duplizierten DNA Stränge (immer 2 Schwester-Chromatide) durch während der S Phase an das Chromatin gebundenes Cohesin zusammengehalten (links, grünes Protein).



Chromosome bestehen aus Zentromer, Telomere und zwei Chromatiden. Bei der Zellteilung wird aus einem 1 Chromatid Chromosom ein zwei Chromatid Chromosom durch Replikation.

Zwei Arten, Um Zellen in der S Phase zu kennzeichnen

Bei der FACS Analyse wird der DNA gehalt der Zelle überprüft, da dieser je nach Zyklus variiert.

Durch ein Modifiziertes Nukleotid werden Zellen in der S Phase markiert, da sie das modifizierte Nukleotid einbaut.

Zellzyklus Übersicht

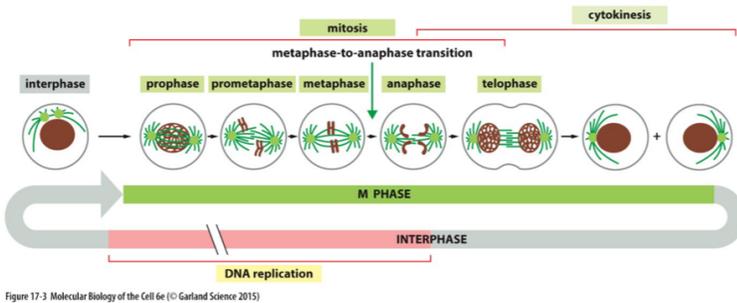


Figure 17-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

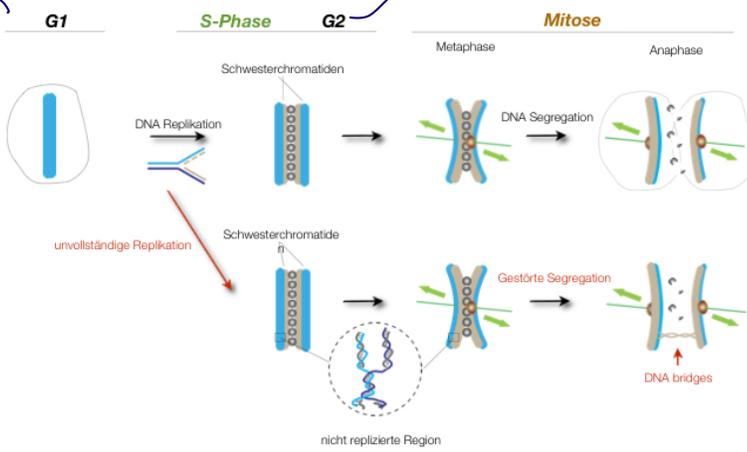


Oben sind zwei Übersichten über den Zellzyklus. Dieser ist **unumkehrbar**.

leben

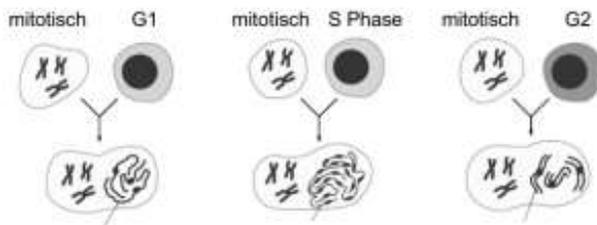
Wachstum

Wieso Replikation und Mitose zeitlich getrennt sind



Bei der unvollständigen Replikation gibt es sehr viele nicht replizierte, zusammengehängte Regionen. Dabei entstehen DNA bridges. Diese werden dann mit der Zeit reissen und führen zu Mutationen, die extreme Folgen haben könnten.

Zellfusionsexperimente von Johnson und Rao



Nur ein Faktor der Zelle in der **M-Phase induziert Chromosomen Kondensation in G2 Zellen**. Der Mitose-induzierte Faktor hat keinen Effekt in Zellen in der G1 oder S Phase.

-> Zellzyklus kann nur in eine Richtung ablaufen

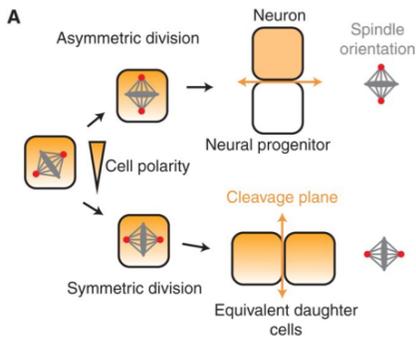
Nur replizierte zellen sind empfänglich für Mitose

Zellzyklusforschung

Folgende Organismen werden zur Zellzyklusforschung verwendet:

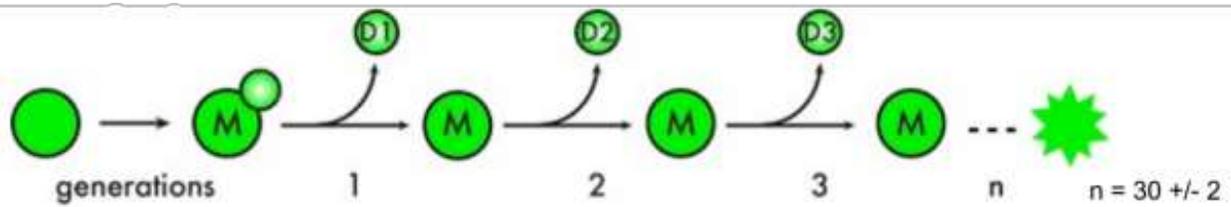
- **Hefe** Bildung der Tochterzelle bereits in der M Phase sichtbar -> CDC screens (= Cell Division Cycle Screen) möglich
- **Fruchtfliege** Synchrones Durchlaufen mehrerer Zellzyklen ohne Gap Phasen und Zellteilung im Embryo (Aus einer grossen Stammzelle werden viele kleine Zellen der gleichen grösse wie die Stammzelle)
- **Fadenwurm** Gerade befruchtete Zygoten können isoliert und unter dem Mikroskop beobachtet werden (gleich wie bei Fruchtfliege) und hat asymmetrische Zellteilung (Tochterzellen in Grösse und Funktionen nicht gleich)
- **Krallenfrosch** Eier können verwendet werden um in vitro Zellzyklus biochemisch zu beschreiben
- **Humane Zell Linienkultur** Hela Krebszellen für Krebsforschung

Asymmetrische Zellteilung für Differenzierung bei neuronalen Zellen



Je nach **Orientierung der Spindel** können **unterschiedliche Arten von Zellen** oder zwei gleiche Zellen entstehen nach der Zellteilung. Für diese Orientierung ist das **PAR-2** Protein verantwortlich.

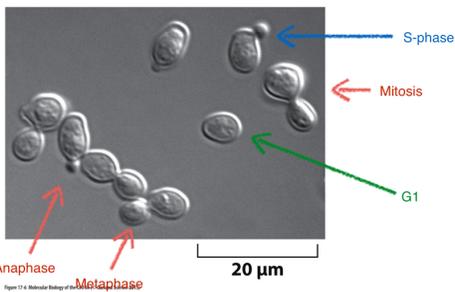
Alter von Hefe als Beispiel für Asymmetrische Zellteilung



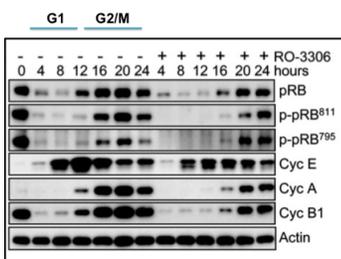
Hefezellen können sich ca. 30 Mal teilen, bis sie absterben. Dabei können sich selbst Tochterzellen von einer 29 Mal geteilten Mutterzelle ebenfalls 30 Mal teilen.

Methoden zur Analyse des Zellzyklus

→ je nach dem wie groß z. Teil → welcher Teil Teilung



Morphologie von Zellen kann anders sein je nach dessen **Schritt im Zellzyklus**. Zum Beispiel haben **Fibroblasten** je nach Schritt eine komplett andere Morphologie. Noch deutlicher ist dies in **Hefezellen** (links) beobachtbar. Auch **Rat Kangaroo** Zellen haben durch Morphologie geholfen, den Zellzyklus zu erforschen. Dessen Zellen sind relativ flach und lassen sich gut Mikroskopieren.



Spezifische Zellzyklus Marker sind biochemische Marker (Proteine), die **nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus vorkommen** (oder modifiziert sind). Durch sie kann auch der aktuelle Schritt des Zellzyklus bestimmt werden.

Das Zellzyklus Kontrollsystem

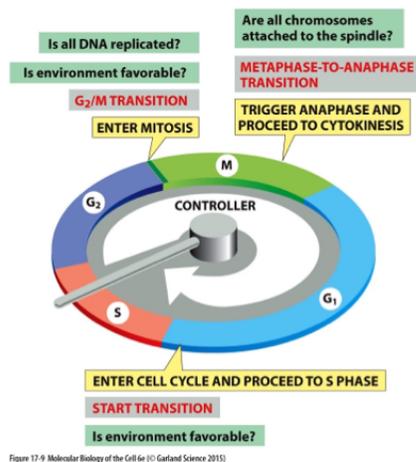


Figure 17-9 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

→ leben

G1 (gap): Pluripotentes Stadium, Möglichkeit zur Replikation, Differenzierung, Arrest. Die Länge der G1 Phase variiert stark *Zelle wächst*

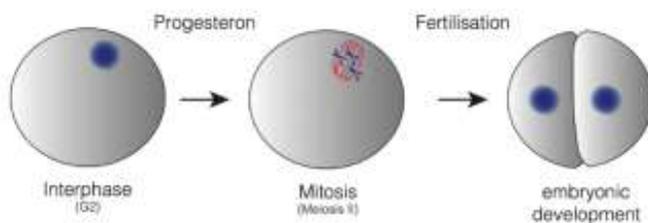
“START” (oder commitment point): Entscheidung zum Eintritt in den Zell Zyklus. Nach diesem Punkt muss der Zell Zyklus komplett durchlaufen werden **“point of no return”** und hat eine **relative konstante Länge**

S-Phase: DNA Replikation

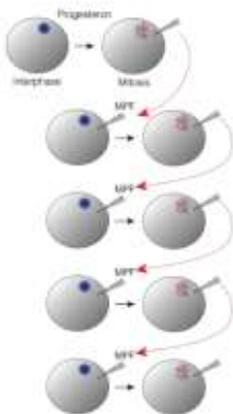
G2 (gap): Zeit für Kontrolle und Reparatur vor der Mitose.

M-Phase: (Mitose). Segregation der Chromosomen und Zell Teilung (Zytokinese)

Aus Johnson and Rao Experiment (siehe oben) ist bekannt: Ein zellulärer M-Phase Faktor induziert Chromosomen Kondensation in G2 Zellen.



Xenopus Oozyten (Knallfrosch Eier) sind normalerweise in der Interphase, aber mit **einem Progesteron kann man die Mitose initiieren.**

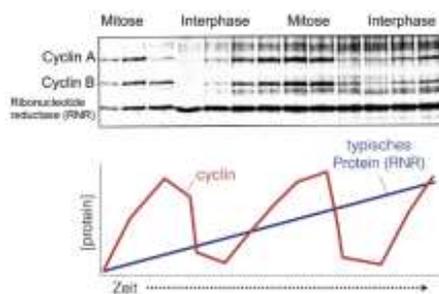


In diese Xenopus Oozyten wurden dann immer wieder verschiedene Extrakte einer Zelle in der M Phase gegeben (serielle Induktion). So konnte der dafür verantwortliche Stoff experimentell bestimmt werden. Er wurde MPF (=Maturation Promoting Factor) genannt. MPF ist:

- Ein Protein, kein Metabolit, da MPF nach kochen keine aktivität mehr
- Universell in allen Eukaryoten

Es wurden bei dem Experiment insgesamt zwei Proteine gefunden:

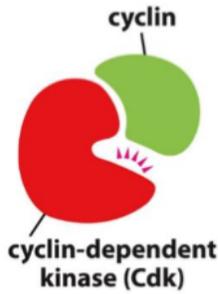
- 32kD grosses Protein, phosphoryliert H1 (= Histone H1) in vitro
- 45kD grosses Protein, phosphoryliert H1 (= Histone H1) in vitro



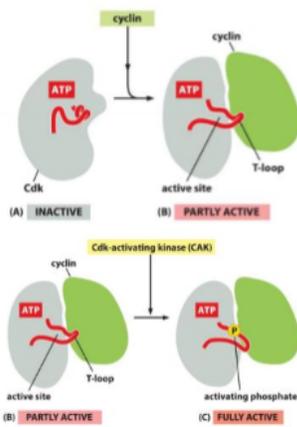
Gleichzeitig wurden auch die Cycline entdeckt. Zwei Proteine gibt es vor allem in der Mitose, nicht aber in der interphase. **Diese Cycline werden in jedem Zellzyklus neu gebildet und sind notwendig für das Fortschreiten des Zellzyklus.**

Ausserdem hat mit mit Hefezellen herausgefunden, dass cdc2 Mutanten nicht mehr in die Mitose gehen können. Somit muss Cdc2 der MPF sein. Cdc2 ist eine H1 Protein Kinase.

Cdk = Cyclin dependent kinase

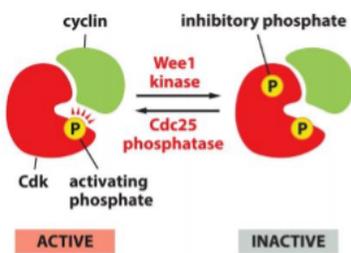


Cdk ist eine Cyclin abhängige Proteinkinase. Dabei wirkt das Cyclin als Aktivator der Kinase. Cyclin wird zyklisch aktiviert/exprimiert (siehe oben) in der Mitose. Der Zellzyklus ist also eine Abfolge von hoher und niedriger Cdk Aktivität.



Ohne gebundenes Cyclin ist die aktive Stelle der Kinase durch den T-Loop blockiert. Durch **Bindung des Cyclins** gibt es eine Konformationsänderung dieses T-Loops, die die aktive Stelle zugänglich macht.

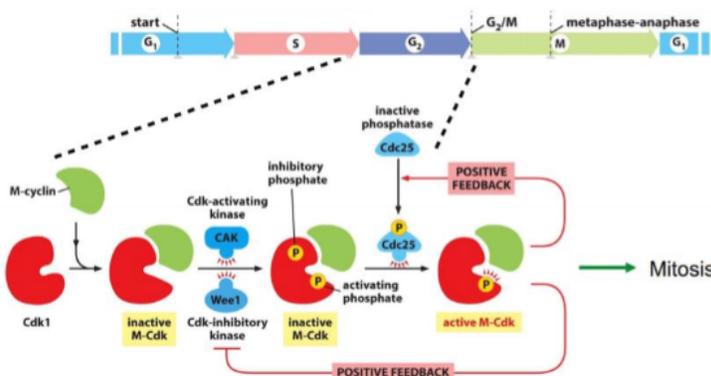
Allerdings erst durch **Phosphorylierung des T-Loops** (durch eine Cdk activating Kinase = CAK) wird die Aktivität stark erhöht und eine bessere Bindung des Substrats ermöglicht.



Ausserdem gibt es noch zwei weitere Regulatoren: **Wee1 Kinase**, die das Cdk ein zweites Mal Phosphoryliert und somit inaktiv macht und die **Cdc25 Phosphatase**, die diese Phosphatgruppe entfernt und Cdk so aktiviert.

- Cdc25 Mutant Phänotyp: werden immer länger
- Wee1 Mutant Phänotyp: wird viel zu klein
- Beide Regulatoren Phänotyp: ?

Dephosphorylierung aktiviert M-Cdk zu Beginn der Mitose



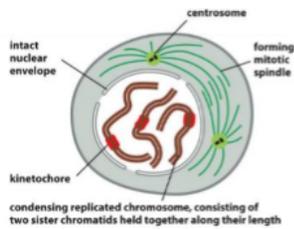
Obige Schritte sind links nochmal aufgezeigt. Wichtig ist noch, dass es einen **Positiven Feedbackloop** von der aktiven M-Cdk auf die Aktivierung von Cdc25 und einen **negativen Feedbackloop** von der aktiven M-Cdk auf die Aktivierung von Wee1 (wird inhibiert). Es gibt also eine switch-like transition (schnellen Übergang von G2 -> M).

In humanen Krebszellen gibt es meist extrem viel Cdc25. Dies ist für Krebszellen gut, da dadurch ein extrem schnelles Wachstum durch schnelle, unkontrollierte Teilung stattfindet. Die für die Koordination und Fehlerkorrektur benötigte G2 Phase wird dadurch übersprungen.

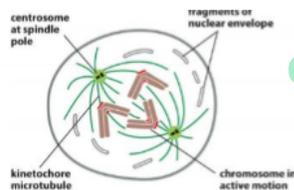
Zusammenfassung Biologie Semester 2

Die Stadien der Mitose

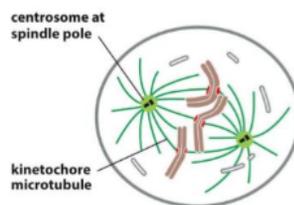
In den unten gezeigten Abbildungen ist rot = DNA und grün = Tubulin



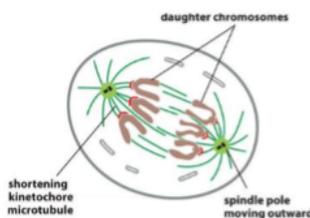
In der **Prophase** werden Chromosomen bestehend aus replizierten Schwesterchromatiden kondensieren (= werden gebildet). Den Zentrosomen trennen sich und die Spindel beginnt sich dazwischen zu bilden.



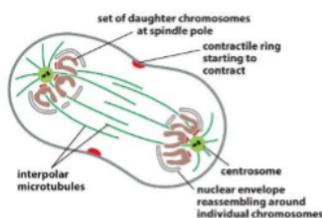
In der **Prometaphase** zerfällt die Kernhülle und die Chromosomen binden mit ihren Kinetochoren (= halbkugelförmige Struktur aus Proteinen und DNA-Abschnitten) am Mikrotubuli und beginnen sich aktiv zu bewegen.



In der **Metaphase** sind die Chromosomen in der Mitte der Spindel angeordnet. Die Schwesterchromatiden sind an den gegenüberliegenden Spindelpolen befestigt.

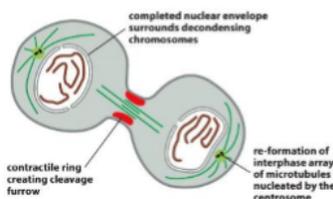


In der **Anaphase** trennen sich die Schwesterchromatiden gleichzeitig und bewegen sich zu den gegenüberliegenden Spindelpolen. Der Abstand der Spindelpole vergrößert sich und die Kinetochor Mikrotubuli verkürzen sich.



In der **Telophase** erreichen die Chromosomen den Spindelpol und die Kernhülle bildet sich um die Chromosomen. Mit der Bildung der zwei Zellkerne ist das Ende der Mitose erreicht. Der kontraktile Ring beginnt sich zu schließen und leitet die Zellteilung ein.

↳ Aktin + Myosin



In der **Zytokinese** trennt sich das Zytoplasma der beiden Tochterzellen vollständig durch die Schließung des kontraktiven Ringes.

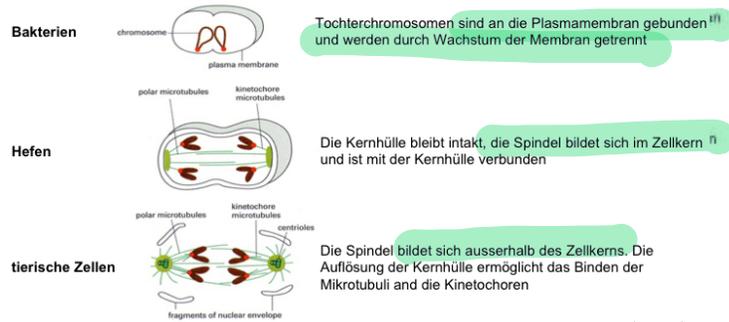
→ ESCRT III → Anschließung

↳ Kwick in Lipiden

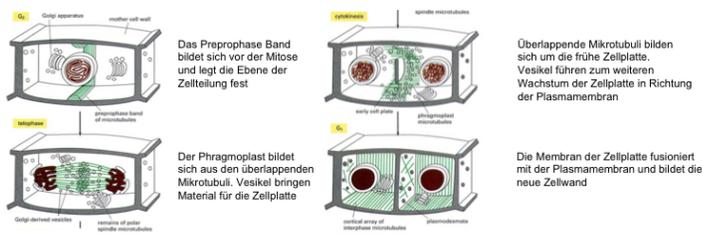
↳ Homolog PSA

Vorlesung 2

Arten von Mitose

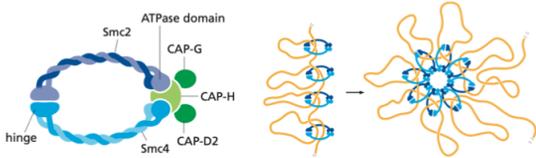


Mitose bei Pflanzen



→ neu gebaut

Regulierung der Struktur der Chromosomen



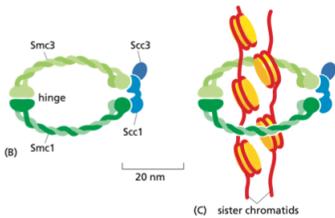
Zwei Proteine sind für Chromosomen Struktur wichtig:

- **Condensin**: Ist während der Prophase an die DNA gebunden und umschliesst die DNA eines Schwesterchromatids Dies führt unter ATP Verbrauch zu Loops und so zu kompakter Chromosomenstruktur.

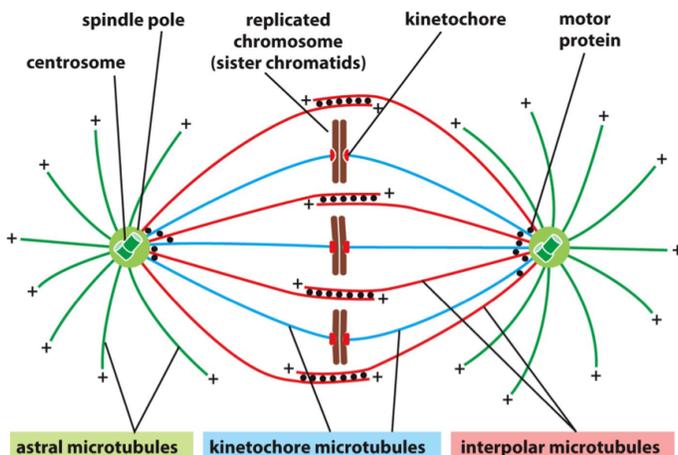
- **Cohesin** (siehe oben)

organisiert Chromosom in sich

↳ hält 2 Chromatide zusammen



Die Mitotische Spindel und Zentrosomen



Mikrotubuli vom Zentrosom sind polar:

- Minus Ende am Zentrosom
- Plus Ende interagiert mit Chromosomen, der Zellperipherie und dem Mikrotubuli

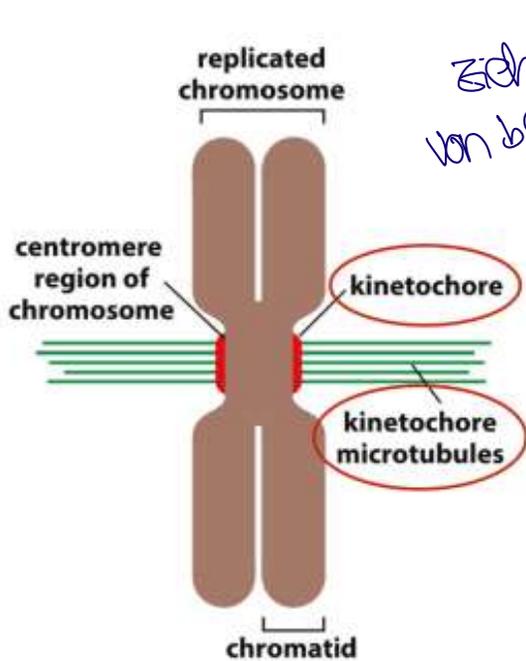
Motorproteine können sich an den Mikrotubuli fortbewegen.

Die verdopplung der Zentrosomen findet am Ende der G1 und vor allem während der S-Phase statt.

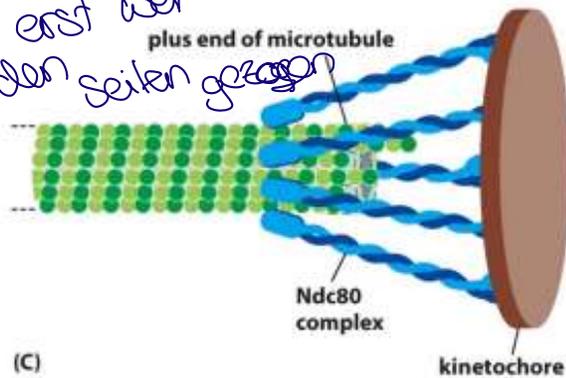
Chromosomen

Figure 17-23 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Kinetochoren verbinden die Chromosomen mit der Spindel



zieht erst wenn von beiden Seiten gezogen



Ndc80 Komplexe sind gecoilte Proteine, die eine Verbindung zwischen den Kinetochoren und den Kinetochor Mikrotubulis bildet. Die Ndc80-Kinetochor Verbindung sorgt schlussendlich bei der Verkürzung des Mikrotubuli dafür, dass die Chromosomenbewegung ausgeführt wird.

Schritte der Bindung von MT an Kinetochoren

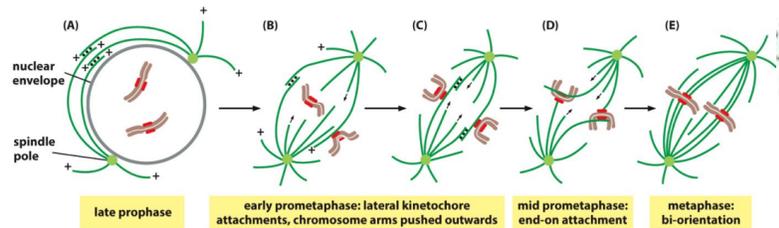


Figure 17-32 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Mikrotubuli wird von beiden Zentrosomen aus gebildet und trifft per Zufall auf Chromosomen. Durch verkürzung der Beiden MT werden die Chromosomen an der Äquatorialebene ausgerichtet.

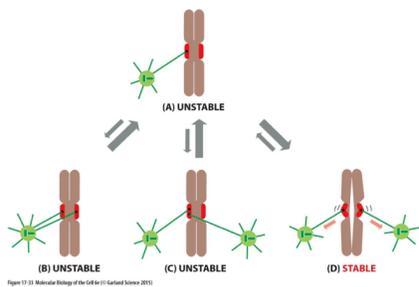


Figure 17-33 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Die oben beschriebene Bindung von MT an die Chromosomen ist ein "Trial-and-Error" Prozess. Das bedeutet, dass zunächst nur ein MT von einer Seite an das Chromosom gebunden ist. Diese Verbindung ist vorübergehend und wird erst stabilisiert, wenn auch MT von der anderen Seite an den gegenüberliegenden Kinetochor gebunden ist. Die Herausforderung für die Zelle ist demnach herauszufinden, ob MT richtig gebunden ist.

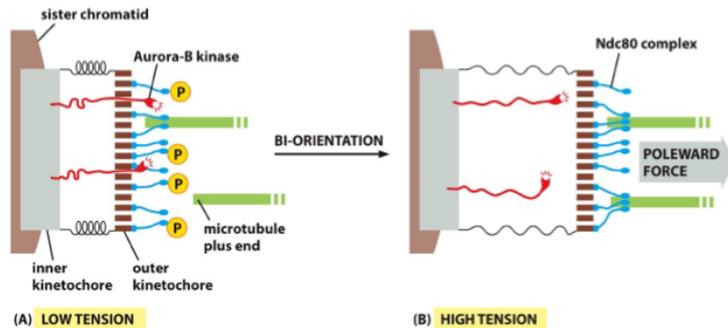
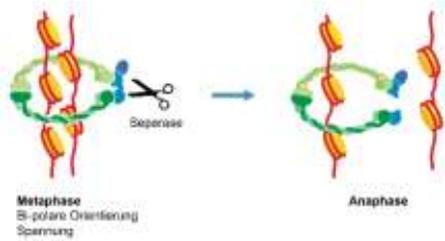


Figure 17-34 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Dies wird vermutlich durch das Tension Modell realisiert: Auf den Kinetochoren ist eine Aurora-B-Kinase, die Ncd80 phosphoryliert (was Ncd80-Kinetochor Bindung destabilisiert). Dies ist so lange möglich, wie kein Zug auf den Kinetochoren herrscht. Sobald Zug herrscht (also nur wenn auf beiden

Seiten des Chromosoms ein MT verbunden ist = bipolar attachment), so werden diese Bindungen stabilisiert.

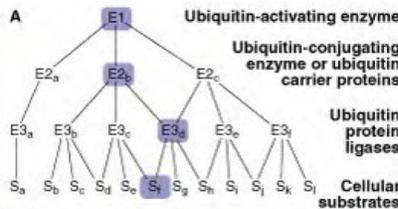
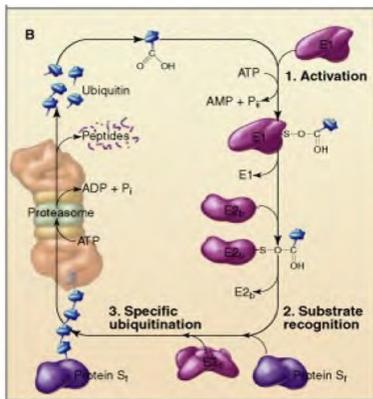
Regulierung der Segregation der Chromosomen (= Induzierung der Anaphase)



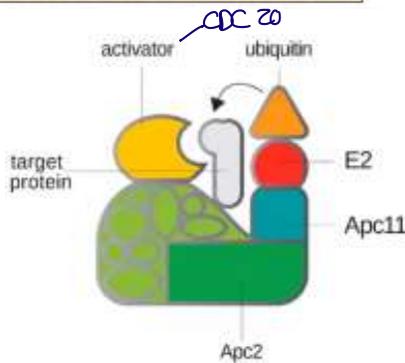
In der Metaphase wird eine Spannung erzeugt, die möglich ist, weil **Cohesin die beiden Schwesterchromatiden zusammenhält**. Durch eine **Seperase** wird die **Scc1** Untereinheit des Cohesins aufgetrennt und durch die Spannung werden die **Beiden Chromatide voneinander weg zu den Zentrosomen hin gezogen**.

Diese Seperase liegt in der Metaphase in einer durch **Securin** **inhibierten Form** vor. Wird die Anaphase eingeleitet (also, wenn alle Chromosomen bipolar attached sind), wird das **Securin abgebaut** und die Seperase beginnt mit ihrer Arbeit. Stichwort Proteinverdauung: Proteasen in

Lysosomen und Proteasom
degradierung von Ubiquitin
markierten Proteinen
(durch E1, E2 und E3) (siehe auch vorherige Vorlesungen).



->APC (Anaphase-promoting complex) ist eine E3-ubiquitin ligase

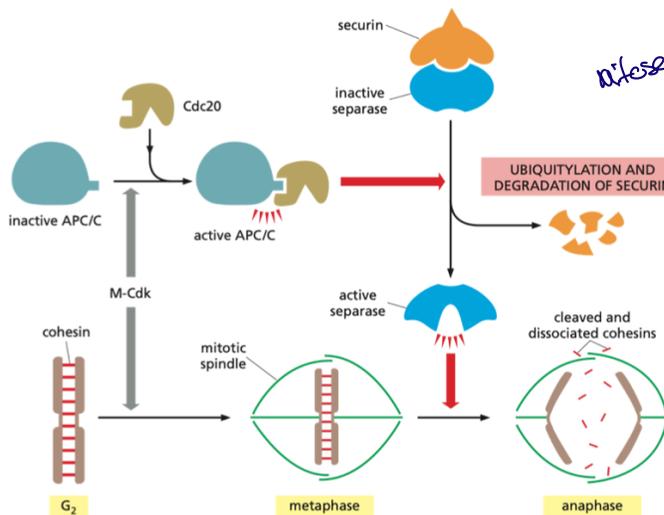


Links ist der **APC (Anaphase-promoting complex, E3)** abgebildet.

Aktivator (gelb) ist das Cdc20 Gen. Cdc20 Mutanten bleiben in der Metaphase stehen.

*erst wenn da ist geht mechanismus los
bringt cdc 20*

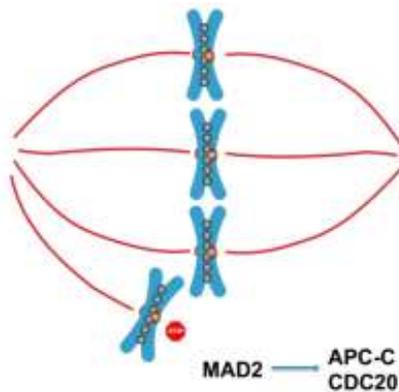
APC-C reguliert den Abbau von Securin



M-Cdk aktiviert **APC-C** (C = **Cyklosom**), APC-C ubiquitiniert Securin. Das ubiquitinierte Securin wird durch **26S-Proteasomen** abgebaut. Somit **reguliert APC-C die Segregation der Chromosomen**.

APC : Anaphase promoting complex

Der Spindel Checkpoint



Der **Spindel Checkpoint** stellt sicher, dass die Anaphase erst eingeleitet wird, sobald alle Chromosomen korrekt an die Spindel angehängt sind.

Bereits ein einzelnes Chromosom ohne Verbindung führt zu einer Blockade der Mitose.

Freie Kinetochoren binden an **MAD Komplex** (mitotic arrest deficient), genauer an MAD1. Ein katalytischer Mechanismus aktiviert MAD2 um CDC20 zu binden und somit den APC-C zu inaktivieren.

Mutationen, die keinen MAD Komplex besitzen können leben, führen aber zu **Aneuploidy** (= unterschiedliche Anzahl von Chromosomen). Diese sterben entweder, weil essentielle Chromosomen fehlen oder werden Krebszellen.

Drei Lagen der Zellzyklus Regulation

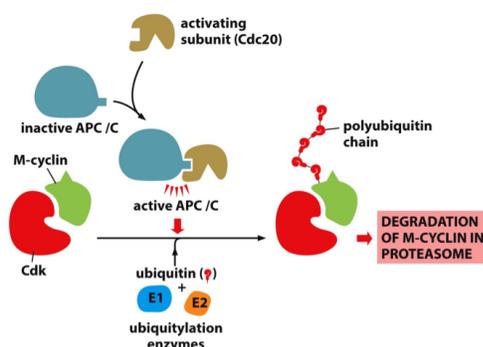
Cyclin dependent Kinase

1. **Grundlegende Zellzyklus Regulatoren:** CDKs, Cycline, APC-C, Spindel
 - Zellautonome Regulation, für jeden Zellzyklus essentiell
2. **Checkpoint Systeme:** Spindel Checkpoint, Replication Checkpoint
 - Erhöhen die Genauigkeit, erlauben Fehlerkorrektur
3. **Externe Kontrolle des Zellzyklus:** Anpassung an Umgebung, Wachstumsfaktoren, Nährstoffe, Stress

Nasmyth-Experiment

Nasmyth hat eine Cdc20 Mutante genommen und den Ring mithilfe eines durch Licht aktivierbaren Proteins gespalten. Dabei hat er festgestellt, dass **die Zellen zwar in die Anaphase übergehen** **Arretierten dann aber in der Telophase**. Also ist die **Separase** oder der **APC** auch für einen späteren Schritt (nach der Telophase, Cdk muss durch degradierung von Cyclin inaktiviert werden, um wieder von der Mitose in die Interphase übergehen zu können) **wichtig**. Ausserdem ist die wichtigste Funktion von APC, die Kohesion der Chromosomen zu lösen und nicht an anderen Prozessen in der **Metaphase-Anaphase**.

Regulation von Cyclin konzentration: Proteolytischer Abbau

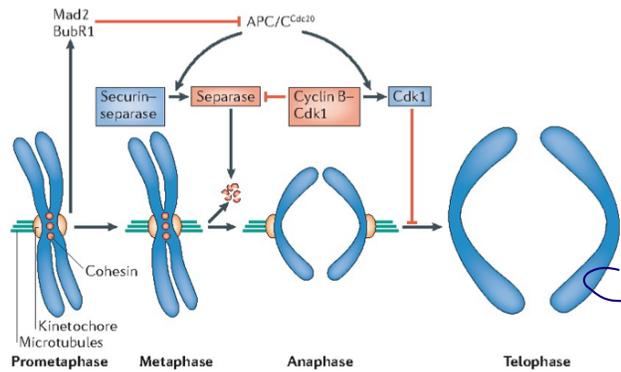


Der Anaphase Promoting Complex (APC/C) erkennt und ubiquitiniert nicht nur Securin, **sondern auch Cycline, die dann vom 26S Proteasom abgebaut werden.**

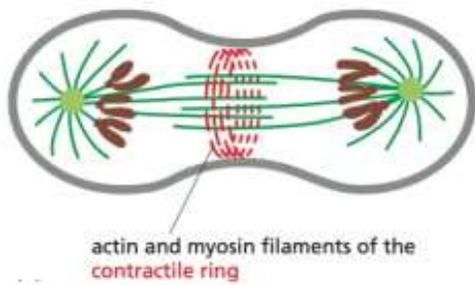
↳ inaktivieren cdk

Analoge Ubiquitin Ligasen (SCF) regulieren den Abbau von Cyclinen in G1 und S-Phase.

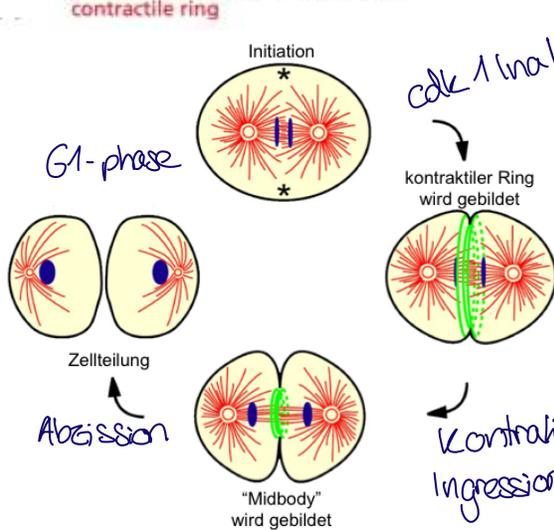
Übersicht APC/C Regulierung und Exit von Mitose



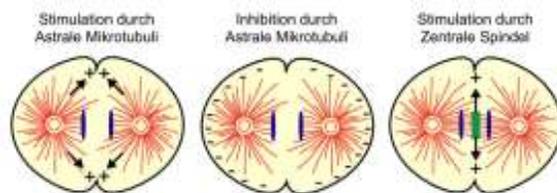
Zytokinese



Ein **Kontraktiver Ring** zwischen den beiden entstehenden Tochterzellen (Aktin und Myosin Motoren) wird aufgebaut und zusammengezogen.

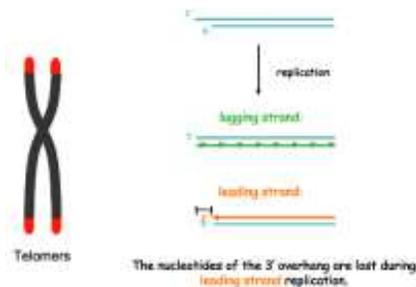


Dass die Zellteilung immer zwischen den beiden Spindeln stattfindet, wird der Kontraktile Ring immer durch die **Zentrale Spindel**, also übrig gebliebenes MT stimuliert. Astrales MT inhibiert dabei die Bildung des Ringes. Durch Schließung des Rings entsteht der **Midbody** (= kleiner Durchgang zwischen den zwei Zellen).



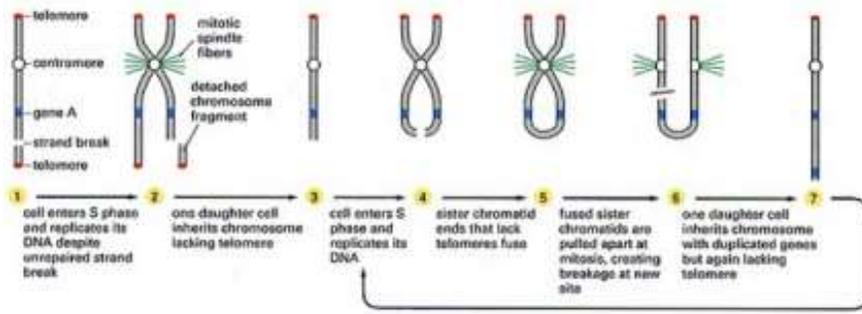
Vorlesung 3

Telomer Problem



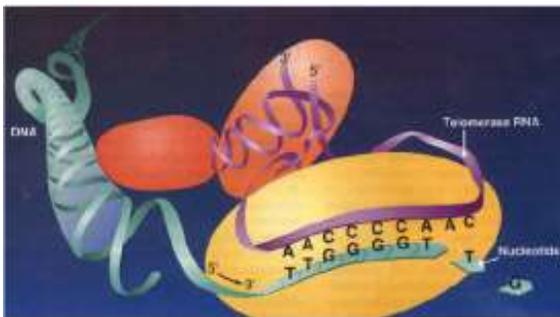
Bei der Replikation kann den Leading Strand nicht komplett bis zum Ende replizieren. Als Folge davon gibt es ein **replicative senescence**, was zu einem **even shorter telomers Phänotyp** führt (mit einer gewissen Anzahl Teilungen sind die Telomere so kurz, dass sich die Zellen nicht weiter teilen kann).

Sind die Telomere zu kurz, sind die Chromosomen nicht mehr geschützt und können sogar miteinander fusionieren.



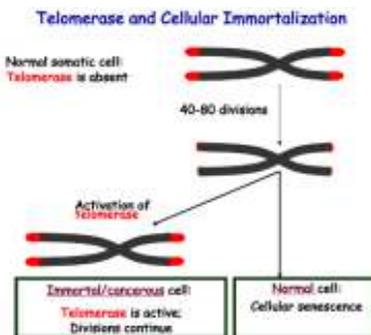
Ein Beispiel von zu kurzen Telomeren: **Durch Fusion werden zwei Chromosomen aneinander fusionieren.** Bei der Mitotischen Segregation der Chromosomen wird es dann gebrochen. (Krebs kann entstehen)

Telomerase



Die **Telomerase** ist eine Reverse-Transkriptase, die Telomerase RNA besitzt, nach wessen Vorbild sie die DNA am Ende des replizierten Chromosomenstrangs **repetitiv erweitern** kann. So kann die Zelle durch Telomerase sicherstellen, dass die DNA bis zum Tod des Lebewesens repliziert werden kann. Ausserdem können so die Chromosomen geschützt werden.

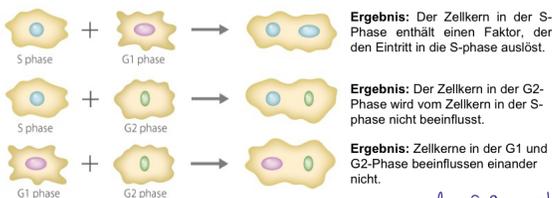
Cellular Immortalization



Normalerweise sind bei somatischen Zellen (Körperzellen, die keine Geschlechtszellen bilden können) die Telomerasen inaktiv. Das heisst nach 40-80 Zellteilungen tritt die Cellular senescence auf (Zelle teilt sich nicht weiter). Bei zum Beispiel Krebszellen ist die Telomerase aber wieder aktiv. Als Folge davon können sich die Zellen wieder unendlich oft teilen, sie werden immortal.

S-Cykline und M-Cykline

Fusionsexperimente von Johnson und Rao (siehe auch weiter oben)



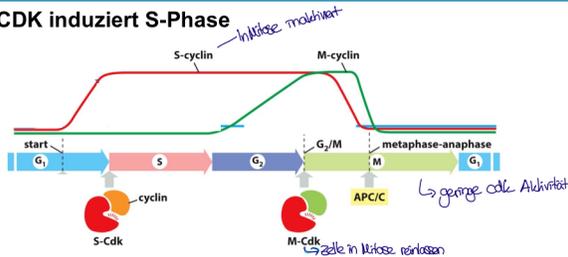
Aus dem Experiment von Johnson und Rao kann man schliessen, dass in S-Phase Zellen ein Faktor enthalten sein muss, der die S-Phase induziert (S-Phase Factor, SPF). Ausserdem sind G2 (nach S-Phase) Zellen resistent gegen diesen SPF.

Was für S-Phase-relevante Aktivitäten sind in den Zellen vorhanden?
 a) Eintritt in S-Phase? induzierender Faktor (SPF) = S-phase factor
 b) Re-Replikation G2 Zellen (nach S-Phase) sind resistent gegen SPF -> werden gegen die S-phase "geschützt"

http://cslb-text13.cu-tokyo.ac.jp/active/13_01.html

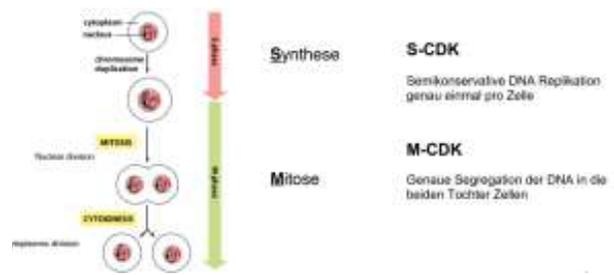
Verschiedenen Cycline in verschiedenen Phasen

S-phase CDK induziert S-Phase

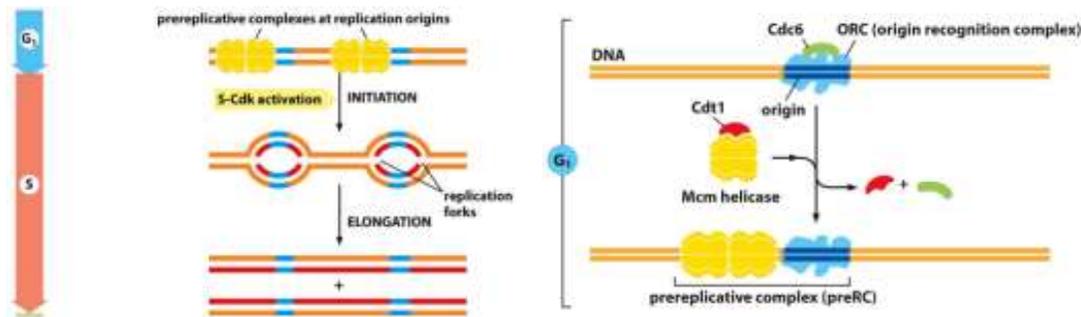


S-Cycline werden in G1 nach der Passage von START exprimiert und regulieren die DNA Replikation. S-Cycline werden in der Mitose inaktiviert und regulieren auch einige frühe Schritte in der Mitose.

M-Cycline aktivieren CDK's, die den Übergang in die Mitose regulieren. M-Cycline werden am Ende der Mitose degradiert.



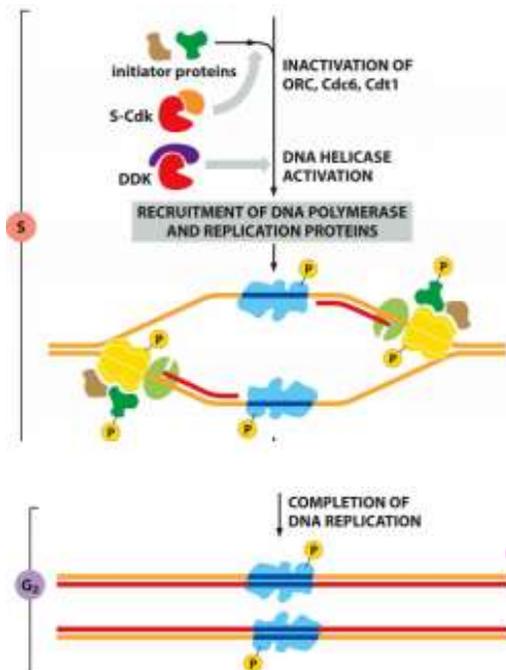
S-Cdk initiiert die S-Phase genau einmal pro Zellzyklus



In der G1 Phase werden prä replikative Komplexe angehängt, an welchen dann die Replikation gestartet werden kann (linkes Bild).

Dieser wird am (=Origin recognition complex (ORC) gebildet. Der ORC bindet während des gesamten Zellzyklus an die DNA. In der G1 Phase bildet er zusammen mit der MCM Helikase den prä replikativen Komplex (preRC). So wird in der G1 Phase "Origin licensing" geschaffen. Um den Komplex aufzubauen wird Cdc6 und Cdt1 benötigt.

Wichtig: preRC kann nur bei tiefer CDK1 Aktivität (G1) gebildet werden. Neue S-Phase kann nur nach M-Phase (CDK1 Inaktivierung) ablaufen. *→ nur in G1*



Durch die Aktivierung der S-CDK wird die Helikase Aktiviert, die Polymerase rekrutiert, eine stabile etablierung von Schwester Chromatid Cohesion wird sichergestellt und der ORC wird phosphoryliert.

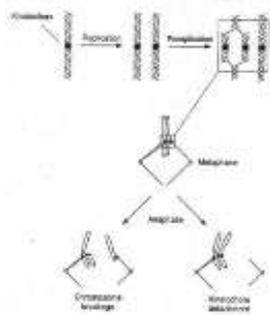
S-CDK ist also wie ein trigger, der preRC aktiviert und die Replikation startet.

Die phosphorylierung des ORC bleibt bis nach der Mitose bestehen und verhindert so erneute Replikation.

Dephosphorylierung erfolgt nach der Inaktivierung der M-CDK.

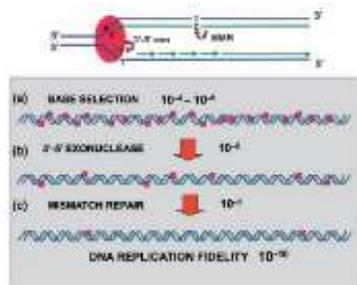
In der G2 Phase kann also keine neue re-replikation stattfinden, bis CDK Aktivität erniedrigt wird.

Fehler durch re-Replikation



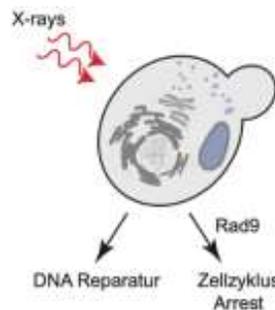
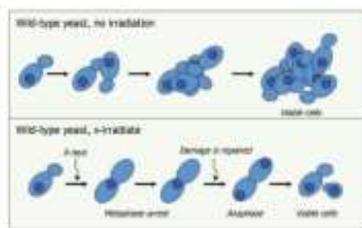
Wird die re-Replikation nicht verhindert (z.B. durch eine nicht phosphorylierbare Mutante des ORC Komplexes), so führt dies zu re-Replikation. Diese sorgt dafür, dass die Chromosomen auch noch in der Anaphase zusammenhängen. Folglich entsteht nach der Anaphase entweder ein DNA Schaden, da die Stränge auseinandergerissen werden, oder eine Tochterzelle wird das Chromosom nicht mehr haben.

DNA Replikation Korrekturprozesse

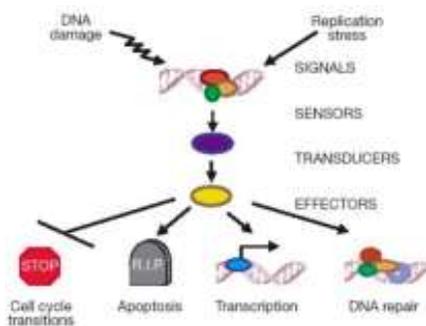


Beispiel eines Replikations Korrekturprozesses: Durch Exonuclease kann ein Mismatch repair (=MMR) stattfinden.

Diese Korrekturprozesse sind wichtig, da nach jeder replikation fehler passieren, die korrigiert werden müssen.

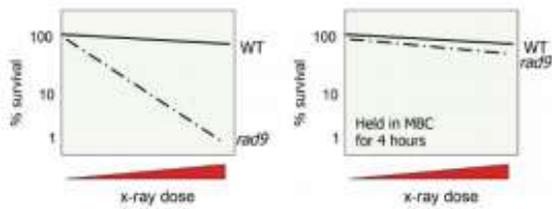


In einem Experiment wurden einer Zelle durch X-rays DNA Schäden zugefügt. Das Ergebnis: Die Zelle bleibt vor der Mitose stehen und repariert die DNA. Also gibt es einen Checkpoint, bei welchem die Zelle die DNA prüft.



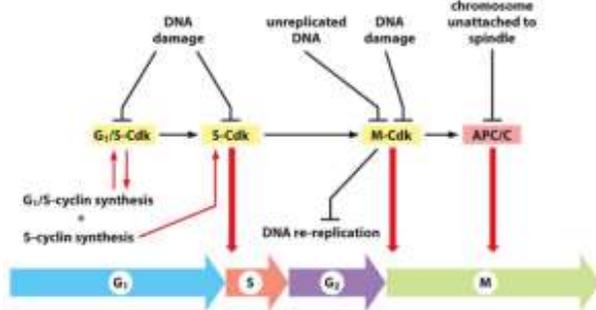
Dieser Checkpoint wird DNA-damage Checkpoint genannt. Durch äussere Einflüsse oder Replikationsfehler können DNA Schäden entstehen, die von Sensoren detektiert werden. Sobald dies geschieht, wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die dann einerseits den Zellzyklus anhält (um eine Fehlerweitergabe zu verhindern) und andererseits DNA Reparatur durch transkription der Reparationsmaschinerie betreibt. In Höheren Eukaryoten kann, wenn der Schaden zu gross ist, auch Apoptosis (= Geplanter Zelltod) auftreten.

Um diesen Checkpoint zu finden, wurde nach Rad Mutanten (Rad = Proteine, die für die Reparatur von DNA Schäden gebraucht werden) gesucht. Dabei wurden Hefezellen mit x-Ray Strahlung beschossen und geschaut, ob sie sich dann weiter teilten oder nicht. Rad Mutanten haben sich weiter geteilt, starben aber mit der Zeit wegen grossen DNA Schäden. Das dafür verantwortliche Protein ist Rad9, dieses führt zu Zell Zyklus Arrest bei DNA Schäden, ist aber nicht aktiv an der Reparatur beteiligt.



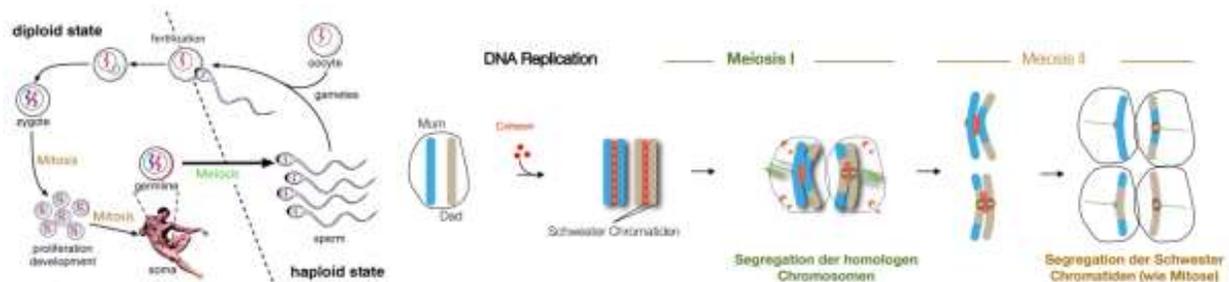
Links ohne Spindelgift, rechts mit Spindelgift (um die Zelle künstlich im Zellzyklus zu arretieren). Dabei wurde festgestellt, dass Rad9 wirklich für den Halt im Zellzyklus benötigt wird. Rad9 Mutanten konnten auch überleben, wenn Zellzyklus künstlich angehalten wird.

Übersicht unerwartete Probleme im Zellzyklus und Kontrollsysteme



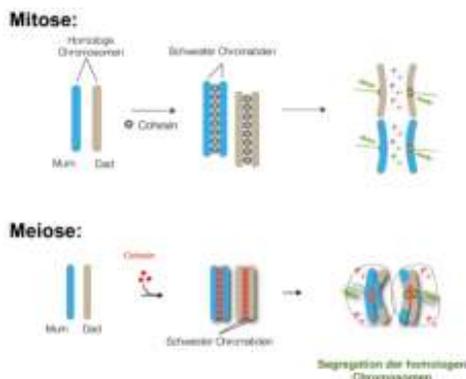
- 1. Grundlegende Zellzyklus Regulatoren**
CDKs, Cycline, APC-C, Spindel
Zellautonome Regulation, für jeden Zellzyklus essentiell
- 2. Checkpoint Systeme**
Spindel Checkpoint, Replication Checkpoint
erhöhen die Genauigkeit, erlaubt Fehlerkorrektur
- 3. Externe Kontrolle des Zellzyklus**
Anpassung an Umgebung, Wachstumsfaktoren, Nährstoffe, Stress

Übersicht Meiose



Im Gegensatz zu der Mitose besteht die Meiose aus 2 verschiedenen Schritten:

- In der Meiose I werden die homologen Chromosomen segregiert
- In der Meiose II werden die Schwesterchromatiden segregiert (wie in der Mitose)



Ausserdem wird in der Mitose das Cohesin während der Replikation gebildet und besteht bis zur M-Phase.

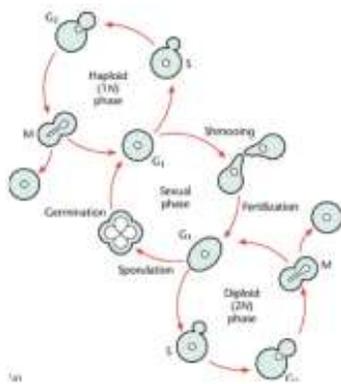
Bei der Meiose muss zusätzlich zur Cohesion zwischen den replizierten Schwester Chromatiden auch Homologe Chromosomen gepaart und korrekt verteilt werden. Die Cohesion muss also (teilweise) bis zur Segregation der Schwesterchromatiden erhalten bleiben.

Abweichung von normaler Zahl Chromosomen

Fehler in der Meiose führen oft zu Aneuploidie in den Gameten. Dies führt zu nicht lebensfähigen Embryonen

(Fehlgeburt) oder zu Entwicklungsstörungen wie Trisomien (Down Syndrom) oder Monosomien (Turner Syndrom).

Modelorganismen für die Meiose



Hefezellen konnten gut verwendet werden, um Meiose zu erforschen. Laborstämme von Hefe sind haploid. Durch Fusion zweier haploider Zellen bildet sich eine Diploide Zelle. Der Übergang vom diploiden zum haploiden Zustand wird durch Meiose realisiert (Sporulation).

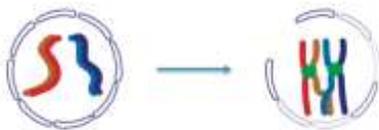
Auch der C. elegans Wurm (Hermaphroditen, produzieren Spermien und Oozyten) ist ein Modelorganismus für die Meiose. Dieser besitzt 2 grosse Gonaden pro Wurm und alle Stadien der Meiose sind parallel beobachtbar.

Gregor Mendel

Samen		Wirtel		Schote		Stängel	
Purpur	Grün	Glatt	Wellig	Lang	Kurz	Stark verzweigt	Schwach verzweigt
grün & rund	gelb	weiß	grün	lang	kurz	stark verzweigt	schwach verzweigt
weiß & schrumpelig	grün	violet	grün	lang	kurz	stark verzweigt	schwach verzweigt

Gregor Mendel hat bereits herausgefunden, dass Keimzellen sowohl mütterliche als auch väterliche genetische Elemente enthalten. Gameten hingegen enthalten nur jeweils eines der beiden Elemente.

C. elegans Wurm

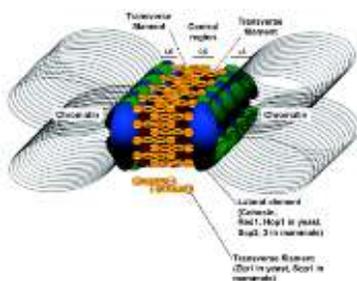
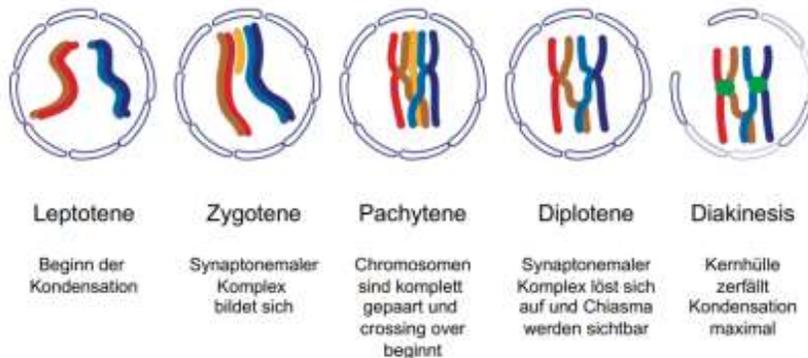
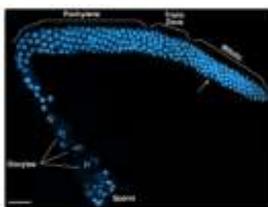


Homologe Chromosomen werden durch "cross over" miteinander verbunden. In der Meiose werden die homologen Chromosomen also miteinander verbunden, indem die DNA Stücke miteinander verbunden werden.

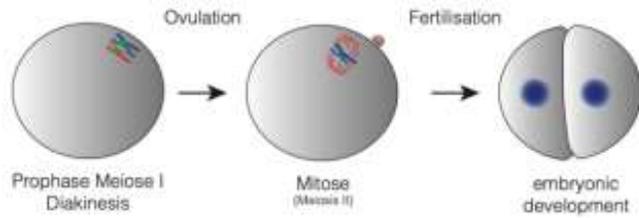
ungepaarte, replizierte Chromosomen

Homologe Chromosomen durch "cross over" zusammengehalten

Dies passiert in verschiedenen Phasen:



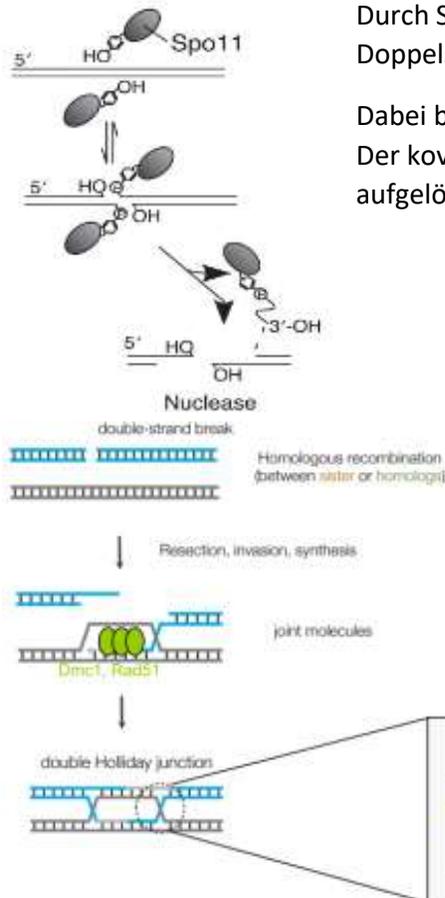
Der oben erwähnte Synaptonemale Komplex verbindet das Chromatin durch transverse Filamente. Er ist vermutlich die Plattform für die Rekombination und dient der Kontrolle der Verteilung von Crossover Ereignissen.



Oozyten können über Jahre in der Prophase der Meiose I sein und sich dann durch befruchtung fehlerfrei weiterentwickeln.

Rekombination

→ ermöglicht Rekombination



Durch Spo11 (= Nuklease) werden in der Meiose verschiedene Doppelstrangbrüche in den Chromosomen gefertigt.

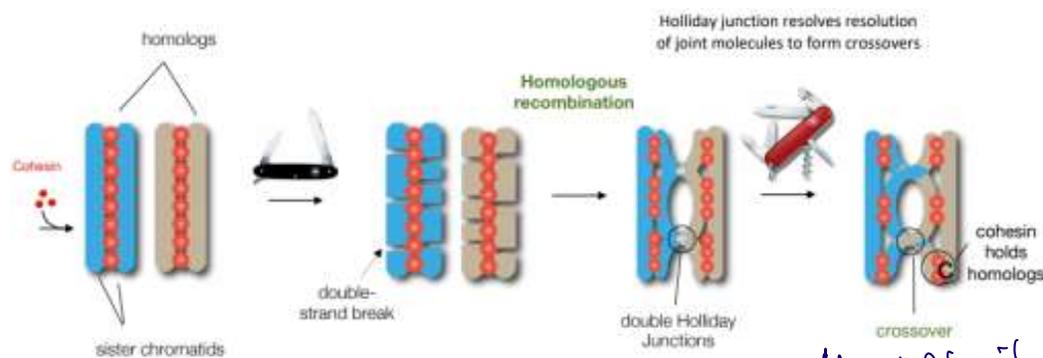
Dabei bildet Spo11 eine kovalente Phosphotyrosyl Bindung zur DNA. Der kovalente DNA-Protein komplex muss durch eine Endonuclease aufgelöst werden.

Nach diesen Brüchen werden durch doppel Holliday junctions ausgebildet, durch welche dann die Rekombination stattfindet.

Viele dieser double Holliday junctions werden dann wieder aufgelöst aber einige davon überdauern, sodass die gepaarten Chromosomen zusammenbleiben und in der Meiose I segregieren können.

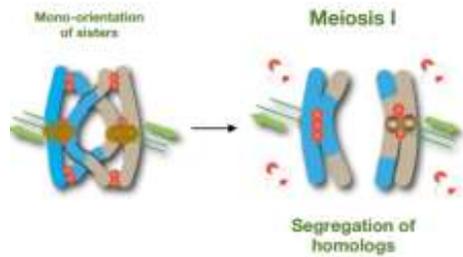
Dabei dürfen es nicht zu viele und nicht zu wenige von diesen DNA Verbindungen geben, beides wäre fatal.

Zwar gibt es in z.B. Hefezellen extrem viele Doppelstrangbrüche (140 – 170) die Meisten werden jedoch wieder repariert. So gibt es nur ca. **1-2 stabile Holliday junctions** pro Chromosom.



→ Möglichkeit Crossover

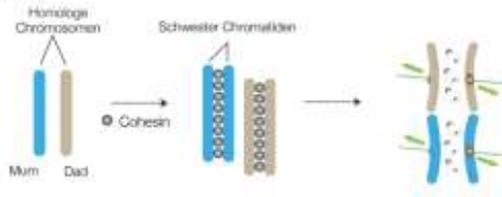
Die Junctions können dann auf zwei Arten geschnitten werden (führt zu Crossover oder nicht).



Wichtig ist bei der Meiose ausserdem, dass die Kinetochoren im Gegensatz zu der Mitose mono-oriental verbunden werden, dass die Homologe segregiert werden können.

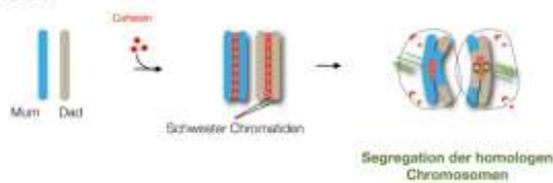
Vorlesung 4

Mitose:



Bei der **Mitose** werden Schwesterchromatiden zu gegenüberliegenden Polen segregiert.

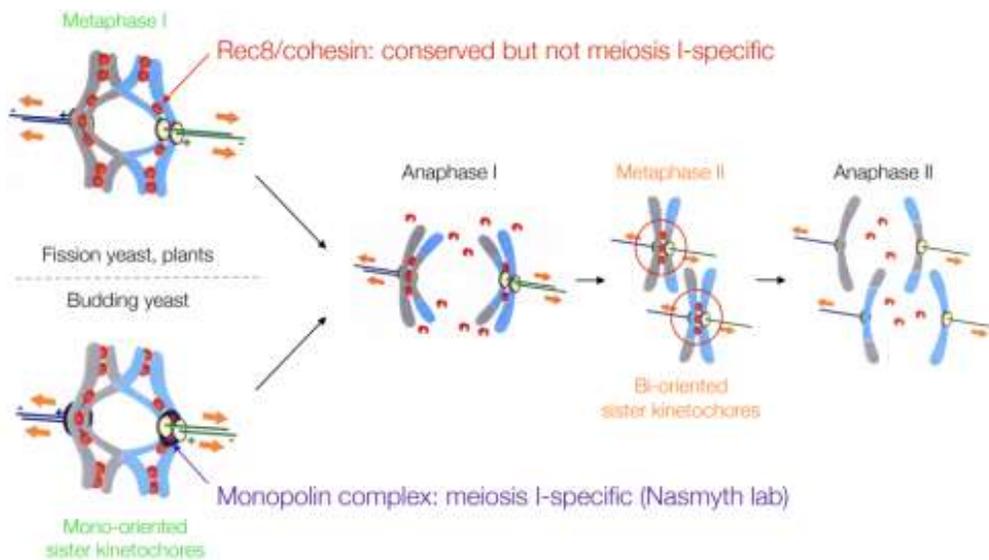
Meiose:



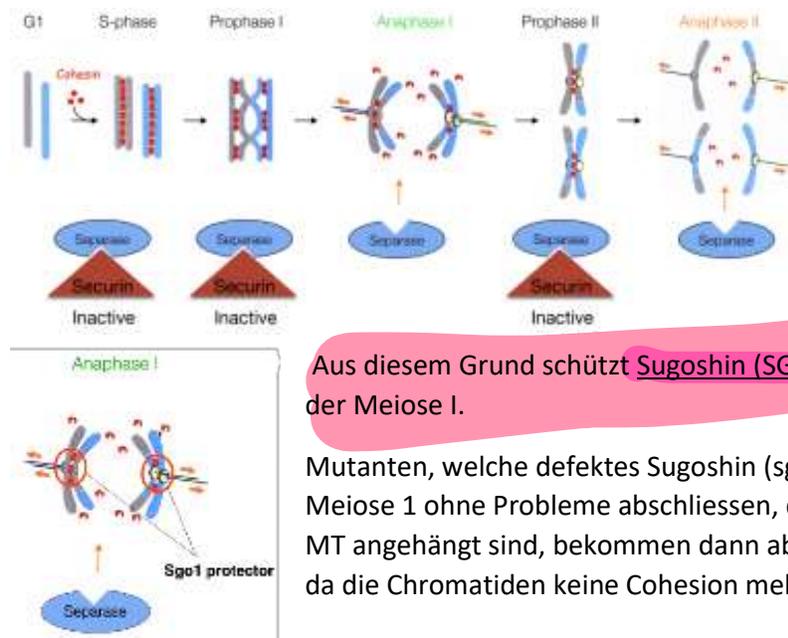
Bei der **Meiose** werden Schwesterchromatiden während der Meiose I zum selben Pol gezogen. Dazu werden die monopolen Attachments benötigt (Holliday Junctions).

Dies ist möglich, indem beide Schwester Kinetochoren in die gleiche Richtung zeigen, die Kinetochoren zu einem einzelnen MT bindendem Element fusionieren oder eines der Kinetochoren inaktiviert wird.

Ein schrittweiser Verlust von Cohesion ermöglicht zwei aufeinander folgende Kernteilungen.



Zerstörung von Cohesion

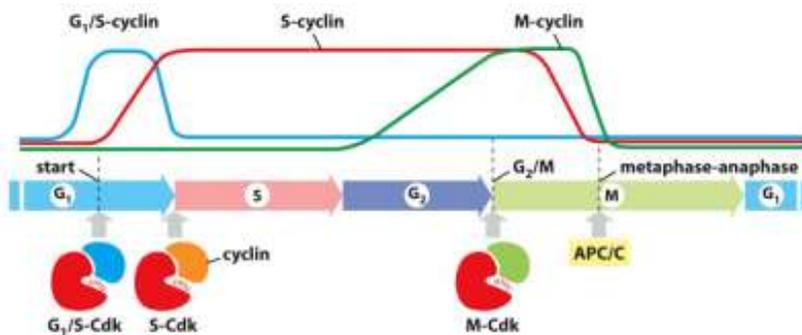


Es darf in der Meiose I in der Anaphase I nur ein Teil der Cohesion zerstört werden, da die Schwesterchromatide als Ganzes weitergegeben werden müssen. Erst bei der Anaphase II in der Meiose II darf die komplette Kohesion zerstört werden.

Aus diesem Grund schützt Sugoshin (SGO1) Cohesin am Zentromer während der Meiose I.

Mutanten, welche defektes Sugoshin (*sgo1*) besitzen, können zwar die Meiose 1 ohne Probleme abschliessen, da Schwesterchromatide bipolar ans MT angehängt sind, bekommen dann aber während der Mitose II probleme, da die Chromatiden keine Cohesion mehr besitzen (Missegregation).

Äussere Regulierung

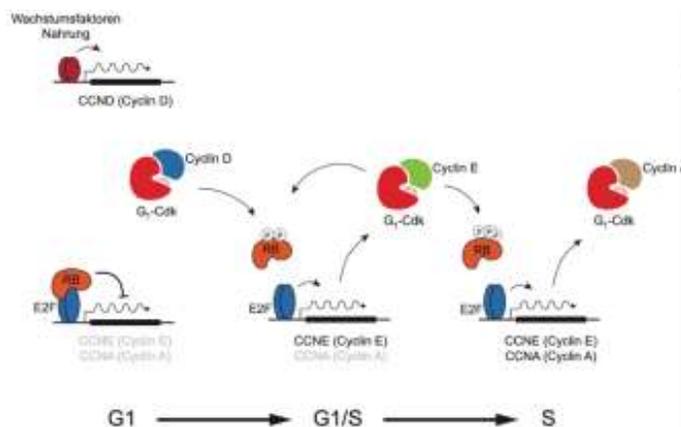


Ein drittes Cyklin, das G1/S Cyklin aktiviert ebenfalls CDK in der späten G1 Phase, führen zum Durchgang durch START und initiieren so die Festlegung auf einen neuen Zellzyklus.

Das G1 Cyklin (Zelltypabhängig) reguliert die Aktivität der G1/S Cyklinen (z.B. in Abhängigkeit

von Wachstumsfaktoren). Die Expression in den verschiedenen Phasen variiert weniger stark.

Eintritt in die S-Phase

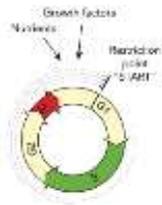


Der Eintritt in die S-Phase wird durch G1-CDK reguliert.

E2F Komplex bindet an Transkriptionsstelle von Cyc. E und Cyc. A, die gebraucht werden, um S-Phase zu aktivieren. Der G1 Cyklin D Komplex wird benötigt, um den RB Repressor (ein Tumor repressor, der verhindert, dass E2F permanent aktiv ist) zu lösen, wodurch Cyklin E transkribiert wird. Cyklin E CDK entfernt dann noch mehr RB (positiver

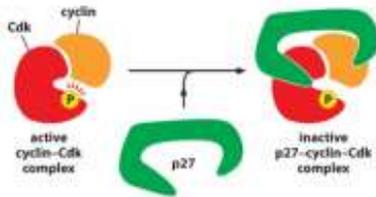
Feedbackloop). Je mehr RB entfernt wird, desto mehr Cyc. E und mit der Zeit auch Cyc. A kann exprimiert werden. Sobald genug Cyc A CDK komplex vorhanden ist, kann die Zelle in die S Phase eintreten.

Zelle benötigen Abwesenheit von Tumor Repressor Genen + Anwesenheit von Faktor



Externe Signale regulieren die G1 CDK durch Expression von Cyclin D.

Anzahl Cyclin D wird durch TORC aufgrund von Vorhandensein von Nährstoffen reguliert, siehe weiter unten.



Inhibitoren von Cyclin Abhängigen Kinasen (CKIs) binden sowohl das Cyclin als auch die Kinase und stören dadurch die aktive Stelle. Zusätzlich wird die ATP Bindung erschwert.

p27 (ein CKI) wird exprimiert, wenn die Zelle aus dem Zellzyklus austreten will. Es ist ein Tumor Suppressor.

Ausserdem gibt es noch folgende temporären CKIs: p27, p15, p16

Eigenheiten vom Zellwachstum

Wichtig: Zellteilung: Anzahl Zellen wird erhöht, Zellwachstum: Zellengröße wird erhöht

Beispiel: Fruchtfliege

Eine Wildtypfliege ist grösser als der Chico Mutant (Mutation in Chico Gen, die zu weniger und kleineren Zellen führt, Proportionen stimmen aber).

Das Chico Gen codiert Teil des IGF-1 (Insulinlike Growth Factor) Rezeptors, aus diesem Grund ist sie kleiner, weil das Signal von diesem Hormon nicht mehr gelesen werden kann.



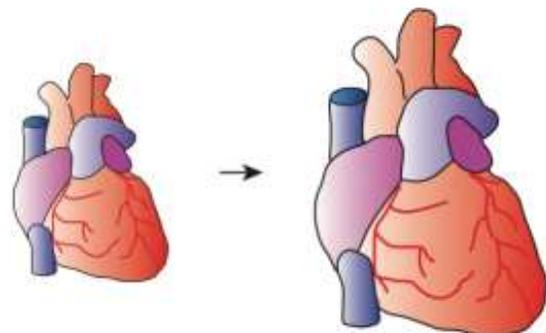
Zellwachstum und Zellteilung sind gekoppelt. Stimmt die Zellteilung, so findet eine Verdopplung der Zellmasse in einem Zellzyklus statt. Die Zellgröße ist stabil. Ist die Zellteilungszeit zu lang oder zu kurz, führt dies zu grösseren oder kleineren Zellen.

Zellteilung und Zellwachstum sind nicht immer gekoppelt (z.B. C. elegans Embryo: Die Erste Zelle ist sehr gross, Zellmasse verändert sich trotz Teilungen nicht).

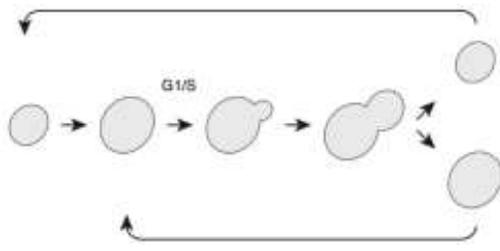
Fehler in Zellteilungszeit in Organen

Hyperplasie: Vergrößerung eines Organs oder Gewebes durch abnorme Vermehrung der Zellen

Hypertrophie: eine vom normalen Wachstum unabhängige Größenzunahme eines Organs oder eines Gewebes durch Vergrößerung der einzelnen Zellen, beispielsweise infolge vermehrter Beanspruchung.



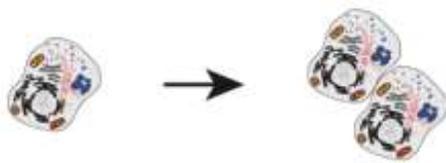
Kopplung von Wachstum und Teilung



Die Kopplung von Wachstum und Teilung erfolgt (meist) in der G1 Phase.

Wenn Bedingungen für ausreichendes Wachstum nicht erfüllt sind: Zellzyklus Arrest in G1 vor Aktivierung von G1-CDK Restriction Point, oder "START" (durch G1 Cykline).

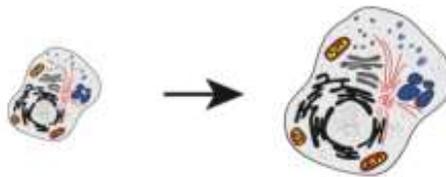
Wachstumskontrollen



Teilung

Zellzyklus Kontrollsystem

DNA Replikation
Verdoppelung von Zentrosomen
Zellteilung



Wachstum

Wachstumskontrolle

Proteinsynthese
Nucleotid Synthese
Lipid Synthese

Verdoppelung der Organellen
(Mitochondrien, ...)

Dabei ist das Wachstum abhängig von Nährstoffen und der Umgebung. Sind zu wenige Nährstoffe (vor allem in der Entwicklungsphase) vorhanden, so führt dies zu reduziertem Wachstum.

Wachstumskontrollen in verschiedenen Organismen

Bakterien		Nährstoffe	Membran gebundene Rezeptoren (two-component systems) allosterische Regulation	<i>Enzyme</i>
Hefe		Nährstoffe	komplexe Signaltransduktions Wege zellautonom	
Gewebe Organe		Nährstoffe Wachstumsfaktoren	komplexe Signaltransduktions Wege zellautonom und Zell-Zell-Kommunikation	

Signaltransduktion

Signal	Hormon Nährstoff Metabolit	IGF-1 Aminosäuren, Glukose
Sensor	Transmembran Rezeptor Intrazellulärer Sensor	IGF-Rezeptor Bestrin
Signalweg	Protein Kinase GTPase	TORC1 Rheb/Rag
Output	Wachstum, Proliferation, ...	Protein Synthese, Cyclin D1

Ein Wachstumsregulator muss reguliert werden durch Nährstoffe, sollte aktiv sein (zumindest in der G1 Phase) und sollte essentiell sein (inhibition hemmt Wachstum und Zellzyklus)

→ TORC1 Komplex

TOR = Target of Rapamycin

Wurde isoliert aus Bakterien von den Osterinseln, sind wachstumshemmend (in Eukaryonten), Antimykotikum (Pilze können sich nicht in seiner Nähe entwickeln), immunsuppressiv (erste Anwendung bei Organtransplantationen), Krebstherapie.

Um herauszufinden, was Rezeptor für Rapamycin ist, hat er es auf Hefeplatten aufgetragen, um so nach überlebensfähigen Mutanten zu suchen. Dabei hat er herausgefunden, dass FPR1 (fpr1) Mutanten immun sind. FPR1 ist also Rezeptor für Rapamycin und nötig für Inhibition von TORC1.

TORC1



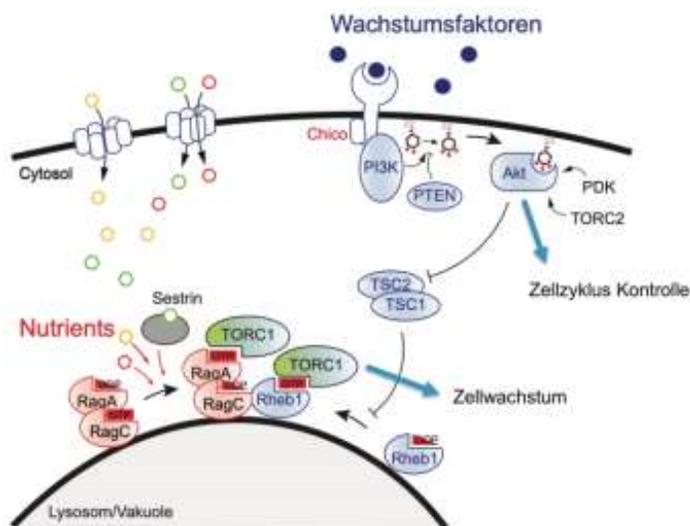
Ist ein Komplex (Dimer), besitzt eine katalytische Untereinheit und ist essentiell (wichtig, dass eine Zelle überleben kann).

Zusammen mit FRB kann Rapamycin an TORC1 binden, und so das Wachstum regulieren.

TOR kann S6K aktivieren, welches Ribosomensynthese (Ribosom Biogenese), sowie Translationsinitiation starten kann.

S6K Mutanten von der Fruchtfliege sind kleiner als der Wildtyp (Zellen sind kleiner) aber sie besitzen dieselbe Anzahl Zellen.

Übersicht TORC1 Kaskade



mTORC1 Aktivierung findet an der Vakuole / dem Lysosom statt.

Wenn gewisse AA (also Nährstoffe) vorhanden sind, so wird TORC1 aktiviert. Dies geschieht über RagGTPasen.

Sestrine binden an Leucin und stimuliert die Aktivität der Rag GTPasen und TORC1.

Wachstumsfaktoren (z.B. IGF-1) werden von Rezeptoren (z.B. Chico) empfangen. Diese können dann ebenfalls über eine RagGTPase (Rheb1) das TORC1 aktivieren.

Gewisse Bestandteile der rechten Kaskade sind Onkogene (dessen aktivierung führt zu verstärktem Wachstum und somit zu Krebs) und gewisse sind Tumor Suppressoren (dessen Verlust führt zu verstärktem Wachstum und somit zu Krebs).

Übersicht Mutationen Fruchtfliege



chico Mutanten: Zellzahl und Zellgrösse verändert

Stk mutanten: nur Zellgrösse verändert

I: Funktionelle Vielfalt bei Eukaryoten (Y. Barral)

Zusammenfassung

(unbedingt auswendig können!)

Multizellularität wurde ermöglicht durch die Fähigkeit von Zellen, miteinander zu kommunizieren.

Zuerst wurde in unizellulären Organismen solche Kommunikationen eingesetzt, um dessen Stress oder Verhungerungslevel zu kommunizieren.

Die Kosten für ein soziales Verhalten war die Möglichkeit von Parasitismus (Cheater, Pathogene)

Dadurch wurden auch neue soziale Funktionen ermöglicht und nötig, wie kin discrimination (= Fähigkeit, eigene Spezies zu erkennen) durch neue Kommunikationsmechanismen und der Entwicklung von Immun Mechanismen.

In metazoans (Vielzellige Tiere) kann Krebs als solch ein Cheater bezeichnet werden.

Die Keimbahn hat eine sehr niedrige selection pressure (dies ist vermutlich ein Grund für die Akkumulation von junk DNA in metazoans).

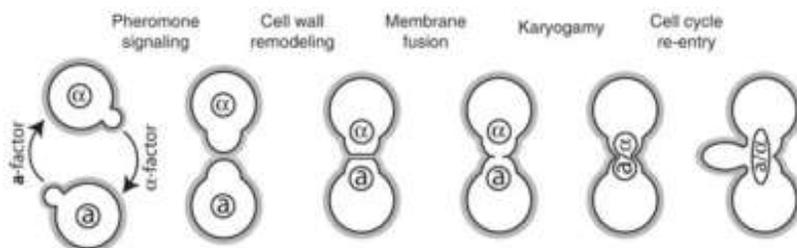
Die somatische Line "lernt" extrem, kann diese Information aber nicht an die Keimbahn weitergeben.

Sowohl somatische Linie als auch Keimlinie sind Subjekt von highjacking (gewaltsamer Einbau) von selfishen Systemen in allen Leveln (Zellulär, Chromosomal, DNA)

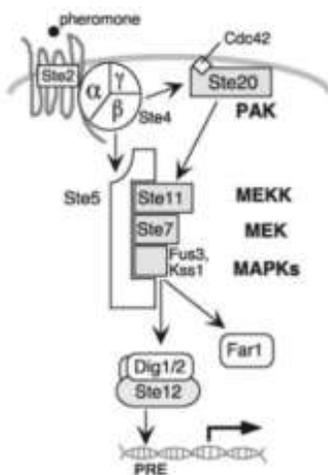
Dies wird in Multizellulären Organismen reflektiert durch die Entstehung von neuen selfishen Systemen, wie Krebs, sowie infektiöse Krankheiten auf den DNA Level (Viren) sowie dem Zellulären Level (Bakterien und andere Pathogene).

Voresung 1

Sexueller Zyklus in Eukaryoten



Pherosom Signalweg während dem sexuellen Zyklus in Hefe



(Namen **nicht** alle auswendig können! Nur die folgenden:)

G-Gekoppelter Rezeptor (oben links)

Ist ein transmembraner Rezeptor mit 7 Domänen, welches ein G-Protein aktiviert. G alpha bindet GTP und G beta/gamma werden freigelassen und starten ein Signal.

Cdc42 (oben rechts)

Kleine GTPase. Es aktiviert Aktin Polymerisation und Polarisierung: Die Zelle wächst in Richtung Partner. Ausserdem wird die MEKK Kinase aktiviert.

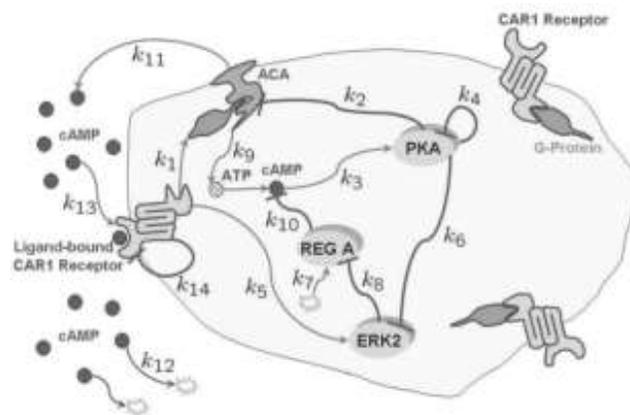
MAPKinase Kaskade (mitte)

Verstärkt das Signal und verbreitet es zu seinen Zielorten.

Transkription (unten)

Transcription factor aktiviert Gene, welche für eine Antwort codiert sind: Karyogamie (= Zellfusion verschiedengeschlechtlicher Zellen)

Beispiel für Soziales Verhalten: Verhungerungssignal in Amöben



PKA (mitte)

Sind genügend Nährstoffe (kleine Bakterien) vorhanden, wird PKA die Synthese von cAMP durch ACA unterdrücken

ACA (oben, mitte)

Ist die Zelle am hungern, unterdrückt PKA nicht länger die cAMP Synthese von ACA. cAMP wird gebildet und verteilt sich innerhalb und ausserhalb der Zelle.

CAR1 Rezeptor (links)

Das äussere cAMP aktiviert einen positiven Feedback Loop, weil der CAR1 Rezeptor extrazelluläres cAMP erkennt und so noch mehr cAMP (über G-Protein) durch ACA synthetisieren lässt. Die Zelle erkennt die Herkunft von cAMP und orientiert sich zu ihr.

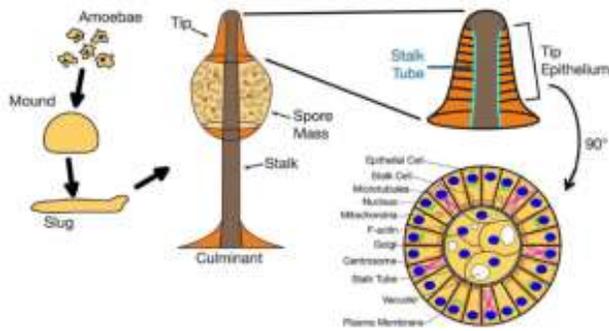
PKA, REG, ERK

Formen ein Repressormodul, um das cAMP wieder abzubauen.

Konsequenzen:

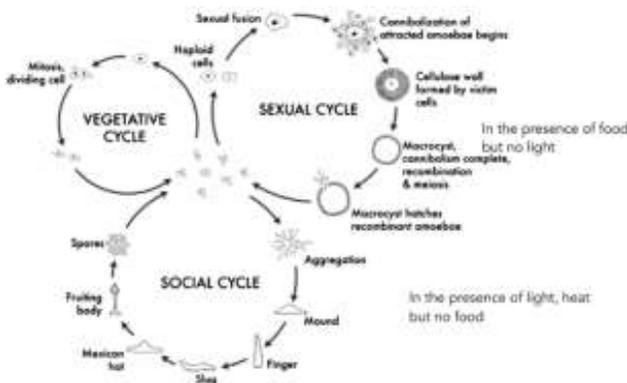
1. Die Zelle erkennt einen cAMP Gradienten und bewegt sich auf ihn zu (Chemotaxis)
2. Da die Zelle ebenfalls cAMP produziert, signalisiert sie (oszillierend) ebenfalls anderen Zellen, sich in ihre Richtung zu bewegen. So bildet sich ein Zentrum.

Formung des Slugs



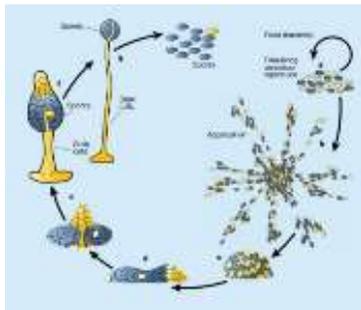
Da sich alle Amöben an einem Punkt sammeln, können sie einen Slug bilden. Dieser bewegt sich in Richtung Licht, wo sich zwar keine Bakterien (Nahrung) befinden aber sie können dort einen Fruitingbody bilden. Dieser wird, sobald konstantes Licht auf den Slug trifft, gebildet und enthält viele Sporen. Diese werden, wenn ein Tier oder Insekt vorbeikommt, entlassen und kleben an ihm. So können die Zellen sich

weiterverbreiten. Diese Amöben sind ein Beispiel für ein Monozelluläres Lebewesen, welches aufgrund eines Verhungersignals Multizellulär werden kann.



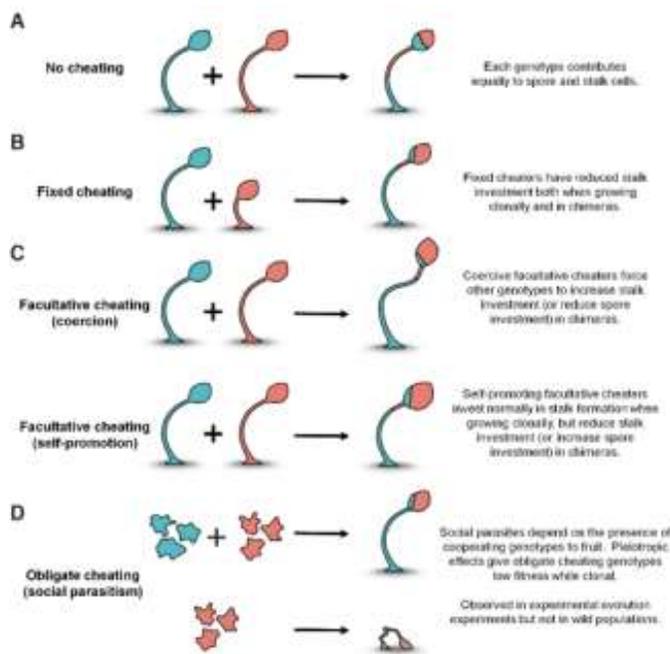
Dies führt zum Sozialen Zyklus, wenn keine Nährstoffe vorhanden sind und dem Vegetativem Zyklus, wenn genügend Nährstoffe vorhanden sind, da unizellulär die Nährstoffaufnahme viel einfacher ist. Beim Sexuellen Zyklus formen zwei haploide Zellen eine Zygote, welche andere Amöben frisst, um eine Zellwand zu bilden. Nach Rekombination und Meiose werden die neu gebildeten Tochterzellen entlassen.

Problem von Altruismus



Bei diesen Amöben gibt es ein Problem: Eine Familie von Amöben formt den Stalk, eine andere die Sporen. Somit wird an einem neuen Zielort viel mehr von den Sporenbildenden Amöben als von den Stalkbildenden Amöben sein.

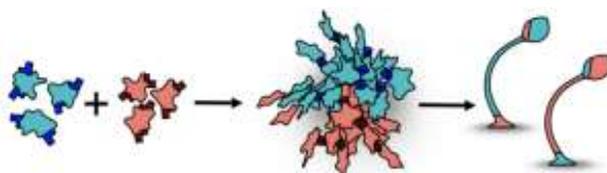
Lösung des Problems:



Es gibt Cheater, welche sich selbst in die Sporen Position bringen können, während sie nicht Cheater dazu bringen, den Stalk zu formen. Dabei müssen aber non Cheater dabei sein, nur eine Population aus Cheater kann nicht überleben, da sie keinen Fruitingbody bilden können (keine Zellen bilden den Stalk). So kann ein Überschuss an Cheatern vermieden werden.

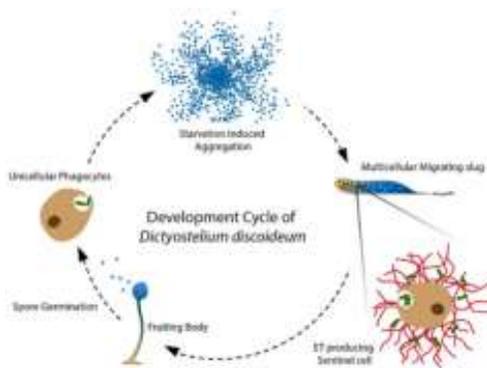
Diese Cheater werden mit der Zeit spontan durch Mutationen gebildet.

Cheater verhindern



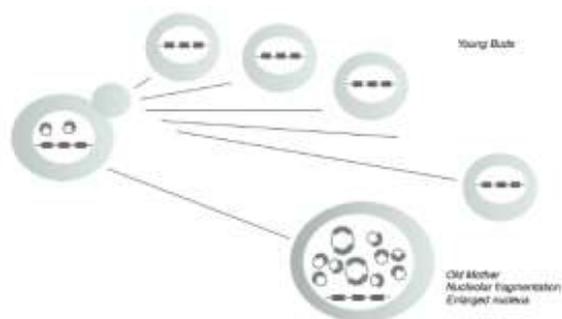
Gewisse Familien haben Rezeptoren (Tiger Genes), um sich selbst wieder zu erkennen. Das Ergebnis: Fruitingbody wird nur mit derselben Familie gebildet (auch wenn zusammen mit Cheatern ein Slug gebildet wird).

Pathogene



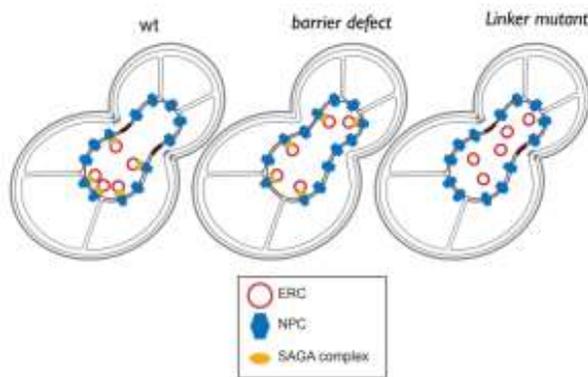
Gewisse Pathogene verwenden den Slug, um sich ebenfalls fortzubewegen. Dabei kann zwischen "guten" und "schlechten" Pathogenen unterschieden werden. Die für die Amöben essbaren werden von späteren Sporenzellen gefressen und in speziellen Vakuolen gelagert, wo sich die Pathogene nicht mehr teilen können. Die "Schlechten" Werden durch spezialisierte Zellen gefressen und durch den Schleim ausgestossen.

Alterung in Eukaryoten



Recap M.Peter: Hefe kann sich selbst 30 Mal teilen, bevor sie stirbt (auch eine von 29 Mal geteilten Mutterzelle teilt sich 30 Mal, bevor sie stirbt).

Dies passiert, weil sich in Hefezellen nach jeder Teilung Zirkuläre DNA bildet, die mit der Zeit die Zelle umbringt (Mutanten, die nicht so viele Zirkuläre DNA bilden, leben länger). Zellen sterben vermutlich wegen Proteinfoldingfehlern. Die Mutter "Zählt" also für die Anpassung an die Umgebung, indem sie altert.



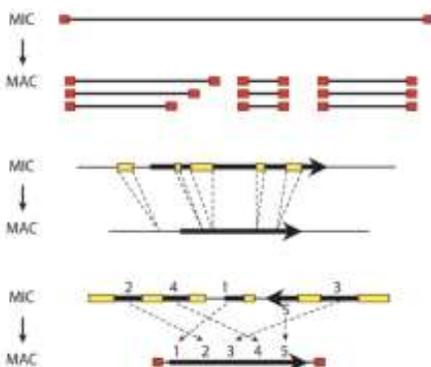
Diese Zirkuläre DNA (ERC) wird durch SAGA an den NPC (Nuclear Pore Complex) gebunden und durch eine Barriere wird verhindert, dass sie sich auch in der Tochterzelle befinden. Durch einen Defekt dieser Barriere sammeln sie sich auch in der Tochterzelle, was zu einem viel früheren Absterben dieser Zellen führt. Linker Mutanten besitzen kein SAGA und können sehr lange leben.

Ciliate



Micronelei enthalten Gene, die exprimiert werden.

Der MIC wird normal geteilt durch Mitose, der alte MAC wird degradiert und es wird ein neuer MAC aufgrund der Informationen vom neuen MIC erstellt wird.



Im MAC befinden sich verschiedene Sequenz Stränge, welche dieselben Sequenzen besitzen, wie das Genom im MIC (welches nur aus einem langen Stück besteht). Dies kann helfen bei z.B. DNA Schaden im MIC.

Das Genom im MAC besitzt keine IESs (shrot, noncoding elements).

Die codierten Gene im MAC können anders Sortiert sein als im MIC.

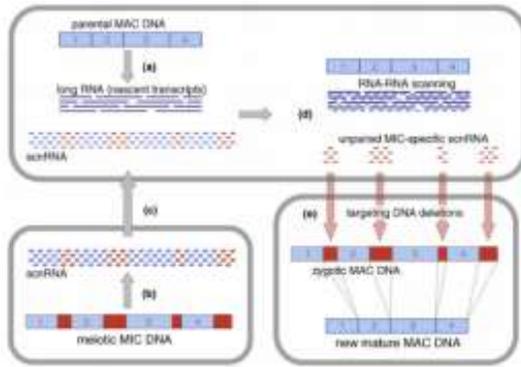
MAC besitzt also eine Vielzahl der gleichen DNA Stücke, die sich auch im MIC befinden (ohne IESs), wobei einige Gene gleich sortiert sind wie im MIC und andere anders sortiert sind.

Dies Erlaubt den Ciliaten also, das Potential ihres Genoms extrem auszunutzen, besitzen aber immernoch eine intakte Kopie ihres Genoms im MIC.

Aufgrund des speziellen Teilungsmechanismus von Ciliaten können einige also 0 Kopien von Chromosomen im MAC, bis hin zu 2x so viele Chromosomen als gewöhnlich besitzen. Durch eine extreme erhöhung der Chromosomenzahl ist es ihnen möglich, selektiv für ein einziges Gen oder kleine Gruppen von Genen individuell zu sein.

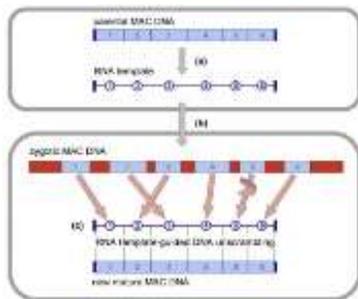
Dies erlaubt ein enormes Anpassungspotential für alle MAC Abstammungen.

IES Elimination basierend auf den Informationen vom alten MAC



Der Mac wird nach der sexuellen Reproduktion degradiert. Bevor dies aber passiert, wird er sehr oft transkribiert in long RNA. Der meiotische MIC wird ebenfalls oft transkribiert in scnRNA (scanning RNA). Die zwei RNAs werden gescannt (aneinandergebunden), was übrig bleibt sind viele Kopien von scnRNA, die nicht gebunden sind und IES Sequenzen enthalten. Diese werden dann bei der Synthese des neuen MACs aus der meiotischen MIC DNA verwendet, um IES

auszuschneiden. Dies passiert durch ein Enzym.



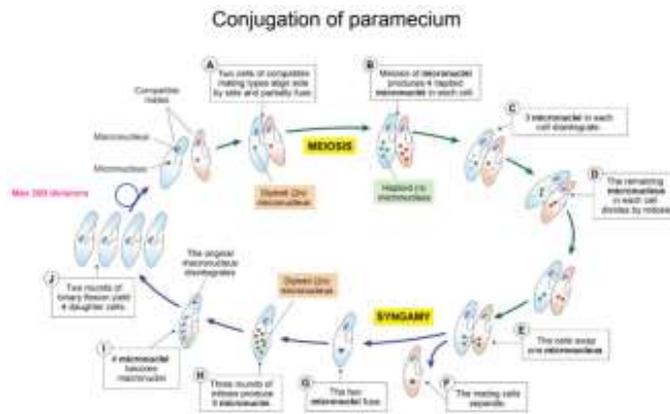
Ausserdem wird aus dem alten MAC ein RNA Template erstellt, welches bei der Sortierung der Gene des neuen MACs hilft.

MIC und MAC haben verschiedene Vor- und Nachteile (Kosten)

	MIC	MAC
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> - Kein Schaden durch Transkription und Chromatinöffnung - Die Zelle kann eine originale Kopie ihres Genoms behalten 	<ul style="list-style-type: none"> - Die Zelle kann alle möglichen Veränderungen von Chromosomenzahl, Genen und Reorganisation von Protein Domänen erleben - Unvorteilhafte Mutationen, Selfish DNA (Transposons) und nutzlose Sequenzen werden durch die Selektion entfernt
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> - Keine Selektion gegen Transposons und Mutationen zwischen zwei Meiosen - Keine Selektion für Innovative Gene - Keine Selektion gegen junk DNA (nichtcodierende DNA) 	<p>Erfolgreiche Genetische Innovation und eliminierung von toxischen oder nutzlosen genetischen Elementen ist nicht möglich (werden nicht an den Nachwuchs über den MIC weitergegeben)</p>

Lösung: Genomediting

- MIC Sequenzen und MAC Informationen werden verwendet, um nutzlose DNA von den MIC Sequenzen zu entfernen
- MIC Sequenzen und MAC Informationen werden verwendet, um Gene zu Sortieren



Aufgrund des sexuellen Zyklus der Ciliaten driftet das MAC Genom mit der Zeit ab und erlaubt mit der Zeit kein Wachstum und keine Gesundheit mehr. Dies ist bei den Hefezellen ähnlich. Also muss Altern ein Problem des Nukleus sein.