

Analyse / Untersuchung von Transkriptionskontrollen

Enhancer

Angenommen, man entdeckt ein neues Gen und stellt sich die Frage, ob es Enhancer und Promotor für dieses Gen gibt. Die Frage nach dem Promotor lässt sich relativ einfach beantworten – man muss ihn am 5'-Ende des Gens suchen, die TATA-Box ist eigentlich immer recht ähnlich und der Abstand, den ein Promotor zum Gen hat, ist auch meist leicht abschätzbar.

Enhancer hingegen muss man suchen – sie können sowohl up- als auch downstream, sowohl in Introns als auch in Exons liegen und recht weit (bis zu mehrere 1000 bp) vom eigentlichen Gen entfernt sein. Sie wirken cis (also auf demselben Strang wie das Gen), müssen Transkriptionsfaktoren binden, um zu wirken.

Enhancer sucht man folgendermaßen mit Hilfe des DNase-Hypersensitivitätssays:

- Zellkern isolieren (nicht die DNA, sondern den ganzen Kern!) → die DNA liegt in Chromatin gebettet vor
- DNase zum Kern dazugeben → die DNase schneidet dort, wo die DNA nicht allzu fest verpackt, sondern eher aufgelockert ist, weil sie nur dort rankommt
- Promotoren sind i.d.R. recht aufgelockert, da sie häufig abgelesen werden → sie sind DNase-hypersensitiv, werden also stark zerschnitten
- Southern-Blot-Analyse des Verdaus
 - Restriktionskarte des Gens erstellen, z.B. mit EcoRI
 - DNase inhibieren
 - DNA sauber isolieren
 - DNA verdauen
 - Gensonden des Gens erstellen
 - Gensonden mit Verdauprodukten hybridisieren lassen → an den DNase-hypersensitiven Stellen wird keine Hybridisierung erfolgen, da die DNA so stark zerschnitten ist, dass die Sonde kein Gegenstück mehr finden kann → auf dem Southern Blot sieht man bei den hypersensitiven Stücken keine Bande (wo nichts ist, kann auch nichts blotten)
 - Hinweis: man verwendet im Blot außerdem eine unverdaute DNA zu Vergleichszwecken; außerdem verwendet man verschiedene DNase-Konzentrationen, deren Verdauprodukte man im Blot vergleicht
- die bei höherer DNase-Konzentration verschwindende Bande des Blots ist vermutlich der Teil der DNA, der den Promotor enthält → dieses Fragment könnte der Enhancer sein → man kloniert das Fragment in zwei Richtungen in ein Plasmid, etwas vom Gen (z.B. βgal) entfernt, und testet dann das in Bakterien eingebrachte Plasmid auf Aktivitätssteigerung
- falls Aktivitätssteigerung zu verzeichnen ist, so hat man das DNA-Fragment mit dem Enhancer gefunden
- das Fragment wird durch Restriktionsendonukleasen „kleingehackt“, immer am Ende noch ein Stückchen mehr weg → man engt den Bereich, in dem der Enhancer liegt, so immer weiter ein, bis man ihn ziemlich gut eingegrenzt hat (immer Test des verkürzten Fragments auf Enhanceraktivität!)

Hat man den Enhancer dann weitestgehend isoliert und seine genaktivitätssteigernde Wirkung nachgewiesen, so testet man den Enhancer noch in anderen Zellen, um herauszufinden, ob der Enhancer zelltypspezifisch ist oder nicht (dies kann man z.T. auch schon im Blot erkennen: ist die Enhanceraktivität in diesem Zelltyp nicht stark ausgeprägt, so ist der Enhancer relativ stark „verpackt“ und wird nicht stark abgebaut → Bande gut zu sehen)

Nachweismethoden für Enhanceraktivität

- β gal wird bei starker Aktivität gelb; wird kaum noch verwendet, da nicht allzu sensitiv
- CAT (Chloramphenicoltransferase), viel mit Radioaktivität; wurde früher viel verwendet, heute kaum noch; ist noch weniger sensitiv als β gal
- Luciferase aus Glühwürmchen leuchtet; heute Standard; das allerneueste: zwei verschiedene Luciferasen, die bei verschiedenen Wellenlängen leuchten → man kann zwei verschiedene Sachen gleichzeitig nachweisen
- GFP; allerdings ungeeignet für die Quantität der Aktivität, aber sehr gut für das wann & wo der Genaktivität
- lacZ in der Embryologie – weist nach, wo was gemacht wird

Weitere Bemerkungen, die Winkler machte

- Definition eines Exons: Mit dem ersten für die mRNA codierenden Triplet beginnt das erste Exon; der Proteinanfang kommt meist später → ATG ist nicht gleich der Anfang des Gens! ATG kann sogar erst im zweiten Exon liegen
- Wenn der Proteinanfang tatsächlich erst im zweiten Exon liegt – wie findet man dann Exon 1? (Das ist z.B. für die Promotorensuche wichtig, man sucht ja vor Exon 1 nach dem Promotor) Man verwendet die Methode *primer extension*, die, meinem Verständnis nach, so funktioniert:
 - o man macht einen RNA- Primer, der dem Anfang des bekannten Exons entspricht, lässt diesen mit der mRNA hybridisieren und gibt Reverse Transkriptase dazu, um die mRNA „rückwärts“ übersetzen zu lassen → man hat Exon 1, muss nun nur noch das entsprechende Stück in der DNA finden
 - o diese Suche erfolgt irgendwie über ein Gel – leider hab ich das nicht so wirklich verstanden und auch keine entsprechende Literatur hier, sorry
 - o jedenfalls gibt es „wie immer“ (Winkler) auch hierfür eine PCR-Anwendung
- bei mRNAs erfolgt die Polyadenylierung nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt, bei manchen mRNAs erfolgt sie vor, bei manchen nach dem Spleißen

EMSA-GelShift-Assay

- Hinweis: Auch hier bin ich mir nicht 100%ig sicher, es richtig verstanden zu haben
- Nachweis, dass Transkriptionsfaktoren an eine Sequenz binden
- man nimmt ein radioaktiv markiertes doppelsträngiges Oligonukleotid der (auf Enhanceraktivität) „verdächtigen“ Bindungsstellen
- Kernextrakt (Proteine – Transkriptionsfaktoren sind Proteine!) auf die Oligonukleotide geben → Transkriptionsfaktoren binden an Enhancersequenzen → auf einem Gel ist die Enhancer-Bande weiter oben als vor der Zugabe des Kernextraktes, da die Oligonukleotidsequenz mit dem bindenden Protein ein höheres Molekulargewicht hat und damit langsamer im Gel läuft
- Kontrolle, ob es auch wirklich eine Enhancersequenz ist, durch Mutation in der Oligonukleotidsequenz → binden die Enzyme nicht mehr, sind es vermutlich sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren ☺