

Silvia Sanner

# **Mechanismen distaler Enhancer**

2., unveränderte Auflage



## **Biochemie**

Zugl.: Diss., 2000

Bibliografische Information der Deutschen  
Nationalbibliothek:

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese  
Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;  
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet  
über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.  
Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die  
der Übersetzung, des Nachdrucks, der Entnahme  
von Abbildungen, der Wiedergabe auf foto-  
mechanischem oder ähnlichem Wege und der  
Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen bleiben  
– auch bei nur auszugsweiser Verwendung –  
vorbehalten.

2., unveränderte Auflage (Erstauflage 2000)  
frühere Ausgabe: ISBN 978-3-89675-782-1 (2000)

Copyright © utzverlag GmbH · 2021

ISBN 978-3-8316-8524-0

Printed in EU  
utzverlag GmbH, München  
[www.utzverlag.de](http://www.utzverlag.de)

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1.1 Transkriptionsfaktoren binden an genetische Kontrollelemente	5
1.2 Generelle Transkriptionsfaktoren der Klasse II Transkription	6
1.3 Die Aktivierung der Transkription	7
1.3.1 Drei funktionelle Klassen von Transkriptionsaktivatoren	7
1.3.2 Mechanismen der Transkriptionsaktivierung	8
1.3.3 Die Aktivierungsdomäne VP16 vermittelt verschiedene Aktivierungs-mechanismen	9
1.4 Transkription und Chromatin	10
1.5 T-Zellspezifische Regulation der Transkription	11
1.6 Expression der $\beta$ Kette des T-Zell-Rezeptors	12
1.6.1 Funktionelle Wechselwirkungen zwischen dem V $\beta$ -8.1-Promotor und dem TCR $\beta$ -Enhancer	13
1.7 Aufgabenstellung	14
<b>2 MATERIAL</b>	<b>16</b>
2.1 Geräte	16
2.2 Chemikalien und Biochemikalien	17
2.3 Radiochemikalien	19
2.4 Enzyme	19
2.5 Antikörper	19
2.6 Lösungen, Puffer und Kulturmedien	20
2.6.1 Lösungen und Puffer	20
2.6.2 Kulturmedien	21
2.6.3 Molekularbiologische Hilfsmittel	22
2.7 Eukaryontische Zell-Linien	23
2.8 Bakterienstämme	23
2.9 DNA- und Protein-Längenstandards	24
2.9.1 DNA-Längenstandards	24
2.9.2 Protein-Längenstandards	24
2.10 Plasmide	25
2.11 Oligodeoxyribonukleotide	26

<b>3 METHODEN</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Methoden der prokaryontischen Zellkultur</b>	<b>27</b>
3.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen	27
3.1.2 Anlegen von Dauerkulturen	27
<b>3.2 Methoden der eukaryontischen Zellkultur</b>	<b>27</b>
3.2.1 Zellvermehrung eukaryontischer Zell-Linien	27
3.2.2 Anlegen von Dauerkulturen	28
<b>3.3 DNA- und RNA-Arbeitstechniken</b>	<b>29</b>
3.3.1 Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäurepräparation	29
3.3.2 Chloropane-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren	29
3.3.3 Reinigung von DNA über Gelfiltration	30
3.3.4 Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Del Sal et al., 1988)	30
3.3.5 Plasmid-DNA-Präparation mit Quiagen-Anionen-Austauschersäulen	31
3.3.6 Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
3.3.7 Restriktionshydrolyse von DNA	33
3.3.8 Agarose-Gelelektrophorese	34
3.3.9 Elution von DNA aus Agarosegelen	34
3.3.10 Reinigung synthetischer Oligodesoxyribonukleotide	35
3.3.11 Radioaktive Markierung von Oligodesoxyribonukleotiden am 5'-Ende	36
3.3.12 Dephosphorylierung von DNA	36
3.3.13 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden	37
3.3.14 Ligation von DNA	37
3.3.15 Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> (nach M. Scott, unveröffentlicht)	38
3.3.16 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> (nach M. Scott, unveröffentlicht)	39
3.3.17 Klonierung von Promotor- und Promotor/Enhancer-Konstrukten	39
3.3.18 Klonierung von E1A 12S-, CBP- und Ets-1-Derivaten	40
3.3.19 Klonierung der GAL4-VP16 Derivative	41
3.3.20 DNA-Sequenzierung	41
<b>3.4 Protein-Arbeitstechniken</b>	<b>43</b>
3.4.1 Konzentrationsbestimmung	43
3.4.2 SDS-Gelelektrophorese	44
3.4.3 Coomassie-Färbung von Proteinen	45
3.4.4 Herstellung von Zellextrakten	45
3.4.5 Heterologe Expression von Proteinen in <i>Escherichia coli</i>	48
3.4.6 Reinigung von GST Fusionsproteinen	50
<b>3.5 Nachweis von Proteinen durch Western-Blot Analyse</b>	<b>50</b>
<b>3.6 Funktionelle Analysen</b>	<b>52</b>
3.6.1 Gelretardationsanalyse (EMSA)	52
3.6.2 Protein-Protein Interaktionsexperimente	53
3.6.3 Reinigung Enhancer-bindender Proteine unter Verwendung des Biotin/Streptavidin-Affinitätssystems	53
3.6.4 <i>In-vitro</i> -Transkription von Klasse II-Promotoren	54
3.6.5 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen	56
3.6.6 GST-Fällung („pull down assay“)	60
3.6.7 Immunpräzipitation von p300 aus Jurkat-Zellkernextrakt	60

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>61</b>
4.1	<b>Strukturelle Eigenschaften des V<math>\beta</math>-8.1-Promotors und des TCR<math>\beta</math>-Enhancers</b>	<b>61</b>
4.1.1	Struktur des V $\beta$ -8.1-Promotors	61
4.1.2	Struktur des TCR $\beta$ -Enhancers	62
4.2	<b>Distinkte Regionen der Transaktivierungsdomäne von Ets-1 vermitteln Enhancer- bzw. Pomotorfunktion</b>	<b>63</b>
4.3	<b>Der Cofaktor CBP/p300 ist an der Regulation der Transkription der <math>\beta</math>-Kette des TCR beteiligt</b>	<b>66</b>
4.3.1	Endogenes CBP/p300 ist an der Aktivität des TCR $\beta$ -Enhancers beteiligt	66
4.3.2	Funktionelle Analyse der flankierenden Regionen der beiden Ets/AML-Elemente	67
4.3.3	Die flankierenden Regionen der beiden Ets/AML-Elemente beeinflussen die Enhanceraktivität	68
4.3.4	Flankierende Sequenzen kompetitieren spezifisch die Ausbildung von Protein-Enhancer Komplexen	69
4.3.5	Ein funktionelles Enhancerkonstrukt bindet spezifisch CREB und Ets-1	70
4.4	<b>Funktionelle Charakterisierung von GAL4-CBP Fusionsproteinen</b>	<b>72</b>
4.4.1	GAL4-CBP Fusionsproteine aktivieren den V $\beta$ -8.1-Promotor	73
4.4.2	Das GAL4-HAT Fusionsprotein simuliert den TCR $\beta$ -Enhancer	74
4.5	<b>Funktionelle Charakterisierung des synthetischen Enhancers GAL4-VP16</b>	<b>75</b>
4.5.1	E1A reprimiert die Aktivierung des V $\beta$ -8.1-Promotors durch den synthetischen Enhancer GAL4-VP16	76
4.5.2	Der prototypische Aktivator GAL4-VP16 aktiviert unspezifisch den V $\beta$ -8.1-Promotor	77
4.5.3	Die Enhancerfunktion von GAL4-VP16 wird teilweise durch die Rekrutierung der core-Aktivatoren vermittelt	78
4.6	<b>Analyse des <i>in-vitro</i> -Aktivierungsmechanismus von VP16</b>	<b>79</b>
4.6.1	VP16 aktiviert spezifisch die Transkription in einem Rohextrakt	80
4.6.2	Der neue positive Cofaktor PC6-MOVE aktiviert nicht gewebespezifisch die Transkription	83
4.6.3	Depletion des Cofaktors PC6-MOVE durch die VP16 Aktivierungsdomäne	84
4.6.4	Die VP16:H2 Domäne interagiert direkt mit der N-terminalen Region von CBP	87
4.6.5	CBP/p300 ist <i>in vivo</i> an der durch VP16 vermittelten Aktivierung beteiligt	89
4.6.6	Die PC6-MOVE Aktivität wird nicht durch p300 vermittelt	90
4.6.7	Zugabe von GST-E1A inhibiert nicht die PC6-MOVE Funktion	91
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>93</b>
5.1	<b>Kooperativität am TCR<math>\beta</math>-Enhancer</b>	<b>93</b>
5.2	<b>Wie funktionieren Aktivatoren innerhalb des core Promotors bzw. des Enhancers</b>	<b>95</b>
5.3	<b>Architektonische Proteine haben eine besondere Bedeutung beim Aufbau des Enhanceosoms</b>	<b>97</b>
5.4	<b>Spezifische Interaktion des V<math>\beta</math>-8.1-Promotors und des TCR<math>\beta</math>-Enhancers</b>	<b>97</b>
5.5	<b>Die VP16 Aktivierungsdomäne vermittelt Enhancerfunktion</b>	<b>99</b>
5.5.1	CBP interagiert direkt mit der VP16:H2 Domäne	99
5.5.2	Aktivierung durch VP16 <i>in vitro</i>	100

5.5.3 Eine neue Aktivität ist an der spezifischen VP16 vermittelten Aktivierung beteiligt	102
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>104</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>106</b>

## 1 Einleitung

Eine typische Zelle höherer Eukaryonten synthetisiert zwischen 10000 bis 20000 verschiedener Proteine. Die Entwicklung multizellulärer Organismen, die in der Lage sein müssen, zu verschiedenen Entwicklungsstadien bestimmte Gene in einer genau definierten zeitlichen Abfolge an- oder abzuschalten, setzt voraus, daß Regulationsmechanismen für eine komplexe zellspezifische Genexpression zur Verfügung stehen. Verschiedene Kontrollstufen tragen zu dieser Regulation bei. Reguliert werden kann auf der Stufe der Transkription der Gene, der Prozessierung primärer RNA-Trankripte, des Transports fertiggestellter mRNAs aus dem Zellkern, der Translation, bei der diese reife mRNA im Cytoplasma an den Ribosomen in ein Protein übersetzt wird, und der Stabilisierung bestimmter mRNA-Moleküle im Cytoplasma. Der gesamte Vorgang der Informationübertragung vom Gen zum Protein wird als Genexpression bezeichnet. Besondere Bedeutung kommt hierbei der Regulation der Transkription zu. Diese wird durch die Interaktion bestimmter DNA-Sequenzen mit zellulären Proteinen reguliert. Spezielle Enhancer-Sequenzen wurden typischerweise in Genen identifiziert, deren Produkte rasch und in großen Mengen gemacht werden müssen (Schlokot et al., 1986; Goodbourn et al., 1985). Zusätzlich zu diesem quantitativen Effekt funktionieren Enhancer auch in einem weiteren Aspekt, nämlich der Zell-spezifischen Genexpression (Edlund et al., 1985; Hanahan et al., 1985). Ziel dieser Arbeit war es nun, die Funktion des T-Zell-Rezeptor- $\beta$ -Kette-Enhancers, der für die Expression der  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors essentiell ist, zu untersuchen. Außerdem sollten einige synthetische Enhancerkonstrukte auf deren Mechanismus hin untersucht werden.

### 1.1 Transkriptionsfaktoren binden an genetische Kontrollelemente

Die Transkription eines Gens wird durch DNA-Elemente reguliert, die man auf Grund ihrer Funktion und Lokalisierung innerhalb eines Gens unterscheiden kann. Transkriptionsfaktoren binden an diese Sequenzen und modulieren die Aktivität von Genen, indem sie auf die Initiation, Elongation oder Termination der Transkription wirken. In Eukaryonten lassen sich die regulatorischen Elemente in drei Klassen unterteilen (Abb. 1):

- **core-Promotoren** sind definiert als ca. 50 bp lange DNA Elemente, welche die Startstelle der Transkription umgeben. Häufig beinhalten diese eine TATA-Box, die circa 30 bp vor dem Transkriptionsstart liegt (Benoist und Chambon, 1981) und ein pyrimidinreiches Initiatorelement