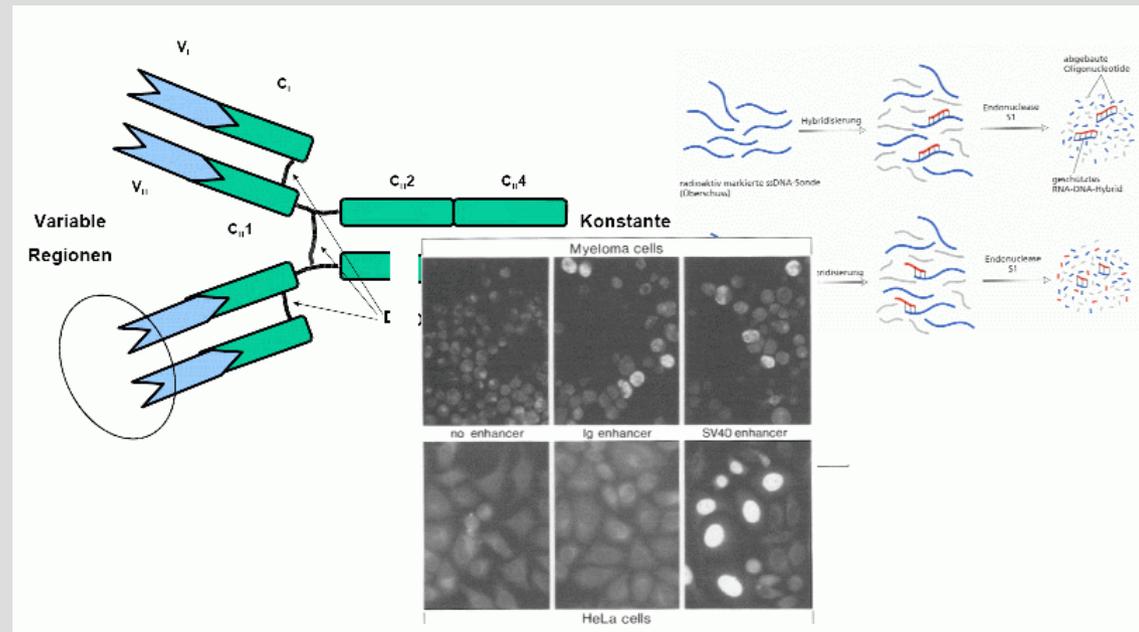


# A Lymphocyte-Specific Cellular Enhancer Is Located Downstream of the Joining Region in Immunoglobulin Heavy Chain Genes

by Julian Banerji, Laura Olson, and Walter Schaffner  
Cell, Vol 33, 729 -740, July 1983



Ein Vortrag von  
Claudia Sauer, Verena Kubesch und Anita Krysta

# Gliederung

- Einleitung
- Theorie
  - Enhancer
  - Immunglobuline
  - „Rearrangement“
- Methoden
  - Transiente Expressionsversuche
  - Klonierung
  - Vektoren
  - Immunfluoreszenz
  - S1 Nuclease Hybridisierung
  - Northern Blot
  - Deletionsmutanten
- Ergebnisse
  - Position des Enhancers
  - Cis- Wirkung
  - Genunspezifität
  - „Template Amplification“
  - Gewebespezifität
  - Genaue Enhancersequenz
- Zusammenfassung und Diskussion

# Einleitung

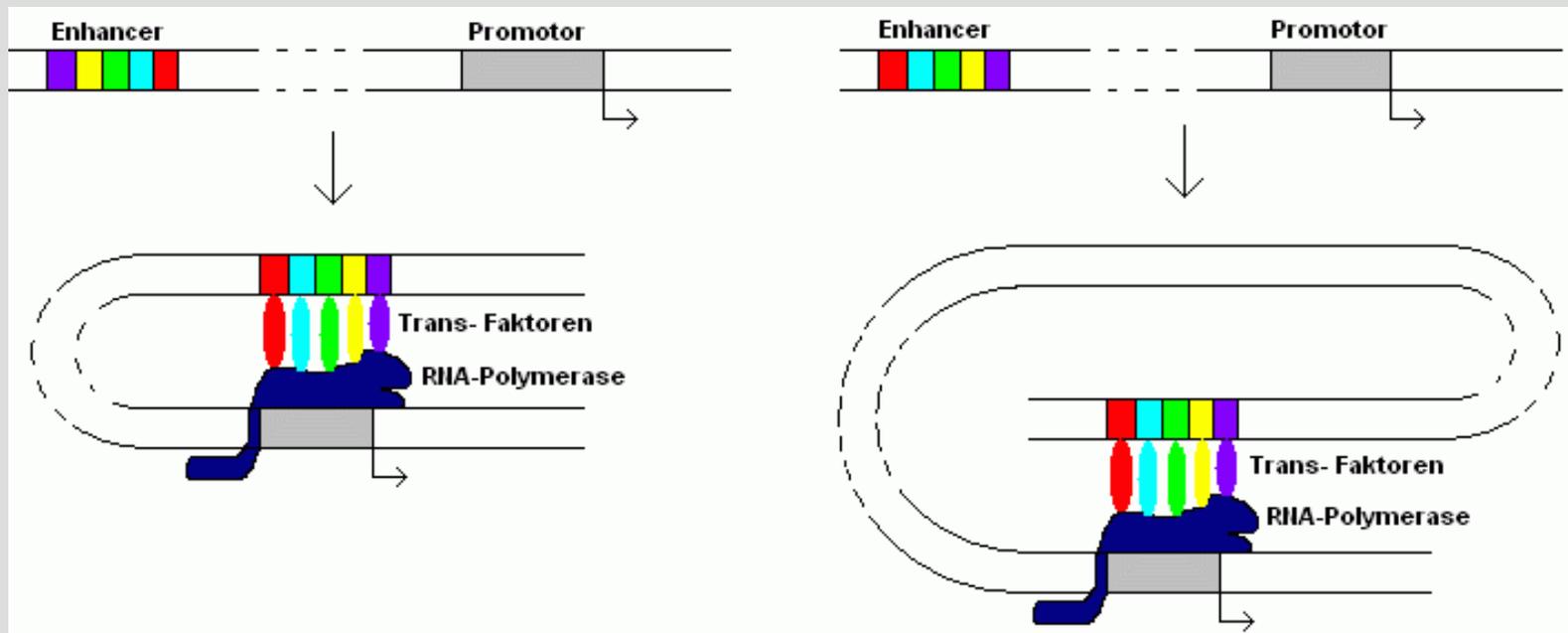
- Enhancer spielen eine große Rolle in der Regulation der Genexpression
- 1983: Enhancer kannte man aus viralen Genomen (SV40), aber noch kein Enhancer in eukaryotischen Genomen bekannt
  - ➔ Vermutung: Enhancer in Mäusegenom
  - ➔ Im Gen, das für die Schwere Kette von Immunglobulinen codiert

# Theorie - Übersicht

- Was ist ein Enhancer?
- Was sind Immunglobuline und wie wirken sie?
- Wie wird die hohe Vielfalt an Antikörpern bewerkstelligt?

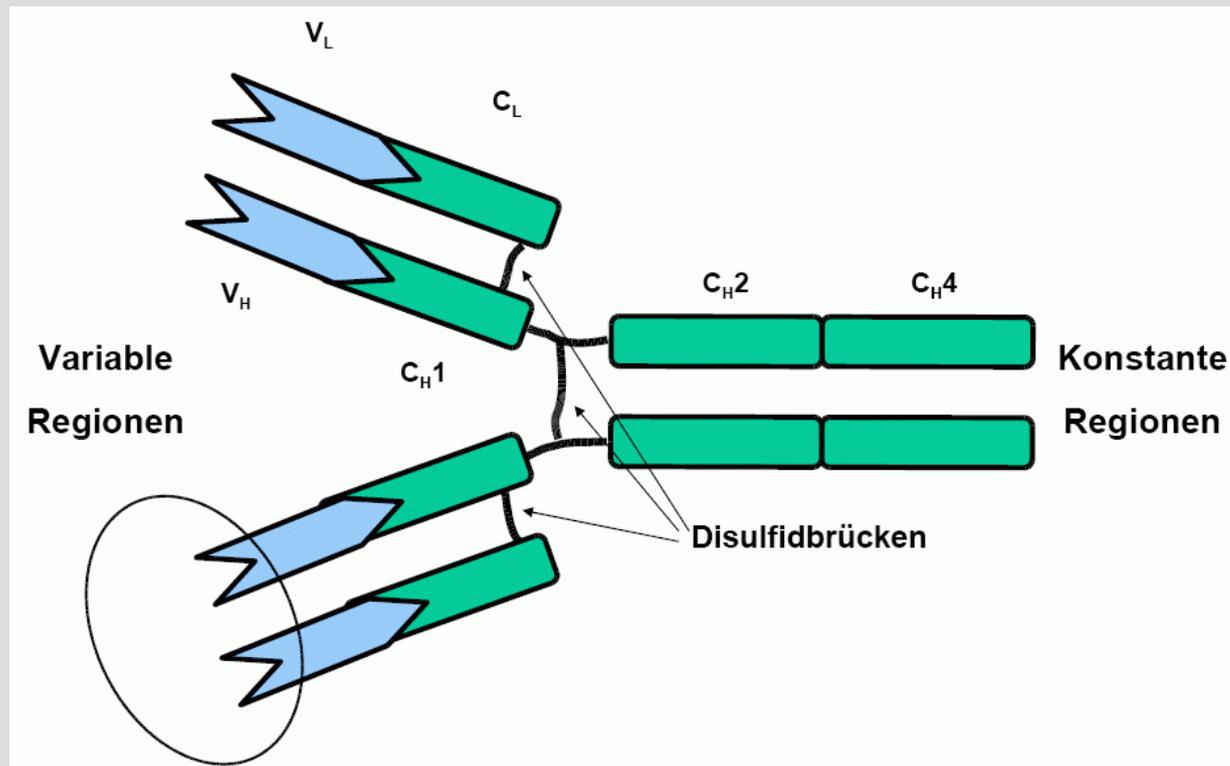
# Enhancer

- Verstärkendes Element (oder reprimierend → Silencer)
- Modular aufgebaut
- cis- aktiv
- Orientierung- und weitestgehend auch positionsunabhängig



# Immunglobuline

Struktur:



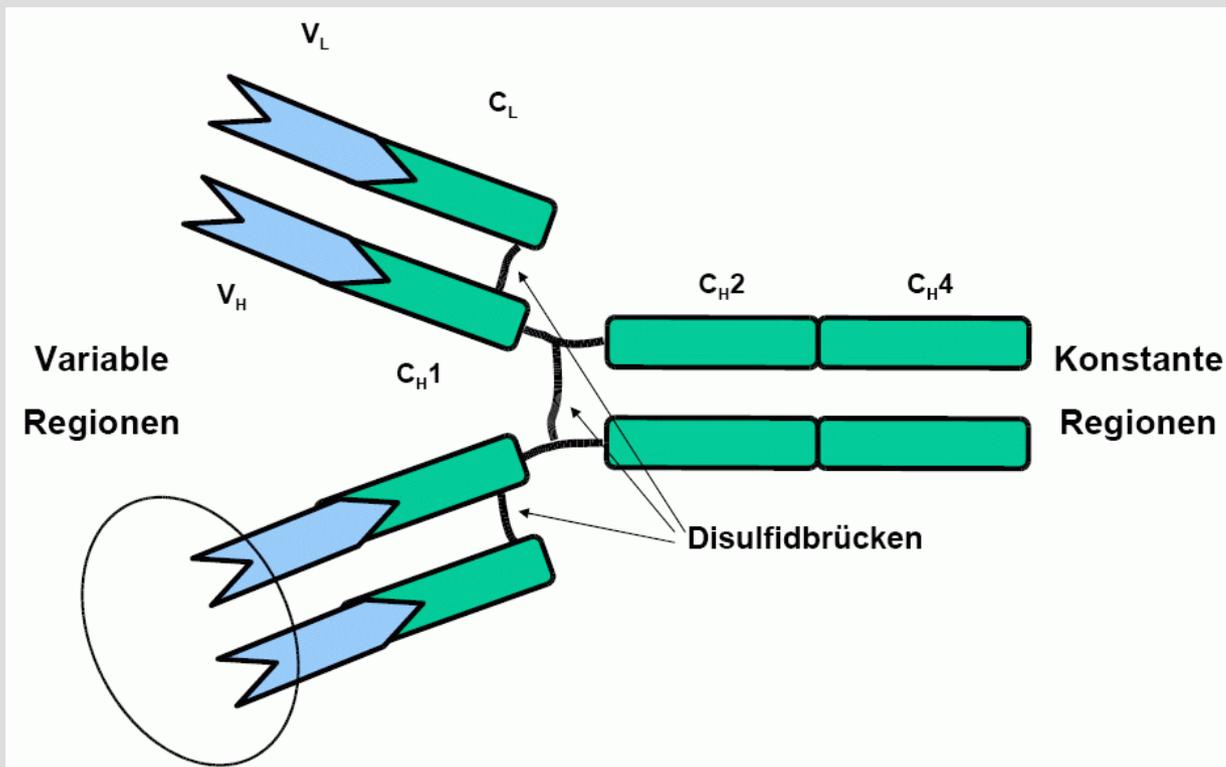
Hohe Vielfalt  
unterschiedlicher  
Antikörper

Aber nur 30.000 Gene

Wie wird das  
bewerkstelligt?

# Immunglobuline

Struktur:



Hohe Vielfalt  
unterschiedlicher  
Antikörper

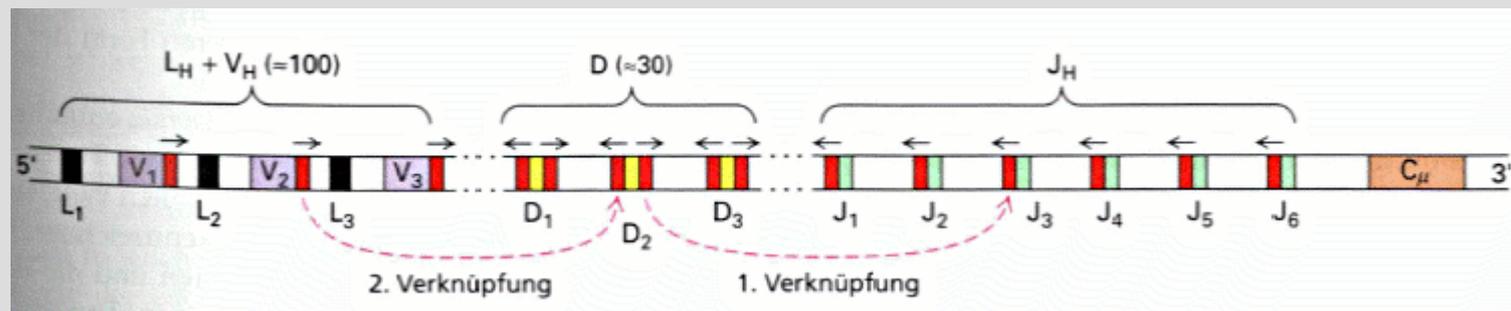
Aber nur 30.000 Gene

Wie wird das  
bewerkstelligt?

→ „Rearrangement“

# “Rearrangement” (Situation in Keimbahn)

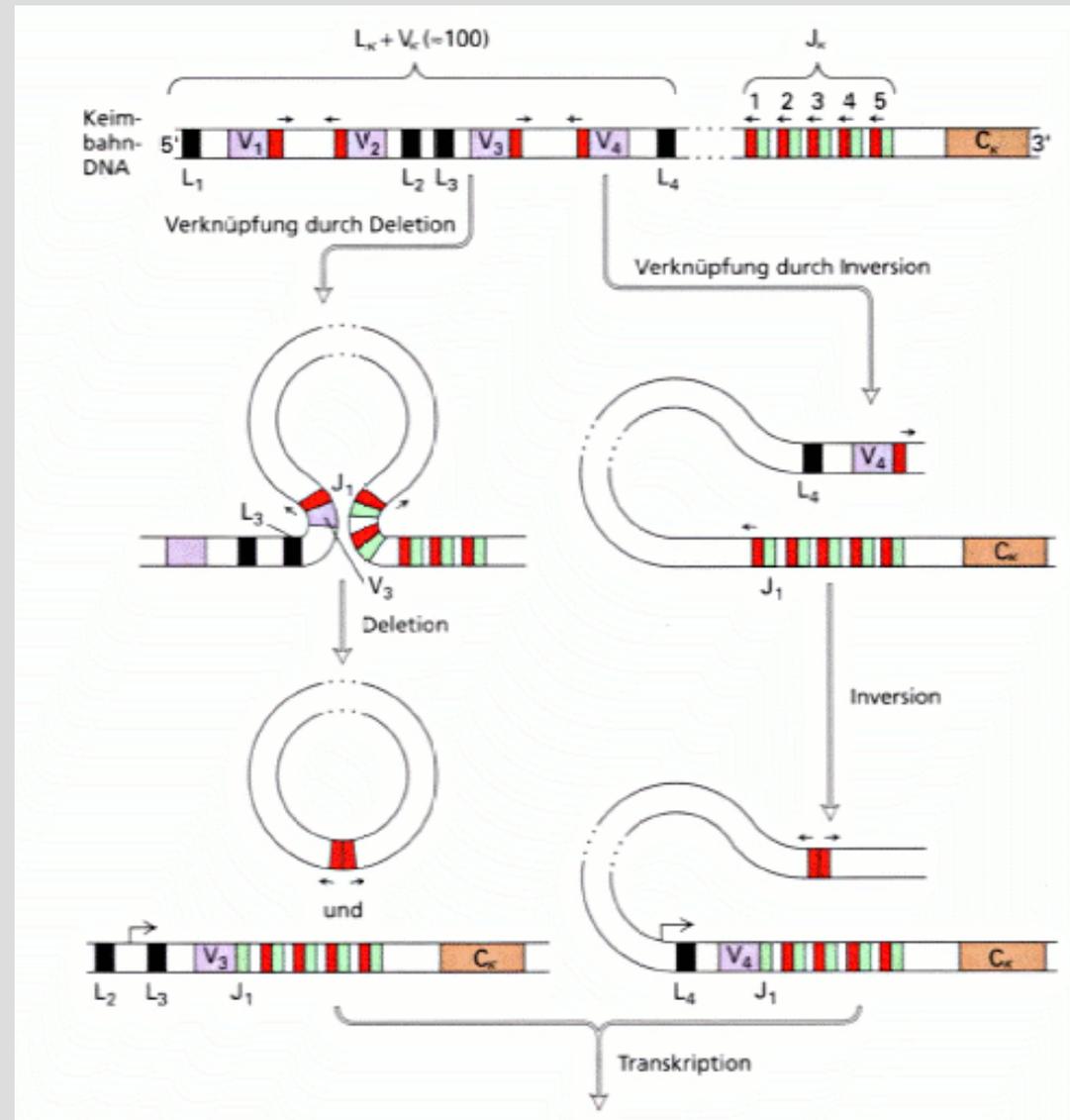
- Modularer Aufbau des Gens
- Elemente:
  - Variable Regionen (V) 100
  - Leader Sequenz (L)
  - Diversity Regions (D) ca. 30
  - Joining Regions (J) 6
  - Konstante Regionen (C)



Keimbahn - DNA

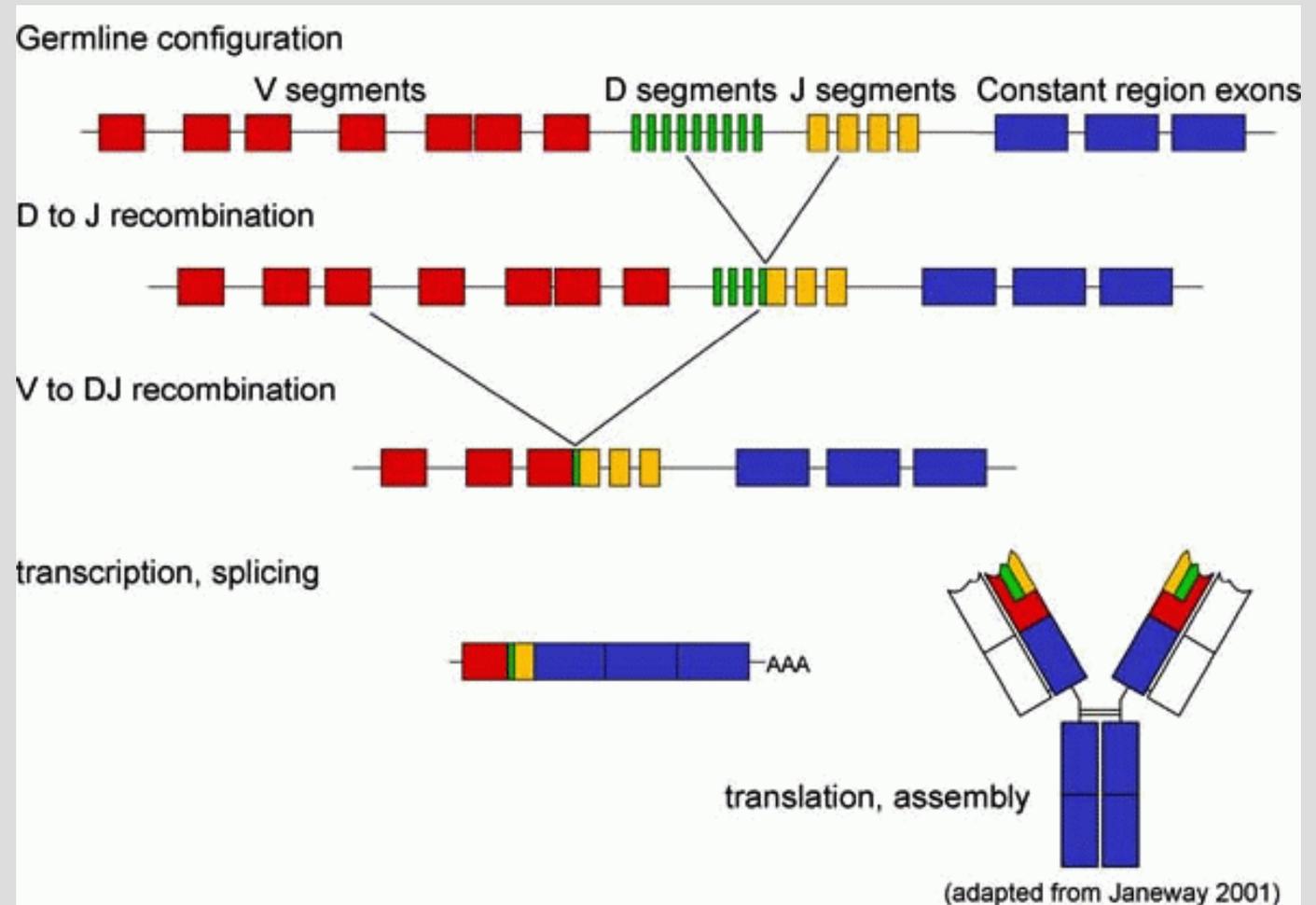
# “Rearrangement” (Umstrukturierung)

- Durch Inversionen und Deletionen erfolgt Umstrukturierung
- Dabei helfen „inverted repeats“ der Rekombination
- In jeder Zelllinie erfolgt ein anderes Rearrangement
- Leserasterverschiebungen erhöhen die Vielfalt
- Es kommt häufig zu Mutationen → Mehr Vielfalt, aber auch häufig Krebsentstehung



# “Rearrangement” (In reifen B- Lymphozyt)

- B- Lymphozyten: Ablesen der umstrukturierten DNA, Prozessierung und Translation in die Schwere Kette
- Für Leichte Kette existiert ebenfalls ein solches Rearrangement, mit ähnlichen Modulen (Kein D)



# Theorie - Übersicht

- Was ist ein Enhancer?
  - ➔ Verstärkerelemente, cis -aktiv, orientierungsunabhängig, weitestgehend positionsunabhängig
- Was sind Immunglobuline und wie wirken sie?
  - ➔ Antikörper, sie können über Bindestellen Antigene erkennen und so körperfremde Stoffe inaktivieren oder markieren (Opsonisierung)
- Wie wird die hohe Vielfalt an Antikörpern bewerkstelligt?
  - ➔ Rearrangement von V, J, D Segmenten in der Embryonalentwicklung

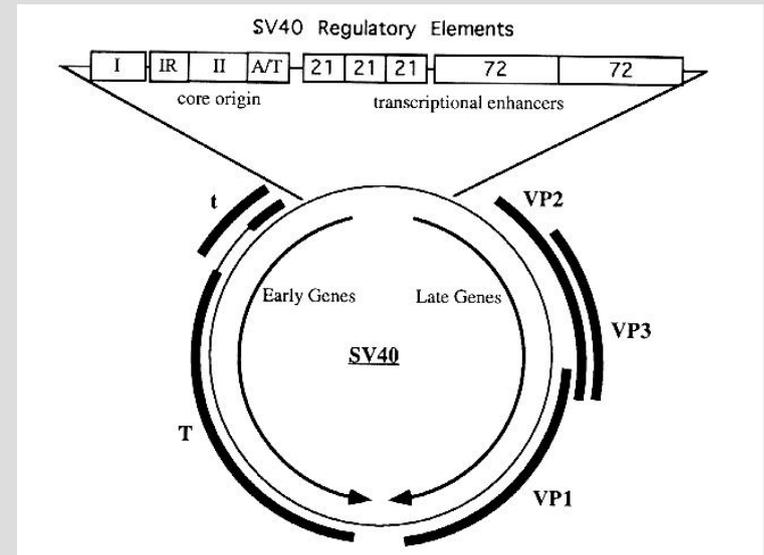
# Fragestellung

- Bekannt:
  - Enhancer aus viralen Genomen
  - cis- aktiv
  - Verstärkerelemente
  - Genunspezifisch
  - Gewebeunspezifisch

- Vermutung:
  - Enhancer gibt es auch in eukaryotischen Genomen (Mausgenom)

- Frage:

**Wo ist ein solcher Enhancer lokalisiert und wie wirkt er?**



# Methoden

# Transiente Expressionsversuche

## („transient expression assay“)

- Methode um den Einfluss einer DNA Sequenz auf benachbarte DNA – Bereiche zu untersuchen.
- Beim „transient Expression assay“ wird ein Gen mit einem vorgeschalteteten Promotor in einem Plasmid kloniert und über Transfektion in eine Zellkultur eingebracht.
- Rekombinante Plasmide, die in den Zellkern gelangen werden kurzfristig expremiert, sofern sie einen funktionsfähigen Promotor haben → Menge des Transkriptes lässt sich bestimmen.

# Klonierung

- Molekularbiologisch versteht man unter Klonierung die Vermehrung eines DNA – Abschnittes als rekombinante DNA in einer Wirtszelle.

## **Schritte der Klonierung:**

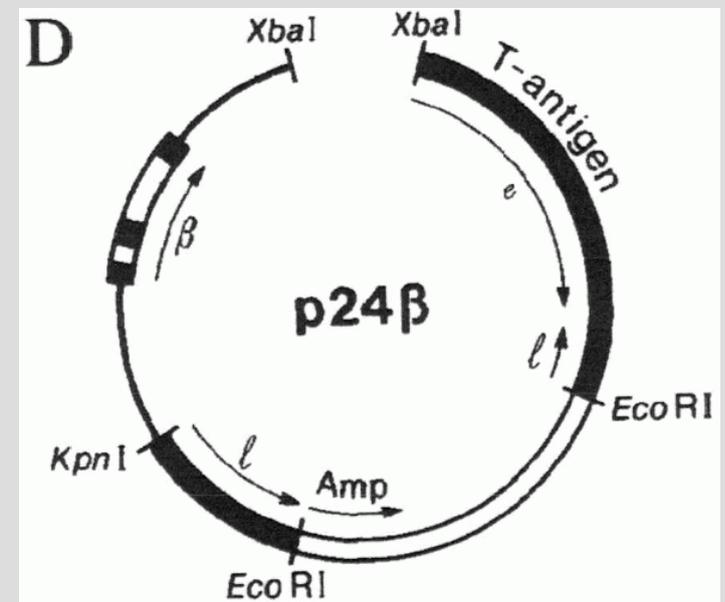
1. Schneiden der DNA mit einem Restriktionsenzym
2. Auftrennung des gewünschten Fragmentes durch Gelelektrophorese
3. Isolation der gewünschten Fragmente
4. Ligation von Vektor und Fremd-DNA durch Ligase
5. Transfektion der DNA in die Wirtszelle

Kontrolle der Klone durch erneuten Restriktionsverdau

# Vektoren

- Vektoren sind DNA – Moleküle, die Fremd DNA aufnehmen und in einer Wirtszelle autonom replizieren können.
- Vektoren werden zur Vermehrung und Expression spezifischer DNA oder zur genetischen Veränderung von Zellen durch Übertragung von Fremd DNA genutzt.

Vektor in unseren Experiment:



# Immunofluoreszenz

- Antikörper können für den Nachweis von Proteinen genutzt werden; Voraussetzung ist, dass das Protein expremiert wird.
- Die Nachweisreaktion beruht auf einer Antikörper-Antigen Reaktion. Antikörper sind gegen charakteristische Oberflächenmerkmale des Proteins gerichtet (=Epitope).
- Im Regelfall werden monoklonale Antikörper für die Nachweisreaktion verwendet. Monoklonale Antikörper sind spezifisch für ein Epitop auf einen Antigen.

# Direkte und indirekte Immunfluoreszenz

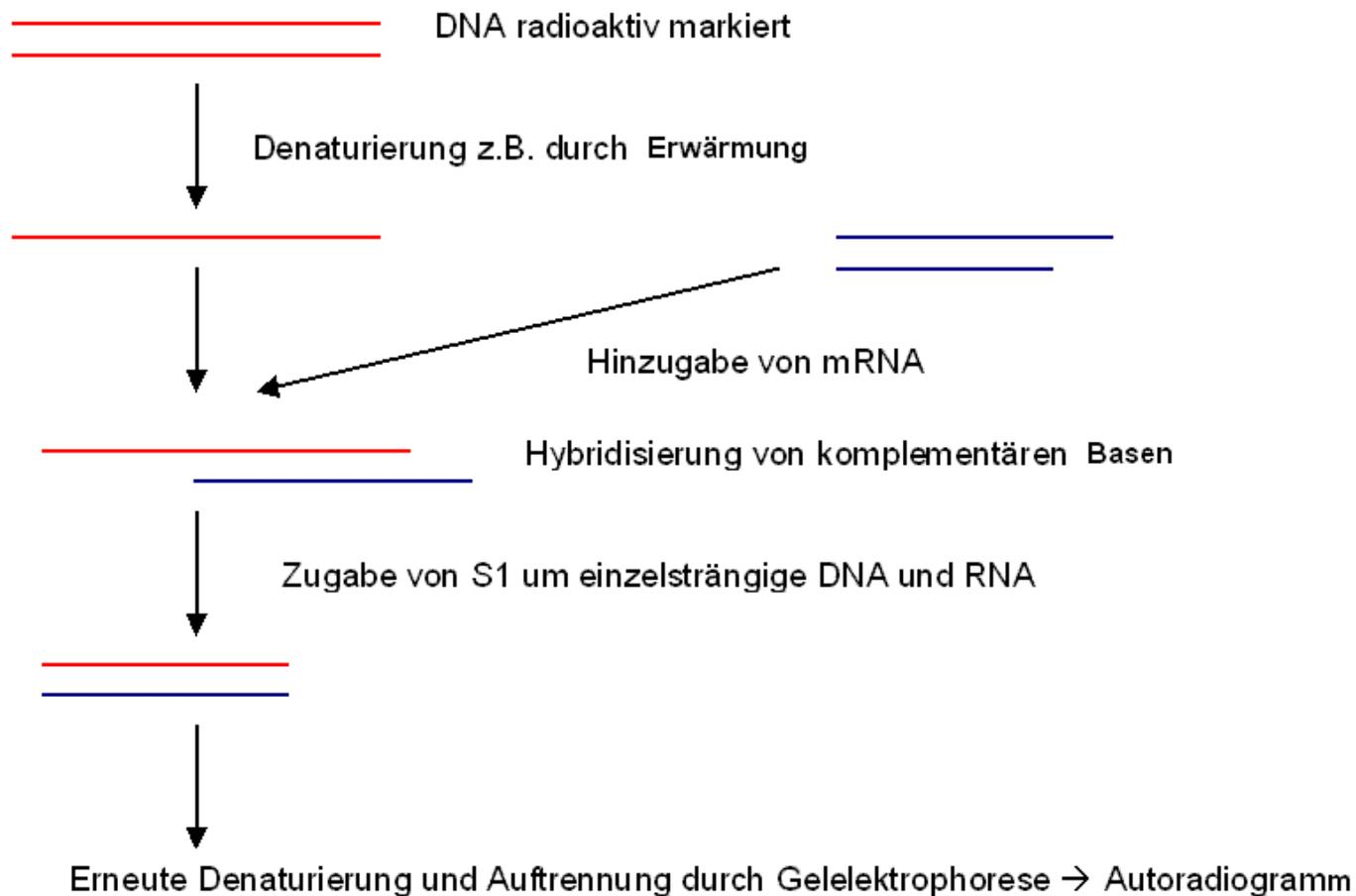
- Die Immunfluoreszenz ist eine immunologische Nachweismethode, bei der der spezifische Antikörper meist mit einem Flurochrom oder einem Enzym markiert wird, ohne dass dadurch seine immunologischen Eigenschaften verändert werden.
- Man unterscheidet zwischen direkter und indirekter Immunfluoreszenz.



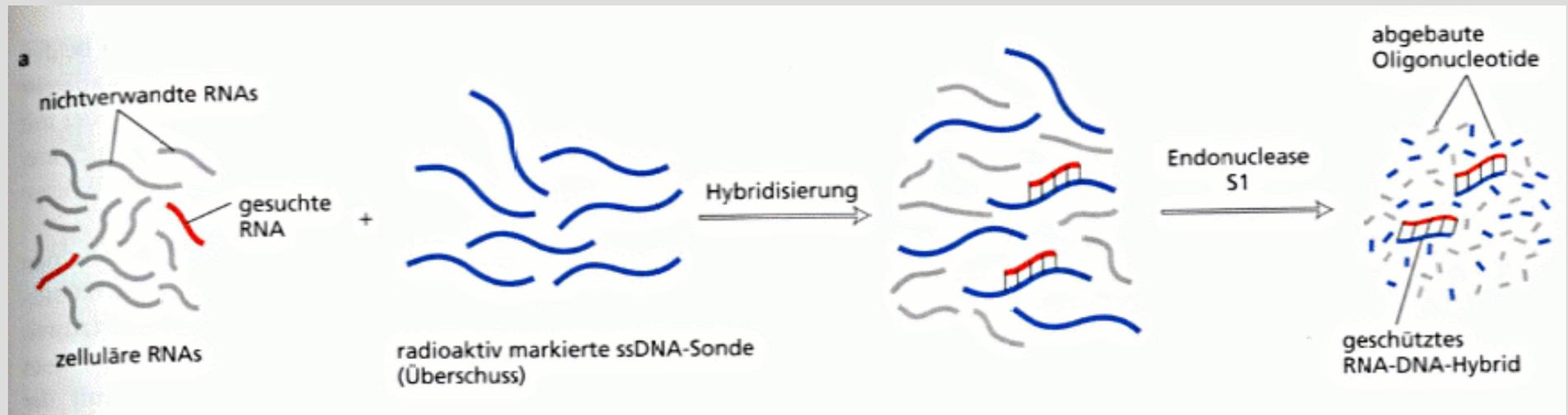
# S1 Nuclease Hybridisierung

- S1 ist eine einzelstrangspezifische Nuclease (aus dem Pilz *Aspergillus oryzae*), die einzelsträngige DNA – und RNA Polynucleotide abbaut. S1 baut jedoch keine Hybride aus DNA und RNA ab.
- Die S1 Hybridisierung wird genutzt, um
  - a) die Menge einer spezifischen mRNA nach zu weisen (im Versuch angewendet)
  - b) Die Startstelle der Transkription zu bestimmen ( Berk – und Sharp – Methode)
  - c) Bestimmung von Introngrenzen
- Nachteile der S1 Hybridisierung ist, daß Fehlpaarungen zwischen RNA und DNA nicht durch die Nuclease mit abgebaut werden.

# Übersicht S1 Hybridisierung



# Übersicht S1 Hybridisierung



# S1 Nuclease Hybridisierung (Schritte)

- Das klonierte DNA – Fragment wird radioaktiv markiert und anschließend z.B. durch Erwärmen denaturiert. Die Wasserstoffbrückenbindungen brechen auf und die DNA liegt einzelsträngig vor.
- Die DNA wird isoliert und mit zellulärer RNA in Lösung hybridisiert. Die DNA – Sequenzen des klonierten Fragmentes, die in der RNA nicht vorliegen, bleiben einzelsträngig.
- Die einzelsträngige DNA wird durch den Abbau von S1 aus der Lösung entfernt. Die Probe wird erneut denaturiert und durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die Stärke der Bande ist ein Maß für die Menge der synthetisierten mRNA.

# Northern Blot

RNA durch Gelelektrophorese auftrennen



Übertragen der RNA vom Gel auf eine Membran



Zugabe einer radioaktiv markierten DNA – Sonde  
(Paarung von komplementären Sequenzen → DNA - RNA  
Hybride)

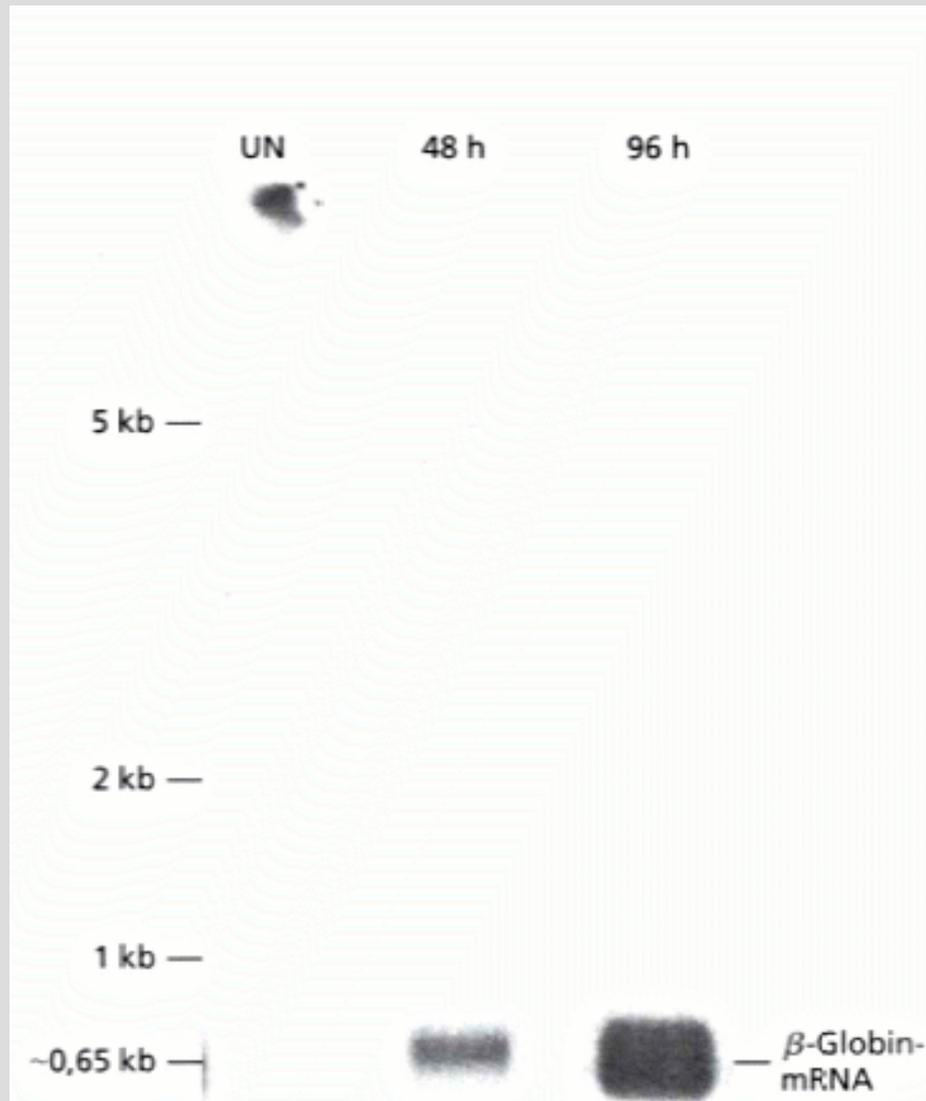


Auswaschen der überschüssigen DNA – Sonden



Autoradiographie → die Intensität der Bande ist ein Maß für  
die Menge der untersuchten mRNA

# Northern Blot



- Der Northern Blot dient wie die S1 Hybridisierung der Bestimmung der mRNA Menge sowie der Art der gebildeten mRNA.
- Um die gebildete mRNA nachzuweisen, muß die Sequenz bekannt sein.

Neben den Northern Blot unterscheidet man noch den Southern Blot und Western Blot:

- **Southern Blot:** Nachweis von einzelsträngiger DNA mit Hilfe von DNA Sonden
- **Western Blot:** Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern (Antikörper – Antigen Reaktion)

# Northern Blot

## Schritte des Northern Blots:

1. Die isolierte mRNA wird durch Gelelektrophorese aufgetrennt
2. Die RNA wird vom Gel auf eine Membran aus Nitrocellulose oder Nylon übertragen.
3. Eine radioaktiv markierte DNA Sonde wird hinzugegeben. Komplementäre Sequenzen der RNA werden Basenpaarung mit der Sonde eingehen.
4. Überschüssige DNA – Sonden werden ausgewaschen. Bei der Autoradiographie hinterläßt die Hybrid DNA eine Schwärzung des Filmmaterials → Die Dichte der Schwärzung ist ein Maß für die Menge der mRNA.

# Deletionsmutationen

- Deletionsmutationen dienen der Genkartierung und Bestimmung von DNA-Sequenzen.
- Die Deletionsmutation ist ein Werkzeug der **reversen Genetik**, durch gezielte Änderung der DNA -Sequenz läßt sich die Auswirkungen auf den Phänotypen untersuchen.
- In unserem Beispiel wird die Sequenz des Enhancers bestimmt.
- **Deletion:** Verlust eines DNA – Abschnittes, wobei sich die Enden der angrenzenden Bereich miteinander verbinden.

# Erzeugen von Deletionsmutanten

Es gibt verschiedene Möglichkeiten um Deletionsmutanten zu erzeugen.

Das Grundprinzip ist:

Schneiden des Plasmids mit Restriktionsenzymen



Behandlung der Schnittstelle mit Nucleasen. Aufgrund unterschiedlicher Inkubationszeit entstehen unterschiedlich große Deletionen



Anfügen eines Linker (= synthetische Oligonucleotide, die Schnittstellen für Restriktionsenzyme enthalten)



Schnittstelle wieder ligieren

# Deletionsmutation

- **zielgerichtete Deletion:**

Das Fragment wird an definierten Restriktionsschnittstellen geschitten → Die „sticky ends“ der Schnittstelle werden durch einzelstrangspezifische Nucleasen abgebaut und anschließend wieder ligiert.

- **systematische Deletion:**

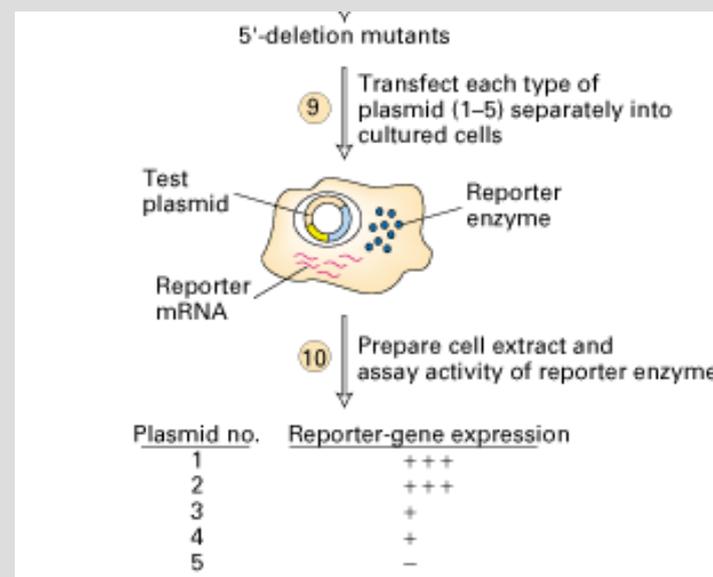
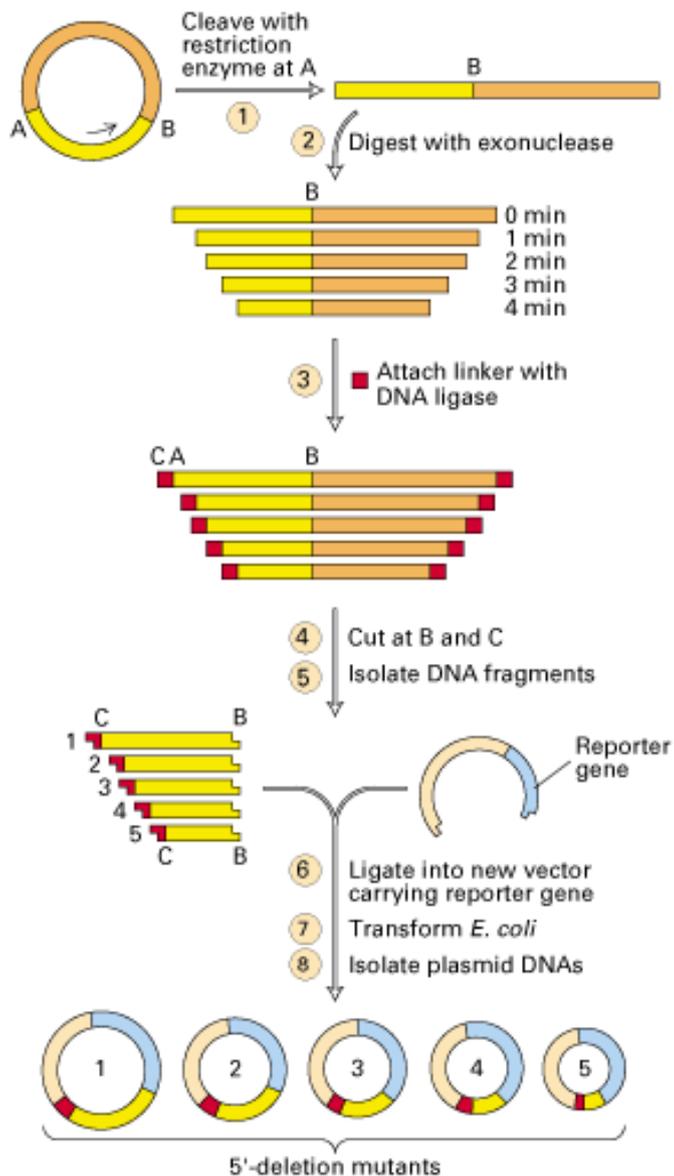
DNA Fragment wird nur an einer Stelle geschnitten und von Exonucleasen von einem Ende her abgebaut. Je nach dem, wann die Reaktion abgebrochen wird, erhält man unterschiedlich große, Deletionen.

- Die Enden werden oft mit Linker verbunden um die Identifizierung leichter zu machen. Linker sind Oligonukleotidsequenzen die eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym tragen.

# Deletion im Experiment

## Exonucleasen:

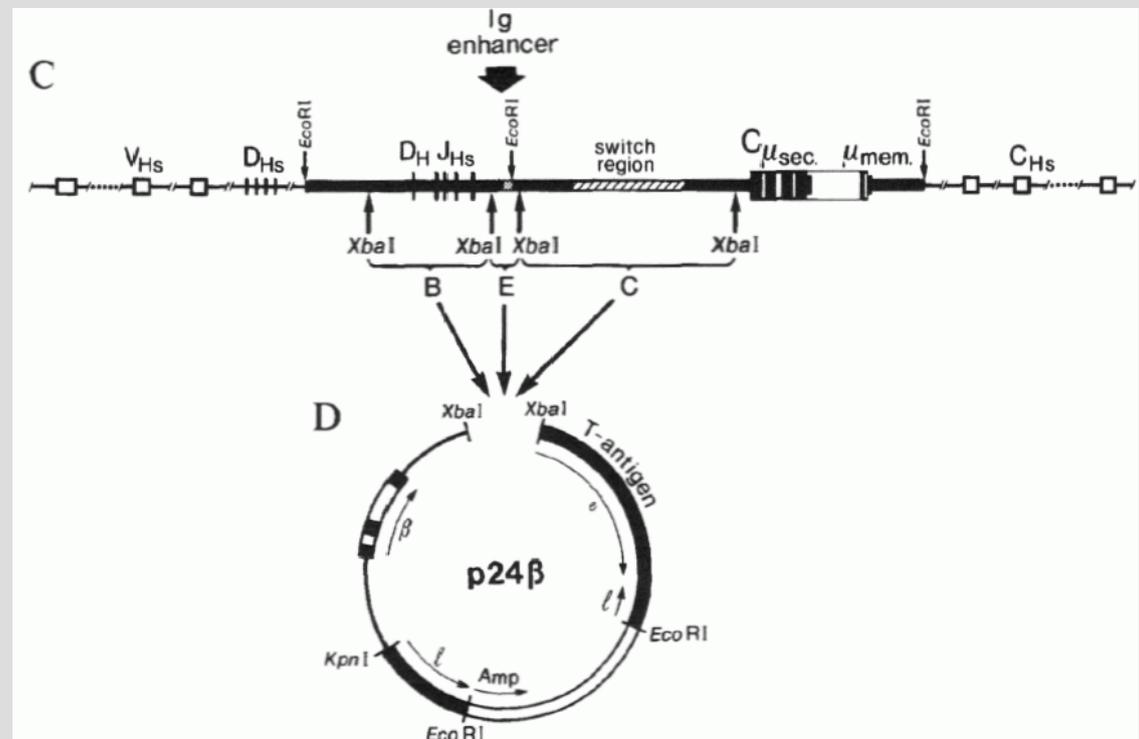
Bauen DNA einzelstrang- oder doppelstrangspezifisch vom Ende her ab. Man unterscheidet zwischen 3' → 5' Exonucleasen und 5' → 3' Exonucleasen



# Ergebnisse

# Position des Enhancers

- Restriktionsverdau mit Xba I von einem DNA Fragment der die J<sub>H</sub> und μ - Konstante Region beinhaltet
- Isolation von drei Fragmenten: B, E und C
- Subklonierung der Fragmente in unterschiedlicher Orientierung in den Plasmiden p24β
- Negative Kontrolle: p24β; positive Kontrolle: pDept
- Transfektion der acht Plasmide in menschliche HeLa Zelle und in Maus Myelomzellen X63-Ag8



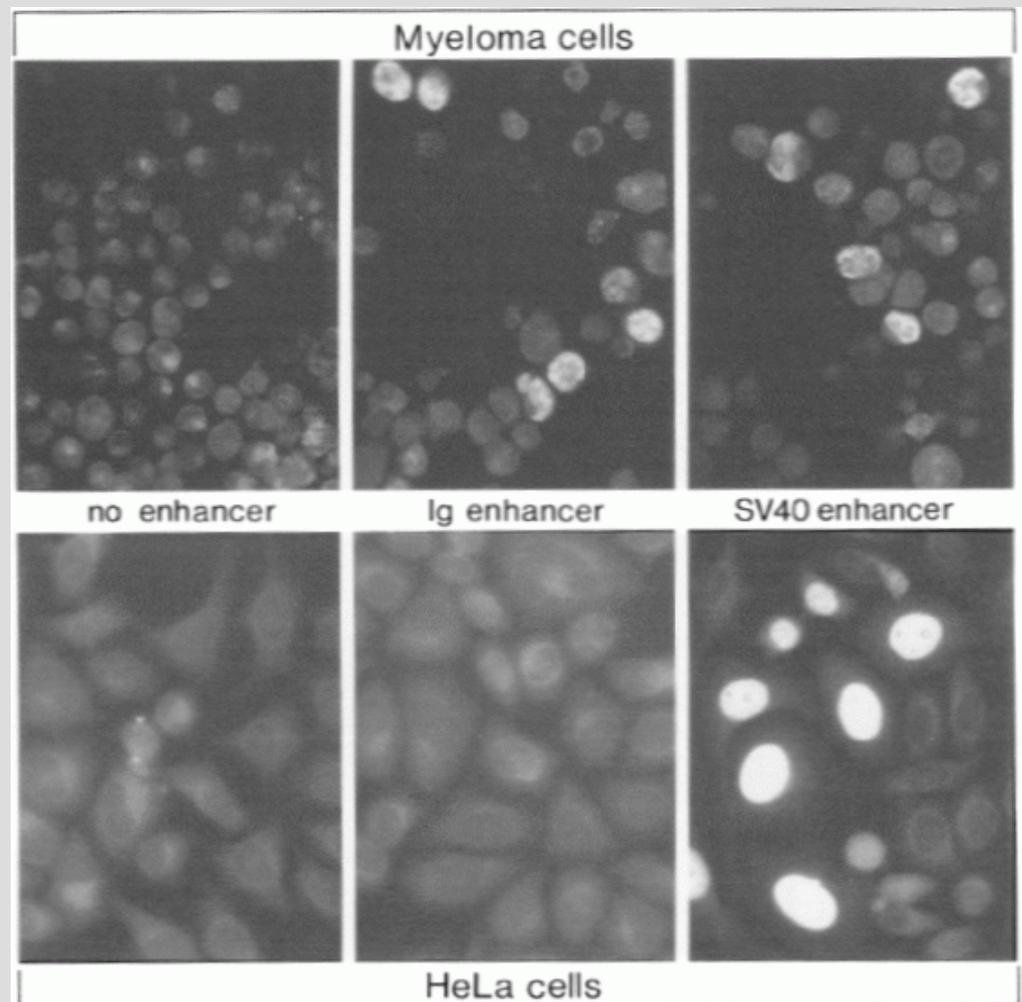
# Nachweis von T-Antigen

- Ergebnis:
  - in den HeLa Zellen, die die Ig Fragmente enthielten, konnte keine T – Antigene nachgewiesen werden
  - in den Myelomzellen, die die Ig E Fragmente enthielten konnten T – Antigene nachgewiesen werden

- Folgerung:

Der Enhancer ist in der konstanten Region des Mausimmunoglobulins codiert

## Indirekte Immunofluoreszenz:



# Cis- oder Trans- Wirkung

- Cotransformation der X63-Ag8 Zellen mit zwei Rekombinanten:
  - pTAR7; enthält Ig E – Fragment, aber keine SV40 Sequenzen
  - pET3; enthält SV40 Promotor aber nicht den Enhancer
- Ergebnis:

In den Zellen konnte die Bildung der T – Antigenen nicht nachgewiesen werden.

- Folgerung:

Der Enhancer kann nur als cis- und nicht als trans-Element wirken

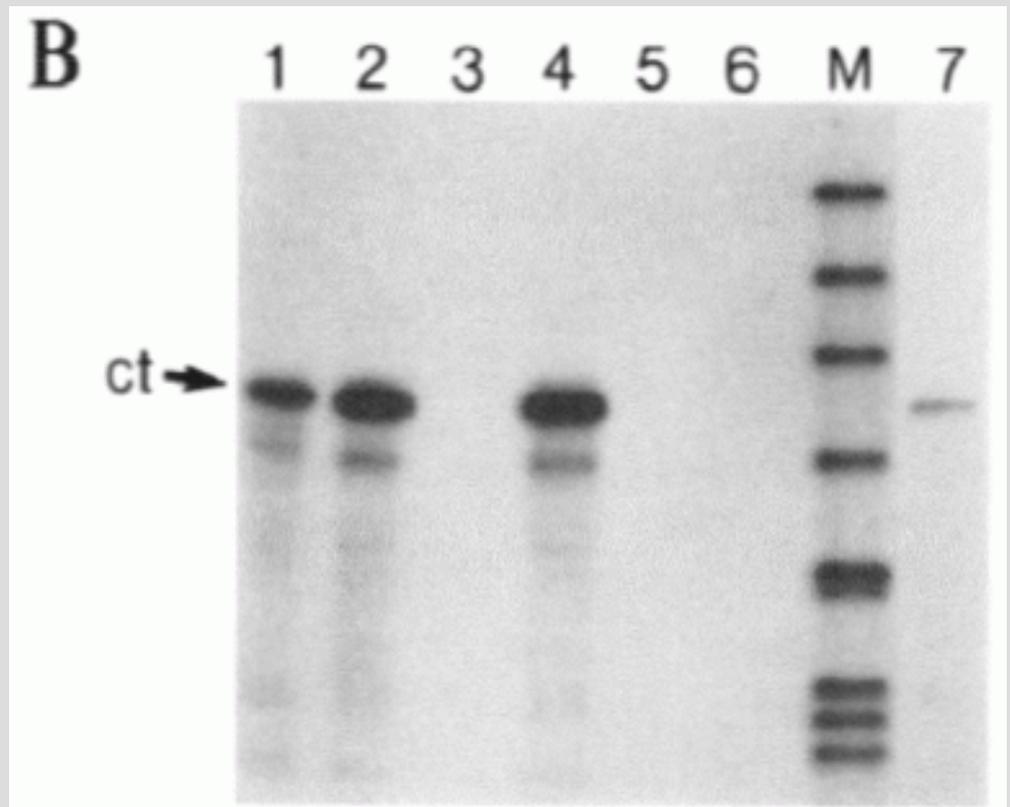
# Genunspezifität

- Expression des  $\beta$ -Globulin Gens des Kaninchens
- Transfektion von acht Rekombinanten in die X63-Ag8 Zellen:
  - sechs Rekombinanten mit Ig Fragmenten
  - als negativ Kontrolle Plasmid p24 $\beta$
  - als positive Kontrolle Plasmid p $\beta$ GXsv512
- nach 3 Tagen: Zellen isoliert und RNA extrahiert
- Anzahl der korrekt gebildeten  $\beta$ -Globulin mRNA über S1 Nuclease Hybridisierung nachgewiesen

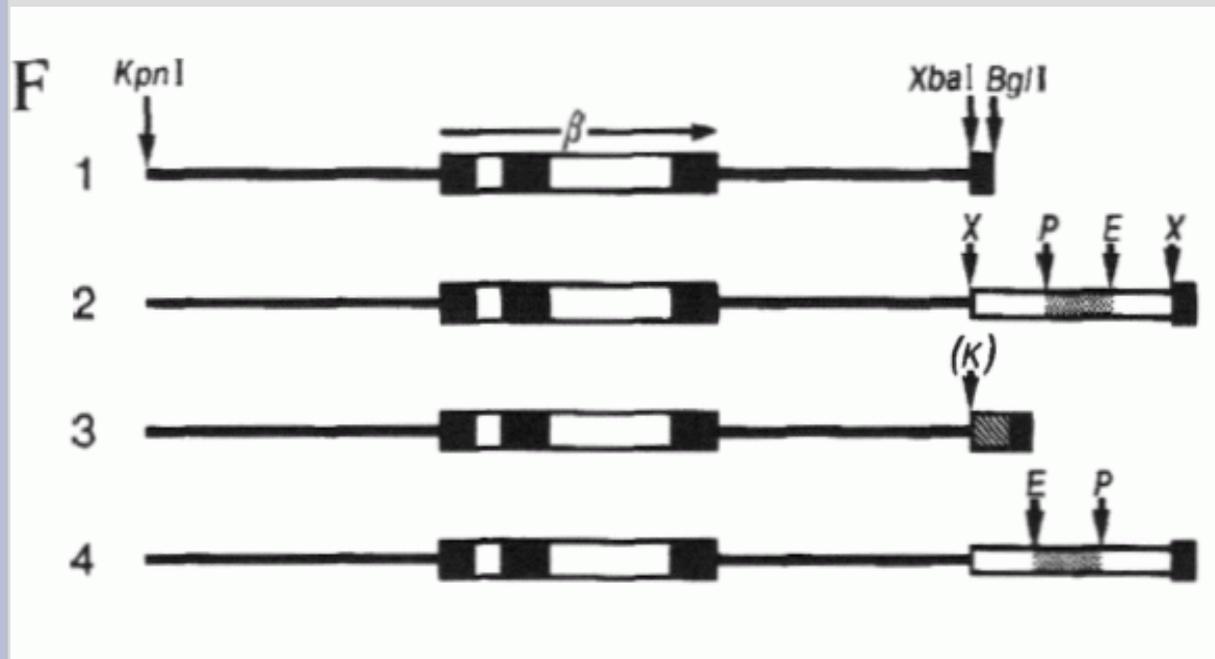
# Genunspezifität

- Ergebnis:  
Erhöhung der Transkription des  $\beta$ -Globulins in Zellen, die das Ig E – Fragment enthalten

- Folgerung:  
Das Ig E Fagment verstärkt auch die Transkription anderer Gene.



# „Template Amplification“



- Rekombinanten werden mit Restriktionsenzymen *Kpn I* und *Bgl I* geschnitten
- Entstandene DNA Fragmente beinhalten das  $\beta$ -Globulin Gen
- Ligation der Ig E Fragmente oder des SV40 Enhancers aber nicht des SV40 Origins und des T-Antigens

- Transfektion in die X63-Ag8 Zellen und Durchführung des S1 Mappings
- Ergebnis: In Myelomzellen wirkt der Ig Enhancer deutlich stärker als der SV40 Enhancer

# „Template Amplification“

- Behandlung dreier Klone mit Hydroxyurea: pET3, pDept und P24 $\beta$ E+, die in X63-Ag8 Zellen transfiziert wurden
- Ergebnis:  
Bei Ig und SV40 Enhancer ist die Expression des T - Antigens ungefähr gleich unabhängig davon ob sie mit Hydroxyurea behandelt wurden

- Folgerung:  
Die erhöhte Transkription beruht nicht auf den mehrfachen Kopien des Plasmids.

# Gewebespezifität

- Transfektion verschiedener Zelllinien:
  - X63-Ag8 Myelomazellen der Mäuse
  - 3T6 Zellen von dem Mausfibroblasten
  - Zellen aus der Lunge vom Nerz
  - Menschliche HeLa Zellen

- Ergebnis:

T - Antigene konnten nur in der Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden

- Folgerung:

Der Ig Enhancer wirkt zellspezifisch

Table 2. Cell-Type Specificity of the Ig Enhancer

DNA Clone* (Amount)	Cells (Species)	Total Cells (per 8 × 8 mm)	Positive for T Antigen
p24βE+ (0.25 μg)	X63-Ag8 (mouse)	31,000	1,320 (4%)
pDept (0.25 μg)	X63-Ag8	41,000	2,920 (7%)
pDept (0.025 μg)	X63-Ag8	32,000	502 (1.6%)
pDept (0.0025 μg)	X63-Ag8	38,000	59 (0.2%)
p24βE+ (0.25 μg)	3T6 (mouse)	27,000	0
pDept (0.25 μg)	3T6	35,000	3,700 (11%)
pDept (0.025 μg)	3T6	30,000	790 (3%)
pDept (0.0025 μg)	3T6	34,000	62 (0.2%)
p24βE+ (0.25 μg)	Lung (mink)	30,000	0
pDept (0.25 μg)	Lung	32,000	2,820 (9%)
pDept (0.025 μg)	Lung	33,000	380 (1.2%)
pDept (0.0025 μg)	Lung	36,000	12 (0.03%)
p24βE+ (0.25 μg)	HeLa (human)	47,000	0
pDept (0.25 μg)	HeLa	43,000	13,000 (30%)
pDept (0.025 μg)	HeLa	45,000	2,240 (5%)
pDept (0.0025 μg)	HeLa	40,000	240 (0.6%)

\* All transfections were done using 35 mm plates where 0.25 μg DNA are normally used (see Experimental Procedures).

# Genauere Enhancersequenz

- Restriktion des Ig E Fragments mit den Restriktionsenzymen Pst I oder Eco RI
- Klone getestet auf erhöhte T – Antigen Expression: erhöhte Enhanceraktivität in dem Pst I – Eco RI Fragment
- Restriktion des Fragments mit Alu I
- Subklonierung des Alu Fragments hinter das  $\beta$  – Globulingen des Klons p $\beta$ GX

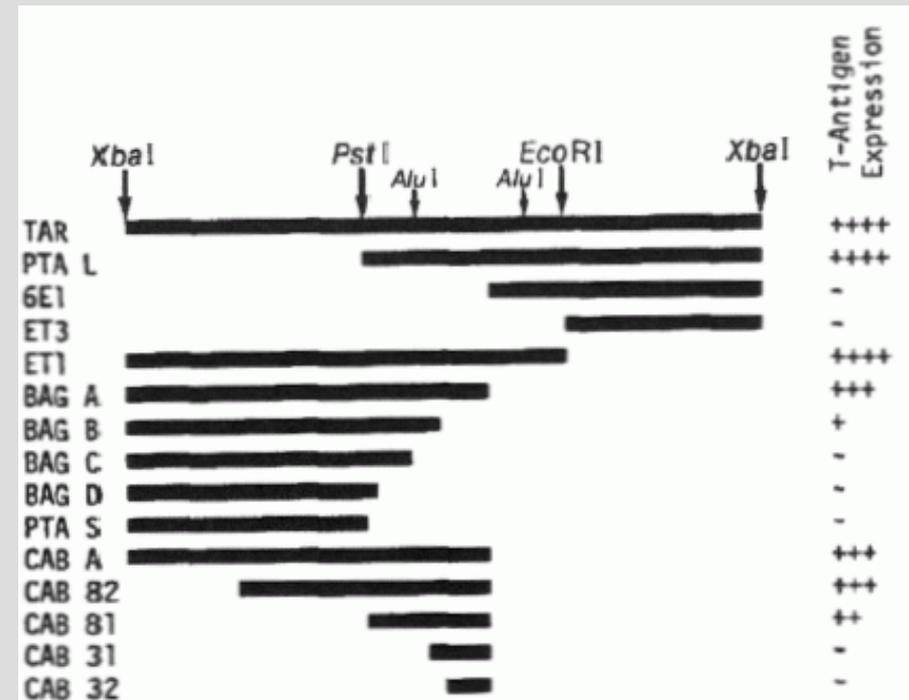


Figure 4. Localization of the Ig Enhancer Activity

Top line: the Xba I E fragment. Black bars indicate DNA still present in the deletion mutants. Immunofluorescence quantitation of the fraction of T-antigen-positive cells was done as indicated in Table 1. – no positive cells, + less than 5%, ++ between 5% and 30%, +++ between 30% and 75%, ++++ more than 75% of the fraction of T-antigen-positive cells seen with the standard recombinant p24 $\beta$ E+. Endpoints of the Bal 31 resection series are as follows: p6E1 extends up to and includes base pair 198; pBAG-A, base pair 198; pBAG-B, base pair 120; pBAG-C, base pair 77; pBAG-D, base pair 21; pCAB-A, base pair 198. pCAB-81, base pair 24; pCAB-31, base pair 138; pCAB32, base pair 164 (see Figure 5 for numeration).

# Genauere Enhancersequenz

- Transfektion von sechs Plasmiden in X63-Ag8 Zellen: p $\beta$ GXalu, p $\beta$ G, p $\beta$ GXsv512, p $\beta$ Gxpy, pTAR1 und pTAR7
- Ergebnis: Ig E Fragment zeigt etwa die zwei- bis dreifach höhere Effizienz als der SV40, der Polyoma Enhancer und der Ig E Alu Fragment
- Erzeugung der Deletationsmutanten, Transfektion in X63-Ag8 Zellen und Bestimmung der T-Antigen Expression
- Ergebnis:  
Enhancersequenz liegt verteilt auf ca. 300 bp zwischen EcoRI und PstI Schnittstellen

# Genauere Enhancersequenz

- Sequenzvergleich hat ergeben: mehrere kurze signifikante Sequenzen die in Kombination zusammenwirken

- Folgerung:

- mehrere Homologien zwischen den verschiedenen Virus-Enhancern und dem Ig Enhancer, jedoch keine zwingend konservierte Sequenz
- zentrale Region: 5'-GTGGTTT-3'
- 150 bp downstream und am anderen Strang 150 bp upstream von der DNase I hypersensitiven Site der Ig  $\kappa$ -L-Kette Intron

# Zusammenfassung und Diskussion

- Ergebnisse:
  - cis – Element
  - Richtungsunabhängig
  - Genunspezifisch
  - Gewebespezifisch
- Vermutungen:
  - von „Rearrangement“ nicht beeinflusst, weiterhin in umstrukturierten Genom funktionsfähig
  - Verantwortlich für die Expression aller Ig- schweren Ketten
  - Wirkt als Silencer auf distale V- Regionen
  - Enorme Transkription der  $\mu$  konstanten Region durch Enhancer-aktivierte Pseudopromotoren
  - In anderen Genen können Enhancer auch in der Nähe von DNase I hypersensitiven Region liegen
  - Wichtige Rolle der Enhancer bei der Entwicklung der Zellen

**Ende**

# verschiedene Vektoren

- **Expressionsvektoren**, erlauben nach der Klonierung noch eine Transkription und Translation des Gens (oft bakterielle Plasmide).
- **Fusionsvektoren**, Sonderform des Expressionsvektors. Sie übertragen ein Fremdgen, das als Fusionsproteine mit einem anderen Protein verknüpft exprimiert wird (Fremdgen kann auch mit einem Reportergen verknüpft werden).
- **Reportergen**, werden mit dem zu klonierenden Fremdgen in einen Expressionsvektor eingebaut. Sie codieren für leicht nachweisbare Genprodukte und dienen zur Überprüfung der Expression eines übertragenen Fremdgens oder zur Überprüfung der Promotorstärke.