

Steuerungsprogramme zweier Gene: Das *lac*-Operon Und das Endo16-Gen des Seeigels

Martin Gühmann

Zusammenfassung

Es gibt viele Prozesse in unserer Umwelt, die der Steuerung bedürfen. Dies gilt auch für die Genexpression, zum Beispiel für die Expression der Gene des Laktoseabbaus in *E. coli*, oder für die Expression des Endo16-Gens des Seeigels. Beide Gene bzw. Gengruppen besitzen eine cis-regulatorische Region. Diese Region ist in *E. coli* auch als *lac*-Operon bekannt. Für beide Beispiele gilt, dass die Gene einer komplexen Regulation bedürfen, um die Proteinproduktion der jeweiligen Situation anzupassen. Klassischerweise wurde angenommen, dass die Funktion des *lac*-Operons einer logischen UND-Verknüpfung gleicht: Das heißt, dass das *lac*-Operon nur aktiv ist, sofern Laktose aber keine Glukose vorhanden ist. Jedoch dem ist nicht so, wie Setty et al. 2003 [1] zeigen konnten. Beim anderen Beispiel, das Endo16-Gen des Seeigels, konnten Yuh et al. 2003 [2] zeigen, dass sich dessen cis-regulatorische Region wie ein fest-verdrahteter Analog-Computer verhält, was womöglich für viele Gene ähnlich gilt, die wie das Endo16-Gen an der Entwicklung von Organismen beteiligt sind.

1 Einleitung

Steuerungsprogramme sind für das Funktionieren unserer Welt unerlässlich. Nehmen wir zum Beispiel die Zubereitung eines Mahls. Gehen wir davon aus, wir wollen Rouladen essen. Aber bevor wir die Rouladen auf den Tisch stellen können, muss davor in der Küche eine Menge an Steuerung passiert sein, damit aus Fleischscheiben, Speck, Zwiebeln und Gurken geschmorte Rouladen werden. Die Rouladen-Zutaten müssen in der richtigen Reihenfolge verarbeitet werden. Dabei muss zuerst der Speck auf eine Fleischscheibe gelegt werden. Danach müssen die Zwiebeln und Gurken auf den Speck gelegt werden. Liegt schließlich alles in der richtigen Reihenfolge aufeinander, kann die Roulade zusammengerollt und anschließend fixiert werden, so dass sie nicht wieder aufgeht. Dann kann die Roulade zum Schmoren in einen Topf gelegt werden, und wir erhalten am Ende eine köstliche Roulade. Schmeißen wir allerdings alle Zutaten einfach in den Topf hinein, so entsteht keine Roulade, sondern nur ein Durcheinander. Wie bei der Roulade selbst benötigt auch das Schmoren eine Steuerung, spätestens, nachdem sich alle Rouladen im Topf befinden, sollte der Herd angestellt werden, sonst werden die Rouladen nicht gar. Auch sollte die Temperatur nicht zu hoch sein, sonst verbrennen die Rouladen noch.

Wir sehen, benötigt die Zubereitung einer Mahlzeit eine Steuerung. Aktion B kann erst stattfinden, wenn Aktion A stattgefunden hat (z.B. Roulade erst

rollen und fixieren dann schmoren). Genauso verhält es sich bei der Genregulation. Zum Beispiel gibt es da auf der einen Seite das *lac*-Operon im Prokaryonten *E. coli* und auf der anderen Seite das Endo16-Gen-Regulationssystem eines Eukaryonten dem Seeigel. Wie funktionieren nun die Regulationen dieser beiden Systeme, schauen wir uns zunächst das *lac*-Operon von *E. coli* und danach das Regulationssystem des Endo16-Gens des Seeigels an.

2 Das *lac*-Operon von *E. coli*

Das *lac*-Operon von *E. coli* steuert die Expression dreier Gene, die zur Laktoseverstoffwechslung notwendig sind. Die Genprodukte dieser drei Gene werden nur exprimiert, wenn zum einen keine Glukose im Nährmedium vorhanden ist, und zum anderen sich Laktose im Nährmedium befindet. Dies ist sinnvoll, da die Zelle Glukose leichter als Laktose verstoffwecheln kann, so dass eine Produktion der Laktoseabbauenzyme nur eine Verschwendung von Energie und Material darstellt - soweit die bisherige Lehrbuchmeinung. Um zu verstehen wie diese Verschwendung durch das *lac*-Operon verhindert wird, ist das Verständnis der Anordnung der regulatorischen Elemente des *lac*-Operons (Abbildung 1) von Nöten.

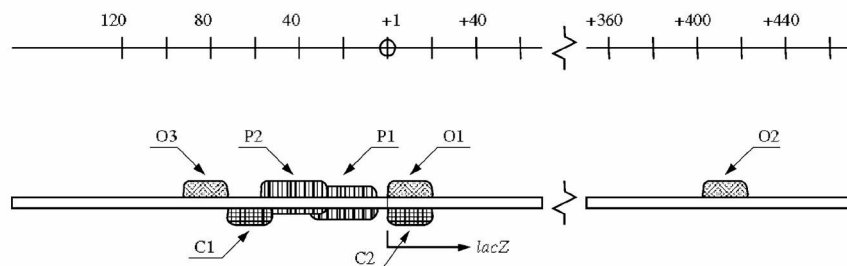


Abbildung 1: Regulatorische Struktur des *lac*-Operons. Die obere Skala gibt die Position der einzelnen regulatorischen Elemente in Basenpaaren relativ zum Start der Transkription an. Position +1 gibt den Start des ersten zu transkribierenden Gens an. Abbildung von Santilán und Mackey 2004 [3].

Die regulatorische Struktur des *lac*-Operons besitzt einige Bindungsstellen, welche sich in drei Klassen einteilen lassen. Zum einen die Promotorbindungsstellen (P-Stellen). Zum zweiten die C-Bindungsstellen, an denen cAMP-Rezeptor-Protein (abgekürzt CRP) im Komplex mit cAMP bindet, was die Affinität des Promotors (P1 und P2) zur RNA-Polymerase erhöht. Somit wirkt CRP-cAMP als Transkriptionsverstärker. Im Gegensatz dazu fungiert *LacI* als Transkriptionsrepressor, indem es als Tetramer an die O-Stellen, den dritten Bindungsstellentyp, bindet und so eine DNA-Schleife ausbildet (Abbildung 2). Dies hat zur Folge, dass keine RNA-Polymerase mehr an den Promotor binden kann, so dass keine Transkription mehr stattfinden kann. Diese Bindung von *LacI* kann durch Stoffe wie Isopropyl- β -D-Thiogalaktoside (abgekürzt IPTG) oder Allolaktose aufgehoben werden. Dagegen kann die Expression durch Glukose gehemmt werden, weil Glukose die Bildung von cAMP verhindert, und somit die Entstehung

des CRP-cAMP Komplexes unwahrscheinlicher wird.

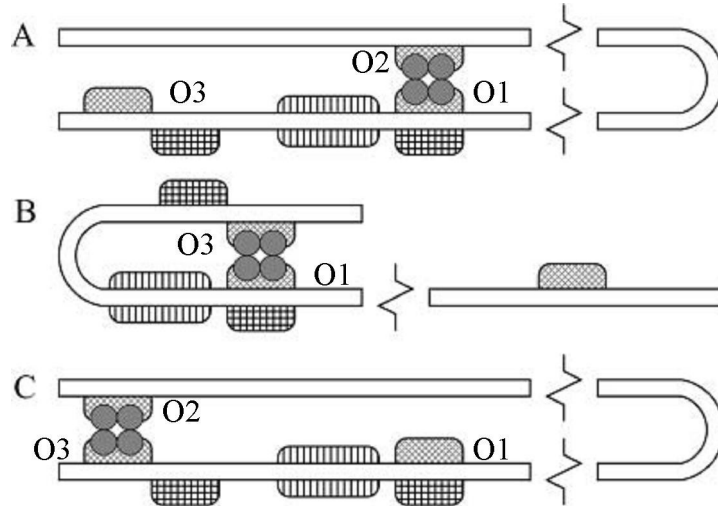


Abbildung 2: Das Molekül *LacI* bindet an zwei O-Bindungsstellen als Tetramer. Dabei formt es eine DNA-Schleife, so dass keine RNA-Polymerase mehr an die Promotorregion binden kann. Abbildung aus Santilán und Mackey 2004 [3]. A zeigt, wenn *LacI* sowohl an O1 und O2 bindet; B zeigt, wenn *LacI* sowohl an O1 und O3 bindet; C zeigt, wenn *LacI* sowohl an O2 und O3 bindet.

Dies führt nun zur Lehrbuchannahme, dass das *lac*-Operon aktiv ist, wenn Lactose und keine Glukose vorhanden ist. Zu fragen ist nun, ob dies wirklich so ist, dass das *lac*-Operon nach solch einer einfachen Logik funktioniert. Dieser Frage sind Setty et al. 2003 [1] nachgegangen. Sie entwickelten ein einfaches mathematisches Modell (Abbildung 3) des *lac*-Operons, das die verschiedenen C-, O- und P-Bindungsstellen zu einer Bindungsstellenregion zusammenfasst: Diese Region lässt sich als cis-regulatorische Region der DNA vor den *lac*-Genen bezeichnen. An diese cis-regulatorische Region bindet *LacI* und inaktiviert das *lac*-Operon. Ist hingegen kein *LacI* vorhanden, kann RNA-Polymerase oder CRP-cAMP an die DNA binden und die Transkription wird in Gang gesetzt, sofern RNA-Polymerase vorhanden ist. Jede dieser Bindungsreaktionen besitzt eine Gleichgewichtskonstante, mit deren Hilfe die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmter Zustand vorliegt, festgelegt werden kann.

Um die Gleichgewichtskonstanten festzulegen machten Setty et al. 2003 [1] ein Experiment: Sie nahmen ein promotorloses Plasmid, das die Sequenz des grün-floureszierenden Proteins trägt und klonierten davor den Promotor der *lac*-Gene samt *lac*-Operon ein. Den so erhaltenen Reporter-Vektor brachten sie in *E. coli* Zellen ein, und ließen sie unter verschiedenen Bedingungen auf einer Platte mit 96 Vertiefungen wachsen. Diese Platte besaß 8 Zeilen von Vertiefungen und 12 Spalten von Vertiefungen. In den Spalten wurde die cAMP-Konzentration von 0 bis 10 μM des Mediums variiert. In den Zeilen wurde die IPTG-Konzentration des Mediums von 0 bis 200 μM variiert. IPTG ist ein künstlicher Genaktivator und wird im Gegensatz zu Lactose oder Allolaktose nicht verstoffwechselt, so dass dessen Konzentration, während des Experimentes nicht abnimmt. Des weiteren war das Nährmedium mit Glukose gesättigt, um Effekte von endogenen

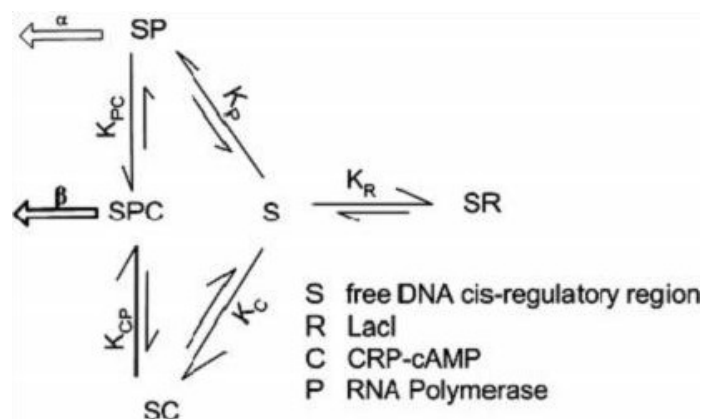


Abbildung 3: Einfaches mathematisches Modell des *lac*-Operons von Setty et al. 2003 [1]. Transkription wird ermöglicht, wenn an die cis-regulatorische Region der DNA RNA-Polymerase gebunden ist. Die Transkription wird verstärkt, wenn außerdem CRP-cAMP gebunden ist. Hingegen werden sämtliche zur Transkription führenden Reaktionen verhindert, wenn *LacI* gebunden ist. Die k -Parameter sind die Gleichgewichtskonstanten. α und β sind die Transkriptionsraten, wenn das System im entsprechenden Zustand ist.

cAMP auszuschließen. Die Konzentrationen von IPTG und cAMP beeinflussen die Promotoraktivität des *lac*-Operons, die in diesen Experiment indirekt über die Fluoreszenzaktivität des grün-fluoreszierenden Proteins gemessen werden kann. Daraus ergibt sich eine cis-regulatorische Eingangsfunktion (Promotoraktivität) (Abbildung 4).

Diese Eingangsfunktion hat vier Ebenen der Promotoraktivität, eine ganz Niedrige, eine ganz Hohe, sowie zwei Mittlere, wobei eine höher ist als die andere. Die ganz niedrige Ebene korrespondiert mit der Bedingung, dass weder cAMP noch IPTG vorhanden sind. Die ganz Hohe hingegen korrespondiert mit der Bedingung, dass sowohl cAMP als auch IPTG vorhanden sind. Die beiden mittleren Ebenen korrespondieren mit den Bedingung, dass entweder cAMP oder IPTG vorhanden ist.

Diese Daten haben Setty et al. 2003 [1] nun verwendet, um die Gleichgewichtskonstanten ihres Modells so anzupassen, dass das Modell das Verhalten zeigt, das im Experiment zu beobachten ist (Abbildung 5a).

Diese Eingangsfunktion ist keine ODER- oder UND-artige Eingangsfunktion. Eine UND-artige Eingangsfunktion (Abbildung 5b) hätte nur zwei Ebenen, eine Hohe und eine Niedrige. Wobei beide Substrate - in diesem Falle IPTG und cAMP - vorhanden sein müssen, damit Promotoraktivität vorhanden ist. Eine ODER-artige Eingangsfunktion (Abbildung 5c) besitzt ebenfalls zwei Ebenen der Promotoraktivität: Wiederum auf der einen Seite eine ganz hohe Ebene und auf der anderen Seite eine ganz niedrige Ebene. Hierbei ist Promotoraktivität vorhanden, wenn wenigstens einer der beiden Stoffe IPTG oder cAMP anwesend ist.

Damit ist die cis-regulatorische Eingangsfunktion des *lac*-Operons weder UND- noch ODER-artig, sondern etwas dazwischen. Wobei es sehr leicht möglich ist, die Parameter des Modells so anzupassen, dass die Eingangsfunktion UND-

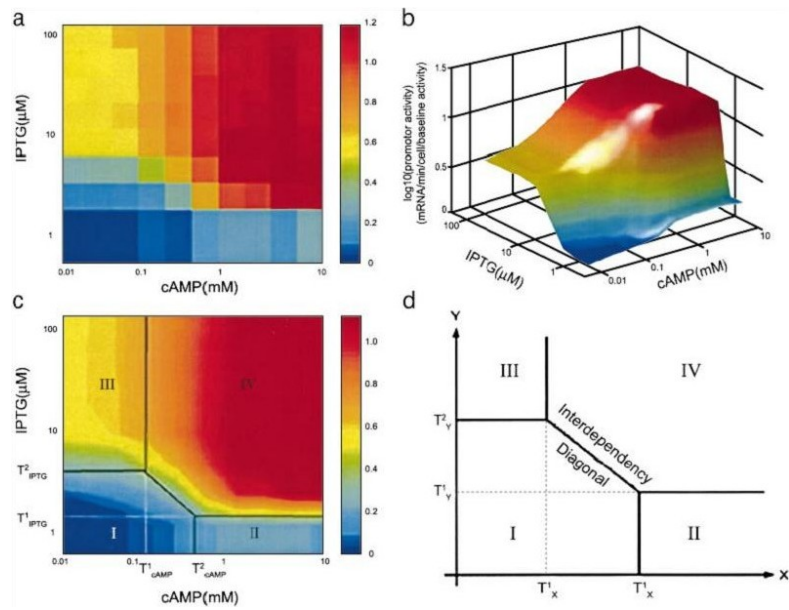


Abbildung 4: Die cis-regulatorische Eingabefunktion (Promotoraktivität) des *lac*-Operons in Abhängigkeit von IPTG- und cAMP-Konzentrationen, welche von Setty et al 2003 [1] in Experimenten am grün-fluoreszierenden Protein-System gewonnen wurde. A: Zeigt die Promotoraktivität der einzelnen Vertiefungen der Versuchsplatte. B: Zeigt einen geglätteten Oberflächen-Plot der Promotoraktivität mit eingezeichneten Ebenengrenzen. D: Schematische Ansicht der Aktivität des *lac*-Promotors. Die vier Ebenen sind wie folgt gekennzeichnet: I - niedrige cAMP-Konzentration, niedrige IPTG-Konzentration; II - hohe cAMP-Konzentration, niedrige IPTG-Konzentration; III - niedrige cAMP-Konzentration, hohe IPTG-Konzentration; IV - hohe cAMP-Konzentration, hohe IPTG-Konzentration;

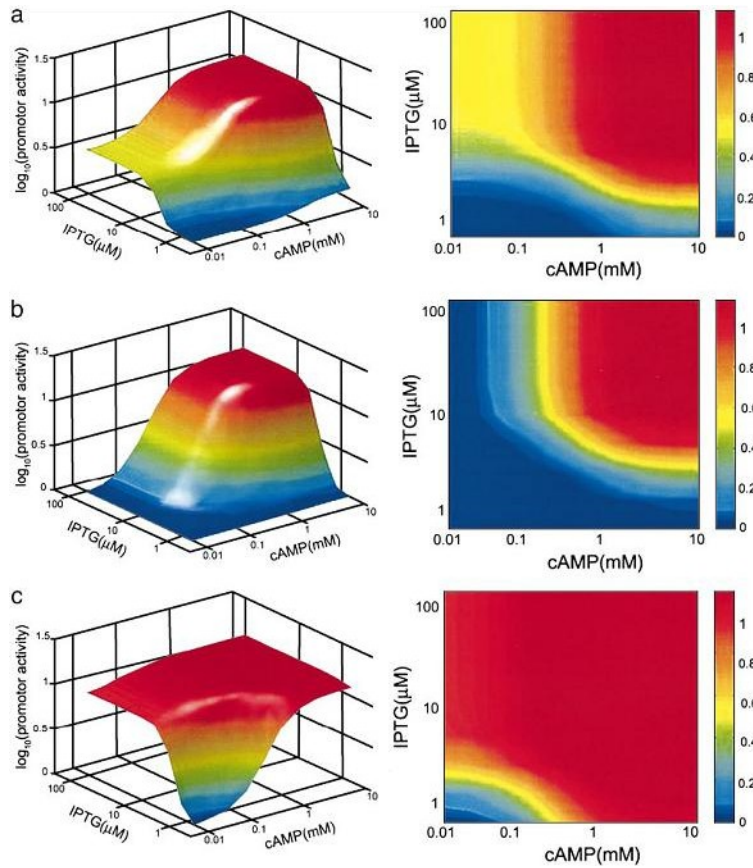


Abbildung 5: Eingabefunktion (Promotoraktivität) des *lac*-Promotors nach dem Modell von Setty *et al* 2003 [1]. A: Eingabefunktion mit den Parametern, die mathematisch so angepasst wurden, dass das Modell den Daten aus den Messungen mit dem grün-fluoreszierenden Protein am nächsten kommt. B: Eingabefunktion mit Parametern, so dass sie einer UND-artigen Funktion ähnelt. C: Eingabefunktion mit Parametern, so dass sie einer ODER-artigen Funktion ähnelt.

oder ODER-artig wird. In beide Richtungen kann das biologische System auch durch wenige Mutationen der CRP-, *LacI*- und RNA-Polymerase-Bindungsstellen verändert werden.

Nun welchen Vorteil hat *E. coli* von solch einer Eingabefunktion, die weder UND- noch ODER-artig ist, wenn diese ausgewählt wird, obwohl UND- oder ODER-artige Funktionen leicht zu erreichen sind. In der Tat gibt es dafür eine Erklärung: Die niedrige Ebene ist für den Fall nützlich, wenn weder Glukose noch Laktose vorhanden sind, und die Zelle hungert. So sind Laktoseabbauenzyme vorhanden, falls plötzlich Laktose kommt, so dass die Laktoseabbauenzyme nicht extra aufwendig hergestellt werden müssen, wenn dann eigentlich schon keine Energie mehr zur Verfügung steht, um noch irgendwas herzustellen. Die mittelhohe Ebene ist nützlich, wenn sich viel Laktose im Medium befindet, und Laktose unspezifisch in die Zelle transportiert wird. Galaktosidase kann ebenfalls unspezifisch in die Zelle gelangen, und muss, da es giftig ist, abgebaut werden. Der Galaktosidase-Abbau erfolgt mit Hilfe von Enzymen, die vom *lac*-Operon gesteuert werden.

Wir haben nun gesehen, dass die Steuerung des *lac*-Operons nicht so einfach ist, wie uns die Lehrbücher glauben machen wollen, es ist komplizierter als einfach: Laktose und nicht Glukose. Und diese Abweichung hat sogar einen biologischen Sinn. Schauen wir uns nun die Steuerung eines Eukarionten-Gens an: Dem Endo16-Gen des Seeigels.

3 Das Endo16-Genregulationssystem des Seeigels

Der Seeigel besitzt das Endo16-Gen, das im Verlaufe der Ontogenese zu unterschiedlichen Zeiten und an unterschiedlichen Orten exprimiert wird. Zum Beispiel im späten Blastulastadium wird Endo16 nur von den Zellen, die die Vegetalplatte (Abbildung 6 VP) ausmachen, gebildet. Während der Ontogenese stülpt sich dieser Teil der Blastozyste ein und formt den Urdarm der zukünftigen Seeigellarve (Abbildung 7). Während dieses Vorgangs verändert sich auch das Muster der Endo16-Expression. Während zu Anfang noch alle Zellen des Endo- und Mesoderms Endo16 exprimieren, stellen Zellen die Endo16-Expression des Mesoderms und des vorderen Urdarms ein, so dass im Larvenstadium nur noch Zellen des mittleren Urdarms Endo16 exprimieren.

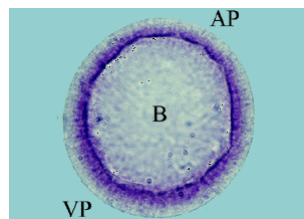


Abbildung 6: Späte Seeigel Blastula: Eine Zellschicht umgibt das innere Blastozoel (B). Die Zellen am vegetativen Pol (VP) liegen in der Fokusebene höher als die Zellen am animalischen Pol (AP), wodurch die Zellen am VP dicker erscheinen als am AP.

Abbildung von:
<http://www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/index.htm?/Faecher/Materialien/hupfeld/Inhalt-Entwicklung.html>

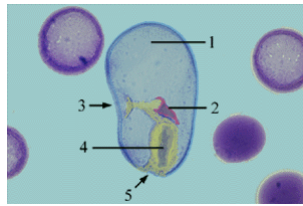


Abbildung 7: Seiegellarve: Rot eingefärbt ist das Gewebe des Mesoderms, blau das Gewebe des Exoderms und gelb das Gewebe des Endoderms. 1: Blastozoele; 2: Enterozoel; 3: Mund; 4: Urdarm; 5: Blastoporus (Anus) Abbildung von: <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/index.htm?/Faecher/Materialien/hupfeld/Inhalt-Entwicklung.html>

Diese örtlich und zeitlich verschiedenen Expressionsmuster benötigen eine feine Steuerung. Um zu verstehen wie diese Steuerung funktioniert, ist es notwendig die cis-regulatorische Region des Endo16-Gens zu untersuchen. Diese Region lässt sich grob in acht Module aufteilen (Abbildung 8a). Eines dieser Module ist der Basalpromotor, die weiteren werden mit den Buchstaben A bis G bezeichnet. Jedes dieser Module, hat einen Einfluss auf die Expression des Endo16-Gens. Modul A steuert in der frühen Entwicklung die Expression von Endo16 in der Vegetalplatte (Abbildung 8c). Die Module B und G verstärken die Endo16-Expression in der späten Entwicklungsphase im Endoderm, indem sie auf Modul A wirken. Die Module DC, E und F unterdrücken die Aktivität von A im Exoderm, so dass keine Endo16-Expression dort vorliegt. Dieser Effekt verkehrt sich ins Gegenteil unter Anwesenheit von LiCl.

Alle Module interagieren mit Modul A, daher lohnt es sich, einen näheren Blick auf den Feinaufbau von Modul A zu werfen. Im Modul A gibt es einige Stellen, die mit den anderen Modulen interagieren. Um herauszufinden wie diese Stellen mit den anderen Modulen interagieren, benutzten (Yuh et al. 2003 [2]) Mutationsexperimente. Bei diesen Mutationsexperimenten injizierten sie ein DNA-Stück, das die 2300 Basenpaare lange cis-regulatorische Region, oder Teile davon, den Basalpromotor und ein anschließendes CAT-Reportergen enthielt, in Seeigelleier. Die Menge von CAT, die durch das Reportergen produziert wird, ist ein Maß für die Promotoraktivität, die durch das Weglassen einzelner Module in der cis-regulatorischen Region oder durch Mutation einzelner Stellen im Modul A variiert werden kann. Bei diesen Stellen in Modul A handelt es sich um vier CG-Stellen, um eine Otx-Stelle sowie um eine P-Stelle und eine Z-Stelle (Abb. 8b).

Beim ersten Experiment injizierten Yuh et al. (2003 [2]) in die Seeigelleier ein Konstrukt aus Modul B, Modul A und dem Basalpromotor. Dies erzeugt ein anderes Expressionsmuster, als wenn Modul B im Konstrukt fehlt. Im Gegensatz dazu ist das zeitliche Expressionsmuster ähnlich, wie wenn Modul A im Konstrukt fehlt. Der einzige Unterschied ist, dass das Konstrukt mit A und B eine 4,2-fach stärkere Expression zeigt als ein Konstrukt mit B allein (Abbildung 9a). Das heißt, dass Modul A das Expressionsmuster von Modul B übernimmt und verstärkt. Nun welche Stellen in Modul A sind für diese Effekte verantwortlich. Konstrukte aus den Modulen A und B mit mutierter P-Stelle oder mutierter SP1-Stelle zeigen ein anderes Expressionsmuster als Konstrukte mit intakten P- und SP1-Stellen (Abbildung 9b). Das beobachtete Expressionsmuster ist das

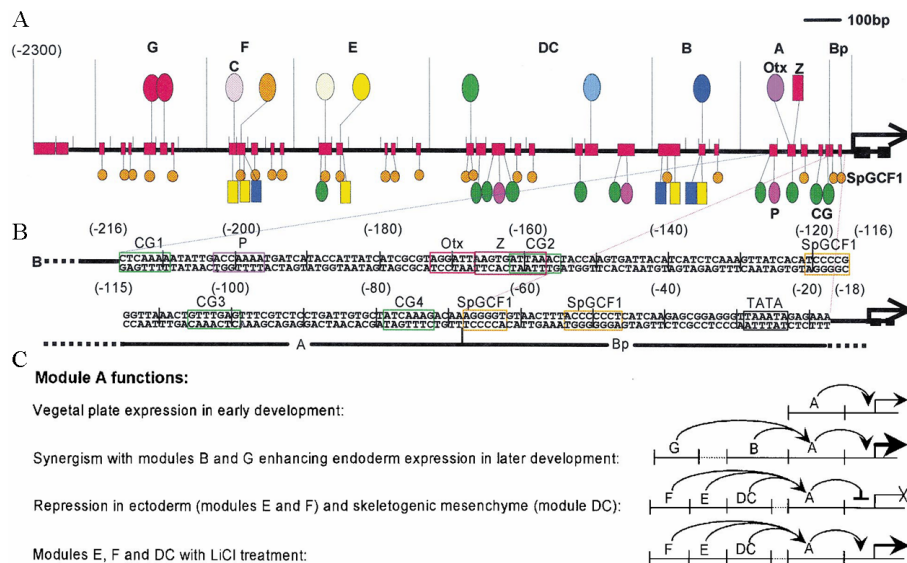


Abbildung 8: Genkarte der cis-regulatorischen Region des Endo16-Gens des Seeigels aus Yuh et al. 2003 [2]. A zeigt die Proteinbindungsstellen der jeweiligen Module der cis-regulatorischen Region des Endo16-Gens des Seeigels. B zeigt die Sequenz des Moduls A, wobei die DNA-Bindungsstellen mit den selben Farben markiert sind wie in A. C zeigt die Interaktion der anderen Module mit Modul A.

Selbe, wie in Konstrukten mit Modul A allein und intakten P- und SP1-Stellen (Abbildung 9c). Sind P- oder SP1-Stelle defekt, so gleicht das Expressionsmuster dem von Modul A allein mit intakten P- und SP1-Stellen (Abbildung 9c und d). Dabei gibt es keinen Unterschied ob Modul B im Konstrukt vorhanden ist oder nicht, das Expressionsmuster gleicht immer dem Expressionsmuster von Modul A. Damit stellen die P-Stelle und SP1-Stelle die Verbindung zwischen den Modulen A und B her.

Das Expressionsmuster von Modul A ist selbst von einer Stelle in Modul A abhängig. Um zu klären welche Stelle dies ist, machten Yuh et al. (2003 [2]) ein weiteres Experiment, indem sie ein Konstrukt aus dem A Modul und dem Basalpromotor oder ein Konstrukt aus Basalpromotor, Z-Stelle und Otx-Stelle, injizierten. Dabei zeigt das Experiment, dass nur die Otx-Stelle dafür sorgt dass Modul A-Aktivität im Endoderm vorhanden ist. Ist die Otx-Stelle hingegen defekt geht die Aktivität des Moduls A (Abbildung 10 und 10a) verloren. Um eine typische Modul A-Expression hervorzurufen, wenn auch mit geringerer Stärke (Abbildung 10b), ist allein ein Konstrukt aus der Z-Stelle und Otx-Stelle notwendig. Aus dem vorhergehenden Experimenten ist zu erwarten, dass diese Mutation die Expressionsrate von einem AB-Konstrukt nicht beeinflusst. Was auch der Fall ist, wie Abbildung 10c zeigt. Das heißt, dass die Otx-Stelle für Modul A-Expression nötig ist, und die Z-Stelle hingegen für Modul A-Expression irrelevant ist.

Wie sieht es nun aus mit den anderen Modulen, nämlich wie verhalten sich die Module F, G und C zum Modul A. Ist in Modul A die Z-Stelle intakt so

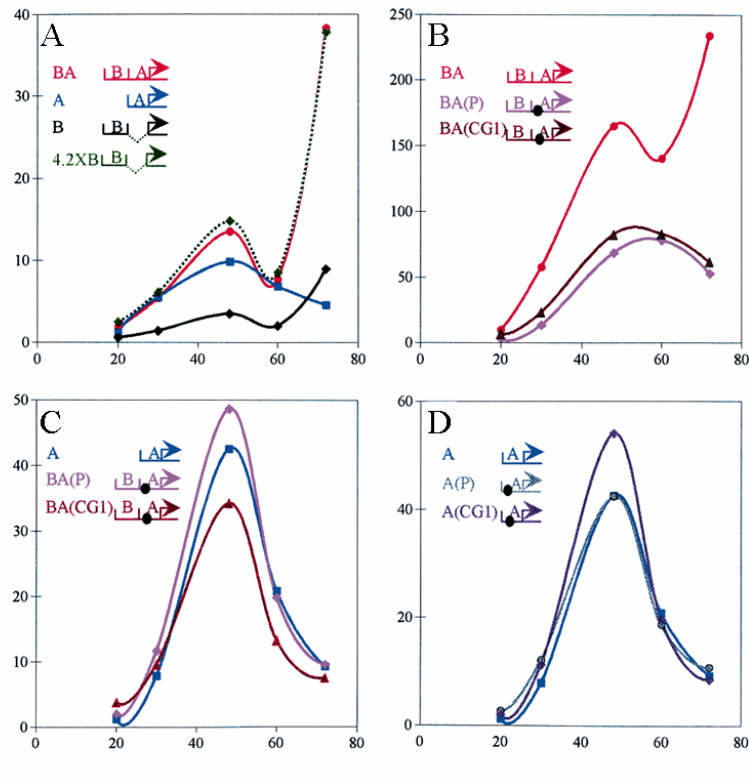
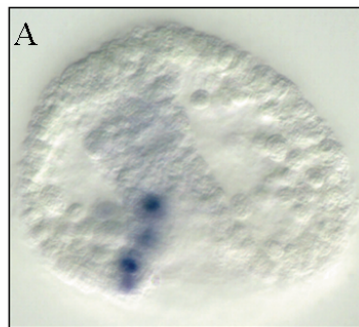


Abbildung 9: Promotoraktivität von Teilen der cis-regulatorischen Region des Endo16-Gens gemessen von Yuh et al. 2003 mit dem CAT-Reporter-Gen-System. A zeigt Experimente mit den Modulen A und B. Einmal mit den Modulen A und B, dann mit Modul A allein, mit Modul B allein und schließlich mit Modul B allein multipliziert mit einem Faktor von 4,2. B zeigt Experimente mit Modulen A und B und zwei Experimente, bei denen entweder die P-Stelle oder die CG₁-Stelle im Modul A mutiert ist. C zeigt die selben Mutationsexperimente wie in B, allerdings im Vergleich zu einem Experiment mit Modul A allein. D zeigt Experimente wie in C, allerdings wurden Mutationsexperimente nur am Modul A ohne Beteiligung von Modul B ausgeführt.



Constructs	Endoderm
<i>OtxZ</i>	56.5%
(<i>Otx</i>) <i>Z</i>	3.6%
<i>Otx</i> (<i>Z</i>)	72.0%
A	78.9%
A(<i>Otx</i>)	5.1%
ENDO16	97.0%

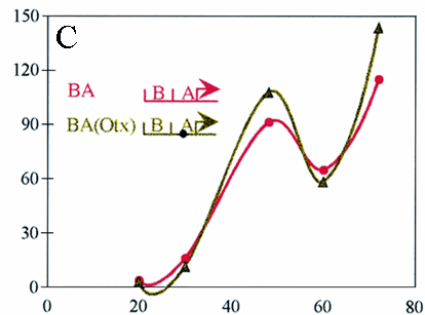
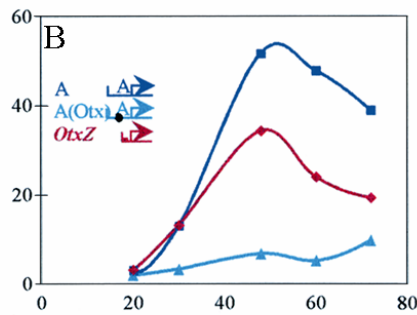


Abbildung 10: Die Auswirkungen der *Otx*-Bindungsstelle auf die Expression des *Endo16*-Gens aus Yuh et al. 2003 [2]. Die Tabelle zeigt welche Konstrukte *Endo16*-Expression im Endoderm hervorrufen. Eingeklammerte Bindungsstellen sind mutierte Bindungsstellen. A: Seeigelembryo mit blauer Färbung am CAT-exprimierenden Gewebe des Endoderms. B: Experimente mit Teilen der *Endo16* cis-regulatorischen Region: Zum einen mit dem Modul A allein, zum zweiten mit Modul A und mutierter *Otx*-Bindungsstelle und zum dritten mit einem Konstrukt aus *Otx*- und *Z*-Bindungsstellen. C: Experimente mit Konstrukten aus A und B wobei bei einem der Experimente, die *Otx*-Bindungsstelle mutiert ist.

verstärken die Module F, G und C die Expression um etwa das 2- bis 3-fache (Abbildung 11), sofern sie unter dem Einfluss von LiCl stehen, das die Hemmung der Module F, G und C auf Modul A in das Gegenteil verkehrt, wobei die Interaktionen immer noch vorhanden sind. Für diesen Effekt wird nur die Z-Stelle benötigt, im Gegensatz dazu ist die Otx-Stelle hier irrelevant. Dies zeigt nun, dass die Z-Stelle mit den Modulen F, G und C interagieren muss, damit diese Module unter physiologischen Bedingungen über Modul A die Expression hemmen können.

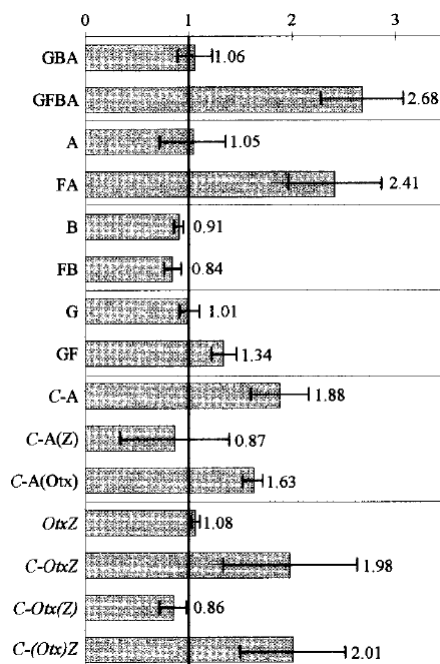


Abbildung 11: Aktivität der einzelnen Module auf die Gesamtexpression unter LiCl Einfluss aus Yuh et al. 2003 [2]. Die Buchstabenkombinationen geben an, welche Module bzw. Bindungsstellen Teil der jeweiligen Konstrukte waren, die Einklammerungen kennzeichnen mutierte Bindungsstellen.

Zuletzt bleiben noch drei der vier SP-Stellen übrig. In einem Konstrukt mit Modul A und Modul B und mutierter SP2-Stelle ist die Expressionsrate im Gegensatz zu einem Konstrukt mit intakten SP-Stellen halbiert. Die Aktivität wird ebenfalls halbiert, wenn in einem Konstrukt ohne Modul B eine der drei Stellen SP2, SP3 oder SP4 defekt ist. Daraus folgt dass die drei Stellen SP2, SP3 und SP4, als Verstärker der Aktivität dienen, die an dieser Stelle ankommt.

Mit all diesen Experimenten lässt sich ein Computermodell der cis-regulatorische Region aufstellen (Abbildung 13). Wobei noch zwei Bemerkungen zu machen sind: Erstens Modul G liefert nur einen geringen additiven Beitrag zur Modul B-Aktivität und wurde daher in der Betrachtung vernachlässigt. Und zweitens die CG₁-P-Stellen-Kombination liefert in Wirklichkeit nur einen Verstärkungsfaktor um zwei, da die drei CG-Stellen (CG₂, CG₃ und CG₄) einen weiteren Verstärkungsfaktor von zwei liefern, der im ersten Experiment noch

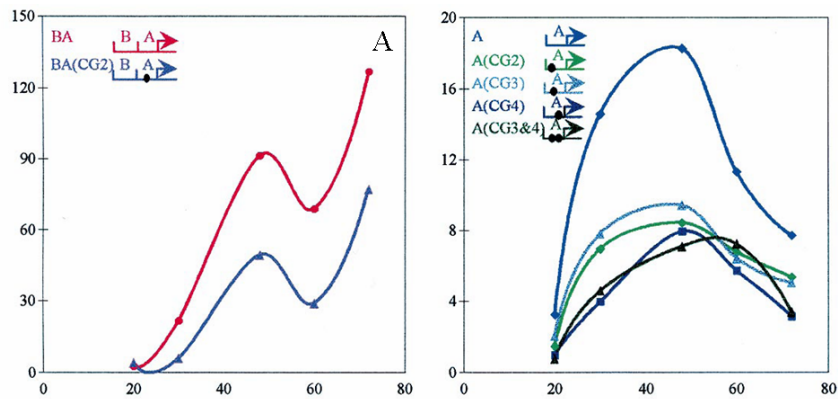


Abbildung 12: Mutationsexperimente zur Aufklärung der Funktion der CG₂-, CG₃- und CG₄-Stellen aus Yuh et al. 2003 [2]. A: Experimente mit Konstrukten aus Modul A und Modul B. Bei einem der Experimente ist die CG₂-Stelle mutiert. B: Vergleich von Konstrukten mit verschiedenen mutierten CG-Stellen.

nicht von dem Faktor von CG₁ und P nicht getrennt werden konnte.

Die einzelnen Module und die einzelnen Stellen des Moduls A definieren einen analogen, mit den mitteln der DNA, festverdrahteten Computer, bei dem nur eine Stelle an der örtlichen Genregulation beteiligt ist. Diese Konstruktion ermöglicht eine sehr feine Genregulation, und mag bei Genen, die bei der Ontogenese aktiv sind, weit verbreitet sein.

Damit haben wir gesehen, dass die einzelnen Module miteinander interagieren, welche Bindungsstellen in Modul A dafür nötig sind, aber was Yuh et al. 2003 [2] nicht gezeigt haben ist welche der Bindungsstellen in den anderen Modulen für die einzelnen Interaktionen nötig sind oder welche Proteine die Interaktionen vermitteln, sofern die DNA nicht selbst der Grund für die Interaktion ist.

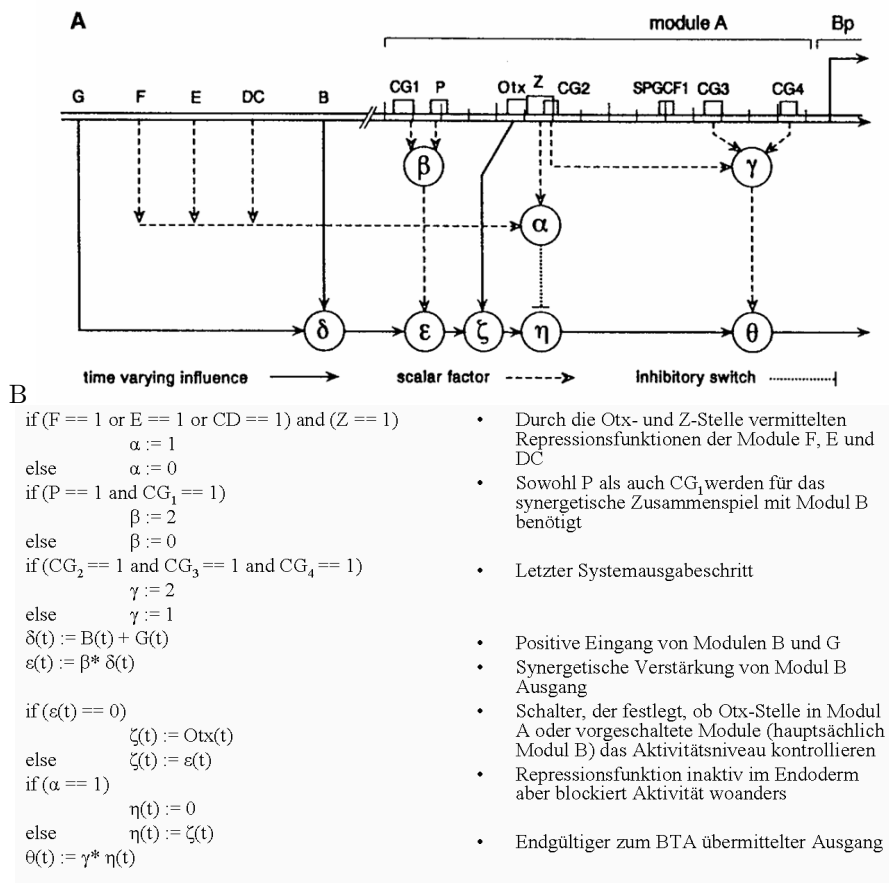


Abbildung 13: Schaltbild (A) und Pseudocode (B) des analogen Computermodells der cis-regulatorischen Region des Endo16-Gens. Schaltbild von Yuh et al. 2003 [2] und Pseudocode nach Yuh et al. 2003 [2].

Literatur

- [1] Y. Setty, A.E. Mayo, M.G. Surette, and U. Alon. Detailed map of a cis-regulatory input function. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 100:7702–7707, 2003.
- [2] Eric H. Davidson Chiou-Hwa Yuh, Hamid Bolouri. Genomic cis-regulatory logic: Experimental and computational analysis of a sea urchin gene. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 279:1896–1902, 1998.
- [3] Moisés Santilán and Michael C. Mackey. Influence of catabolite repression and inducer exclusion on the bistable behaviour of the *lac* operon. *Biophysical Journal*, 86:1282–1292, 2004.