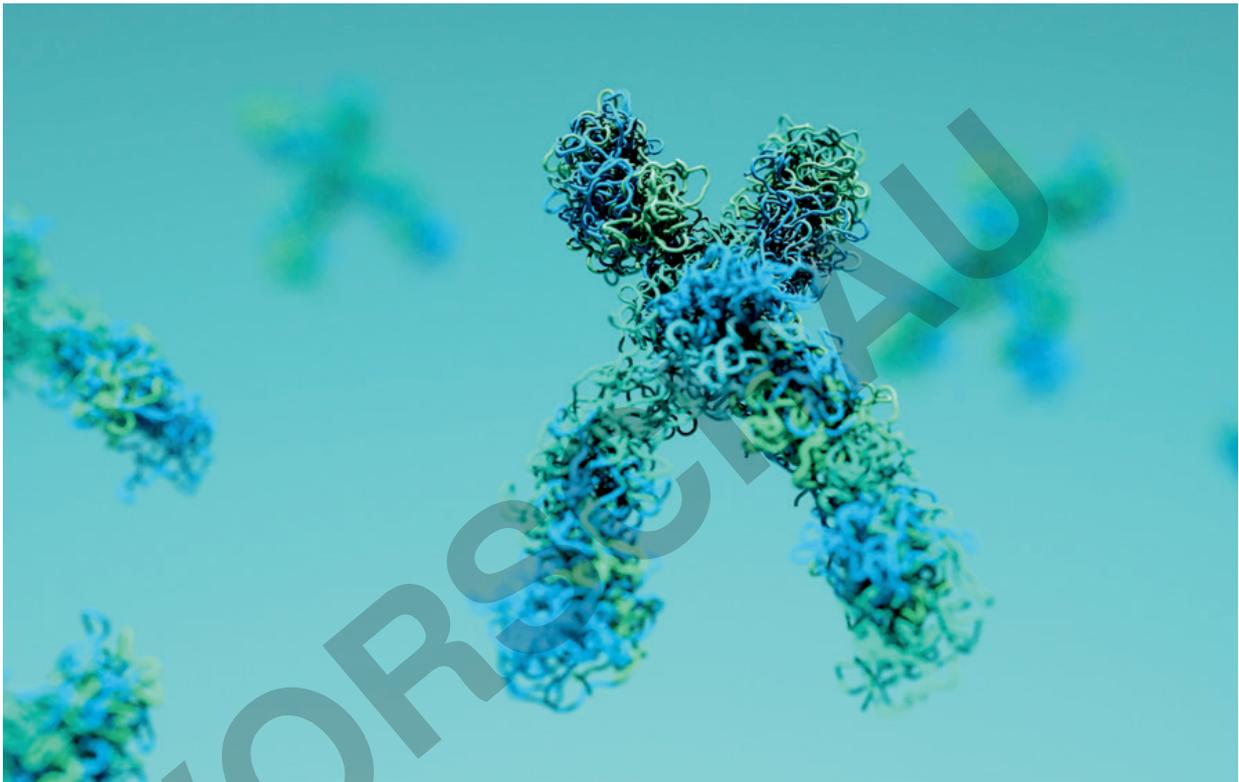


Erkennen des epigenetischen Codes durch Chromatin-Immunpräzipitation

von Dr. Monika Pohlmann und Anna Reetz



© Design Cells/iStock/Getty Images Plus

Als sogenannter zweiter Code werden epigenetische Informationen gespeichert und sogar an Nachkommen vererbt. Um eine epigenetische Information zu entschlüsseln, wird heute die Chromatin-Immunpräzipitation angewendet. Dies ist eine Methode, welche sich hervorragend eignet, den Lernenden sowohl epigenetische Mechanismen näherzubringen als auch das naturwissenschaftliche Protokollieren als fachspezifische Arbeitsweise zu vertiefen. Beim Protokollieren eines Experimentes erwerben Ihre Schülerinnen und Schüler Kompetenzen, wie epigenetische Muster heute identifiziert werden. Sie erlangen damit hochaktuelles Fachwissen sowie eine neue Methode zur Erkenntnisgewinnung. Durch die Gestaltung eines Erklärvideos in einem Peer-to-Peer-Projekt wird das neu erworbene Fachwissen gefestigt sowie die Medienkompetenz gefördert.

Erkennen des epigenetischen Codes durch Chromatin-Immunpräzipitation

Niveau: weiterführend, vertiefend

von Dr. Monika Pohlmann und Anna Reetz

Fachwissenschaftliche Hinweise	1
M1: Wandel von Struktur und Funktion im Lebenszyklus	7
M2: Die epigenetische Codierung	9
M3: Faktencheck: Epigenetik	12
M4: Experimentelle Selektion epigenetischer Schalter	15
M5: Ein Glossar – Fachbegriffe erklären können	19
M6: Präsentieren mit einem Lernplakat	22
M7: Präsentieren mit einem Erklärvideo	24
Lösungen	27
Literatur	37

VORFORSCHAU

Erkennen des epigenetischen Codes durch Chromatin-Immunpräzipitation

Fachwissenschaftliche Hinweise

Es ist für Schülerinnen und Schüler verwunderlich, dass sich die Metamorphosestadien eines Insekts oder die Organe eines Lebewesens so stark voneinander unterscheiden, obschon ihre Zellen jeweils ein identisches Genom besitzen. Lange vertrat die Genetik die Ansicht, dass allein der genetische Code die Struktur und Funktion einer jeden Zelle, und damit auch die Ausprägung des gesamten Organismus, festlegt. Um den Gestaltwandel während einer Metamorphose oder die unterschiedliche Physiologie von Organen zu erklären, kommt heute der epigenetische oder regulatorische Code mit ins Spiel.

Die **Epigenetik** als Teilgebiet der Molekularbiologie untersucht, welche Faktoren die Aktivität eines Gens und damit die Entwicklung der Zelle zu bestimmten Zeiten festlegen. Sie erforscht Änderungen der Genfunktion, die nicht auf Veränderungen der Basensequenz der DNA, durch Mutation oder Rekombination beruhen und dennoch an Tochterzellen weitergegeben werden. Die Expression des Codes, so wissen wir heute, kann durch die Aktivierung von DNA-Abschnitten oder durch Genstilllegung beeinflusst werden. Solche Aktivitätsmuster des genetischen Codes können über Generationen weitergegeben werden, sie sind vererbbar. Die Zelle hat verschiedene Möglichkeiten, epigenetische Schalter des Genoms zu nutzen. Neben der RNA-Interferenz, RNAi oder auch RNA-Silencing, und der DNA-Methylierung spielt die Histonmodifikation eine wichtige Rolle. Die Veränderungen an Histonproteinen werden im Folgenden in den Fokus gerückt.

Die Verpackungsform der DNA ist das **Chromatin**. Es besteht aus **Nukleosomen**. Ein Nukleosom stellt eine Einheit aus einem **DNA-Abschnitt** und einem **Histonoktamer** dar. Das Oktamer setzt sich wiederum aus vier verschiedenen **Histonen** H2A, H2B, H3 und H4 zusammen, die jeweils doppelt vorkommen. Um einen solchen Proteinkomplex winden sich 146 oder 147 Basenpaare der DNA. Durch die Aufwicklung der DNA um den Histonkomplex verkürzt sich deren Länge von 68 nm auf 10 nm, also um fast ein Siebtel. Auf diese Weise kann die fadenförmige DNA, die sich aus Millionen von Basenpaaren zusammensetzt, platzsparend im Zellkern angeordnet werden.

Dicht gepackte DNA, wie sie im **Heterochromatin** vorliegt, geht mit einer verminderten Genexpression einher, da die räumliche Unzugänglichkeit der stark aufgewickelten DNA eine Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren und anderen Molekülen der Transkriptionsmaschinerie erschwert.

B: Zitat aus „Die kleine Raupe Nimmersatt“

[...] "Sie war nicht mehr hungrig, sie war richtig satt. Und sie war auch nicht mehr klein, sie war groß und dick geworden. Sie baute sich ein enges Haus, das man Kokon nennt und blieb darin mehr als zwei Wochen lang. Dann knabberte sie sich ein Loch in den Kokon, zwängte sich nach draußen und...war ein wunderschöner Schmetterling!"

© Eric Carle, 1969, Verlag Gerhard Stalling, Oldenburg

C: Schülergespräch

Wenn ich die Raupe mit dem Schmetterling vergleiche, sehe ich zwei verschiedene Tiere, die unterschiedliche Nahrung zu sich nehmen, anders aussehen, sich unterschiedlich fortbewegen und ein gänzlich anderes Leben führen. Sie entstammen zwar derselben Eizelle, aber das Genom der beiden Tiere muss sich doch verändert haben.

Aber wie soll sich denn das Genom während der Verpuppung ändern? Nein, ich glaube nicht, dass sich das Genom von Raupe und Schmetterling unterscheidet. Unsere Organe haben ja auch unterschiedliche Formen und Funktionen, obwohl ihre Zellen das gleiche Genom besitzen. Es muss einen anderen Grund für die Verschiedenartigkeit geben.

© RAABE 2022

Aufgabe

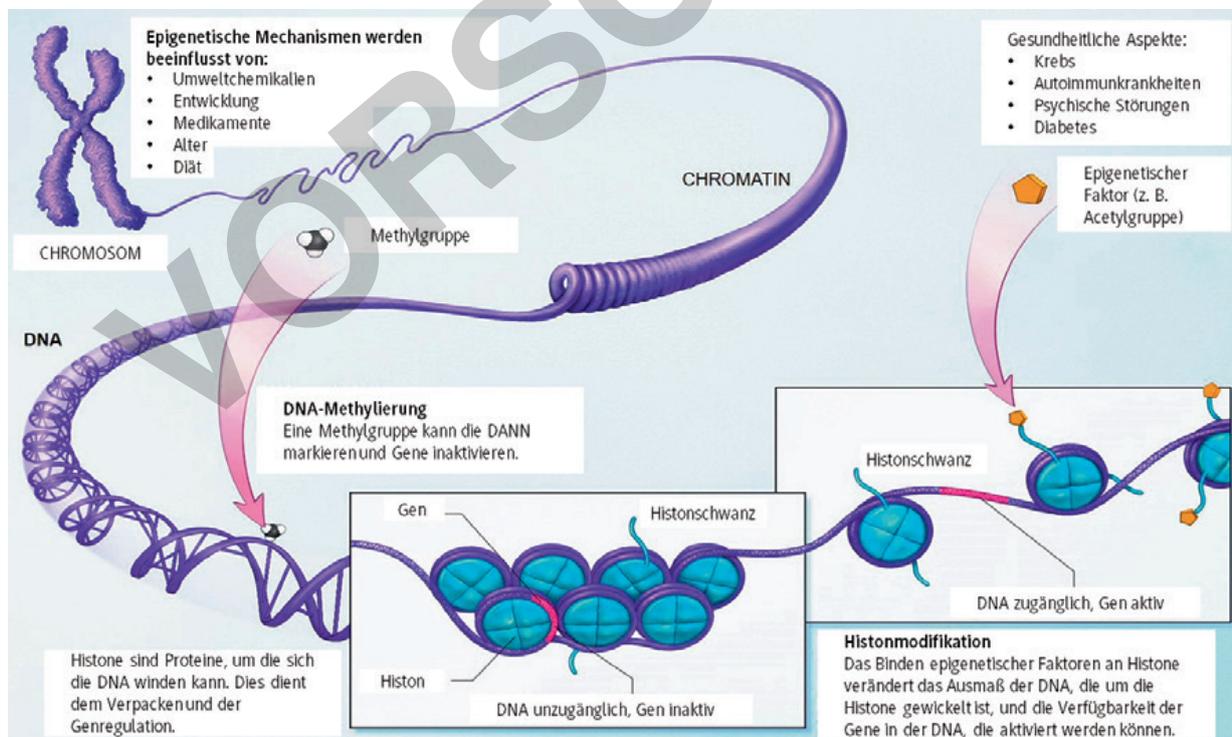
1. **Erläutern** Sie den Ablauf der vollständigen Verwandlung, der Metamorphose, von Schmetterlingen. 
2. **Beschreiben** Sie den Gedankengang der beiden Schülerinnen und Schüler und **formulieren** Sie die zugrundeliegende naturwissenschaftliche Frage. **Tauschen** sie sich mit einem Lernpartner **aus**. 

3. **Stellen** Sie Hypothesen **auf**, wie die Veränderung des Erscheinungsbildes von Raupe und Schmetterling auf molekulargenetischer Ebene zu erklären sein könnte. **Stellen** Sie ihre Vermutungen dem Plenum **vor**. 

Zellkernproteine, die aus einem globulären Zentrum und einem flexiblen, endständigen Molekülarml, engl. *histone tail*, bestehen, der räumlich aus dem Nukleosom herausragt. Diese „Histonschwänze“ der acht Histone eines Nukleosoms enden, wie alle Proteine von Eukaryoten, mit einer freien Aminogruppe ($-NH_2$), dem N-Terminus. Die N-terminalen Aminosäuren in Histonschwänzen sind oft Lysin und Arginin. Da diese basischen Proteinenden aus dem Nukleosom herausragen, stehen sie für Interaktionen mit anderen Molekülen zur Verfügung. Dies können Methylgruppen ($-CH_3$) oder Acetylgruppen ($-CO-CH_3$) sein. Die Übertragung dieser Molekülgruppen auf „Histonschwänze“ wird Methylierung beziehungsweise Acetylierung genannt. Je nachdem welche Molekülgruppe an den Histonen eines Nukleosoms chemisch gebunden ist, werden die aufgewickelten Gene aktiviert oder stumm geschaltet. Die Methylierung und Acetylierung bestimmen damit das Aktivitätsmuster der Gene. Gebundene Methyl- und Acetylgruppen stellen damit einen relativ leicht veränderbaren 2. Code dar, der quasi über den grundständigen genetischen Code der Basensequenz der DNA gelegt ist.

B: Epigenetische Mechanismen

© RAABE 2022



verändert nach: National Institutes of Health/wikimediacommons gemeinfrei

Protokoll

1. Fixieren und Vernetzen (Crosslinking)

Um epigenetische Schalter untersuchen zu können, werden embryonale Zellen verschiedener Modellorganismen mit 1-2prozentigem Formaldehyd fixiert. Durch das Vernetzungsmittel wird die DNA kovalent an das Protein gebunden. Diese Vernetzung von Proteinen und DNA schützt sie vor weiteren Einflüssen. Mittels Detergenzien werden die Zellen dann lysiert und das Chromatin aus Kernhülle und Zellmembran freigesetzt.

2. Zerkleinern (Shearing)

Mithilfe von Ultraschall wird die DNA in diesem Schritt fragmentiert. Die Nukleosomen des Chromatins werden auseinandergerissen. Die Bruchstücke haben eine Länge von etwa 150 bp oder einfacher Vielfachen davon.

3. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die DNA-Proteinfragmente werden nun zusammen mit Antikörpern, die eine bestimmte Histonmodifikation erkennen können, inkubiert. Durch seine Affinität bindet ein Antikörper ein spezifisches Antigen in der Lösung des Zelllysats. Die Antikörper binden passgenau an Histon-proteine, die hier eine Antigenfunktion haben. Damit werden jene Genabschnitte markiert, die mit der gesuchten Histonmodifikation assoziiert sind.

Die entstehenden Antikörper-Protein-Komplexe werden durch Agarosekugeln aus der Lösung ausgefällt. In der Regel ist der Antikörper an eine solche feste Phase, das Agarosekügelchen, gekoppelt. Ein bestimmtes Antigen wird auf diese Weise mitsamt seinen Interaktionspartnern, den Kopräzipitaten, aus dem Gemisch ausgefällt. In diesem Fall ist der Interaktionspartner der Histone der assoziierte DNA-Abschnitt.

Eine Zentrifuge trennt dann die verschiedenen Komponenten des Reaktionsgemisches. Es folgen einige Waschschrte. Da die Agarosekügelchen nur als Selektionshilfe dienen und im weiteren Verlauf stören würden, werden sie durch Salzzugabe aus der Lösung ausgefällt.