

Der Transkriptionsfaktor REST: Zelltyp-spezifische Regulation von REST Zielgenen

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultäten
der Universität des Saarlandes

von
Dipl.-Biol. Mathias Hohl

Homburg/Saar
2007

Datum des Promotionskolloquiums: 03.07.07

Dekan: Prof. Dr. Uli Müller

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Hans Stahl

**Berichterstatter: Prof. Dr. Gerald Thiel
Prof. Dr. Jörn Walter**

Akademischer Mitarbeiter: Dr. Jens Mayer

Eigene Veröffentlichungen während der Doktorarbeit:

Lietz M., Hohl M. und Thiel G. (2003) Re-1 silencing transcription factor (REST) regulates human synaptophysin gene-transcription through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Eur.J.Biochem.* **270**, 2-9

Thiel G., Lietz M., und Hohl M. (2004) How mammalian transcription factor works. *Eur.J.Biochem* **271**, 2855-2862

Bauer I., Hohl M., Al-Sarraj A., Vinson C., Thiel G. (2005) Transcriptional activation of the Egr-1 gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate and extracellular signal-regulated protein kinase *ABB* **438** 36-52 available at www.sciencedirect.com

Hohl M., und Thiel G. (2005) Cell type-specific regulation of RE1-silencing transcription factor (REST) target genes. *Eur.J.Neuroscience* Vol.**22**, 2216-2230

Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit, selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Mathias Hohl

Danksagung

Für die gute Betreuung während meiner Doktorarbeit möchte ich mich herzlich bei Professor Dr. Gerald Thiel bedanken. Die wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen haben zu dem Gelingen der vorgelegten Arbeit maßgeblich beigetragen.

Herrn Prof. Dr. J. Walter für die Bereitschaft zur Übernahme der Zweitkorrektur.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima während der letzten Jahre danken. Mein besonderer Dank gilt Dr. Oliver Rössler und Dr. Inge Bauer für ihre wertvollen Ratschläge und Tipps.

Meiner Familie für ihre Unterstützung und Hilfe außerhalb des Labors.

Meinen Freunden, die immer für mich da waren, wenn Homburg mal zu klein wurde. Felix, Luzie, Christine, Elmar, Daphni, Sunny, Simone, Edgar, Philippe, Uli, Basti, Sandra, Michael W. und Gaby. Vielen lieben Dank für alles!

Last but not least: Annick, Illkyu, Uli, Frodo, Martin, Anna, Juli, Daniel M, LauLi, Sophie, Viktor K, Pegah, Daniel G., Seb, Manu, Rabea, Lea, Victor M., Sven, Natalia, Clairli, Ju, Anna, Pit, Lili, Claudia, Franka, Hedi, Dirk, Eva und Myriam. Vielen Dank für die wundervolle Zeit mit Euch.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Einleitung	4
2.1	Regulation der Genexpression durch die Modifikation des Chromatins	5
2.2	Zellspezifische Genexpression des zentralen Nervensystems	9
2.3	Der Transkriptionsfaktor REST	9
2.4	Der Repressionsmechanismus von REST	11
2.5	REST-regulierte Gene	12
2.6	Die <i>REST</i> -Genexpression in neuronalen Zellen	12
2.7	Analyse der Funktion von REST in transgenen Mäusen	14
2.8	Die Bedeutung von REST bei der neuro-degenerativen Erkrankung Chorea Huntington	14
2.9	Neurale Stammzellen: Essentielles Element des ZNS	15
2.10	Zielsetzung	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Chemikalien und Enzyme	18
3.2	Radioisotope und Filter	18
3.3	Vektoren und Plasmide	18
3.3.1	Reporterplasmide	18
3.3.2	Expressionsplasmide	20
3.3.3	Referenzplasmide	21
3.3.4	Plasmide zur Generierung stabiler Zelllinien	22
3.3.5	Plasmide zur in vitro-Synthese von cRNA's	23
3.4	Eukaryontische Zellkultur	26
3.4.1	Nährmedien zur Kultivierung eukaryontischer Zelllinien	26
3.4.2	Zelllinien	26
3.4.3	Passagieren von Säugerzellen	28
3.4.4	Auftauen von Säugerzellen	28
3.4.5	Einfrieren von Säugerzellen	28
3.4.6	Differenzierung der Neuralen Stammzelllinie HNSC.100	29
3.4.7	Differenzierung der Neuralen Stammzelllinie HNSC.100 mit all-trans Retinsäure	29
3.4.8	Inkubation der DP-REST:ER exprimierenden Zellen mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)	30
3.4.9	Inkubation der Zellen mit Trichostatin A	30
3.4.10	Inkubation der Zellen mit 5-Azacytidine	30
3.5	Manipulation eukaryontischer Zellen und deren Analyse	31
3.5.1	Transiente Transfektionen eukaryontischer Zellen mit Kalziumphosphat	31
3.5.2	Proteinpräparation aus transfizierten Zellen und deren Quantifizierung	32
3.5.3	Retrovirale Infektion zur Generierung stabiler Zelllinien	33
3.6	Molekularbiologische Methoden	34
3.6.1	Bakterienstämme	34
3.6.2	Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien	34
3.6.3	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35
3.6.4	Transformation von <i>E.coli</i>	35
3.6.5	Anlegen einer <i>E.coli</i> -Glycerinkultur	36
3.6.6	Plasmid-DNA Mini-Präparation	36
3.6.7	Plasmid-DNA Maxi-Präparation	37

3.6.8	Bestimmung der DNA-Konzentration	37
3.6.9	DNA-Restriktion	37
3.6.10	Phosphatase-Behandlung	39
3.6.11	Ligation	40
3.6.12	DNA Reinigung und Fällung	40
3.6.13	Agarose-Gelelektrophorese	41
3.6.14	Phenol/Chloroform-Extraktion	42
3.6.15	DNA-Sequenzierung	42
3.6.16	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
3.6.16.1	Oligonukleotide	44
3.6.17	Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)	45
3.6.17.1	Oligonukleotide für ChIP	48
3.7	RNA	49
3.7.1	RNase-Schutzexperiment	49
3.7.2	Präparation zytoplasmatischer RNA für die reverse Transkription	53
3.7.3	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	54
3.7.4	Isolation zytoplasmatischer RNA für Affimetrix-Chip Assay	55
3.7.5	Affimetrix-Chip-Assay	55
3.8	Proteine	55
3.8.1	Extraktion von Kernproteinen aus eukaryontischen Zellen	55
3.8.2	Proteingehaltsbestimmung	56
3.8.3	Denaturierende diskontinuierliche Gelelektrophorese	56
3.8.4	Western-Blot von SDS-Gelen	57
3.8.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen	57
4	Ergebnisse	59
4.1	Regulation der <i>Synaptophysin</i> -Genexpression	59
4.1.1	Eine REST-Bindestelle ist im ersten Intron des <i>Synaptophysin</i> -Gens vorhanden	59
4.1.2	Funktioneller Vergleich der REST-Bindestelle NRSE aus dem <i>Synapsin I</i> - und dem <i>Synaptophysin</i> -Gen	63
4.2	Analyse der Genexpression von <i>REST</i> und seiner Zielgenen in unterschiedlichen Zelllinien	64
4.3	Analyse der Genexpression REST-regulierter Gene durch Hemmung der Histon-Deacetylasen mit Trichostatin A (TSA)	68
4.4	Induzierte Genexpression von REST-Zielgenen	71
4.4.1	Generierung von Zelllinien, die dauerhaft DP-REST:ER exprimieren	73
4.4.2	Analyse der transkriptionellen Aktivität der DP-REST:ER	74
4.5	Transkription von REST-Zielgenen durch Stimulation von DP-REST:ER mit 4-OHT	77
4.6	Additiver Effekt auf die Genexpression von <i>Synaptophysin</i> , <i>Sekretogranin II</i> und <i>Connexin36</i> durch gleichzeitige Inkubation mit Trichostatin A und 4-OHT	79
4.7	Einfluss des DNA-Methyltransferase-Inhibitors 5-Aza-Cytidine auf die Expression REST-regulierter Gene	82
4.8	Einfluss des DNA-Methyltransferase-Inhibitors 5-Aza-Cytidine auf die Expression REST-regulierter Gene bei gleichzeitiger Inkubation mit Trichostatin A und Aktivierung von DP-REST:ER mit 4-OHT	84
4.9	Zelltyp-spezifische Bindung von DP-REST:ER an die REST-Bindestelle auf der DNA	87

4.10	Analyse der Chromatinstruktur	88
4.11	Affymetrix GenChip-Assay	90
4.12	Genexpression in der neuronalen Stammzelllinie HNSC.100	93
4.12.1	Zelltyp-spezifische Expression von Markergenen	93
4.12.2	Analyse der basalen Expression neuronaler Gene mittels RNase Schutzexperiment	96
4.13	Induzierte Differenzierung von HNSC.100 durch verschiedenen Kulturbedingungen	97
4.13.1	Induktion der neuronalen Genexpression in HNSC.100	97
4.13.2	Analyse der Expression neuronaler Gene in HNSC.100-Zellen mittels RNase Schutzexperiment	100
4.14	Expression neuronaler Gene in HNSC.100 nach Hemmung der Histon-Deacetylasen	101
4.15	Auswirkung der Expression von DP-REST:ER in HNSC.100	102
4.15.1	Herstellung von humanen Zelllinien, die dauerhaft DP-REST:ER exprimieren	102
4.15.2	Analyse der Aktivität von DP-REST:ER nach Induktion mit 4-OHT	104
4.15.3	Expression neuronaler Gene in HNSC.100 _{DP-REST:ER} -Zellen nach Zugabe von 4-OHT	105
4.15.4	Analyse der Expression neuronaler Gene in HNSC.100 _{DP-REST:ER} mittels des RNase Schutzexperimentes	107
4.16.	Zelltyp-spezifische Bindung von DP-REST:ER an die REST-Bindestelle auf der DNA	108
4.17	Analyse der Chromatinstruktur	109
5	Diskussion	112
5.1	REST reguliert die Expression des <i>Synaptophysin</i> -Gens	112
5.2	Zelltyp-spezifische Expression von REST-Zielgenen	112
5.3	Die Hemmung der Histon-Deacetylasen mit Trichostatin A zeigt zelltyp-spezifische Auswirkungen auf die Genexpression von <i>Synaptophysin</i> , <i>Sekretogranin II</i> und <i>Connexin36</i>	114
5.4	<i>Synaptophysin</i> , <i>Sekretogranin II</i> und <i>Connexin36</i> werden in neuronalen-, neuroendokrinen und endokrinen Zellen durch REST reguliert.	116
5.5	Einfluss der DNA-Methylierung auf die Expression von REST-Zielgenen	116
5.6	Die Modulation der Chromatinstruktur bestimmt die Genexpression REST-regulierter Gene	117
5.7	Identifizierung weiterer REST-Zielgene mittels GenChip (Affymetrix-Assay)	118
5.8	Genexpression von REST und REST-regulierter Gene in der neuronalen Stammzelllinie HNSC.100	120
5.9	Retinsäure löst in HNSC.100 die Neurogenese aus	120
5.10	Histon-Deacetylasen abhängige Repression von REST-Zielgenen in der der Neuronalen Stammzelle HNSC.100	122
5.11	Die Genexpression von REST-Zielgenen wird in HNSC.100 über die Modulierung des Chromatins reguliert	122
5.12	Ausblick	124
6	Zusammenfassung	125
7	Summery	126
8.	Literaturverzeichnis	127

1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ara-C	Cytosin β -D-Arabinofuranosid
5-AzaC	5-Azacytidine
BDNF	„Brain-derived Neurotrophic Factor“
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosin-5'-Phosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChAT	Cholinazetyltransferase
ChIP	(Chromatin-Immuno-Präzipitation)
CREB	„cAMP-Response-Element-Binding Protein“
CMV	Cytomegalovirus
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
C-Terminus	Carboxyl-Terminus einer Desoxyribonukleinsäure
CoA	Coenzym A
Cx36	Connexin 36
DMEM	„Dulbecco`s Modified Eagle Medium“
DMEM-F12	„Dulbecco`s Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 HAM“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
E. coli	Escherichia coli
ER TM	Estrogen Rezeptor „Tamoxifen Mutant“
EtOH	Ethanol
FCS	„Fetal Calf Serum“
FGF-b	Fibroblast Growth Factor-Basic
G418	Genectin 418 Sulfat
GAL4	DNA-Bindungsdomäne des Hefetranskriptionsfaktors <i>S. cerevisiae</i>
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GluR2	Glutamat Rezeptor 2

°C	Grad Celsius
g	Gramm
x g	x Erdbeschleunigung
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HAT	Histon Acetyltransferase
HDAC	Histon Deacetylase
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinmethan]-sulfonsäure
HIV	“human immunodeficiency virus”
HMT	Histon Methyltransferase
HP1	Heterochromatinprotein 1
kDa	Kilodalton
LTR	„long terminal repeats”
LB	lysogeny broth
M	Mol
mM	Milimol (10^{-3} Mol)
mg	10^{-3} Gramm
ml	10^{-3} Liter
mm	10^{-3} Meter
mRNA	„messenger RNA”
MeCP2	methyl-CpG-binding protein 2
NaV1.2	spannungsabhängiger Natriumkanal Typ II
neo	Neomycin Phosphotransferase
ng	Nanogramm (10^{-6} g)
Ng-CAM	„neuronglia cell adhesion molekül“
NLS	„nuclear localisation sequence“ (Kernlokalisationssignal)
nm	Nanometer
NMDAR1	„N-Metyl-D-Aspartat Rezeptor 1“
NRSE	„neural-restrictive silencer element”
NRSF	„neuron-restrictive silencer faktor”
nt	Nukleotide
N-Terminus	Stickstoff-Terminus einer Desoxyribonukleinsäure
OD	optische Dichte
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen

pac	Puromylin Acetyltransferase
PBS	„Phosphate-buffered saline“
PCR	„Polymerase Chain Reaktion“
PMSF	Phenylmethylnsulphonylfourid
P. pyralis	Photinus pyralis
RA	all-trans Retoinic Acid
RE-1	„repressor element-1“
REST	„RE-1-silencing transcription factor“
REST4	„RE-1-silencing transcription factor 4“
RNA	Ribonukleisäure
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
SCG10	“super cervical ganglion 10“
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Sp1	„Specifity Protein 1“
SV40	Simian Virus 40
TSA	Trichostatin A
U	Unit
UAS	„upstream activation sequence“
VP16	Virus Protein 16
(v/v)	Verhältnis von Volumen zu Volumen
(w/v)	Verhältnis von Gewicht zu Volumen
µg	10 ⁻³ Milligramm
µl	10 ⁻³ Milliliter
µm	10 ⁻⁶ Meter
ZNS	Zentrales Nervensystem

2. Einleitung

Der eukaryontische Organismus ist ein komplexes Gebilde, der aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen besteht, welche im Allgemeinen alle die gleiche genetische Information beinhalten. Die verschiedenen Zellen unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Morphologie und ihrer Funktion voneinander. Diese Zelldiversität ergibt sich aus einer unterschiedlichen Zusammenstellung von Proteinen innerhalb einer Zelle.

Das menschliche Genom enthält schätzungsweise 25.000 proteinkodierende Gene (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Dazu gehören metabolische und strukturelle Proteine, aber auch Proteine, die jede Zelle zur Erfüllung ihrer spezifischen Aufgaben im Organismus benötigt. Die einzelnen Schritte der Proteinbiosynthese, d.h. von der Expression der Gene bis hin zum funktionellen Protein, unterliegen einer strikten Regulation. Diese erfolgt im wesentlichen auf Ebene der Transkription und Translation, aber auch durch RNA-Splicing, mRNA-Transport, mRNA-Degradation und ubiquitinabhängige Proteolyse (siehe Abb. 1).

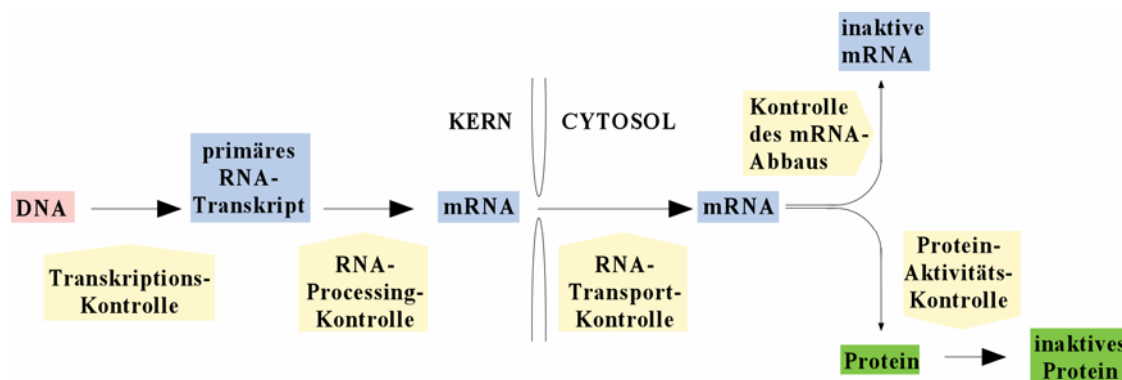


Abb. 1: Kontrollpunkte der Transkription/Translation bei Eukaryonten (Alberts et al., 1995)

Die Kontrolle der Transkription ist der entscheidende Schritt bei der Regulation der Expression, da hier entschieden wird, welche Gene aktiv oder inaktiv sind und somit exprimiert oder nicht exprimiert werden. Proteine, die die Transkription regulieren, werden als Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Die Analyse des menschlichen Genoms zeigte, dass etwa 2000 Gene für Transkriptionsfaktoren kodieren (Venter *et al.*, 2001). Generell wird zwischen zwei Transkriptionsfaktorgruppen unterschieden: Transkriptionsaktivatoren und Transkriptionsrepressoren. Das Zusammenwirken unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren, die entweder ubiquitär oder zellspezifisch exprimiert werden, sorgt dafür, dass die

entsprechenden Gene, welche für die unterschiedlichen Funktionen der Zellen im Organismus verantwortlich sind, exprimiert werden.

2.1 Regulation der Genexpression durch die Modifikation des Chromatins

In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass die Regulation der Genexpression mit dem Zustand des Chromatins in enger Verbindung steht. Als Chromatin bezeichnet man einen Nukleinsäure-Protein-Komplex, bestehend aus DNA und die mit der DNA interagierenden Proteine wie z.B. die Histone. Histone sind basische Proteine, die Aufgrund ihrer positiven Ladung mit der negativ geladenen DNA interagieren. Je zwei Moleküle der Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden ein Oktamer, um das jeweils 146 Basenpaare der DNA gewunden sind. Das Histon H1 wird benötigt, um die Komprimierung der DNA weiter zu verstärken. Der Komplex aus DNA und Histone wird als Nukleosom bezeichnet. Die Nukleosome interagieren miteinander und bilden so eine kondensierte Chromatinstruktur aus.

Seit ungefähr 30 Jahre weisen Studien darauf hin, dass Histone nicht nur als Verpackungsmaterial, sondern auch als Informationsspeicher genutzt werden und somit direkt an der Ausführung biologischer Prozesse, wie z.B. der Transkriptionsregulation, beteiligt sind. Die Histone im Nukleosom können posttranskriptionell durch Phosphorylierung, Acetylierung oder durch Methylierung biochemisch modifiziert werden, was in einer Veränderung der Chromatinstruktur resultiert (van Holde, 1988; Zhang and Reinberg, 2001). Ein Großteil der heutigen Studien beschäftigt sich mit der Rolle der Histon-Acetylierung/Deacetylierung bei der Regulation der Genexpression. In Abb. 2 ist der Mechanismus der Histon-Acetylierung/Deacetylierung schematisch dargestellt. Die überwiegend Lysin- und Arginin-reichen, und damit positiv geladenen N-terminalen Enden der Histone binden an die negativ geladene Phosphate des DNA-Rückgrats. Histon-Acetyltransferasen (HAT) übertragen Acetylgruppen von Acetyl-CoA auf diese N-terminalen Lysinreste der Histone H3 und H4, was zu einer Abnahme der positiven Ladung innerhalb der Histone führt und somit zu einer verminderten Affinität für die negativ geladene DNA. Sind viele Histonmoleküle im Nukleosom acetyliert, nimmt das Chromatin eine aufgelockerte, offene Konfiguration an. Dies macht die DNA zugänglicher für Transkriptionsfaktoren. Werden die Acetylgruppen durch die Histon-Deacetylase (HDAC) entfernt, kommt es zu einer Positivierung der Histone und zu einer höheren Affinität zur negativ geladenen DNA. Das Chromatin wird dichter gepackt und somit weniger zugänglich für transkriptionelle Regulatoren.

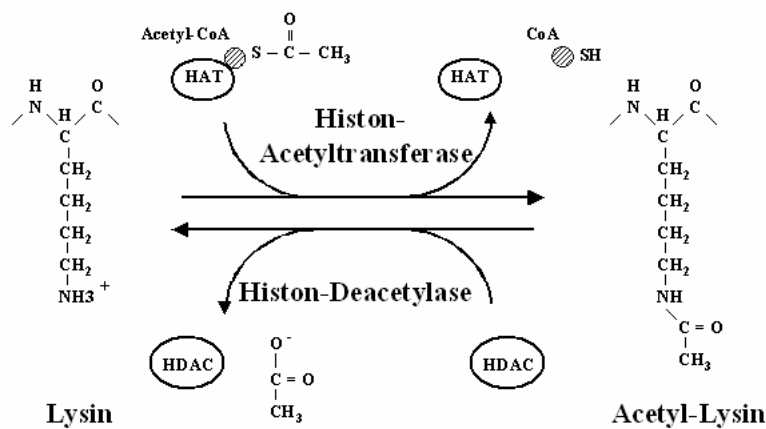
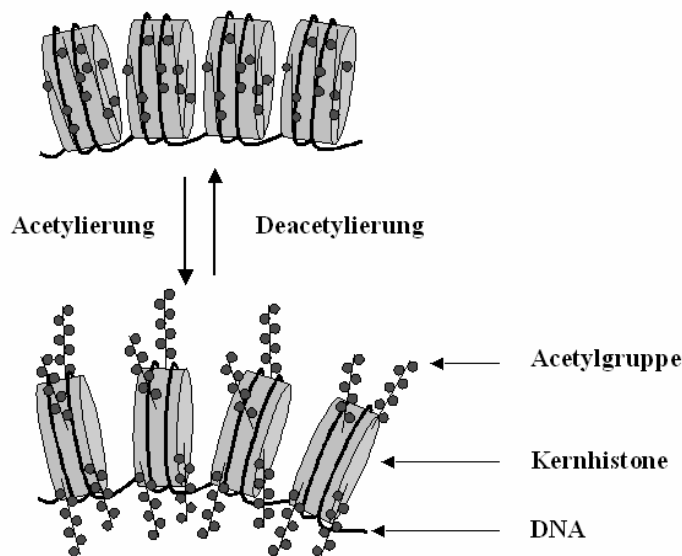
A**B**

Abb. 2: Schematische Darstellung der Histonmodifikation durch Histon-Acetylierung/Deacetylierung

A. Histon-Acetyltransferasen (HAT) übertragen die Acetylgruppen von Acetyl-CoenzymA (CoA) auf die ε-amino-Gruppe von Lysin. Die positive Ladung des Lysinrests geht somit verloren. Histon-Deacetylases (HDAC) entfernen die Acetylgruppe, was zu einer positiven Ladung des Lysinrestes führt. **B.** Histon-Acetyltransferasen übertragen Acetylgruppen auf die Lysinreste der Histone, was zu einer verminderten positiven Ladung der Histone führt. Die negativ geladene DNA stößt sich ab und kann nicht mehr so dicht gepackt werden. Sind viele Histonmoleküle im Nukleosom acetyliert, nimmt das Chromatin eine aufgelockerte, offene Konfiguration an, was die DNA zugänglich für Transkriptionsfaktoren macht. Histon-Deacetylases können diese Acetylgruppen wieder entfernen. Die nun positive Ladung der Histone führt zur Bindung an die negativ geladenen Phosphate des DNA-Rückgrats. Das Chromatin wird dichter gepackt und somit unzugänglich für transkriptionelle Regulatoren (Thiel *et al*; 2004).

Im Gegensatz zur Histon-Acetylierung gilt die Histon-Methylierung als eine vererbare Histon-Modifikation. Der N-Terminus des Histons H3 kann an den Lysinresten 4, 9 oder 27

durch Histon-Methyltransferasen (HMT), wie beispielsweise SUV39H1 und G9a, mono-, di- oder trimethyliert werden (Rea *et al.*, 2000; Tachibana *et al.*, 2001). Je nach Ort und Anzahl der Methylgruppen entstehen "aktives" oder "inaktives" Chromatin (Strahl and Allis, 2000). Die Methylierung des Lysinrests 4 am Histon H3 korreliert mit einer aktiven Genexpression, wohingegen die Methylierung der Lysinreste 9 und 27 mit einer Repression der Gene einhergeht (Bannister *et al.*, 2002). Die Methylierung der Lysinreste 9 und 27 stellt eine Bindestelle für das "*silencing protein*" Heterochromatin Protein 1 (HP1) dar (Bannister *et al.*, 2001). HP1 bewirkt durch Homo- und Heterodimerisierung die Bildung von Heterochromatin, wodurch auch benachbarte Genabschnitte für Transkriptionsfaktoren unzugänglich werden können. Die Gene auf diesen Chromatinabschnitten sind „inaktiv“ und werden in diesem Zustand an die Tochterzelle weitervererbt (Abb. 3).

Die Histon-Modifikation bietet somit die Möglichkeit die Genexpression epigenetisch zu regulieren. So können zusätzliche Informationen über die Genregulation, die nicht in der DNA-Sequenz kodiert sind, über den sog. „Histoncode“ an die Tochterzelle weitergegeben geben.

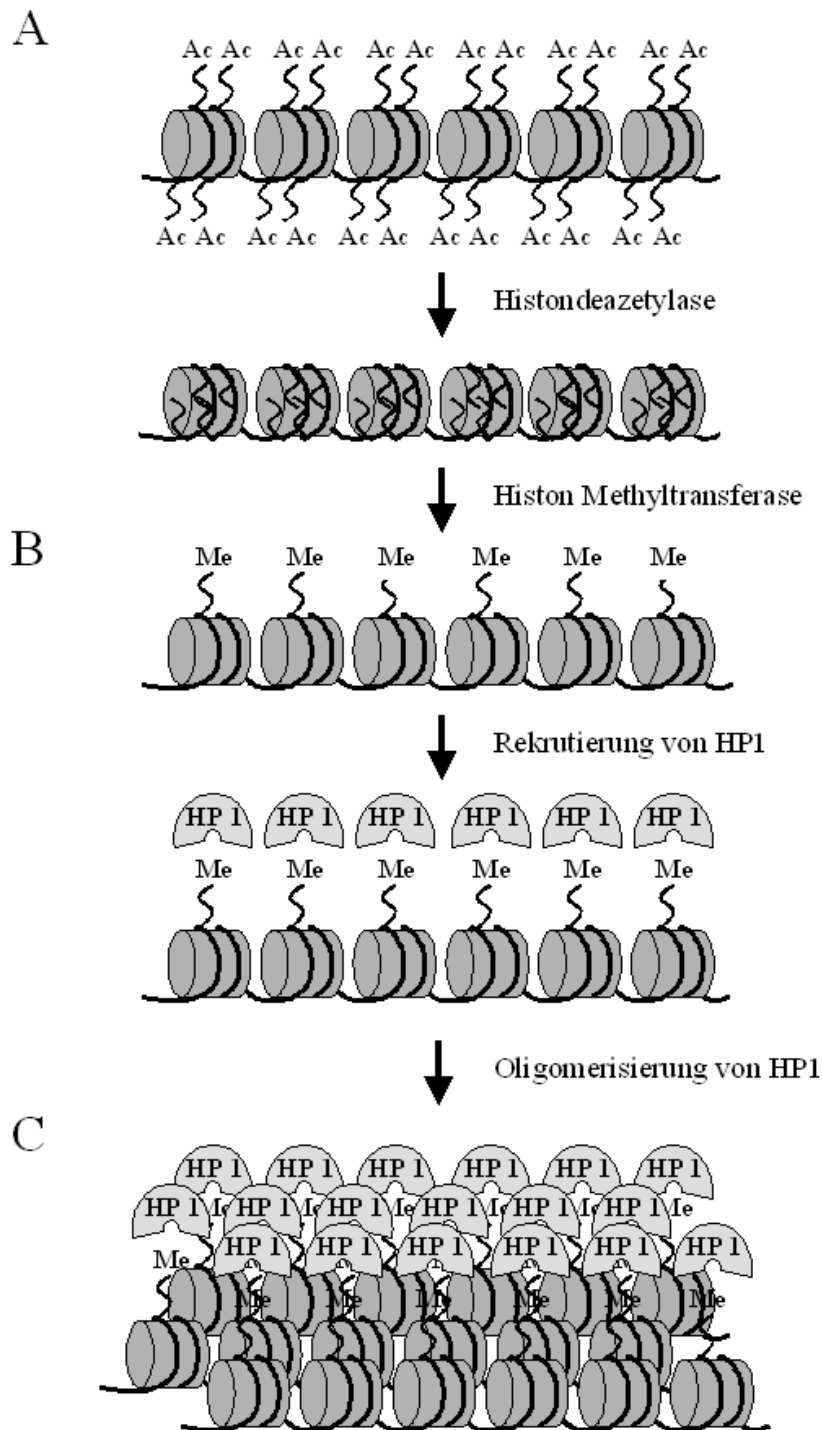


Abb. 3 Bildung von Heterochromatin

(A) Histon-Deacetylasen werden von transkriptionellen Repressoren an die Transkriptionseinheit rekrutiert. Die Deacetylierung der Histone bilden Substrate für Histon-Methyltransferasen, welche den Lysinrest 9 des Histons H3 methylieren **(B)** Der methylierten Lysinrest 9 dient als Substrat für das Heterochromatin Protein 1 (HP1) **(C)** Dimerisierung und Oligomerisation der HP1 führt zu Bildung von Heterochromatin, die Nukleosomen werden fest zusammengepresst und unzugänglich für Transkriptionsfaktoren (Thiel *et al.*, 2004).

2.2 Zellspezifische Genexpression des zentralen Nervensystems

Das zentrale Nervensystem (ZNS) besteht aus einer Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen, die entsprechend der Funktion des jeweiligen ZNS-Abschnitts, den verschiedenen Segmenten des Gehirns und des Rückenmarks, in spezifischer Weise räumlich angeordnet und verknüpft sein müssen. Die Mechanismen, die die Entstehung dieser Zelldiversität und ihres räumlichen Musters kontrollieren, sind noch weitgehend unverstanden. Die Entwicklung des ZNS beruht auf einer strikten Kontrolle der Genexpression, die zur Ausbildung hochspezifischer Zellen mit spezialisierten Aufgaben führt. Damit eine Nervenzelle die ihr zugewiesene Aufgabe erfüllen kann, benötigt sie eine bestimmte Zusammensetzung an neuron-spezifischen Proteinen. Die neuronale Differenzierung und die Aufrechterhaltung des differenzierten Zustands werden durch neuron-spezifische Transkriptionsfaktoren reguliert. Eine Expressionsanalyse des Mäusegehirns identifizierte etwa 350 Transkriptionsfaktoren, die an der Organisation und Entwicklung des Gehirns beteiligt sind (Gray *et al.*, 2004). Die Klasse der Zinkfinger-Proteine stellt dabei die größte Anzahl an Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der Genexpression im Gehirn beteiligt sind.

2.3 Der Transkriptionsfaktor REST

Das Zinkfingerprotein REST („RE-1 silencing transcription factor“), welches auch unter dem Namen NRSF („neuron-restrictive silencer factor“) beschrieben wurde, ist ein Repressor neuronaler Gene in nicht-neuronalen Geweben. REST wurde unabhängig von zwei Arbeitsgruppen im Jahre 1995 kloniert (Chong *et al.*, 1995; Schoenherr and Anderson, 1995). Beide Arbeitsgruppen forschten an den neuron-spezifischen Genen, die für den spannungsabhängigen Natriumkanal Typ II (*NaV1.2*) und für SCG10 („super cervical ganglion 10“) kodieren. Die regulatorischen Bereiche dieser Gene beinhalten eine spezifische DNA-Sequenz, die als „neural-restrictive silencer element“ (NRSE) bezeichnet wird. Dieses Element ist für die neuron-spezifische Expression dieser Gene verantwortlich (Kraner *et al.*, 1992; Mori *et al.*, 1992), da diese als DNA-Bindestelle für das Repressorprotein REST fungiert. REST reprimiert die Transkription seiner Zielgene unabhängig davon, ob die DNA-Bindestelle NRSE in der 5'-flankierenden Region, in Introns oder 3' des offenen Leserasters lokalisiert ist (Thiel *et al.*, 1998).

Das REST-Protein, bestehend aus 1096 Aminosäuren, besitzt acht Zinkfinger, die für die DNA-Bindung verantwortlich sind, wobei der Zinkfinger 7 für die Bindung essentiell zu sein scheint (Shimojo *et al.*, 2001). Die Zinkfinger 2-5 sind zudem an der Kernlokalisierung und am Eintritt des REST-Proteins in den Nukleus beteiligt (Shimojo *et al.*, 2001, 2006). REST besitzt zwei Repressordomänen, welche am N-, bzw. am C-Terminus lokalisiert sind (Tapia-Ramírez *et al.*, 1997; Thiel *et al.*, 1998, Naruse *et al.*, 1999). Ein einzelner Zinkfinger befindet sich an der C-terminalen Repressordomäne. Die modulare Struktur des Transkriptionsfaktors REST ist in Abb. 4 dargestellt.

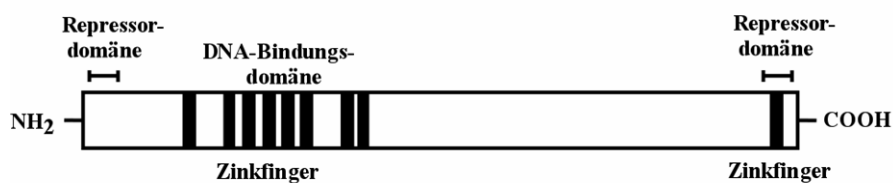


Abb. 4: Moduläre Struktur des Transkriptionsfaktors REST

Das Repressorprotein enthält acht Zinkfinger in der Nähe des N-Terminus und ein einzelner Zinkfinger am C-Terminus. Die Repressordomänen und die DNA-Bindungsdomäne sind markiert.

Da REST hauptsächlich in nicht-neuronalen Gewebe exprimiert wird (Chong *et al.*, 1995, Schoenherr and Anderson, 1995), bedeutet dies, dass REST die neuron-spezifische Expression nicht durch Aktivierung der Transkription in neuronalen Zellen, sondern durch Repression neuronaler Gene in nicht-neuronalen Zellen reguliert. Diese inverse Abhängigkeit der Expression von REST und den REST-regulierten Genen führte zu dem in Abb. 5 dargestellten Schema.

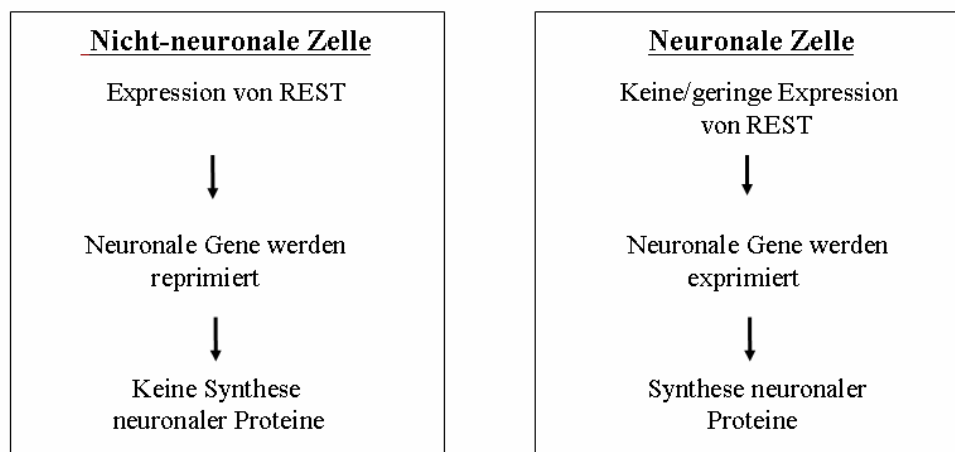


Abb. 5: Abhängigkeit der neuronalen Genexpression von der Expression des Repressors REST (Thiel *et al.*, 2003)

2.4 Der Repressionsmechanismus von REST

Untersuchungen zum molekularen Repressionsmechanismus von REST zeigten, dass die N-terminale Repressordomäne die Transkription über einen Komplex bestehend aus dem Korepressorprotein mSin3A und Histon-Deacetylasen reprimiert (Naruse *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999). Über die C-terminale Repressordomäne rekrutiert REST ein weiteres Korepressorprotein namens CoREST (Andrés *et al.*, 1999). CoREST kann ebenfalls als Komplex mit Histon-Deacetylasen vorliegen (Humphray *et al.* 2001). REST steht demnach über die C-terminale Repressordomäne ein zusätzlicher Histon-Deacetylase-abhängiger Repressionsmechanismus zur Verfügung (Ballas *et al.*, 2001, Grimes *et al.*, 2000; You *et al.*, 2000). Alternativ ist REST in der Lage über die C-terminale Repressordomäne die Histon-Methyltransferase G9a an die Transkriptionseinheit heranzuführen (Roopra *et al.*, 2004). Die Methyltransferase G9a katalysiert bevorzugt mono- und di-Methylierungen der Lysinreste 9 und 27 des Histons H3 (Tachibana *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2003), welche wiederum als Substrat für das Heterochromatin Protein 1 (HP1) dienen. Der Korepressor CoREST scheint bei der Rekrutierung von G9a jedoch keine Rolle zu spielen (Roopra *et al.*, 2004).

Ein weiterer Mechanismus, die Expression ganzer Genabschnitte zu regulieren ist, neben der Histon-Modifikation, die DNA-Methylierung. Veränderungen des Methylierungsgrads der DNA ist meist mit transkriptioneller Reprimierung verbunden. Dies kann entweder durch die Blockierung der DNA-Bindestelle transkriptioneller Aktivatoren geschehen oder durch das Heranführen von Repressorproteinen an die Transkriptionseinheit. Die Methylierung des Cytosins in CpG-Dinukleotiden durch DNA-Methyltransferasen spielt dabei eine entscheidende Rolle. Die methylierten CpG-Dinukleotide (C^mpG) bilden eine Bindestelle für das Repressorprotein MeCP2 (methyl-CpG-binding Protein 2). MeCP2 reprimiert die Gentranskription durch Rekrutierung von Histon-Deacetylasen oder Histon-Methyltransferasen an die methylierten DNA-Abschnitte (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998; Fuks *et al.*, 2003). REST wurde als duales Repressorprotein beschrieben (Thiel *et al.*, 2004), welches die Repression seiner Zielgene über die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen bewirkt, aber auch über Wechselwirkungen mit dem C^mpG-bindenden Repressorprotein MeCP2. Dabei dient das Korepressorprotein CoREST als Protein-Brücke zwischen REST und MeCP2 (Lunyak *et al.*, 2002). Abb. 6 zeigt schematisch den durch REST rekrutierten Repressionsapparat.

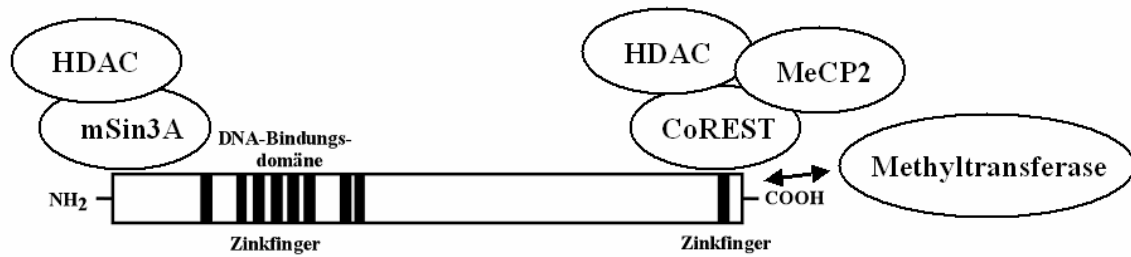


Abb. 6: Schematische Darstellung der durch REST rekrutierten Korepressorproteine

Das Zinkfingerprotein REST hat am N-terminalen- und am C-terminalen Ende je eine Repressordomäne (hier nicht gekennzeichnet). Am N-terminalen Ende wird die Transkriptionshemmung über einen Komplex aus Histon-Deacetylasen (HDAC) und dem Korepressorprotein mSin3A vermittelt (Roopra *et al.*, 2000). An der C-terminalen Repressordomäne wird die Transkription der Gene ebenfalls durch einen Proteinkomplex bestehend aus Histon-Deacetylasen und dem Korepressorprotein CoREST inhibiert (Ballas *et al.*, 2001). Zusätzlich können entweder über Wechselwirkungen mit CoREST oder direkt über die C-terminale Repressordomäne weitere Kofaktoren rekrutiert werden, wie beispielsweise das Repressorprotein MeCP2 oder die Histon-Methyltransferase G9a (Lunyak *et al.*, 2002; Roopra *et al.*, 2004).

Ein weiterer interessanter Repressionsmechanismus von REST wurde von Murai *et al.* (2004) und Yeo *et al.* (2005) beschrieben. Danach erfolgt die REST-vermittelte Repression über Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den Repressordomänen von REST und Proteinen des Transkriptionsapparats, wie zum Beispiel dem TATA-Box Bindeprotein (TBP) oder der RNA-Polymerase II. So kann die Genrepression alternativ zur Modulation der Chromatinstruktur auch auf der Ebene der Transkriptionsinitiation erreicht werden.

2.5 REST-regulierte Gene

Die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms machte es möglich unter Zuhilfenahme der bekannten Konsensussequenz der REST-Bindestelle NRSE (NNCAGCACCNNGCACAGNNNC, nach Schoenherr *et al.*, 1996, Roopra *et al.*, 2001, Bruce *et al.*, 2004) weitere REST regulierte Gene zu identifizieren. Bruce *et al.* (2004) konnten in einer Genom-umfassenden Datenbankanalyse bei Maus und Mensch etwa 1900 Gene identifizieren, welche ein putatives NRSE beinhalten. (Die RE1-Datenbank ist unter http://bioinformatics.leeds.ac.uk/group/online/RE1db/re1db_home.htm veröffentlicht). Hierzu gehörten Gene, die z.B. für Neurotransmitterrezeptoren, Neurotrophine, synaptische Vesikelpoteine, Ionenkanäle, Adhäsionsmoleküle und Transkriptionsfaktoren kodieren (siehe Tabelle 1). Da REST an der Regulation vieler für den neuronalen Phänotyp essentieller Gene beteiligt ist, wurde postuliert, dass es sich bei REST um einen „Masterregulator“ der neuron-spezifischen Genexpression handeln könnte (Schoenherr and Anderson, 1995).

REST-regulierte Gene
Neurexin III (H)
Paired box Gen 4 (M)
Opioid Rezeptor Mu 1 (H,M,R)
5-Hydroxytryptamin (Serotonin) Rezeptor 1A (H,M,R)
BDNF (R,M,H)
Natriumkanal Typ II (R)
Cholinazetyltransferase (H,M)
Dynamin I (M)
Glutamatrezeptor 2 (R,M)
Glyzinrezeptor $\alpha 3$ (H,R)
L1 Adhäsionsprotein (H,R)
muskarinischer Azetylcholinrezeptor M4 (R)
Neuron-Glia Zelladhäsionsmolekül (M)
nikotinischer Azetylcholinrezeptor $\beta 2$ (H,R,M)
SCG10 (R)
Secretogranin II (R,M)
Synaptotagmin IV (H,R,M)
Synapsin I (H,R,M)
Synaptophysin (R)
$\beta 3$ -Tubulin/N-Tubulin (M)

Tabelle 1: Beispiel einiger bekannter REST-regulierter Gene

(R=Ratte, H=Mensch, M=Maus) (teilweise übernommen von Schoenherr *et al.*, 1996; Roopra *et al.*, 2001 und Zhang *et al.*, 2006).

2.6 Die *REST*-Genexpression in neuronalen Zellen

Eine Analyse der *REST*-Genexpression in verschiedenen menschlichen Neuroblastomazelllinien durch Lietz *et al.* (1998) wies *REST* in geringen Konzentrationen in den neuronalen Vorläuferzellen nach. Ein durchgeführter Vergleich der Genexpression von *REST* und dem *REST*-regulierten Gen *Synapsin I* (Schoch *et al.*, 1996) zeigte, dass trotz des Vorhandenseins geringer *REST*-Konzentrationen das Zielgen *Synapsin I* exprimiert wird, und dass die Expressionslevel von *REST* und *Synapsin I* in einem inversen Verhältnis zueinander stehen. Mit zunehmender Expression des *REST*-Gens nimmt die *Synapsin I* Genexpression ab (Lietz *et al.*, 1998). Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung und RNase Schutzexperimenten untersuchte Palm *et al.* (1998) die *REST*-Expression im ZNS der Ratte. Sie fanden heraus, dass *REST* auch in den adulten Neuronen des Hippokampus exprimiert wird, wenn auch in deutlich geringeren Mengen, verglichen mit undifferenzierten neuronalen Vorläuferzellen. Interessanterweise wird *REST* zu Beginn der neuronalen Differenzierung in hohen Konzentrationen im Gehirn exprimiert (embryonaler Tag 13). Während der fortschreitenden

Entwicklung des Gehirns nimmt die *REST*-Genexpression ab (embryonaler Tag 19) (Palm *et al.*, 1998). Dies lässt den Schluss zu, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Konzentrationsabnahme von REST und der neuronalen Differenzierung besteht.

2.7 Analyse der Funktion von REST in transgenen Mäusen

Um die Funktion von REST *in vivo* zu analysieren, untersuchten Chen *et al.* (1998) die Genexpression in *REST*^{-/-} *Knock-out* Mäusen. Interessanterweise zeigten die Ergebnisse, dass lediglich das neuronale Gen *βIII-Tubulin* in *REST*^{-/-} *Knock-out* Mäusen in nicht-neuronalem Gewebe exprimiert wurde. Da die Mäuse durch den *Knock-out* von *REST* letal waren (embryonaler Tag 9,5 – 10) und zu diesem Zeitpunkt viele neuronale Gene noch nicht exprimiert werden, konnte der Einfluss eines Fehlens von REST in neuronalem und nicht-neuronalem Gewebe nicht analysiert werden. Trotzdem zeigen die Daten der *Knock-out* Maus, dass der Transkriptionsfaktor REST nicht der „Masterregulator“ der neuronalen Differenzierung ist, da weder die Neurogenese früher oder stärker vermittelt wurde, noch das nicht-neuronale Gewebe zu Neuronen transformiert wurde. Diese Daten unterstellen, dass REST nicht für die initiale Entscheidung zwischen neuronaler oder nicht neuronaler Differenzierung, sondern eher für das Aufrechterhalten des neuronalen Differenzierungsstatus verantwortlich ist. Zusammenfassend bedeutet dies, dass die neuronale Differenzierung und die aktive Aufrechterhaltung des differenzierten Status (Blau, 1992) durch REST kontrolliert wird.

2.8 Die Bedeutung von REST bei der neuro-degenerativen Erkrankung Chorea Huntington

Die Huntington-Krankheit, auch Chorea Huntington genannt, ist eine genetisch bedingte und autosomal dominant vererbte Nervenkrankheit. Diese neuro-degenerative Erkrankung äußert sich in der Fehlsteuerung des Gehirns und der Dysfunktion neuronaler Zellen. Auslöser ist eine Mutation innerhalb der kodierenden Region des *Huntingtin*-Gens, wobei eine stark vermehrte Abfolge des Basentriplets CAG im 1. Exon des *Huntingtin*-Gens auftritt (The Huntington's Disease Study Group, 1993). Das Basentriplett CAG kodiert für die Aminosäure Glutamin. Durch die Expansion der CAG-*repeats* auf der mRNA entsteht ein Protein mit einem ausgedehnten Poly-Glutamin Abschnitt, wodurch das Protein neue und toxische Eigenschaften annimmt (Rubinsztein, 2002).

In gesunden neuronalen Zellen stimuliert das Wildtyp Huntingtin die Expression von *BDNF* (*brain-derived neurotrophic factor*) (Zuccato *et al.*, 2001), ein Protein, welches für das Überleben und die Entwicklung von Neuronen essentiell ist. Das *BDNF*-Gen enthält eine funktionelle REST-Bindestelle in der Promotor II-Region (Timmusk *et al.*, 1999), über die die Genexpression von *BDNF* durch REST reprimiert werden kann.

Im Zytoplasma der Zelle kommt es zur Bildung eines Proteinkomplexes, aus Wildtyp Huntingtin und REST. Der Eintritt von REST in den Nukleus wird durch diese Komplexbildung blockiert und so die Repression des *BDNF*-Gens verhindert. Das mutierte Huntingtin-Protein ist nicht mehr in der Lage mit REST zu interagieren, so dass es zu einer Anreicherung von REST im Zellkern kommt und somit zur Repression von REST-Zielgenen, wie beispielsweise dem *BDNF*-Gen (Zuccato *et al.*, 2003).

2.9 Neurale Stammzellen: Essentielles Element des ZNS

Neurale Stammzellen sind unreife Vorläuferzellen des zentralen Nervensystems. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, 1) sich zeitlebens zu teilen, 2) sich selbst zu erneuern und 3) reife Nerven- und Gliazellen hervorzubringen (Gage, 2000; Taupin and Gage, 2002). Aufgrund dieses Differenzierungspotentials sind diese Zellen therapeutisch für den Gen- und Zellersatz bei neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. M. Parkinson und multiple Sklerose) vielversprechend. Die Entdeckung neuronaler Stammzellen im erwachsenen Gehirn (Gross, 2000) eröffnete die Möglichkeit, diese körpereigenen Zellen zu entnehmen, sie außerhalb des Körpers zu vermehren, zu Nerven- und Gliazellen reifen zu lassen und auf diese Weise die zur Differenzierung notwendigen biochemischen Prozesse genau zu untersuchen.

Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren gelten als Regulatoren der frühen Differenzierung neuraler Stammzellen von der Initiierung der Differenzierung über Vorläuferzellen bis hin zur Festlegung des „*cell fate*“. Signalmoleküle der Differenzierung sind Wachstumsfaktoren, wie z.B. b-FGF (*basic fibroblast growth factor*) und EGF (*epidermal growth factor*) (Morrison, 2001; Ross *et al.*, 2003).

Die humane Neurale Stammzelle HNSC (*human neuronal stem cell*) bietet ein exzellentes Modellsystem zur molekularen und zellulären Erforschung der Entwicklung des zentralen Nervensystems. HNSC-Zellen sind immortalisiert, pluripotent und exprimieren den Stammzellmarker Nestin. Sie haben die Fähigkeit beibehalten sich aktiv und dauerhaft zu teilen, um so den *pool* an Stammzellen *in vitro* ständig zu erneuern (siehe Abb. 7).

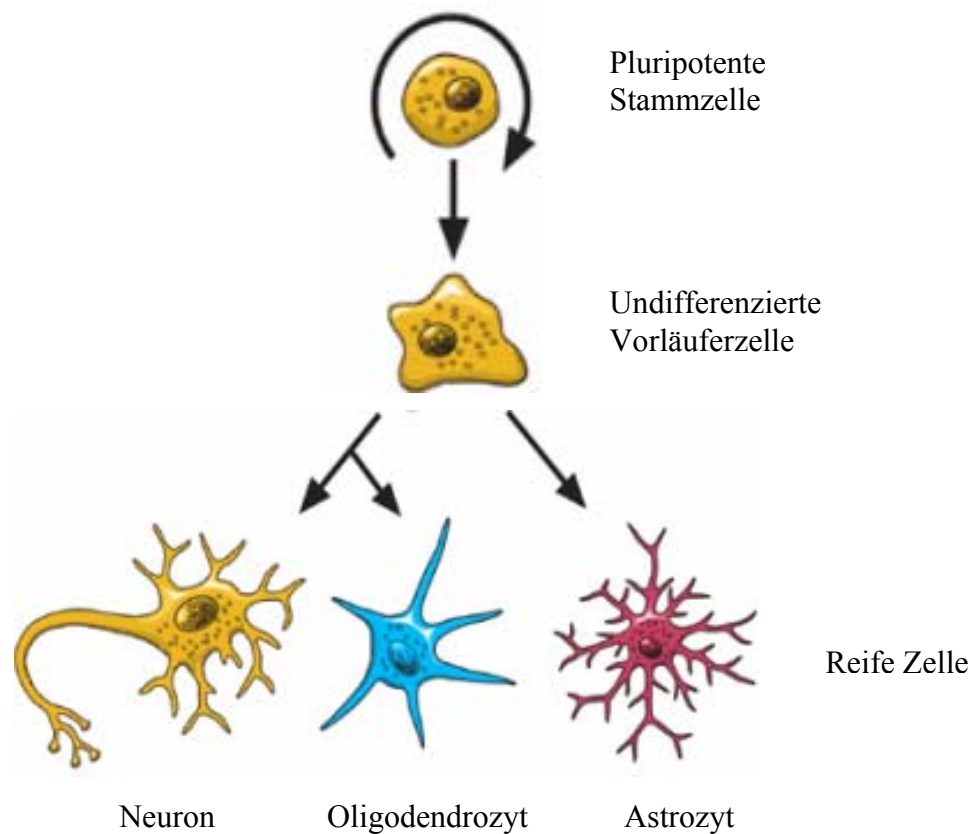


Abb. 7: Schema zur Differenzierung neuraler Stammzellen

Neurale Stammzellen sind pluripotent und besitzen die Fähigkeit der Selbsterneuerung. Im undifferenzierten Zustand teilen sich die Zellen und erneuern fortwährend den Zellpool. Erst bei Entzug der Wachstumsfaktoren beginnen die Zellen zu differenzieren und bilden die drei wichtigsten Zelltypen des ZNS: Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten. (Bild aus www.helpforheadaches.com/.../life-neuron.htm)

Während der Zellteilung behalten diese Zellen ihren undifferenzierten Phänotyp bei. Erst bei Entzug der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF stellen sie die Proliferation ein und differenzieren sich zu Astrozyten, Neuronen oder Oligodrozyten (Villa *et al.*, 2000).

Die Manifestation eines neuronalen Phänotyps setzt die Expression neuron-spezifischer Gene voraus. Eine undifferenzierte Stammzelle zeigt einen hohen endogenen Level an REST (Lorincz *et al.*, 2004; Ballas *et al.*, 2005), eine adulte Nervenzelle jedoch nur noch einen sehr geringen REST-Level (Palm *et al.*, 1998). Im Laufe der neuronalen Entwicklung muss die Expression von *REST* nach und nach eingestellt werden, um die Expression neuron-spezifischer Gene zu gestatten. Die neurale Stammzelllinie HNSC wurde in dieser Arbeit als Modellsystem verwendet, um die Rolle von REST bei der neuronalen Differenzierung untersuchen zu können.

2.10 Zielsetzung

In dieser Studie soll geklärt werden, ob die REST-vermittelte Repression neuronaler Gene in verschiedenen Zellsystemen gleich verläuft, oder ob es zelltyp-spezifische Unterschiede gibt. Im Mittelpunkt der Untersuchung steht dabei der Einfluss der Chromatinstruktur auf die Regulation der neuronalen Genexpression. Ausgangspunkt war die Generierung von Zelllinien, die dauerhaft eine induzierbare, Dominant-Positive REST-Mutante (DP-REST:ER) exprimierten. DP-REST:ER ist ein spezifischer Aktivator REST-regulierter Gene und soll zusätzlich zur Identifikation weiterer potentieller REST-Zielgene herangezogen werden. In einem weiteren Projekt dieser Arbeit soll geklärt werden, welche Rolle REST bei der Initiation der Neurogenese und der Regulation der neuronalen Genexpression in der humanen neuronalen Stammzelllinie HNSC spielt.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit benutzen Verbrauchsmaterialien und Chemikalien wurden, wenn nicht anders beschrieben, von folgenden Firmen bezogen:

Fluka	(Neu-Ulm)
VWR (Merck)	(Darmstadt)
PAA	(Cölbe)
Roche Diagnostics	(Mannheim)
Roth	(Karlsruhe)
Sigma	(Deisenhofen)
Sarstedt	(Nümbrecht)
Greiner bio-one	(Frickenhäusen)

Die in dieser Arbeit benötigten Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

MBI	(St.Loer-Rot)
Promega	(Heidelberg)

3.2 Radioisotope und Röntgenfilme

Die benutzte Radioaktivität stammte von der Firma Amersham (Braunschweig) und die verwendeten Röntgenfilme wurden von Fuji-Film bezogen.

3.3 Vektoren und Plasmide

3.3.1 Reporterplasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pGL3-Basic	Dieses Plasmid enthält die kodierende Region des Luziferasegens aus <i>P. pyralis</i> .	Firma Promega
pGL3-Promotor	Dieses Plasmid enthält die kodierende Region des Luziferasegens aus <i>P. pyralis</i> , die unter der Kontrolle des SV40 Promotors steht.	Firma Promega
pHIVTATALuc	Dieses Plasmid enthält die kodierende	Laborkollektion Thiel et al.,

	Region des Luziferasegens aus <i>P. pyralis</i> unter der Kontrolle eines Minimalpromotors, bestehend aus der TATA-Box des „human immunodeficiency virus“ (HIV) und dem Transkriptionsinitiationselement des „major late promoters“ vom Adenovirus.	1996
pSyIluc	Dieses Plasmid enthält den menschlichen Synapsin I Promotor (-422/+47) vor der kodierenden Region des Luziferasegens aus <i>P. pyralis</i> .	Laborkollektion Lietz et al., 2001
pSyINRSE²luc	Dieses Plasmid enthält die kodierende Region des Luziferasegens aus <i>P. pyralis</i> unter der Kontrolle eines Minimalpromotors. Zusätzlich wurden proximal zur TATA-Box 2 Kopien des Synapsin I NRSE's (2 x TTCAGCACCG CGGACAGTGCC) inseriert.	Laborkollektion Lietz et al., 2001
pSyINRSE⁴luc	Dieses Plasmid enthält die kodierende Region des Luziferasegens aus <i>P. pyralis</i> unter der Kontrolle eines Minimalpromotors. Zusätzlich wurden proximal zur TATA-Box 4 Kopien des Synapsin I NRSE's (4 x TTCAGCACCGC GGACAGTGCC) inseriert.	Laborkollektion Lietz et al., 2001
pSyIlucΔNRSE	Dieses Plasmid enthält den menschlichen Synapsin I Promotor (-422/+47) ohne die REST Bindungsstelle (-235/-199) vor der kodierenden Region des	Laborkollektion Lietz et al., 2001

	Luziferasegens aus <i>P. pyralis</i> .	
pSYP_{Intron}luc	Dieses Plasmid enthält die kodierende Region des Luziferasegens aus <i>P. pyralis</i> unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Zusätzlich wurde die Sequenz von 3 bis 427 des ersten Introns des menschlichen Synaptophysin Gens proximal zum SV40 Promotor inseriert.	Laborkollektion Lietz et al., 2003
1.1 pSYPNRSE²SV40luc	Dieses Plasmid enthält die kodierende Region des Luziferasegens aus <i>P. pyralis</i> unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Zusätzlich wurden 2 Kopien des Synaptophysin NRSEs (2 x TCCAGCACCGTGGACAGAGCC) proximal zum SV40 Promotor inseriert.	Laborkollektion Lietz et al., 2003

3.3.2 Expressionsplasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pCMV5	Dieses Plasmid ist ein eukaryontischer Expressionsvektor unter der Kontrolle des Cytomegalie Virus IE Gen-Promotors/Enhancers (NCBI accession # AF239249)	M. Rubin (The Rockefeller University, New York, USA)
pCMVtriBDNF	Dieses Plasmid enthält die kodierende Sequenz des BDNF-Gens unter Kontrolle des Cytomegalie Virus IE Gen-Promotors/Enhancers.	Laborkollektion
pCMVmyc-REST4	Dieses Plasmid enthält die kodierende	Laborkollektion Magin et al., 2001

	Sequenz des menschlichen REST4 Gens unter der Kontrolle des Cytomegalie Virus IE Gen-Promotors/Enhancers. REST4 ist eine neuron-spezifische Spliceform des REST Gens. Darüber hinaus enthält das Plasmid die kodierende Region für ein myc-Epitop proximal zur REST4 cDNA.	
pCMVFLAG DP-REST	Dieses Plasmid enthält die kodierende Region für die REST DNA-Bindungsdomäne von Ser ¹⁵⁴ bis Pro ⁴³⁸ , sowie für die Aktivierungsdomäne des Proteins VP16 von Ala ⁴¹³ bis Gly ⁴⁹⁰ unter der Kontrolle des Cytomegalie Virus IE Gen-Promotors/Enhancers. Zusätzlich wurden proximal zur kodierenden Region für die REST DNA-Bindungsdomäne, die kodierende Region für ein FLAG-Epitop und für ein Kernlokalisierungssignal inseriert.	Laborkollektion Lietz et al., 2003
pCMVFLAG-REST	Dieses Plasmid enthält die kodierende Sequenz des menschliche REST Gens unter der Kontrolle des Cytomegalie Virus IE Gen-Promotors/Enhancers. Darüber hinaus enthält das Plasmid die kodierende Region für ein FLAG-Epitop proximal zur kodierenden Region für die REST cDNA.	Laborkollektion Lietz et al., 2003

3.3.3 Referenzplasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pRSVβ	Das Plasmid enthält die Kodierregion der β-	Jüngling et al., 1994

	Galaktosidase aus <i>E. coli</i> unter der Kontrolle des Promotors des Rous-Sarcoma-Virus.	
1.1.1 pMFG lacZ	Das Plasmid enthält die Kodierregion des für die β -Galaktosidase kodierenden Gens aus <i>E. coli</i> im retroviralen Vektor MFG	Laborkollektion

3.3.4 Plasmide zur Generierung stabiler Zelllinien

Bezeichnung	Selektions-Marker	Beschreibung	Herkunft
pMSCV	AMP ^r PAC ^r	Der retrovirale Vektor pMSCV (Hawley et al., 1994) enthält die Kodierregion für das Puromyzin-Acetyltransferase-Gen unter der Kontrolle des Phosphoglyzerat-Kinase Promotors (P _{PKG}) und das Verpackungssignal Ψ +	Hawley et al., 1994
pLNCX	AMP ^r NEO ^r	Der retrovirale Vektor LNCX (Miller et al., 1989) enthält die Kodierregion für das Neomyzin-Phosphotransferase-Gen unter der Kontrolle des SV40 Promotors und das Verpackungssignal ϕ .	Miller et al., 1989
pMSCV-FLAG-DP-REST:ER	AMP ^r PAC ^r	Dieser retrovirale Vektor enthält die Kodierregion des Expressionsplasmides pBSKII-FLAG-DP-REST:ER (Michael Lietz) mit der REST DNA-Bindungsdomäne von Ser ¹⁵⁴ bis Pro ⁴³⁸ und die Aktivierungsdomäne des Proteins VP16 von Ala ⁴¹³ bis Gly ⁴⁹⁰ unter der Kontrolle der „long terminal repeats“ (LTR). Zusätzlich wurden proximal zur kodierenden Region für die REST DNA-	Laborkollektion Hohl et al., 2005

		Bindungsdomäne, die Kodierregion für ein FLAG-Epitop und für ein Kernlokalisationssignal (NLS) inseriert. Distal zur kodierenden Region für die VP16 Aktivierungsdomäne enthält das Plasmid die kodierende Region des modifizierten Östrogenrezeptors von R ²⁸¹ bis Ile ⁶⁰⁰ (Littlewood et al., 1995).	
pLNCX-FLAG-DP-REST:ER	AMP ^r NEO ^r	Dieser retrovirale Vektor enthält die Kodierregion des Expressionsplasmides pCMVFLAG-DP-REST:ER (Michael Lietz) mit der REST DNA-Bindungsdomäne von Ser ¹⁵⁴ bis Pro ⁴³⁸ und die Aktivierungsdomäne des Proteins VP16 von Ala ⁴¹³ bis Gly ⁴⁹⁰ unter der Kontrolle der „long terminal repeats“ (LTR). Zusätzlich wurden proximal zur kodierenden Region für die REST DNA-Bindungsdomäne, die Kodierregion für ein FLAG-Epitop und für ein Kernlokalisationssignal (NLS) inseriert. Distal zur kodierenden Region für die VP16 Aktivierungsdomäne enthält das Plasmid die kodierende Region des modifizierten Östrogenrezeptors von R ²⁸¹ bis Ile ⁶⁰⁰ (Littlewood et al., 1995).	Laborkollektion Hohl et al., 2005

3.3.5 Plasmide zur in vitro-Synthese von cRNA's

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pSP6 mp21^{WAF/CIP}	Hierbei handelt es sich um ein Plasmid, dass zur Analyse der Maus mRNA des „ <i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i> “	Laborkollektion

	p21 ^{WAF/CIP} eingesetzt wurde. Zur <i>in vitro</i> -Synthese wurde das Plasmid mit <i>Bam</i> HI endonukleotytisch gespalten und mit Hilfe der SP6-Polymerase eine 370 nt lange cRNA erstellt. Das geschützte Fragment betrug nach der Hybridisierung mit der mRNA und anschließendem RNase-Verdau 329 nt.	
pT3mp38	Hierbei handelt es sich um ein Plasmid, dass zur Analyse der Maus mRNA von Synaptophysin eingesetzt wurde. Zur <i>in vitro</i> -Synthese wurde das Plasmid mit <i>Bam</i> HI endonukleotytisch gespalten und mit Hilfe der T3-Polymerase eine 374 nt lange cRNA erstellt. Das geschützte Fragment betrug nach der Hybridisierung mit der mRNA und anschließendem RNase-Verdau 282 nt.	Laborkollektion Lietz et al., 2003
pT3mSgII-II	Hierbei handelt es sich um ein Plasmid, dass zur Analyse der Maus mRNA von Secretogranin II eingesetzt wurde. Zur <i>in vitro</i> -Synthese wurde das Plasmid mit <i>Bam</i> HI endonukleotytisch gespalten und mit Hilfe der T3-Polymerase eine 374 nt lange cRNA erstellt. Das geschützte Fragment betrug nach der Hybridisierung mit der mRNA und anschließendem RNase-Verdau 289 nt.	Laborkollektion
pT3mGluR2	Hierbei handelt es sich um ein Plasmid, dass zur Analyse der Maus mRNA des Glutamat Rezeptors 2 eingesetzt wurde. Zur <i>in vitro</i> -Synthese wurde das Plasmid mit <i>Eco</i> RI endonukleotytisch gespalten und mit Hilfe der T3-Polymerase eine 360 nt lange cRNA erstellt. Das geschützte Fragment betrug nach der Hybridisierung mit der mRNA und anschließendem RNase-Verdau 290 nt.	Laborkollektion
pT3mBDNF	Hierbei handelt es sich um ein Plasmid, dass zur Analyse der Maus mRNA des „Brain derived nerve growth factor“ eingesetzt wurde. Zur <i>in vitro</i> -Synthese wurde das Plasmid mit <i>Bam</i> HI endonukleotytisch gespalten und mit Hilfe der T3-Polymerase eine 298 nt lange cRNA erstellt. Das	Laborkollektion

	geschützte Fragment betrug nach der Hybridisierung mit der mRNA und anschließendem RNase-Verdau 211 nt.	
pT7mCx36	Hierbei handelt es sich um ein Plasmid, dass zur Analyse der Maus mRNA von Connexin 36 eingesetzt wurde. Zur <i>in vitro</i> -Synthese wurde das Plasmid mit <i>XbaI</i> endonukleotytisch gespalten und mit Hilfe der T7-Polymerase eine 250 nt lange cRNA erstellt. Das geschützte Fragment betrug nach der Hybridisierung mit der mRNA und anschließendem RNase-Verdau 245 nt.	Laborkollektion
pT7mREST	Hierbei handelt es sich um ein Plasmid, dass zur Analyse der Maus mRNA von REST (RE1 silencing transcription factor) eingesetzt wurde. Zur <i>in vitro</i> -Synthese wurde das Plasmid mit <i>EcoRI</i> endonukleotytisch gespalten und mit Hilfe der T7-Polymerase eine 367 nt lange cRNA erstellt. Das geschützte Fragment betrug nach der Hybridisierung mit der mRNA und anschließendem RNase-Verdau 314 nt.	Laborkollektion
pTRI-GAPDH-Rat Control Template	Hierbei handelt es sich um ein Plasmid, dass zur Analyse der Maus mRNA der Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) eingesetzt wurde. Zur <i>in vitro</i> -Synthese wurde das Plasmid mit <i>XbaI</i> endonukleotytisch gespalten und mit Hilfe der T7-Polymerase eine 383 nt lange cRNA erstellt. Das geschützte Fragment betrug nach der Hybridisierung mit der mRNA und anschließendem RNase-Verdau 316 nt.	Firma Ambion
pT7hSyI-2	Hierbei handelt es sich um ein Plasmid, dass zur Analyse der Mensch mRNA von Synapsin I eingesetzt wurde. Das Plasmid wurde mit <i>HindIII</i> endonukleotytisch gespalten und mit Hilfe der T7-Polymerase eine 168 nt lange cRNA erstellt. Das geschützte Fragment betrug nach der Hybridisierung mit der mRNA und anschließendem RNase-Verdau 161 nt.	Laborkollektion
pT7hp38-2	Hierbei handelt es sich um ein Plasmid, dass zur Analyse	Laborkollektion

	der Mensch mRNA von Synaptophysin eingesetzt wurde. Das Plasmid wurde mit <i>HindIII</i> endonukleotypisch gespalten und mit Hilfe der T7-Polymerase eine 307 nt lange cRNA erstellt. Das geschützte Fragment betrug nach der Hybridisierung mit der mRNA und anschließendem RNase-Verdau 237 nt.	
pT7hGFAP	Hierbei handelt es sich um ein Plasmid, dass zur Analyse der Mensch mRNA von GFAP eingesetzt wurde. Das Plasmid wurde mit <i>EcoRI</i> endonukleotypisch gespalten und mit Hilfe der T7-Polymerase eine 287 nt lange cRNA erstellt. Das geschützte Fragment betrug nach der Hybridisierung mit der mRNA und anschließendem RNase-Verdau 260 nt.	Laborkollektion
pSP6-G3PDH-Human Control Template	Hierbei handelt es sich um ein Plasmid, dass zur Analyse der Mensch mRNA der Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) eingesetzt wurde. Das Plasmid wurde mit <i>XbaI</i> endonukleotypisch gespalten und mit Hilfe der Sp6-Polymerase eine 220 nt lange cRNA erstellt. Das geschützte Fragment betrug nach der Hybridisierung mit der mRNA und anschließendem RNase-Verdau 170 nt.	Firma Ambion

3.4 Eukaryontische Zellkultur

3.4.1 Nährmedien zur Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden mit Ausnahme der Zelllinie HNSC.100 in „Dulbecco`s Modified Eagle Medium“ (DMEM), 10% „Fetal Calf Serum“ (FCS), 100 µg/ml Penizillin/Streptomycin kultiviert.

Die humane Stammzelllinie HNSC.100 wurde in HNSC-Proliferationsmedium kultiviert (HNSC-Medium: DMEM-F12 [1:1] (Sigma, #D0547) / 0,5% N2-Supplements (GIBCO #17502) / 1%BSA (5 mg/ml) (Sigma #A1470) / 20 ng/ml rekombinantes EGF (CHEMICON #GF001) / 20 ng/ml rekombinantes bFGF (CHEMICON #GF003) / 0,5% FCS / 100 µg/ml Penizillin/Streptomycin).

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in einer feuchten Atmosphäre kultiviert.

3.4.2 Zelllinien

SHSY5Y

Diese Neuroblastomazelllinie des Menschen wurde freundlicherweise von J. Biedler (Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, New York, USA) zur Verfügung gestellt (Biedler et al., 1973).

NS20Y

Diese murine Neuroblastomazelllinie wurde freundlicherweise von M. Nierenberg (National Institut of Health) zur Verfügung gestellt.

HepG2

Diese humane Hepatomazelllinie wurde bei der DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Deutschland gekauft.

1.1.2 HNSC.100

Diese humane neurale Stammzelllinie (HNSC.100) (Villa et al., 2000) wurde freundlicherweise von A. Martinez-Serrano (Center of Molecular Biology Severo Ochoa, Madrid, Spain) zur Verfügung gestellt. HNSC.100-Zellen wurden aus dem Diencephalon und dem Telencephalon eines 10,5 Wochen alten fetalen menschlichen Aborts präpariert. Durch eine retrovirale Transduktion mit dem gag-v-myc kodierenden Retrovirus konnte diese Zelllinie immortalisiert werden (Villa et al., 2000).

SN56

Diese immortalisierte cholinerge murine Vorläuferzelle wurde freundlicherweise von B. Wainer (The University of Chicago, USA) zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie entstand aus der somatischen Fusion von septalen Neuronen und der Neuroblastomazelllinie N18TG2 (Blusztajn et al., 1992).

1.1.3 AtT20

Diese murine pituitary cortikotrophe Zelllinie wurde bei ATCC gekauft

1.2 LMTK-

Diese murine Fibroblasten Zelllinie wurde bei ATCC gekauft

β TC3

Diese murine pankreatische β -Zelllinie wurde von Douglas Hanahan, UCSF zur Verfügung gestellt.

α TC1-9

Diese murine pankreatische α -Zelllinie wurde von Douglas Hanahan, UCSF zur Verfügung gestellt.

293T/17

Diese menschliche embryonale Nierenzelllinie wurde freundlicherweise von D. Baltimore (Rockefeller University, New York, USA) zur Verfügung gestellt (Pear et al., 1993).

Phoenix-Eco

Diese retrovirale Verpackungszelllinie wurde von G. P. Nolan, (Department of Molecular Pharmacology, Department of Microbiology and Immunology, Stanford University School of Medicine, USA) zur Verfügung gestellt.

Phoenix-Ampho

Diese retrovirale Verpackungszelllinie wurde von G. P. Nolan, (Department of Molecular Pharmacology, Department of Microbiology and Immunology, Stanford University School of Medicine, USA) zur Verfügung gestellt.

3.4.3 Passagieren von Säugerzellen

Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit 5ml 1xPBS "phosphate-buffered saline" (170 mM NaCl / 3,35 mM KCl / 4 mM Na₂HPO₄ / 1,84 mM KH₂PO₄ / pH 7.2) gewaschen und mit 1-2 ml Trypsin/EDTA (0.25% (w/v) Trypsin / 0.1% (w/v) EDTA) für kurze Zeit inkubiert. Die abtrypsinisierten Zellen wurden in einem entsprechenden Volumen Medium aufgenommen und im Verhältnis 2:8 ausgedünnt.

3.4.4. Auftauen von Säugerzellen

Das Auftauen von Zellen erfolgt möglichst rasch, indem die tiefgefrorene Zellsuspension in einem 37°C warmen Wasserbad unter Schütteln erwärmt wurde. Die Suspension wurde anschließend in ein steriles 15ml Röhrchen, in dem das 10fache Volumen an Medium vorgelegt wurde, überführt. Die Zellen wurden danach fünf Minuten lang bei 400 x g abzentrifugiert, in 5 ml DMEM + 10% FCS resuspendiert und in eine T25-Gewebekulturschale überführt.

3.4.5 Einfrieren von Säugerzellen

Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA vom Boden der Gewebekulturschale gelöst, in DMEM resuspendiert und fünf Minuten lang bei 400 x g abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden danach in 1 ml eiskaltem FCS + 10% DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde sofort in ein eisgekühltes Kryo-Röhrchen (Greiner bio-one) überführt und über Nacht bei -20°C zwischengelagert. Danach können die Zellen bei -80°C gelagert werden. Zur Aufbewahrung über einen längeren Zeitraum wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

3.4.6 Differenzierung der Neuralen Stammzelllinie HNSC.100

Zur Differenzierung der neuralen Stammzelle HNSC.100 wurde ein Protokoll von Villa et al. (2000) verwandt. Hierzu wurden 100mm² Zellkulturschalen (Sarstedt # 83.1802) mit Poly-L-Lysine (10µg/ml) (Sigma, #P6282) behandelt und darauf 1×10^6 Zellen/ml Proliferationsmedium (siehe 3.4.1) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Differenzierung der Zellen wurde das HNSC-Medium abgesaugt und durch HNSC-Medium, dass die Mitogene EGF und bFGF nicht beinhaltet, ersetzt. Dieses Medium wurde als astrozytäres Differenzierungsmedium bezeichnet. Ein Mediumwechsel wurde alle 3 Tage durchgeführt. Nach 2 Wochen Inkubation ohne die Mitogene EGF und bFGF, wurden die Zellen geerntet und die zytoplasmatische RNA präpariert.

3.4.7 Differenzierung der Neuralen Stammzelllinie HNSC.100 mit all-trans Retinsäure

Zur Differenzierung der HNSC.100-Zellen mit all-trans Retinsäure (RA) wurde ein modifiziertes Protokoll von Leypoldt *et al.* (2002) verwandt. All-trans Retinsäure wurde von der Firma ICN Biomedicals Inc (# 302-79-4) bezogen und in Ethanol in einer Konzentration von 10mM/ml EtOH gelöst. Vorbereitend wurden 100mm² Zellkulturschalen (Sarstedt # 83.1802) mit Poly-L-Lysine (10µg/ml) (Sigma, #P6282) behandelt. Es wurden 800.000 Zellen auf Zellkulturschalen ausgesät und für 24 h in Proliferationsmedium kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch Medium ohne bFGF und EGF ersetzt. Diesem Medium wurde all-trans Retinsäure in einer Endkonzentration von 1µM zugegeben und neuronales Differenzierungsmedium genannt. Dieses Medium wurde alle drei Tage erneuert. Nach 14 Tagen Inkubation mit RA, folgte die Selektion mittels dem mitotischen Inhibitor Cytosine β -D-Arabinofuranosid (Ara-C) (Sigma #C-6645). Ara-C wurde in DMEM ohne FCS gelöst und in einer Endkonzentration von 1µM zugegeben. Dies sollte sicherstellen, daß ausschließlich nicht-proliferierende Zellen überleben. Das Medium wurde alle 24 h abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Nach 7 Tagen Inkubation mit Ara-C wurden die Zellen geerntet und die RNA präpariert.

3.4.8 Inkubation der DP-REST:ER exprimierenden Zellen mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)

Alle stabilen DP-REST:ER-Zelllinien, wurden 24 h nach dem Aussäen mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) induziert. 4-OHT wurde von der Firma Sigma (# H7904) bezogen und in Ethanol in einer Konzentration von 1mM/ml EtOH gelöst. Das Medium wurde abgesaugt und frisches Medium zugegeben. Zusätzlich wurde dem Medium 4-OHT in einer Endkonzentration von 1µM zugegeben und die Zellen für weitere 24-48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.4.9 Inkubation der Zellen mit Trichostatin A

Es wurden zwischen 1,0-1,5x 10⁶ Zellen auf 100mm² Zellkulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium abgesaugt, frisches Medium zugegeben und die Zellen mit 100 ng/ml Medium des Histon-Deacetylase-Inhibitors Trichostatin A (TSA) behandelt. Im Fall der Zelllinie HNSC.100 wurde nur 25ng/ml TSA eingesetzt. TSA wurde von der Firma

Sigma (# T8552) bezogen und in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 1 µg/µl gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 24-48 h wurden die Zellen geerntet und die zytoplasmatische RNA präpariert.

3.4.10 Inkubation der Zellen mit 5-Azacytidine

Es wurden $1,0 \times 10^6$ Zellen auf 100mm² Zellkulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium abgesaugt und den Zellen frisches Medium gegeben. Diesem Medium wurde der DNA-Methyltransferase Inhibitors 5-Azacytidine (5-AzaC) in einer Endkonzentration von 5µM zugegeben. 5-Azacytidine wurde von der Firma Sigma (# A2385) bezogen und in DMEM-Medium ohne FCS in einer Konzentration von 10mM gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden die Zellen geerntet und die zytoplasmatische RNA präpariert.

3.5 Manipulation eukaryontischer Zellen und deren Analyse

3.5.1 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen mit Kalziumphosphat

1.2.1 Die zur Transfektion verwendeten Expressions-, Reporter- und Referenzplasmide sind unter dem Abschnitt 3.3.1 bis 3.3.3 beschrieben.

Durch Messung der β-Galaktosidase Aktivität und der Luziferaseaktivität des Reporterplasmids kann man die Transfektionseffizienz bestimmen. Hierzu wurde das Referenzplasmid pRSVβ, welches eine Transkriptionseinheit, die für das Enzym β-Galactosidase kodiert, enthält in die Transfektionen eingesetzt. Je Transfektionsansatz wurden vier 60mm-Kulturschalen mit je 400.000 Zellen ausgesät. Zunächst wurde das vorhandene Medium abgenommen, die Zellen 2 mal mit 1xPBS (170mM NaCl / 3,35mM KCL / 4mM Na₂HPO₄ / 1,84mM KH₂PO₄ / pH 7,2) gewaschen und 2 ml Trypsin-EDTA zugegeben. Nachdem die Zellen sich vom Flaschenboden gelöst hatten, wurde zur Vereinzelung der Zellen die Zellsuspension 2-3 mal durch eine 22G 1 1/2 Kanüle gezogen. Danach wurde die Zellzahl durch Auszählen in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Material:

- 10 x HBSS-Puffer:

1,37 M NaCl

50 mM	KCL
7,5 mM	NaHPO ₄ x H ₂ O
55,5 mM	Glucose
210 mM	HEPES

Zunächst wurde 2 x HBSS-Puffer hergestellt, auf einen pH-Wert von 7,1 eingestellt und steril filtriert.

- Zusammensetzung von Lösung 1

1100µl 2x HBSS-Puffer

- Zusammensetzung von Lösung 2

Expressionsplasmid: 1-3µg/Kulturschale

Reporterplasmid: 1-3µg/Kulturschale

Referenzplasmid: 1-3µg/Kulturschale

Lösung 2 wurde tropfenweise zu Lösung 1 gegeben, wobei Lösung 1 vorsichtig besprudelt wurde, bis eine Trübung des Gemisches zu erkennen ist. Von den Kulturschalen mit den ausgesäten Zellen wird das Medium abgesaugt und jeder Schale wurden 500 µl des aus Lösung 1 und Lösung 2 bestehenden Gemisches zugegeben, leicht geschwenkt und für 10 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Schalen erneut geschwenkt und erneut inkubiert. Nach weiteren 10 min wurden 5 ml Medium zu den Zellen gegeben. Es folgt eine Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für vier Stunden. Anschließend wurde ein Glycerolschock durchgeführt.

Zunächst wurde 15%iges Glycerol (170 ml 1xPBS + 30ml Glycerol der Firma Biomol) hergestellt und steril filtriert. Das Medium wurde abgenommen, die Kulturschalen 2 mal mit 1xPBS gewaschen, das PBS abgesaugt und 2 ml 15%iges Glycerol zugegeben. Nach einer zweiminütigen Inkubation wurde das Glycerol abgesaugt, die Kulturschalen 2 mal mit 1xPBS gewaschen und jeder Kulturschale 4 ml frisches Medium zugegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit Ethanol oder mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) induziert. Hierzu wurde zuerst das Medium abgesaugt und anschließend frisches Medium mit einer Konzentration von 1 µM 4-OHT / EtOH auf die Zellen gegeben und für weitere 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.5.2 Proteinpräparation aus transfizierten Zellen und deren Quantifizierung

Die transfizierten Zellen wurden nach 48 h geerntet und anschließend in 100 µl Reporter-Lysis-Puffer (Promega # E397A) aufgenommen. Nach einer 5 minütigen Lyse auf Eis wurden die Proben bei 16060 x g bei 4°C zentrifugiert. Zur β-Galaktosidaseaktivitäts-Bestimmung wurden 30 µl Extrakt mit Hilfe von 1 mM MgCl₂, 45 mM β-Mercaptoethanol, 264 µg O-Nitrophenyl-2-Differenzierung-Galaktopyranosid (ONPG) und 89 mM Natriumphosphat (pH 7,5) in einem Endvolumen von 300 µl eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 bis 120 min bei 37°C wurde die Absorption der dann gelbgefärbten Proben bei einer Wellenlänge von 415 nm im BioRad Reader gemessen (Messbereich OD₄₁₅: 0,2 - 0,8). Die β-Galaktosidaseaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\beta\text{-Galaktosidaseeinheiten} = \frac{380 \times \text{OD}_{415}}{\text{Reaktionszeit (min)}}$$

Um die Luziferaseaktivität zu bestimmen, wurden 10 µl des Zellextraktes in 20 mM N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin (Tris, pH 7,8), 1,07 mM (MgCO₃)₄Mg(OH)₂ x 5 H₂O, 2,67 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 0,1 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 33 mM Dithiothreitol (DTT), 270 µM Coenzym A, 530 µM ATP und 470 mM Luziferin aufgenommen (Endvolumen 110 µl) und die Lumineszenz im Luminometer der Firma Berthold Detection Systems gemessen.

Die relative Luziferaseaktivität konnte mit folgender Formel errechnet werden:

$$\text{relative Luziferaseaktivität} = \frac{\text{Lichteinheiten}}{\beta\text{-Galaktosidaseeinheiten}}$$

Da die Transfektion im vierfachen Ansatz durchgeführt wurde, konnte ein Mittelwert mit Standardabweichung angegeben werden. Jede Transfektion wurde im Minimum zweimal durchgeführt, um das erhaltende Ergebnis zu bestätigen.

3.5.3 Retrovirale Infektion zur Generierung stabiler Zelllinien

Die retrovirale Infektion der Zellen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von M. Rothenberg und G. P. Nolan (Department of Molecular Pharmacology, Department of Microbiology and Immunology, Stanford University School of Medicine, Stanford). Um Mauszellen (AtT20, SN56, LMTK⁻, β TC3 und α TC1-9) zu infizieren wurden Phoenix-Eco-Zellen, bei der Infektion von Mensch-Zelllinien (SHSY5Y, HepG2, HNSC.100) wurden Phoenix-Ampho-Zellen verwendet. Phoenix-Eco bzw. Phoenix-Ampho-Zellen wurden trypsiniert und anschließend $2,3 \times 10^6$ Zellen auf 60mm Schalen ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Zu Beginn der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und frisches Medium mit der Konzentration von 25 μ M Chloroquin auf die Zellen gegeben. Das Kalziumphosphat-DNA-Gemisch mit 10 μ g DNA wurde auf die Zellen gegeben und anschließend für 6 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde das Medium abpipettiert, die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen und anschließend frisches Medium hinzugegeben. Nach weiteren 72 h Inkubation der Zellen bei 37°C wurde der Überstand, der die Viren enthielt, von den Zellen abgesaugt. Nach Filtrierung des „Virusstocks“ (Porengröße 0,45 μ m, Schleicher & Schuell) und Zugabe bis auf 18 ml mit frischem Medium wurde Polybren (1,5-Dimethyl-1,5-Diazaundecamethylpolymethylbromid, Sigma # H-9268) in einer Endkonzentration von 8 μ g/ml hinzupipettiert. 4×10^5 der zu transfizierenden Zellen wurden zusammen mit 8 ml des Virusstocks für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abpipettiert und durch frisches Medium ersetzt. Nach weiteren 3 Tagen wurden die Zellen unter Antibiotika-Selektion gesetzt. Die Zellen wurden mit Neomycin (G418) bzw. Puromycin über einen Zeitraum von drei Wochen inkubiert. Im Anschluss daran wurden die resistenten Zellen analysiert. Die zur Generation stabiler Zelllinien verwendeten Plasmide und deren Selektionsmarker sind an dem Abschnitt 3.3.4 beschrieben.

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 Bakterienstämme

E. coli DH5 α , F- *supE44* Δ (*lacU169* (Φ 80*dlacZM15*) *hsd17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* (Hanahan, 1983)

3.6.2 Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien

- LB-Medium (lysogeny broth-Medium)

25 g	Hefeextrakt
50 g	Trypton
25 g	NaCl
5 l	H ₂ O bidest.

Plasmidtragende *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium kultiviert, der Antibiotikum in einer Endkonzentration von 100µg/ml zugesetzt wurde.

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden zu 1000 ml LB-Medium vor dem Autoklavieren 20 g Agar (Fa. Roth) gegeben. Danach wurde das Nährmedium auf 55°C abgekühlt und das Antibiotikum zugesetzt. Die noch flüssige Agarlösung wurde schließlich unter sterilen Bedingungen in 9.4 cm Petrischalen (Sarstedt) gegossen und nach Aushärtung bei 4°C gelagert.

- Antibiotika

Die Antibiotika wurden als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt, sterilfiltriert und in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

Ampicillin: 100 mg/ml

3.6.3 Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen

Die bei -80°C eingefrorenen Bakterien wurden in 20 ml LB-Medium gelöst und den Tag über bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 2 ml der LB-Über-Tag-Kultur in 250 ml LB überführt. Wenn die Bakterien eine Dichte von $OD_{600nm} = 0,5$ erreicht hatten, wurde die Kultur für 10 Minuten auf Eis gekühlt, auf drei 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und in der Eppendorfzentrifuge bei 3500 x g 10 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 20 ml SEM-TB mit 1,5 ml DMSO langsam tropfend resuspendiert und 10 Minuten lang auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Bakterien in 1ml-Aliquots in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

SEM-TB

10 mM PIPES

15 mM CaCl₂

250 mM KCL

→ pH 6,78 mit KOH einstellen

Lagerung bei 4°C

3.6.4 Transformation von *E. coli*

Transformations-kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und davon 200 µl mit 2 µl Plasmid-DNA vermischt. Danach erfolgte ein 30 sekündiger Hitzeschock bei 42°C. Nach einer zweiminütigen Inkubation des Ansatzes auf Eis wurden 1 ml LB-Medium hinzugegeben und die Bakteriensuspension eine Stunde lang bei 37°C auf einem Schüttler (Eppendorf Thermomixer comfort) inkubiert. Daraufhin wurde die Bakteriensuspension mit Hilfe von sterilen Einmal-Impfösen auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.6.5 Anlegen einer *E. coli*-Glycerinkultur

Material:

Glycerol 86%, steril

Zu 0,765 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur werden 0,235ml 86% Glycerol-Lösung gegeben. Die Aufbewahrung erfolgt bei -70°C.

3.6.6. Plasmid DNA Mini-Präparation

Grundlage dieser Methode ist die Trennung von Plasmid- und chromosomaler DNA aufgrund ihres Konformationsunterschieds und dem daraus resultierenden unterschiedlichen Verhalten bei alkalischer Denaturierung. Lineare DNA zerfällt bei pH-Werten über 12 in Einzelstränge, während sich die überwiegend als ccc-DNA („covalently closed circular“) vorliegenden Plasmide inert gegenüber solchen Bedingungen verhalten. Durch anschließendes schnelles Absenken des pH-Wertes fällt die zu einem Netzwerk aggregierende chromosomale DNA aus und kann durch Zentrifugation entfernt werden (Maniatis *et al.*, 1989).

Material:

P1:	Glucose 50mM EDTA 10mM, pH 8 Tris 25mM, pH 8 → ad 1l A.d.	9g 20ml EDTA 0,5M pH 8 25ml Tris 1M, pH 8
P2:	NaOH 0,2N SDS 1% → ad 200ml A.d. (unmittelbar vor Gebrauch ansetzen)	4ml NaOH 10N 20ml SDS 10%
P3:	Kaliumacetat-Lsg. → vor Gebrauch auf Eis stellen	11,5ml Eisessig 28,5ml A.d. 60ml KAc 5M
TE-Puffer:	10mM Tris, pH8,0 1mM EDTA	

Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Maxipräparation (Kulturvolumen 50ml), die in Klammern nachgestellten Werte gelten für die Minipräparation (Kulturvolumen bis 5ml).

Eine 50ml- (1,5ml-) Übernachtskultur wird 10min (10sec) mit 3500 x g (9500 x g) bei RT abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 5ml (100µl) P1 resuspendiert und 5min bei RT inkubiert. Anschließend werden 10ml (200µl) P2 zugegeben, vorsichtig durch Invertieren des Gefäßes gemischt und 10min (5min) auf Eis inkubiert. Danach gibt man 7,5ml (150µl) eiskalten P3 dazu, mischt erneut vorsichtig und inkubiert nochmals 10min (5min) auf Eis. Es bildet sich ein weißer Niederschlag aus Proteinen, Zellwandbestandteilen und chromosomaler DNA. Die Suspension wird 30min bei 3500 x g bei 4°C zentrifugiert (5min bei 9500 x g bei RT), und der plasmidhaltige Überstand wird in ein neues Gefäß überführt. Die DNA wird, wie in Abschnitt 3.6.12 beschrieben, gefällt und das Pellet in ca. 500µl (20-50µl) TE-Puffer gelöst.

3.6.7 Plasmid-DNA Maxi-Präparation

Plasmide, die in der Zellkultur eingesetzt wurden, wurden nach dem Standard-Protokoll von Qiagen Second Edition durchgeführt.

Hierzu wurde das QIAgen Tip500-Kit (#A10063) verwendet.

3.6.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Basen der DNA und RNA besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Im Spektralphotometer (Eppendorf BioPhotometer) wurde in Quarzküvetten die

Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Aus diesen Werten lässt sich zum einen die Reinheit der DNA mittels des Quotienten $\text{Absorption OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ bestimmen und zum anderen der DNA-Gehalt über die Beziehung $1/\text{OD}_{260} = 50 \mu\text{g dsDNA}/\mu\text{l}$ bei 1 cm Schichtdicke der Küvette. Bei sehr reinen DNA-Lösungen liegt der Quotient $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ zwischen 1.8 und 1.95. Niedrigere Werte sind ein Indiz für die Anwesenheit von Proteinen. Quotienten über 2.0 in DNA-Präparationen sind ein Hinweis auf die Anwesenheit von RNA oder zeigen an, dass die DNA denaturiert ist.

3.6.9 DNA-Restriktion

DNA kann mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzymen), die kurze DNA-Abschnitte erkennen und DNA-Stränge durch Hydrolyse der Phosphodiester-Bindungen spalten, geschnitten werden. Die Erkennungssequenzen sind in der Regel palindromisch aufgebaut und 4 bis 8 Basenpaare lang. In Abhängigkeit vom jeweiligen Restriktionsenzym entstehen beim Verdau von DNA glatte, bündige Enden (blunt-ends) oder bedingt durch die versetzten Schnittstellen komplementäre, einzelsträngige Enden (sticky-ends).

Material:

Restriktionsenzyme mit entsprechenden Puffern

Beladepuffer:	Bromphenolblau 0,05%	50mg
	EDTA 200mM	4ml EDTA 0,5M
	Glycerin 50%	5ml Glycerin 100%
	→ad 10ml A.d.	
TE-Puffer:	10mM Tris, pH8,0	
	1mM EDTA	

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen wird nach den Angaben der entsprechenden Hersteller durchgeführt (MBI Fermentas). Die optimale Inkubationstemperatur liegt für die verwendeten Enzyme bei 37°C (außer *SmaI*, 30°C). Als Inkubationsdauer wird in der Regel 2h für Plasmid-DNA gewählt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt durch Inkubation bei 68°C, sofern vom Hersteller keine anderen Angaben vorliegen. Alternativ hierzu kann der Restriktionsverdau durch Zugabe von 0,1Vol EDTA 0,25M abgestoppt werden. Wird im Anschluß eine weitere Restriktion mit einem anderen Puffersystem durchgeführt, wird eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender EtOH-Fällung durchgeführt und das Pellet in TE aufgenommen. Zur Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese setzt man 0,1Vol Beladepuffer („loading mix“) zu

Zur Überprüfung, ob die aus Bakterientransformanten isolierten Plasmide die korrekten Inserts enthielten, wurden Kontrollverdau durchgeföhrt und dazu folgende Ansätze pipettiert und 2 h lang beim Temperaturoptimum der Enzyme inkubiert:

Ansatz:

5 µl	DNA Mini-Prep
0.3 µl	Restriktionsenzym 1
0.3 µl	Restriktionsenzym 2
2 µl	10x Puffer (passend zum jeweiligen Restriktionsenzym)
<u>12.4 µl</u>	H ₂ O _{bidest.}
20 µl gesamt	

Die Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von MBI Fermentas bezogen. Bei der Durchführung eines Doppelverdaus musste darauf geachtet werden, dass der Puffer für beide Restriktionsenzyme geeignet ist. Die verdauten Fragmente wurden über ein Agarosegel aufgetrennt.

Zur Präparation von Plasmid-DNA für eine anschließende Ligation von DNA-Fragmenten wurde folgender Ansatz gewählt:

20 µl	DNA Midi-Prep
2 µl	Restriktionsenzym 1
2 µl	Restriktionsenzym 2
8 µl	10x Puffer (passend zum jeweiligen Restriktionsenzym)
<u>68 µl</u>	H ₂ O _{bidest.}
100 µl gesamt	

Die verdauten Fragmente wurden über ein Agarosegel aufgetrennt und anschließend aus dem Gel präpariert.

3.6.10 Phosphatase-Behandlung

Wenn ein Fragment mit zwei gleichen Enden in einen Vektor inkloniert werden soll, empfiehlt es sich, den Vektor zu dephosphorylieren. Die Dephosphorylierung verhindert eine Zirkularisierung des Kloniervektors während einer Ligation, was die Anzahl an rekombinanten Molekülen erhöht.

Das zur Dephosphorylierung verwendete Enzym ist die alkalische Phosphatase (CIAP), welche die freien 5'-Phosphatgruppen der linearen DNA entfernt. Dadurch ist eine Ligation

nur zwischen den freien 5'-Phosphat-Enden der Fremd-DNA und den 3'-OH-Enden des Vektors möglich.

Material:

Alkalische Phosphatase CIAP von MBI Fermentas mitgelieferter Puffer

TE-Puffer 10mM Tris, pH8,0
 1mM EDTA

20µg DNA werden mit 10U CIAP in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit einer Konzentration von 1xDephosphorylierungspuffer versetzt und 30min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wird erneut mit 10U CIAP versetzt und mit der entsprechenden Menge Puffer und TE auf ein Gesamtvolumen von 120µl gebracht, dann erneut 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine DNA-Fällung durchgeführt. Das Pellet wird in TE-Puffer gelöst.

3.6.11 Ligation

Ligationen wurden mit der T₄-DNA-Ligase von MBI Fermentas #EL0014 durchgeführt. Das Enzym katalysiert die Verknüpfung zwischen benachbarten 3'-OH-Enden und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Ketten, wobei ATP als Coenzym und Energieträger benötigt wird.

Material:

T₄-DNA-Ligase von MBI Fermentas [1,5U/μl]
Ligationspuffer 10x

Insert-DNA und Vektor-DNA werden im Verhältnis 1:1 bis 2:1 mit 1µl T₄-DNA-Ligase in 15-20µl-Ansätzen mit 1xLigationspuffer für 12-16h bei 14°C inkubiert.

3.6.12 DNA-Reinigung durch Fällung

DNA-Fällungen werden zur Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA durchgeführt. Die gelöste DNA kann sehr effizient durch Zugabe von 3Vol 100%igem EtOH präzipitiert werden. Auch eine Fällung mit 100%igem Isopropanol ist möglich und kann in einem kleineren Ansatzvolumen durchgeführt werden. Zum Fällern mit Isopropanol werden der

gelösten DNA 1/10Vol 3M NaAc und 0,6Vol 100%iges Isopropanol zugesetzt. Während die Fällung mit EtOH für 30min bei -70°C abläuft, benötigt die Fällung mit Isopropanol 2h bei -20°C.

Material:

Isopropanol 100%

Ethanol 100%

Ethanol 70%

TE-Puffer	10mM Tris, pH8,0 1mM EDTA
-----------	------------------------------

Die Fällung erfolgt wie oben beschrieben entweder mit 100%igem EtOH oder alternativ mit 100%igem Isopropanol. Es folgt eine Pelletierung durch Zentrifugation für 10min bei 4°C und 16060 x g. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 70%igem EtOH gewaschen, erneut zentrifugiert und das Pellet auf einem Heizblock oder bei RT getrocknet. Anschließend wird das Pellet in TE gelöst.

3.6.13 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese ist die Standardmethode zum Auftrennen, Charakterisieren und Reinigen von DNA-Fragmenten. Sie beruht auf Wanderungseigenschaften der negativ geladenen DNA-Moleküle in einem Feld konstanter, elektrischer Spannung, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur angelegten Spannung ist. Die Migrationseigenschaften der Moleküle werden sowohl von ihrer Größe ($-\log_{10}$ MW), wie auch vom Salzgehalt des Puffers und der Beschaffenheit der Gelmatrix bestimmt. Die Trägermatrix besteht aus Agarose, einem aus Algen gewonnenen linearen und neutralen Polysaccharid. Die Wahl der geeigneten Gelkonzentration ermöglicht die Auftrennung von Fragmenten in einem Bereich von 0,2-50kb. Die DNA wird im Gel durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Ethidiumbromid, gefärbt. Durch Anregung des Farbstoffs mit UV-Licht der Wellenlänge 302nm ist es möglich, die DNA-Banden im Gel sichtbar zu machen.

Material:

TAE-Puffer 50x:	Tris	242g
	Eisessig	57,1ml
	EDTA 5mM, pH 8	100ml EDTA 0,5M, pH 8

→ad 1l A.d.

Agarose: 0,5-1,5% in 1xTAE-Puffer 0,5-1,5g/100ml

Laufpuffer: 1xTAE-Puffer

Ladepuffer: Bromphenolblau 0,2% 20mg
EDTA 0,2M 4ml EDTA 0,5M, pH 8
Glycerin 50% 5ml Glycerin 100%
→ad 10ml A.d.

Verwendete Marker:

GeneRuler™ 100bp plus (# SM0321) von MBI Fermentas

Die Agarose wird in 1xTAE-Puffer aufgekocht, bis die Lösung klar und schlierenfrei ist. Nach Abkühlen auf „Handwärme“ wird sie in die Gelform gegossen. Nach Erkalten wird der Kamm gezogen und das Gel in die Gelkammer überführt.

Durch den DNA-interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid können DNA-Fragmente im Gel bei Anregung mit UV-Strahlung (302 nm) sichtbar gemacht werden.

3.6.14 Phenol/Chloroform-Extraktion

1.3 Diese Methode dient dem Aufreinigen von DNA. Dabei werden Proteine z.B. nach einem Restriktionsverdau entfernt.

Material:

Phenol/Chloroform von Roth im Verhältnis 1:1, pH 7,5, Tris gesättigt

Chloroform

TE-Puffer 10mM Tris, pH8,0
1mM EDTA

Methode:

Die DNA-Lösung wird mit 1Vol Phenol/Chloroform versetzt, gevortext und 5min bei 16060 x g bei RT zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die obere Phase wird dann mit 1Vol Chloroform versetzt, gevortext und wie zuvor

beschrieben zentrifugiert. Die obere, DNA-enhaltende Phase wird, wie unter Abschnitt 3.6.12 beschrieben, gefällt.

3.6.15 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Sequence Laboratory Göttingen GmbH (Göttingen) durchgeführt.

3.6.16 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl.: Polymerase Chain Reaktion) erlaubt eine einfache Amplifikation beliebiger Nukleinsäure-Abschnitte *in vitro*. Bei diesem Verfahren wird die Eigenschaft von DNA-Polymerasen ausgenutzt, an freie 3'-OH-Enden von kurzen DNA-Stücken, sogenannte Primer (Oligonukleotide), weitere Basen anzuhängen. Die Primer sind so entworfen, dass sie jeweils an einem der beiden DNA-Stränge an spezifische Sequenzen upstream und downstream des gewünschten, zu amplifizierenden DNA-Abschnitts binden. Während der PCR durchläuft der jeweilige Reaktionsansatz einen dreistufigen Temperaturzyklus. Im ersten Schritt wird die DNA, die als Vorlage dient („Template DNA“), bei hoher Temperatur in Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung). Im zweiten Schritt bei niedriger Temperatur hybridisieren die sequenzspezifischen Primer mit der Template DNA („Annealing“). Bei mittlerer Temperatur erfolgt schließlich unter Katalyse durch die Polymerase in Gegenwart von Desoxynukleotiden (dNTPs) die Polymerisation und damit ein Auffüllen der Einzelstrang- zur Doppelstrang DNA (Elongation). Als Produkt entstehen zwei neue doppelsträngige DNA-Moleküle. Durch mehrfache zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte erhält man eine exponentielle Anreicherung des zwischen den beiden Primern liegenden DNA-Bereiches. Als Polymerase kommt aufgrund der hohen Temperatur, die zur Denaturierung der Template-DNA nötig ist, nur eine thermostabile Polymerase in Frage. Hier wurde die Taq-Polymerase der Firma MBI (#EP0402) verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden im „Eppendorf Mastercycler gradient“ unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Zusammensetzung eines 20 µl Ansatzes:

- | | |
|------|------------------|
| 1 µl | Primer 1 [10 µM] |
| 1 µl | Primer 2 [10 µM] |

0,5 µl	dNTPs (je 10 mM)
2 µl	10x PCR-Puffer (ohne MgCl ₂)
2 µl	25 mM MgCl ₂
2 µl	Template DNA
0,125 µl	Polymerase [2.5 U/µl]
11 µl	H ₂ O _{bidest.}

PCR-Protokoll:

Denaturierung	95°C	5 min.	Denaturierung der Template DNA
30 Zyklen	94°C	45 sec.	Denaturierung
	52°C	45 sec.	Annealing (Temperatur variabel je nach Schmelztemperatur des Primers)
	72°C	1 min.	Elongation
Elongation	72°C	10 min.	Elongation nicht vollständiger Produkte

3.6.16.1 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Sigma Genosys (Steinheim) bezogen.

Human Primer Nr.:	Annealing-temperatur	Sequenz 5' → 3'	menschliche mRNA
G537	58 ⁰ C	GAG AGG GAG GAC AAA GTC CC	Nestin
G538	58 ⁰ C	TCC CTC AGA GAC TAG CGC AT	Nestin
G541	66 ⁰ C	CTG TTG CCA GAG ATG GAG GTT	GFAP
G542	66 ⁰ C	TCA TCG CTC AGG AGG TCC TT	GFAP
G409	64 ⁰ C	GCA CGT CCT GGC TGG GTT TCT GGG	SynapsinI
G408	64 ⁰ C	AGG CTA CCC GTC AGA CAT CCG TCT C	SynapsinI
G597	58 ⁰ c	ATG CTG CTG CTG GCG GAC ATG G	Synaptophysin
G598	58°C	TGG CCA CCA CCT CCC	Synaptophysin

		AGA GTC	
G405	64 ⁰ C	CAC ACT GAG GAG TTT GAA GAT GGA	GluR2
G403	64 ⁰ C	TTA GTA CTG CGA GGT TAA CCG CAT	GluR2
G414	64 ⁰ C	TTT GAA GTT GCT TCT ATC TGC TGT	REST
G415	66 ⁰ C	GAA TCT GAA GAA CAG TTT GTG CAT	REST
G573	55 ⁰ C	TTC CAG GAG CGA GAT CCC T	GAPDH
G574	55 ⁰ C	CAC CCA TGA CGA ACA TGG G	GAPDH

Alle Primer wurden mittels BLAST unter www.ncbi.com auf ihre Richtigkeit überprüft.

Produktgrößen der verschiedenen Primer:

Human GAPDH: 175nt

Human GFAP (glial fibrillary acidic protein): 382nt

Human GluR2 (Glutamat Rezeptor 2): 600nt

Human Nestin: 195nt

Human REST: 626nt

Human SynapsinI: 248nt

Human Synaptophysin: 297nt

Eine Überprüfung der amplifizierten Fragmente erfolgte mittels einer Agarosegel-Elektrophorese.

3.6.17 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin Immunopräzipitation ermöglicht es Protein:DNA-Interaktionen im Zellkern nachzuweisen. Das quervernetzt Chromatin wird isoliert, durch Ultraschall zerkleinert und mit Antikörpern immunopräzipitiert. Anschliessend wird die präzipitierte DNA gereinigt und über PCR nachgewiesen, ob ein gesuchtes Zielgen präzipitiert wurde.

Formaldehyd cross-linking und Chromatin-Immunopräzipitation von Gewebekulturzellen wurden in Anlehnung an das Protokoll von upstate.com durchgeführt.

Verwendete Antikörper

	Bezeichnung
1	anti di-methyl H3K9 (abcam #ab7312)
2	anti tri-methyl H3K4 (abcam #ab8580)
3	Anti-Flag M2 affinity gel (Sigma # A2220)

Es wurden 2×10^7 Zellen pro 100mm^2 Schale in DMEM mit 10% FCS oder in Proliferationsmedium bzw. DMEM ausgesät und ggf. mit 4-OHT für 24 h stimuliert. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz wachsen gelassen, und anschließend Formaldehyd (37%) in einer Endkonzentration von 1% direkt in das Medium gegeben und für 10 min bei RT auf der Wippe inkubiert. Um das cross-linking zu stoppen wurde Glycin in einer Endkonzentration von 125 mM zupipettiert und weitere 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen 3 x mit kaltem 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml 1x PBS plus Protease Inhibitoren (Roche # 1697498) mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt, in ein frisches 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und bei $700 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Zelllysis-Puffer [5mM Pipes (KOH), pH 8.0 / 85mM KCl / 0,5% NP-40] plus Protease Inhibitoren (Roche # 1697498) und 1mM PMSF resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei $16060 \times g$ für 5 min pelletiert und in Kernlysis-Puffer [50 mM Tris, pH 8.1/ 10mM EDTA/ 1% SDS] plus Protease Inhibitoren (Roche # 1697498) und 1 mM PMSF resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Das Chromatin wurde anschließend mittels Ultraschall (Branson Sonifier cell disrupter B15) auf eine Größe von etwa 600 bp zerkleinert. Für die verwendeten Zellen wurden 3-4 mal pro Probe, je 1 min mit 30 sec-bursts sonifiziert und anschließend 1 min auf Eis gekühlt.

Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei $16060 \times g$ für 10 min bei 4°C vom Chromatin getrennt und in ein frisches 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt, oder in einem Verhältnis von 1:5 in Chip dilution Puffer [0,01% SDS / 1,1% Triton X-100 / 1,2mM EDTA / 16.7mM Tris, pH 8.1 / 167mM NaCl, plus Protease Inhibitoren] verdünnt. Zur Reduktion von unspezifischen Background, wurden den Proben 80µl Protein-A-Sepharose (Amersham Bioscience # 17-0780-01) zupipettiert und für mindestens 30 min bei 4°C auf dem Rotator (Faust GmbH, Köln) inkubiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation bei $16060 \times g$ für 1 min pelletiert und der Überstand in ein frisches 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. 20% des Überstandes wurden abgenommen und als spätere "Total Input Kontrolle" bei -20°C

aufbewahrt. Der restliche Überstand wurde in zwei Fraktionen geteilt und einer Fraktion 5µg di-methyl H3K9 Antikörper oder tri-methyl H3K4 zupipettiert und über Nacht bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Die Zweite Fraktion diente als negativ Kontrolle und enthielt kein Antikörper. Um die Immunokomplexe zu sammeln wurden den Proben 60µl Protein-A-Sepharose zugegeben und mind. 1 h bei 4°C auf dem Rotator inkubiert und danach für 1 min bei 16060 x g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nacheinander mit je 1 ml der folgenden Waschlösungen resuspendiert und für 3-5 min auf dem Rotator gewaschen.

a) "Low salt" Waschpuffer [0,1% SDS/ 1% Triton X-100/ 2mM EDTA/ 20mM Tris, pH8.1/ 150mM NaCl] bei 4°C

b) "high salt" Waschpuffer [0,1% SDS/ 1% Triton X-100/ 2mM EDTA/ 20mM Tris, pH8.1/ 500mM NaCl] bei 4°C

c) LiCl waschpuffer [0,25M LiCl/ 1% NP40/ 1% Deoxycholat/ 1mM EDTA/ 10mM Tris, pH 8.0] bei 4°C

d) zwei mal mit TE-Puffer (10mM Tris, pH8,0 / 1mM EDTA) bei RT

Anschließend wurde der pelletierte Immunokomplex in 250µl frischem Elutions Puffer [1% SDS/ 0,1M NaHCO₃] eluiert und mindestens 15 min bei RT auf dem Rotator inkubiert. Das Pellet wurde bei 16060 x g für 3 min bei RT pelletiert und der Überstand in eine frisches 1,5ml Eppendorfgefäß pipettiert und das Pellet erneut in 250µl Elutions Puffer eluiert und für mindestens 15 min auf dem Rotator inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wurden beide Überstände vereint. Um das Formaldehyd-crosslinking rückgängig zu machen wurden die Proben mit 1µl 10mg/ml RNase und 5M NaCl in einer Endkonzentration von 0,3M zugegeben und für 4-5 h bei 65°C inkubiert. Auch die "Total Input Kontrolle" wurde diesem Schritt unterzogen. Es folgte die Präzipitation über Nacht bei -20°C durch Zugabe von 2 1/2 Volumen 100%igem Ethanol.

Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 16060 x g für 30 min bei 4°C pelletiert und in 100µl A.dest resuspendiert. Anschließend wurde 10 mM EDTA, 40mM Tris, pH6,5 und 20µg Proteinase K zugegeben und für 2 h bei 45°C inkubiert. Die DNA wurde durch Phenol-Chloroform Extraktion gereinigt und durch Zugabe von 2 1/2 Volumen 100% Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 50µl A.dest resuspendiert und für die PCR verwendet.

Um die Bindung von DP-REST:ER an die DNA zu detektieren wurde Anti-Flag M2-Agarose verwendet welche das Flag-Epitop der REST-Mutante bindet. Vorbereitend wurde die M2-Agarose drei mal in Chip dilution buffer gewaschen.

Den Chromatin-Proben wurden 80µl Protein-A-Sepharose (Amersham Bioscience # 17-0780-01) zupipettiert und für mind. 30 min bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation bei 16060 x g für 1 min pelletiert und der Überstand in ein frisches 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. 20% des Überstandes wurden abgenommen und als spätere "Total Input Kontrolle" bei -20°C aufbewahrt. Der restliche Überstand wurde in zwei Fraktionen geteilt und einer Fraktion 40µl Anti-Flag M2 Gel-Suspension zupipettiert und über Nacht bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Die Zweite Fraktion diente als negativ Kontrolle und wurde mit 60µl Protein-A-Sepharose behandelt und ebenfalls über Nacht bei 4°C auf dem Rotator inkubiert.

Die Beads wurden danach für 1 min bei 16060 x g bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet nacheinander mit je 1 ml der oben genannten Waschlösungen resuspendiert und für 3-5 min auf dem Rotator gewaschen. Die weitere Prozedur entspricht dem oben beschriebenen Protokoll.

3.6.18.1 Oligonukleotide für ChIP

Mouse Primer Chip-Assay Nr.:	Annealing- temperatur	Sequenz 5' → 3'	Zielgen
G585	60°C	CCC TGC AAC CTC AGC CCA TAG C	<i>GluR2</i>
G586	60°C	CCG AGA AAG CGC GGC TCA GAG	<i>GluR2</i>
G581	58°C	AGG AGC TCG GCC ACC TGC AC	<i>Connexin36</i>
G582	58°C	AGA GGG GAG TGG GGG AAG CA	<i>Connexin36</i>
G579	62°C	TGC TGG CAG ACA TGG ACG TGG	<i>Synaptophysin</i>
G580	62°C	CAG CTC CAG CGA CCG TAT CTC	<i>Synaptophysin</i>
Human Primer ChIP-Assay Nr.:			

G601	60°C	CCA GGT TGG AGC ATC TCC GCA GC	<i>GluR2</i>
G602	60°C	TAG CCG CTG TCC CTC CGC GAG A	<i>GluR2</i>
G597	64°C	ATG CTG CTG CTG GCG GAC ATG G	<i>Synaptophysin</i>
G598	64°C	TGG CCA CCA CCT CCC AGA GTC	<i>Synaptophysin</i>
G599	62°C	GGG GAA ACA GGA TGC GGC GAG	<i>SynapsinI</i>
G600	62°C	AAG GTG GCC GGG AAG GGG AGT	<i>SynapsinI</i>

Alle Oligonukleotide wurden von Sigma Genosys (Steinheim) bezogen und mittels BLAST unter www.ncbi.com auf ihre Richtigkeit überprüft.

Produktgrößen der Maus ChIP-Primer:

Maus GluR2 (Glutamat Rezeptor 2): 115nt

Maus Connexin36: 165nt

Maus Synaptophysin: 144nt

Produktgrößen der Human ChIP-Primer:

Human GluR2 (Glutamat Rezeptor 2): 150nt

Human Synaptophysin: 128nt

Human SynapsinI: 163nt

3.7 RNA

3.7.1 RNase-Schutzexperiment

Die zytoplasmatische RNA-Präparation für das RNase-Schutzexperiment wurde nach dem Protokoll von Chirgwin et al. (1979) durchgeführt.

Die Methode des RNase-Schutzexperimentes beruht auf der Herstellung sequenz-spezifischer RNA-Proben die durch den Einbau von [$\alpha^{32}\text{P}$] UTP in die synthetisierte Antisense-RNA radioaktiv markiert wird. Dazu wird eine Teilsequenz des zu untersuchenden Gens distal eines SP6-, T3-, oder T7-Promotors inkloniert. Die inklonierte Sequenz dient den RNA-Polymerasen als Matrize zur Synthese von Antisense-RNA. Die Detektion erfolgt durch die

Hybridisierung der radioaktiven Antisense-RNA mit der zytoplasmatischen mRNA. Diese läßt sich nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben auf einem denaturierenden Polyakrylamidgel aufgrund der Radioaktivität auf einem Fuji-Röntgenfilm nachweisen.

Zuerst wurde eine *in vitro* Transkription durchgeführt, um die Antisense-RNA (Riboprobe) zu synthetisieren. Dazu wurden die entsprechenden Plasmide mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen geschnitten und bis zur Synthese der cRNA bei -20°C aufbewahrt. Zur Synthese der ³²P-radioaktiv markierten Antisense-RNA wurden folgende Transkriptionsbestandteile zusammenpipettiert:

2µl 5x Transkriptionpuffer (200 mM Tris/HCl , 30 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 50 mM NaCl,
10 mM Spermadine)

1µl DTT 100mM

0,6µl rATP

0,6µl rCTP

0,6µl rGTP

0,6µl Ribonuklease Inhibitor (MBI Fermentas # EO0311 mit 40U/µl)

2,0µl Template

1-2 µl [α ³²P] UTP (40µCi)

1µl RNA-Polymerase (20U/µl)

Abhängig vom Promotor des Plasmids und Orientierung des einklonierten Genabschnitts diente zur *in-vitro*-Synthese der Antisense-RNA entweder die T3-, die T7- oder die Sp6-RNA-Polymerase von MBI Fermentas (siehe Abschnitt 3.3.5).

Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde 1µl DNase (MBI Fermentas # EN0521 mit 1U/µl) zugegeben und bei 37°C für 10min weiter inkubiert. Anschließend wurden 11µl Formamid dye, sowie 0,5µl 10% SDS hinzupipettiert und die Proben über ein 4%iges denaturierendes Gel aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet.

- Zusammensetzung des 4%igen Trenngels:

8ml Rotiphorese Gel 40

8ml 10x TBE (0,5 M Tris / 0,5 M Borsäure / 10 mM EDTA / pH 8,0)

40g Harnstoff

40ml A.dest

0,07g Ammoniumperoxidsulfat

70µl TEMED

Nach einer Laufzeit von 2-3 h bei 400V wurden die radioaktiv markiert Antisense-RNA mittels "Crush and Soak" aus dem Gel eluiert. Dazu wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten in ein 1,5ml Eppendorgefäß überführt, zerkleinert und 400µl Crush and Soak Solution (500 mM Ammoniumacetat / 10 mM Magnesiumacetat / 1 mM EDTA / 0,1% SDS (w/v) / pH 6,7) zupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 42°C wurden die Polyacrylamidreste über Filtersäulen (Quiagen) 45 Minuten lang bei 4°C und 3220 x g abzentrifugiert und das Eluat einer Phenol-Chloroform Extraktion unterzogen. Die obere, wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorgefäß pipettiert und mit Hilfe der Ethanol-Fällung mit 40 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2), 60 µg Glycogen (MBI Fermentas # R0561) und 1 ml 100% EtOH über Nacht bei -20°C gefällt.

Nach einstündiger Zentrifugation bei 16060 x g wurde das Ethanol vorsichtig abgenommen, das Pellet getrocknet und in 30 µl S1-Puffer (80% [v/v] Formamid, 40 mM Piperazin-1,4-bis[2-ethansulfonsäure] [PIPES] pH 6,4, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA) bei 37°C resuspendiert. 2 µl dieses Ansatzes wurden in ein neues Eppendorgefäß überführt und mit Hilfe des Packard „Liquid scintillation analyzer“ die „Counts per Million“ (cpm nach Cerenkov) der verschiedenen Riboprobes gemessen. Anschließend wurde die gemessene Probe mit 100µl Formamid dye (98% deionisiertes Formamid (v/v) / 0,05% Bromphenolblau (w/v) / 0,05% Xylencyanol (w/v) / 10 mM EDTA, pH 8,0) versetzt und bei -20°C aufbewahrt. Diese wurde später als unverdaute Riboprobe in das Gel eingesetzt. Die zu untersuchende zytoplasmatische RNA wurde mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 175 µl aufgefüllt und mit 25 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 1 ml 100% Ethanol präzipitiert und das Pellet nach einstündiger Zentrifugation bei 16060 x g in 20µl S1-Puffer resuspendiert. $2,5-5 \times 10^5$ cpm der radioaktiv markierten Riboprobe wurde zu der zytoplasmatische RNA zugegeben und das Gesamtvolumen mit S1-Puffer auf 30µl aufgefüllt und das Gemisch für 10min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben bei 44°C über Nacht hybridisiert. Die Proben wurden danach mit dem sog. RNase-Cocktail behandelt. Dazu wurden 400 µl dieses RNase-Cocktails zu den Proben zupipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 5 µl Proteinase K (10 µg/µl, Böhlinger # 1029766) und 7 µl 10% SDS gegeben und mindestens 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Phenol-Chloroform Extraktion und eine Fällung mit 6 µg Glycogen und 900 µl 100% EtOH über Nacht bei -20°C.

RNAse Cocktail:

Für 40 ml

37,5 ml H₂O

2,4 ml 5M NaCl

400µl 1M Tris-HCL

400µl 0,5M EDTA

bei 37°C den pH auf 7,5 einstellen

+ 2,46 µl RNAse A (10U) (Sigma #R 4642)

+ 3,36 µl RNAse T (8U) (Roche Mannheim # 10118021)

Am nächsten Tag wurden die Proben 1 h bei 4°C und 16060 x g zentrifugiert und das Ethanol vorsichtig abgenommen. Das getrocknete Pellet wurde in 10 µl Formamid Dye resuspendiert. Zusammen mit den Riboprobes wurden die Proben 5 Minuten lang bei 95°C erhitzt, kurz auf Eis gelagert und anschließend auf einem 5%igem deanturierendem Gel aufgetragen. Für den ersten Lauf wurden 3µl Marker, 2µl unverdaute Riboprobe und maximal 2µl der zu untersuchenden Probe auf das Gel aufgetragen und mit Hilfe des Photoimager ausgewertet. Anhand dieser Berechnung konnte der zweite Gellauf durchgeführt werden. Eine quantitative Auswertung der Signale fand mit Hilfe eines Phosphorimagers der Firma FUJIFILM, Modell BAS-2500, Düsseldorf statt. Als Analyseprogramme wurde Raw Data PC 1.1A7 und Aida 2.0 eingesetzt.

- Zusammensetzung des 5%igen Trenngels:

50ml A.dest

12,5ml Rotiphorese Gel 40

50g Harnstoff

10ml 10xTBE

0,08g Ammoniumperoxidsulfat

80µl TEMED

RPA-Marker:

5µl pUC 19 DNA / MspI Marker 23 (MBI Fermentas # SM0221)

2µl [³²P]- γATP

1,2µl Polynukleotidkinase-Puffer B

1µl T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl) (MBI # EK0031)

Bei 37°C für 30min inkubieren, dann mit TE auf 50-100µl auffüllen und 1:1 mit Formamid dye versetzen

3.7.2 Präparation von zytoplasmatischer RNA für die reverse Transkription

Material:

- Guadinium Lösung:

100g Guanidiniumisothiocyanat

120 ml DEPC Wasser

5,3 ml 1M Natriumcitrat pH 7,0

10,6 ml 10% N-Laurylsarkosin

- DEPC Wasser:

1 Liter A. dest + 1 ml DEPC in einer sterilen 1L Schottflache ansetzen, über Nacht mit leicht aufgedrehtem Deckel im Abzug schütteln, dann autoklavieren.

- β-Mercaptoethanol

Es wurden 1×10^6 bis $1,5 \times 10^6$ ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Gegebenfalls wurden die Zellen mit 4-OHT oder mit TSA behandelt und weitere 24 h inkubiert. Um die Zellen zu ernten, wurde zunächst das Medium abgesaugt, die Zellkulturschale (60mm) einmal vorsichtig mit kaltem A. dest. gewaschen und das A.dest. umgehend abgesaugt. Pro Zellkulturschale wurde 0,5ml Guanidinisothiocyanatlösung (mit 72µl β-Mercaptoethanol/10ml Guanidinisothiocyanatlösung) zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst, die Suspension vollständig in ein Eppendorfgefäß überführt und 3 x durch eine 22G 1 1/2 Kanüle auf und abgezogen. Im direktem Anschluß folgte eine Phenol-Chloroform Extraktion. Hierzu wurde pro 0,5ml Suspension 50µl 2M Na-Acetat (pH4,0) zugegeben, kurz gevortext, dann 1 Volumen Phenol-Chloroform zupipetiert und erneut gut gevortext. Die Proben wurden 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 4°C und 9500 x g wurde die wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein frisches, RNase freies Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgte mit 600µl Isopropanol über Nacht bei -20°C. Zum Schluß wurde die RNA Suspension für 20 min bei 16060 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 0,5 ml 70%

Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und in DEPC Wasser gelöst und bei -80°C aufbewahrt (Methode nach Chomocynski *et al.*, 1987).

3.7.3 Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei dieser Methode erfolgt zuerst die cDNA-Erststrangsynthese (reverse Transkription) mit RNA als Template. Danach wird die gebildete cDNA in der PCR-Reaktion als Template eingesetzt. Die RT-PCR wurde nach dem Standardprotokoll zur MuLV-Transkriptase der Firma MBI Fermentas (# EP0441) durchgeführt. Die hier verwendeten Random-Hexamer-Primer wurden von der Firma Gibco (# 48190-011) bezogen. Die RT-PCR-Reaktionen wurden im „Eppendorf Mastercycler Gradient“ unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle : Zusammensetzung eines 20 µl Ansatzes

1,5 µl	RNA
1 µl	Random Primer
8.5 µl	DEPC-H ₂ O
→	Inkubation bei 70°C für 10 min, auf Eis abkühle lassen
→	Auf EIS abkühlen lassen
4 µl	5 x M-MuLV Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 250 mM KCl, 20mM MgCl ₂ , 50 mM DTT)
2 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	M-MuLV Reverse Transcriptase [200 U]
0,5 µl	RNase Inhibitor
1,5 µl	DEPC-H ₂ O
	Inkubation bei 20°C für 10 min
→	Inkubation bei 37°C für 59 min
→	Inkubation bei 95°C für 5 min
→	Abkühlen auf 4°C für 10 min

Von der erhaltenen cDNA wurden 2 µl in PCR einsetzen und die verbleibende cDNA bei -80°C gelagert.

3.7.4 Isolation zytoplasmatischer RNA für Affimetrix-Chip Assay

Die RNA wurde nach dem Protokoll des Qiagen RNeasy Midi Kit (# 75142) präpariert.

3.7.5 Affimetrix Chip Assay

Der Affimetrix Chip Assay wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Franc Schuit (Catholic University of Leuven, Belgium) durchgeführt.

Der DNA „*microarray*“ erlaubt eine Genom-umfassende Analyse der Genexpression. Auf einem *microarray* (oder auch GenChip genannt) befinden sich mehrere tausend bekannte Sequenzen des Genoms eines bestimmten Organismus. Um die Genom-umfassende Analyse der Genexpression unter bestimmten Bedingungen untersuchen zu können, muss zunächst die Gesamt-RNA isoliert werden. Die RNA wird über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und dabei mit einem Farbstoff markiert. Die markierten Fragmente werden mit dem GenChip hybridisiert, wobei die cDNA Fragmente spezifisch die jeweilige komplementäre Gensequenz auf dem Chip binden. Anschließend wird die Intensität des Markersignals mit Hilfe eines Lasers gemessen und mit der entsprechenden Software ausgewertet. Die in dieser Arbeit verwendeten GenChips wurden von der Firma Affymetrix (Santa Clara/Kalifornien) hergestellt.

3.8 Proteine

3.8.1 Extraktion von Kernproteinen aus eukaryontischen Zellen

Puffer A:

10 mM HEPES, pH 7,9
10 mM KCl
0,1 mM EDTA
0,1 mM EGTA
1 mM DTT
0,5 mM PMSF

Puffer B:

20 mM HEPES, pH 7,9
0,4 M NaCl
1 mM EDTA
1 mM EGTA
1 mM DTT
1 mM PMSF

Die Präparation der zytoplasmatischen- und Kernproteine wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Gerber et al. (1992) durchgeführt. $4-5 \times 10^6$ Zellen wurden geerntet, mit 1xPBS gewaschen und in Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Nach 15 sec Zentrifugation bei $16060 \times g$ wurde der Überstand abpipettiert und das Zellpelett in 400 µl Puffer A resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis wurden 25 µl 10% Nonidet (in 1xPBS) hinzugegeben und gut gemischt. Durch die anschließende Zentrifugation der Proben für 30 sec bei $16060 \times g$ konnte der Überstand, der die zytoplasmatischen Proteine enthielt, in

ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt werden. Das verbleibende Kernpellet wurde in 50 µl eiskaltem Puffer B aufgenommen und für 15 min bei 4°C inkubiert und ab und zu gevortext. Nach der Zentrifugation für 1 min bei 16060 x g und 4°C konnte der Überstand, der die Kernproteine enthielt, in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt werden. Anschließend konnte die Konzentration der Proteinfractionen bestimmt werden oder die Proben wurden sofort in SDS-STOP-Puffer gesichert.

- Zusammensetzung SDS-STOP-Puffer (Stocklösung):

125mM Tris/HCL, pH6,8

3mM EDTA

20% (v/v) Glycerol

9% SDS

0,05% Bromphenolblau

Vor Gebrauch wurden 9 Vol SDS-STOP-Puffer mit 1 Vol β-Merkaptoethanol vermischt.

3.8.2 Proteingehaltsbestimmung

Zur Proteingehaltsbestimmung wurde das Protokoll und die Lösungen des BCL-System von Pierce eingesetzt.

3.8.3 Denaturierende diskontinuierliche Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt mittels Gelelektrophorese in denaturierenden Polyacrylamidgelen (SDS-Gelen) mit unterschiedlichen Konzentrationen. Ein SDS-Gel besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Das Trenngel wurde zuerst in eine Minigelkammer gegossen und mit Wasser überschichtet, um eine scharfe Gelfront zu erhalten. Nachdem das Gel auspolymerisiert hatte, wurde das Wasser abgeschüttet, das Sammelgel gegossen und ein Gelkamm eingesetzt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteinproben mit 5 µl SDS-Stop-Puffer (9 Vol. SDS-Stop-Puffer (Stocklösung), 1 Vol. β-Mercaptoethanol) versetzt und für 5 min bei 95°C gekocht und bis zum Probenauftrag auf Eis gelagert. Für den Gellauf wurde 1x SDS-Laufpuffer (250mM Tris/HCL, pH8,3 / 2,5M Glycin / 1% SDS) verwendet. Solange sich die Proben im Sammelgel befanden wurde eine Spannung von 60V angelegt, sobald die Proben sich im Trenngel befanden wurde die Spannung auf 80V erhöht. Als Marker wurde der Prestained Protein Molecular Weight Marker (MBI Fermentas # SM0441) verwendet.

- Zusammensetzung des 10%igen Trenngel:

4 ml H₂O
3,3 ml 30% Acryl-Bisacrylamid Mix
2,5 ml 1,5M Tris pH8,8
0,01 ml 10% SDS
0,01 ml Ammonium Persulfat
0,002 ml TEMED

- Zusammensetzung des Sammelgel:

2,1 ml H₂O
0,5 ml 30% Acryl-Bisacrylamid Mix
0,38 ml 1,5M Tris pH8,8
0,003 ml 10% SDS
0,003 ml Ammonium Persulfat
0,0002 ml TEMED

3.8.4 Western Blot von SDS-Gelen

Nach der Auftrennung der Proteine im SDS-Gel wurden diese im Flüssigtransfer-Verfahren in einer Blottingapparatur (Hofer Scientific Instruments, San Francisco) bei einer Stromstärke von 400 mA und einer Laufzeit von etwa 120 min auf eine Nitrocellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Schleicher und Schüll, Dassel) übertragen. Für den Transfer wurde ein „Sandwich“ luftblasenfrei aus einem Schwamm, drei Lagen aus 3MM-Wattman-Papier, der Nitrocellulose-Membran, dem SDS-Gel, erneut drei Lagen 3MM-Wattman-Papier und einem Schwamm in die mit Transferpuffer befüllte Transferkammer gespannt. Die Membran war zu der Anoden- und das SDS-Gel zu der Kathodenseite orientiert.

- Zusammensetzung des Transferpuffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% SDS (w/v)
10% Methanol (v/v)

3.8.5 Immunologische Nachweis von Proteinen

Der Immunologische Nachweis von Proteinen wurde exakt nach der Vorschrift von Sigma Anti-Flag M2 Monoclonal Antibody durchgeführt.

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

Primärantikörper:

α FLAG-M2: (Sigma # F3165) Dieser Primärantikörper wurde in der Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

Sekundärantikörper:

Anti-Maus IgG ist ein polyklonaler Antikörper, der von der Firma Sigma (# A-4416) bezogen und in einer Verdünnung von 1:20.000 eingesetzt wurde.

Zum Nachweis des entstandenen Komplexes aus nachzuweisendem Protein, Primär- und Sekundärantikörper wurde das ECL^{Plus}-System (Firma Amersham Biosciences, Buckinghamshire) verwendet. Hierzu wurde 1 ml der ECLplus-Gebrauchslösung gleichmäßig auf der Nitrocellulose-Membran verteilt und 5 min inkubiert. Die Gebrauchslösung setzt sich wie folgt zusammen: 40 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B (ECLplus-Kit). Danach wurde die Membran mit Whatman-3MM-Papier abgetupft und unmittelbar danach wurde die durch die Peroxidase katalysierte Chemilumineszenz durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

4. Ergebnisse

Der Transkriptionsfaktor REST ist ein Repressor neuronaler Gene in nicht-neuronalem Gewebe (Chong *et al.*, 1995; Schoenherr *et al.*, 1995). Die Rolle von REST besteht darin, die Expression neuronaler Gene auf das zentrale Nervensystem (ZNS) zu beschränken, indem es diese Gene in nicht-neuronalen Zellen reprimiert.

Bisher wurden nur wenige durch REST regulierte Gene experimentell genauer untersucht. Hierzu zählen Gene, die für Synapsin I, den *Brain-derived Neurotrophic Faktor* (BDNF), den spannungsabhängigen Natriumkanal Typ II (*NaV.1.2*) und den Glutamat-Rezeptor 2 (*GluR2*) kodieren. Lietz *et al.* (1998) konnte zeigen, dass in menschlichen Neuroblastomazellen ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression des REST-regulierten Gens *Synapsin I* und der Expression des *REST*-Gens besteht, wobei eine erhöhte Konzentration von REST mit einer erniedrigten Konzentration des Vesikelproteins Synapsin I einher geht und umgekehrt. Synaptophysin, ein weiteres Vesikelprotein, wird während der neuronalen Differenzierung zeitgleich mit dem *Synapsin I*-Gen exprimiert (Knaus *et al.*, 1986, LeClerc *et al.*, 1989). Die Hemmung der Histon-Deacetylasen mit dem Inhibitor Trichostatin A in P19 Teratocarcinoma-Zellen resultierte in der Expression der beiden Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* (Lietz *et al.*, 2003), was auf eine Histon-Deacetylase-abhängige Expression beider Gene hinweist. Daraus lässt sich schließen, dass die Regulation des *Synapsin I*-Gens und des *Synaptophysin*-Gens möglicherweise über den gleichen Mechanismus erfolgt.

Ein Ziel dieser Studie war es, die Regulation des *Synaptophysin*-Gens in unterschiedlichen Zellsystemen zu analysieren und weitere Gene zu identifizieren, die durch den Transkriptionsfaktor REST reguliert werden.

4.1 Regulation der *Synaptophysin*-Genexpression

4.1.1 Eine REST-Bindestelle ist im ersten Intron des *Synaptophysin*-Gens vorhanden

Aus bereits publizierten Daten zum *Synaptophysin*-Gen der Ratte (transiente Transfektionen, DNA-Protein-Bindungsexperimente von Schoenherr *et al.*, 1996) konnte geschlossen werden, dass das *Synaptophysin*-Gen der Ratte durch REST reguliert wird. Die REST-Bindestelle NRSE des *Synaptophysin*-Gens der Ratte ist im ersten Intron lokalisiert. Die NRSE Sequenz ist

speziesübergreifend hoch konserviert (Schoenherr *et al.*, 1996). Ein Sequenzvergleich zeigte, dass im ersten Intron des menschlichen *Synaptophysin*-Gens ebenfalls ein NRSE vorhanden ist und mit dem der Ratte zu 100% identisch ist (Lietz *et al.*, 2003). Ein Vergleich der NRSE Sequenzen ist in Abb. 8 angegeben. Zudem wird ersichtlich, dass die regulatorische Sequenz aus dem menschlichen *Synapsin I*-Gens nur drei abweichende Nukleotide zum NRSE aus dem *Synaptophysin*-Gen aufweist.

TTCAGCACCGGACAGCGCC	Konsensussequenz
TTCAGCACCGCGGACAGTGCC	Synapsin I NRSE
TCCAGCACCGTGGACAGAGCC	Synaptophysin NRSE (Mensch)
TCCAGCACCGTGGACAGAGCC	Synaptophysin NRSE (Ratte)

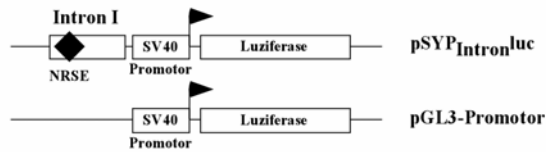
Abb. 8: Sequenzvergleich des NRSE aus dem *Synaptophysin*-Gens mit dem NRSE aus dem *Synapsin I*-Gen
Vergleich der NRSE-Konsensussequenz (nach Schoenherr *et al.*, 1996) mit dem NRSE des menschlichen *Synapsin I*-Gens, dem NRSE des menschlichen *Synaptophysin*-Gens (Accession Nr: U93305) und dem NRSE des *Synaptophysin*-Gens der Ratte.

Transfektionsexperimente sollten zunächst klären, ob das NRSE des menschlichen *Synaptophysin*-Gens regulatorisch funktionell ist. Hierzu wurde das Reporterplasmid pSYP_{Intron}luc verwendet, welches das NRSE aus dem ersten Intron des menschlichen *Synaptophysin*-Gens, den SV40-Promotor und die kodierende Sequenz des Luziferasegens (luc) enthält. Da die REST-Bindestelle unabhängig zur Lokalisation innerhalb der Transkriptionseinheit funktionell ist (Thiel *et al.*, 1998), konnte die intronische Sequenz 5' zum SV40 Promotor inseriert werden (siehe Abb. 9A). Als Kontrollplasmid wurde der Vektor pGL3-Promotor eingesetzt, der lediglich den SV40-Promotor und die kodierende Sequenz des Luziferasegens enthält. Als Expressionsplasmide dienten entweder pCMVFLAG-REST, pCMVFLAG-DP-REST oder pCMVmyc-REST4. Diese Plasmide kodieren für FLAG-REST, für die dominant-positive (DP) REST-Mutante FLAG-DP-REST, und für myc-REST4, eine neuronspezifische Splicevariante von REST. Die modulare Struktur von FLAG-REST, FLAG-DP-REST und myc-REST4 sind in Abb. 9B dargestellt. Michael Lietz konstruierte und analysierte die dominant-positive Form von REST (DP-REST), welche aufgrund einer starken Aktivator-domäne die Transkription von REST-regulierten Reportergen zu aktivieren vermag. DP-REST besteht aus der DNA-Bindedomäne von REST, bindet also die gleiche Erkennungssequenz auf der DNA. Die Repressordomänen

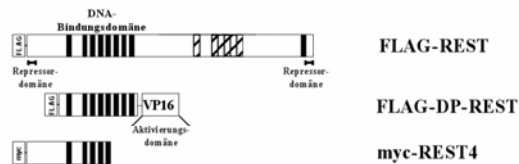
wurden deletiert und die starke Aktivator-domäne des Herpes Simplex Virus Proteins VP16 an die DNA-Bindedomäne fusioniert. Die Fähigkeit von DP-REST, an DNA zu binden und die Transkription zu aktivieren, wurde mehrfach in Transfektionsexperimenten gezeigt (Lietz *et al.*, 2001, 2003; Magin *et al.*, 2002). myc-REST4 besteht aus der N-terminalen Repressordomäne von REST und den ersten fünf der acht Zinkfinger, sowie einem myc-Epitop am N-terminus (Magin *et al.*, 2002). Da REST4 weder ein transkriptioneller Repressor ist, noch die Dereprimierung von REST-Zielgenen bewirkt (Magin *et al.*, 2002; Gurolla-Diaz *et al.*, 2003), wurde myc-REST4 als Negativkontrolle eingesetzt.

Je eines der Reporterplasmide pSYP_{Intron}luc oder pGL3-Promotor, sowie je eines der Expressionsplasmide pCMVFLAG-REST, pCMVFLAG-DP-REST oder pCMVmyc-REST4 wurden in die menschliche Neuroblastomazelllinie NS20Y transfiziert. Als Kontrollplasmid diente der Vektor pCMV5. Um Unterschiede in der Transfektionseffizienz auszugleichen, wurde das Referenzplasmid pRSV β , welches das β -Galaktosidase kodierende Gen enthält, kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellextrakte präpariert und durch Messung der Lichteinheiten und der β -Galaktosidaseeinheiten analysiert. Die transiente Transfektion der beiden Reporterplasmide pSYP_{Intron}luc und pGL3-Promotor (Abb. 9C und 9D) führte in den NS20Y-Zellen zu einer basalen relativen Luziferaseaktivität. Die Kotransfektion des Reporterplasmids pSYP_{Intron}luc mit dem Expressionsplasmid pCMVFLAG-REST hatte eine deutliche Reduktion der relativen Luziferaseaktivität zur Folge. Im Gegensatz dazu konnte die relative Luziferaseaktivität durch Kotransfektion des Expressionsplasmids pCMVFLAG-DP-REST aufgrund der transkriptionellen Aktivator-domäne, in der von dem Plasmid kodierten Transkriptionseinheit, deutlich erhöht werden. Die Kotransfektion des Expressionsplasmids pCMVmyc-REST4 zeigte weder eine Reduzierung noch eine Erhöhung der relativen Luziferaseaktivität (Abb. 9C). Die Expression von FLAG-REST, FLAG-DP-REST und myc-REST4 hatten keinen Einfluss auf das Reporterplasmid pGL3-Promotor (Abb. 9D). Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass die Genexpression des *Synaptophysin*-Gens über das NRSE im ersten Intron reguliert wird.

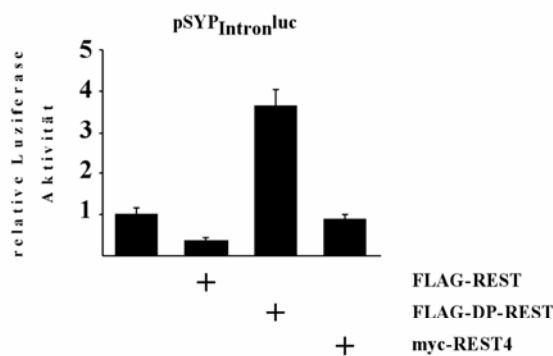
A Reporterplasmide



B



C



D

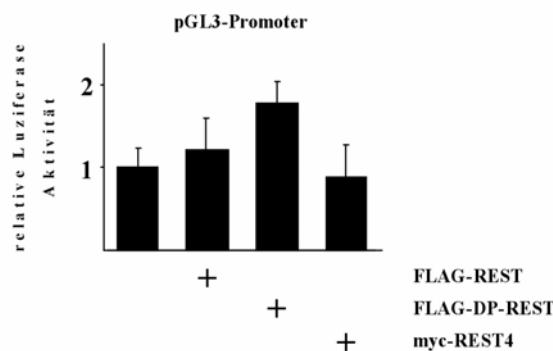


Abb. 9: Funktionelle Aktivität des NRSE aus dem ersten Intron des *Synaptophysin*-Gens

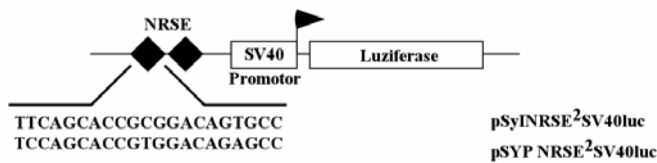
(A) Dargestellt sind die Reporterplasmide pSYP_{Intron}luc und pGL3-Promotor. Das Reporterplasmid pGL3-Promotor enthält den SV40-Promotor und die kodierende Sequenz des Luziferasgens (luc). Das Reporterplasmid pSYP_{Intron}luc enthält zusätzlich das intronische NRSE des menschlichen *Synaptophysin*-Gens. (B) Moduläre Struktur von REST, DP-REST und REST4. Ein FLAG-Epitop ist am N-Terminus von REST vorhanden. DP-REST enthält die REST DNA-Bindedomäne und die Aktivierungsdomäne des VP16 Proteins aus dem Herpes Simplex Virus. Zusätzlich sind ein FLAG-Epitop und eine Kernlokalisationssequenz (NLS) am N-Terminus vorhanden. myc-REST4 enthält die ersten fünf Zinkfinger der DNA-Bindedomäne, sowie ein myc-Epitop am N-Terminus (C) Bestimmung der relativen Luciferaseaktivität in NS20Y, welche mit dem Reporterplasmid pSYP_{Intron}luc (1 µg/Platte) oder (D) dem Vektor pGL3-Promotor (1 µg/Platte) transfiziert wurden. Zusätzlich wurde eines der Expressionsplasmide pCMVFLAG-REST (100ng/Platte), pCMVFLAG-DP-REST (100ng/Platte), pCMVmycREST4 (100ng/Platte) oder der Vektor pCMV5, sowie das Referenzplasmid RSVβ (0,5µg/Platte) welches das für die β-Galaktosidase kodierende Gen enthält, in die NS20Y-Zellen kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellextrakte präpariert und die Luciferase-, sowie die β-Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Daten zeigen das Verhältnis zwischen der Luciferaseaktivität (Lichteinheiten) relativiert auf die β-Galaktosidaseaktivität (OD Einheiten), die in den Zellextrakten bestimmt wurden.

4.1.2 Funktioneller Vergleich der REST-Bindestelle NRSE aus dem *Synapsin I*- und dem *Synaptophysin*-Gen

Ein Vergleich der REST-Bindestelle NRSE aus dem *Synapsin I*-Gen mit der des *Synaptophysin*-Gen wies Unterschiede innerhalb der Nukleotidsequenz der beiden NRSE auf (Abb. 8). Um die regulatorische Funktion der NRSEs aus beiden Genen zu vergleichen, wurden die Reporterplasmide pSYPNRSE²SV40luc und pSyINRSE²SV40luc verwendet (Lietz *et al.*, 2003), die entweder zwei NRSE-Kopien aus dem *Synaptophysin*-Gens (pSYPNRSE²SV40luc) oder zwei NRSE-Kopien aus dem *Synapsin I*-Gens (pSyINRSE²SV40luc) enthalten (Abb. 10A). Darüber hinaus bestehen diese Reporterplasmide aus dem SV40-Promotor und der kodierenden Region des Luziferasegens (luc). Als Expressionsplasmide wurden pCMVFLAG-REST, pCMVFLAG-DP-REST sowie pCMVmyc-REST4 eingesetzt. Die Neuroblastomazelllinie NS20Y wurde mit dem Reporterplasmid pSYPNRSE²SV40luc oder pSyINRSE²SV40luc, dem Expressionsplasmid pCMVFLAG-REST, pCMVFLAG-DP-REST oder pCMVmyc-REST4, sowie dem Referenzplasmid RSV β transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellextrakte präpariert und durch Messung der Lichteinheiten und der β -Galaktosidaseeinheiten analysiert. Die Transfektion der Reporterplasmide führte zu einer basalen relativen Luziferaseaktivität (Abb. 10B). Die gleichzeitige Expression von FLAG-REST resultierte in einer deutlichen Reduktion der relativen Luziferaseaktivität (Abb. 10B, oben zweiter Balken). Im Gegensatz dazu wurde durch Kotransfektion des Expressionsplasmids pCMVFLAG-DP-REST die relative Luziferaseaktivität stark erhöht (Abb. 10B, unten zweiter Balken). Die Kotransfektion des Plasmids pCMVmyc-REST4 zeigte weder eine Aktivierung noch eine Reprimierung der Transkription des Reportergens. Die Reduktion bzw. Aktivierung der relativen Luziferaseaktivitäten zeigten keinen Unterschied zwischen den beiden Reporterplasmiden pSYPNRSE²SV40luc und pSyINRSE²SV40luc.

Diese Daten machen deutlich, dass beide NRSE die gleiche funktionelle Aktivität besitzen und als REST-Bindestelle für die Regulation der Gene *Synaptophysin* und *Synapsin I* fungieren.

A Reporterplasmide



B

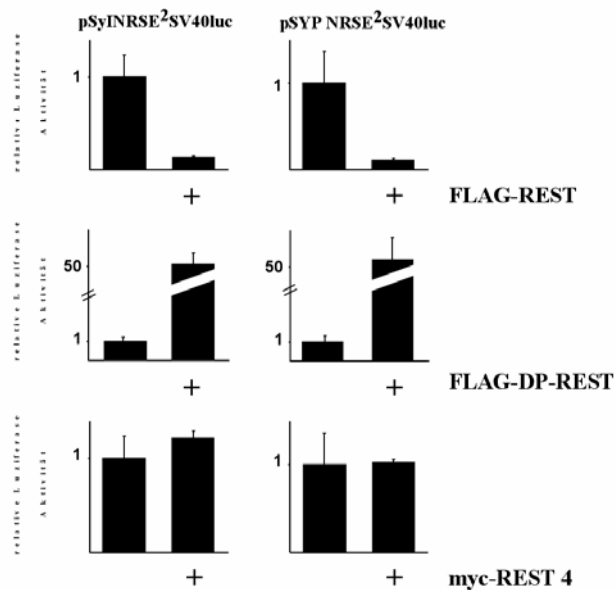


Abb. 10: Funktioneller Vergleich der REST-Bindestelle NRSE aus dem *Synapsin I*- und dem *Synaptophysin*-Gen

(A) Die beiden Reporterplasmide enthalten den SV40-Promotor und die kodierende Sequenz des Luziferasegens (luc). Zusätzlich wurden proximal zwei NRSE aus dem *Synapsin I*-Gen (pSyINRSE²SV40luc) oder dem *Synaptophysin*-Gen (pSYPNRSE²SV40luc) inseriert. (B) Je eins der Reporterplasmide pSyINRSE²SV40luc (2µg/Platte) oder pSYPNRSE²SV40luc (2µg/Platte), und je eines der Expressionsplasmid pCMVFLAG-REST (100ng/Platte), pCMVFLAG-DP-REST (100ng/Platte) oder pCMVmyc-REST4 (100ng/Platte), sowie das Referenzplasmid RSVβ (1µg/Platte), welches das für die β-Galaktosidase kodierende Gen enthält, wurden in NS20Y Zellen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellextrakte präpariert und die Luziferase-, sowie die β-Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Daten zeigen das Verhältnis zwischen der Luziferaseaktivität (Lichteinheiten) relativiert auf die β-Galaktosidaseaktivität (OD Einheiten), die in den Zellextrakten bestimmt wurden.

4.2 Analyse der Genexpression von *REST* und seiner Zielgene in unterschiedlichen Zelllinien

Neuronalen Gene, wie beispielsweise *Synapsin I* und *Synaptophysin* werden nicht nur in neuronalen und neuroendokrinen Zellen exprimiert, sondern auch in endokrinen, Insulin produzierenden β-pankreatischen Zellen (Atouf *et al.*, 1997; Navone *et al.*, 1986; Thomas-

Reetz *et al.*, 1993) und wird auf die niedrige endogene REST-Konzentration in diesen Zellen zurückgeführt (Atouf *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2003; Abderrahmani *et al.*, 2001; 2004).

In dieser Arbeit wurden die Gene *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF* (*brain-derived neurotrophic factor*) und *GluR2* (Glutamat-Rezeptor 2) in neuronalen, neuroendokrinen und pankreatischen Maus-Zellen auf ihre Expression hin untersucht. Wir konnten bereits zeigen, dass das menschliche *Synaptophysin*-Gen eine funktionelle REST-Bindestelle im ersten Intron besitzt (Lietz *et al.*, 2003). *Secretogranin II*, ein weit verbreitetes Protein in sekretorischem Granula, wird genau wie *Synaptophysin* in neuronalen und neuroendokrinen Zellen exprimiert. Ebenso gibt es Hinweise darauf, dass das *Secretogranin II*-Gen eine potentielle REST-Bindestelle aufweist und somit als REST-Zielgen in Frage kommt (Roopra *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2004). Das *Connexin36*-Gen kodiert ein *gap-junction* bildendes Protein, welches in pankreatischen Zellen exprimiert wird. Das *Connexin36*-Gen enthält eine REST-Bindestelle in der 5' untranslatierten Region. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von REST in β -Zellen zu einer Abnahme des *Connexin36* mRNA-Level in der Zelle führte (Martin *et al.*, 2003). *BDNF* (*brain-derived neurotrophic factor*) ist ein Neurotrophin, welches für das Überleben von Neuronen essentiell ist. Das *BDNF*-Gen wird über eine palindromische REST-Bindestelle im Promotor II reguliert (Timmusk *et al.*, 1999; Zuccato *et al.*, 2003). Die Untereinheit des Glutamat Rezeptors 2 (*GluR2*) wird in Neuronen und im ZNS exprimiert. *GluR2* kontrolliert die Ca^{2+} -Permeabilität des AMPA-Glutamat Rezeptors. Das *GluR2*-Gen enthält eine REST-Bindesequenz in der proximalen Promotorregion (Myers *et al.*, 1998).

In dieser Studie wurde zuerst die Expression des *REST*-Gens und seiner Zielgene in der Neuroblastomazelllinie SN56, der Hypophysenzelllinie AtT20, den pankreatischen Zelllinien α TC1-9 und β TC3 und der Fibroblastenzelle LMTK⁻ analysiert und miteinander verglichen. Als Kontrolle wurde die Expression des *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase*-Gens (*GAPDH*) analysiert, da dieses Gen ubiquitär exprimiert wird.

Die zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde aus AtT20, SN56, LMTK⁻, α TC1-9 und β TC3 präpariert und mit spezifischen, radioaktiv markierten cRNA-Sonden, den sog. „Riboprobes“ gegen die mRNA der Gene *REST*, *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF* und *GluR2* hybridisiert und mit Hilfe des RNase Schutzexperimentes (siehe Material und Methoden 3.7.1) analysiert. Als Kontrollen dienten Gene, die nicht durch REST reguliert werden. Es wurden spezifische Riboprobes gegen die mRNA des *GAPDH*-Gens und gegen die mRNA des *p21^{WAF/CIP}*-Gen, welches für den Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitor kodiert. Aus Abb. 11 wird ersichtlich, dass die Genexpression von *REST* am stärksten in der

Fibroblastenzelle LMTK⁻ war, wohingegen in der neuronalen Zelllinie SN56 und der Hypophysenzelllinie AtT20 eine nur geringe Expression des *REST*-Gens detektiert werden konnte. Eine Expression des *REST*-Gens konnte in den pankreatischen α - und β -Zellen nicht detektiert werden.

Das Expressionsmuster der Gene *Synaptophysin* und *Secretogranin II* zeigte deutlich, dass beide Gene in den neuronalen, neuroendokrinen und pankreatischen Zellen exprimiert wurden, jedoch nicht in den Fibroblastenzellen. Der höchste Level an *Synaptophysin*-mRNA konnte in der neuronalen Zelllinie SN56 gemessen werden. *Secretogranin II* wurde stark in AtT20 und den pankreatischen α TC1-9 exprimiert, und weniger stark in SN56 und der Pankreaszelllinie β TC3. *Connexin36*-Gentranskripte konnten nur in den pankreatischen Zellen nachgewiesen werden, wodurch eine pankreas-spezifische Expression des *Connexin36*-Gens bestätigt wird (Martin *et al.*, 2003). *BDNF*- bzw. *GluR2*-mRNA wurde in keiner der fünf analysierten Zelllinien detektiert. Die für *GAPDH* und *p21*^{WAF/CIP} kodierenden Gene, wurden in allen Zellen etwa gleich stark exprimiert.

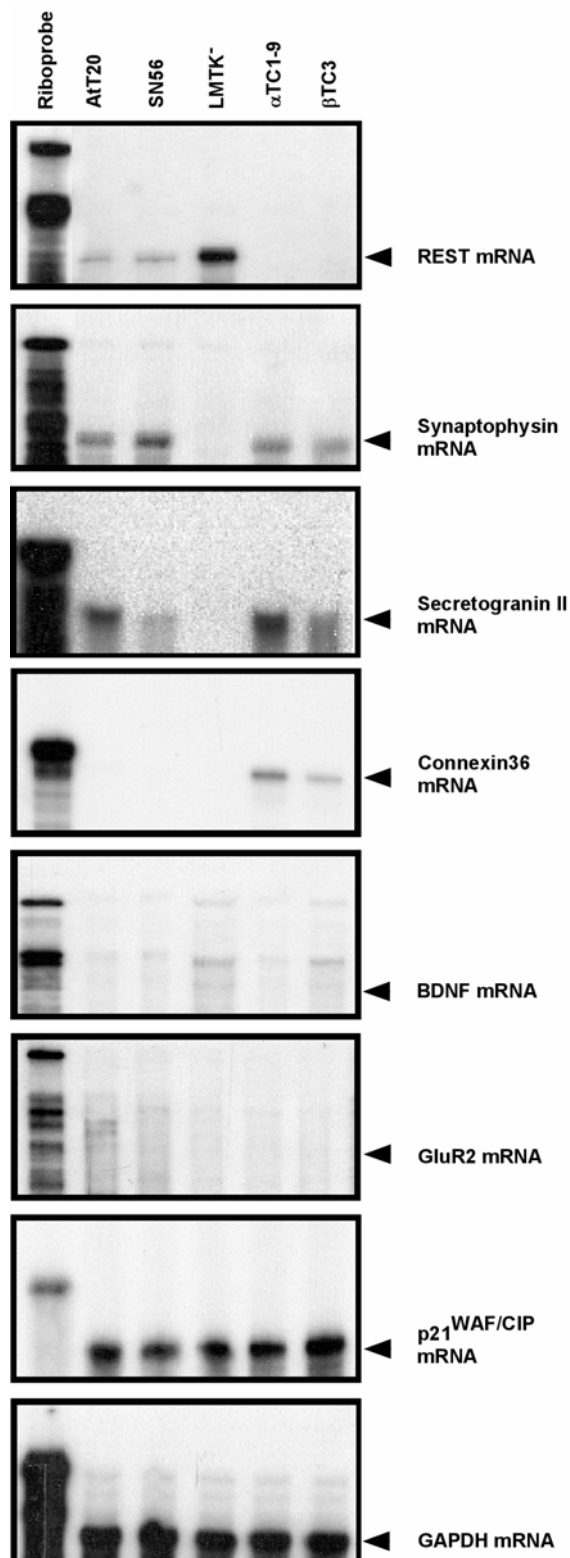


Abb. 11: Genexpression von *REST* und *REST*-Zielgenen

Die zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde aus den Zelllinien SN56, AtT20, αTC1-9, βTC3 und LMTK⁻ präpariert und mit Hilfe des RNase Schutzexperimentes unter Verwendung von spezifischen cRNA-Sonden gegen die mRNA von *REST*, *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF*, *GluR2*, *p21^{WAF/CIP}* und *GAPDH* hybridisiert und analysiert. Hierzu wurden 20µg zytoplasmatische Gesamt-RNA für die Analyse der Genexpression von *REST*, *Synaptophysin*, *Secretogranin II* und *Connexin36*, sowie 40µg zytoplasmatische Gesamt-RNA zur Analyse der Genexpression von *BDNF* und *GluR2* und 2,5µg zytoplasmatische Gesamt-RNA für das *GAPDH*-Gen eingesetzt.

Um sicherzustellen, dass die spezifische cRNA-Sonde zur Detektion der *BDNF*-mRNA funktionell ist, wurde das Expressionsplasmid pCMVtriBDNF, welches drei Kopien der kodierende Sequenz des *BDNF*-Gens enthält, in die embryonale Nierenzelllinie 293T transfiziert und für 24 h inkubiert. Im Anschluss daran wurde die zytoplasmatische Gesamt-RNA präpariert und die RNA mit der spezifischen cRNA-Sonde gegen die mRNA von *BDNF* hybridisiert und analysiert. Das Ergebnis zeigte, dass die *BDNF*-cRNA-Sonde, welche mit der *BDNF*-mRNA hybridisiert, funktionell war (Abb. 12).

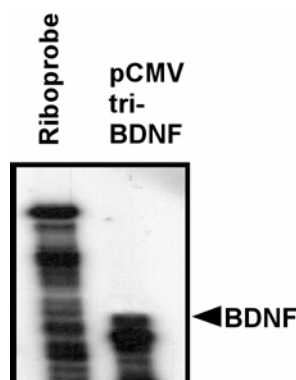


Abb. 12: Test zur Funktionalität der *BDNF*-spezifischen cRNA-Sonde

Das Expressionsplasmid pCMVtriBDNF (1µg/Platte) wurde in 293T-Zellen transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die zytoplasmatische Gesamt-RNA aus der Zelllinien 293T präpariert und mit Hilfe des RNase Schutzexperimentes mit der spezifischen cRNA-Sonde gegen die mRNA des *BDNF*-Gens hybridisiert und analysiert. Hierzu wurden 20 µg zytoplasmatische Gesamt-RNA für die Analyse der *BDNF* -mRNA eingesetzt.

4.3 Analyse der Genexpression REST-regulierter Gene durch Hemmung der Histon-Deacetylasen mit Trichostatin A (TSA)

REST besitzt zwei Repressordomänen, eine am N-Terminus und die Zweite am C-Terminus (Tapia-Ramirez *et al.*, 1997; Thiel *et al.*, 1998). REST reprimiert die Genexpression durch das Heranführen von Histon-Deacetylasen (HDAC) an die Transkriptionseinheiten seiner Zielgene (Huang *et al.*, 1999; Naruse *et al.*, 1999; Ballas *et al.*, 2001). Diese Arbeitsgruppen zeigten, dass die HDAC-vermittelte Repression durch eine Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) aufgehoben werden konnte. Darüber hinaus konnte von Naruse *et al.* (1999) gezeigt werden, dass die nicht-neuronale Zelllinie NIH-3T3 nach Inkubation mit TSA die neuronalen Gene *SCG10*, *Cholinazetyltransferase (ChAT)* und *N-Methyl-Differenzierung-Aspartat Rezeptor 1 (NMDAR1)* exprimierte.

Die Frage, ob REST die Genexpression seiner Zielgene in jeder Zelllinie über den gleichen Repressionsmechanismus reguliert, soll durch die Inhibition der Histon-Deacetylase mit TSA

in verschiedenen Zellsystemen analysiert werden. Da die Expression von $p21^{WAF/CIP}$ als Trichostatin A sensitiv beschrieben wurde (Sowa *et al.*, 1999), diente dieses Gen als Positivkontrolle. Die Zelllinien wurden 24 h mit Trichostatin A oder dem Lösungsmittel DMSO inkubiert und anschließend die zytoplasmatische Gesamt-RNA präpariert. Die zu analysierende RNA wurde mit Hilfe spezifischer cRNA-Sonden gegen die mRNA der Gene *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF* und *GluR2*, $p21^{WAF/CIP}$ und *GAPDH* hybridisiert und durch RNase Schutzexperimente untersucht. Aus den erhaltenen Daten ging hervor, dass die Expression der Gene *Synaptophysin* und *Secretogranin II* in AtT20, SN56, α TC1-9 und β TC3 durch die Behandlung der Zelllinien mit TSA verstärkt wurde (Abb. 13). Der Expressionslevel des Gens *Synaptophysin* war in AtT20 um etwa das 4-fache erhöht, der *Secretogranin II*-mRNA Level stieg in AtT20, SN56, α TC1-9 und β TC3 um das 2-2.5-fache. Die Expression des *Connexin36*-Gens blieb weiterhin auf die pankreatischen α - und β -Zellen beschränkt. Hier erhöhte sich der *Connexin36*-mRNA Level um das 3.5 bis 4-fache. Die Inhibition der Histon-Deacetylasen war jedoch nicht ausreichend, um die Expression des *Connexin36*-Gens in den neuronalen SN56-Zellen oder der Hypophysenzelle AtT20 zu induzieren. Auch konnte die Expression der Gene *BDNF* und *GluR2* in keiner der untersuchten Zelllinien durch TSA dereprimiert werden.

Dies gab einen Hinweis darauf, dass weder die endogene Konzentration von REST, noch die Aktivität der Histon-Deacetylasen eine Rolle bei der Regulation der Genexpression von *BDNF* und *GluR2* spielen. Die Inhibition der Histon-Deacetylasen zeigte keinerlei Derepression der Gene *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF* oder *GluR2* in den LMTK⁻ Fibroblasten, was darauf schließen lässt, dass diese Gene in LMTK⁻ unabhängig von Histon-Deacetylasen reprimiert werden. Die Expression des Kontrollgens $p21^{WAF/CIP}$ stieg nach der Inkubation mit Trichostatin A in allen Zelllinien um das 2-2.5 fache an (Abb. 13).

Die gewonnenen Daten machen deutlich, dass die Expression der neuronalen Gene *Synaptophysin* und *Secretogranin II* in den neuronalen-, neuroendokrinen-, und endokrinen Zelllinien über Histon-Deacetylasen reguliert werden. Gleiches gilt für das *Connexin36*-Gen, dessen Expression jedoch zelltyp-spezifisch reguliert zu sein scheint und nur auf die pankreatischen Zellen beschränkt ist.

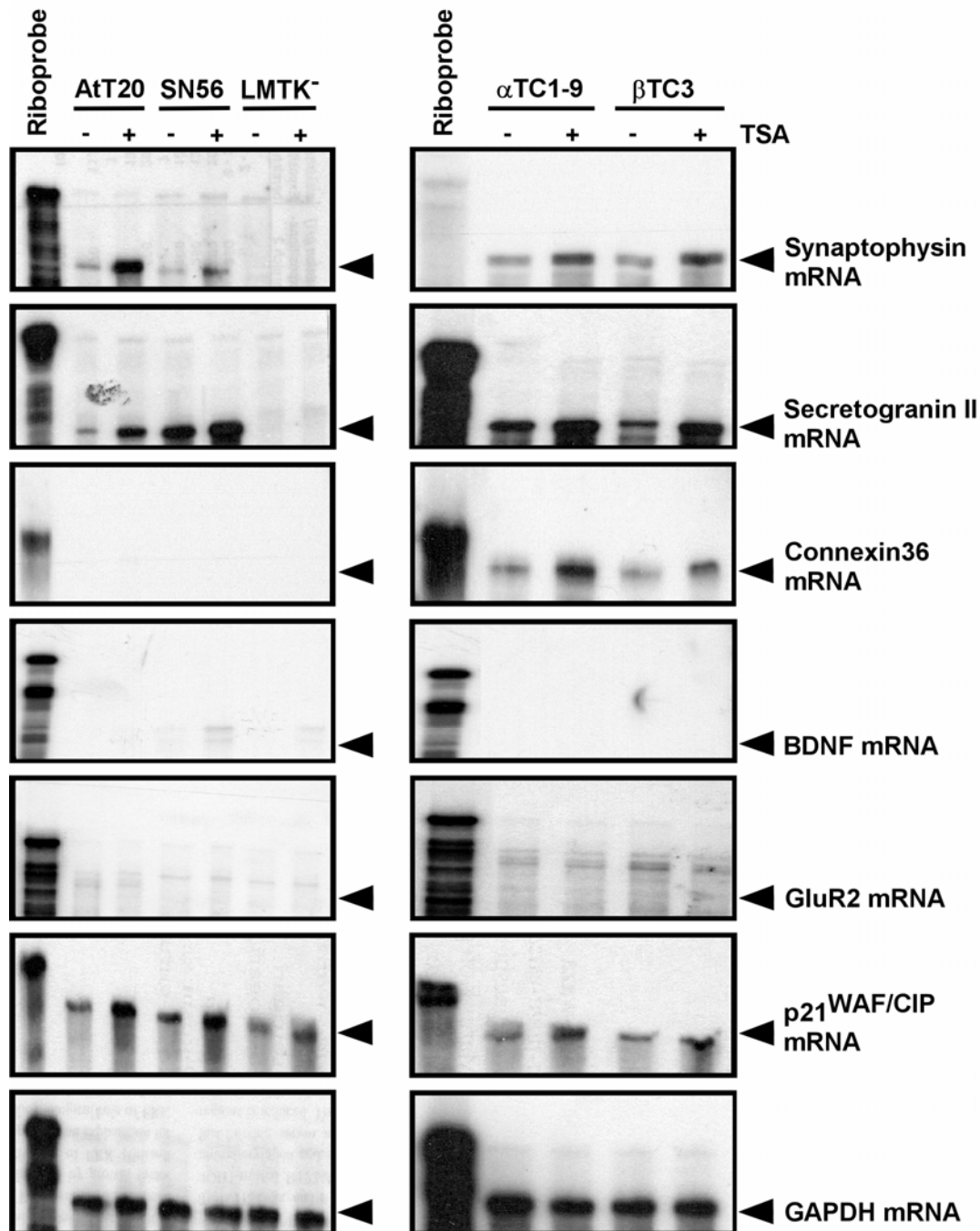


Abb. 13: Gesteigerte Expression von REST-Zielgenen in neuronalen, neuroendokrinen und endokrinen Zellen durch Inkubation mit dem Histon-Deacetylase Inhibitor Trichostatin A (TSA)

Die Zellen wurden ausgesät und über einen Zeitraum von 24 h mit DMSO (-) oder mit Trichostatin A (+) (100 ng/ml Medium) inkubiert. Die zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde aus den unbehandelten und den mit Trichostatin A behandelten Mauszellen präpariert und mit Hilfe des RNase Schutzexperimentes und spezifischen cRNA-Sonden gegen die mRNA der Gene *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF*, *GluR2*, *p21^{WAF/CIP}* und *GAPDH* hybridisiert und analysiert. Hierzu wurden 20µg zytoplasmatische Gesamt-RNA für die Analyse der Genexpression von *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36* und *p21^{WAF/CIP}*, sowie 40µg zytoplasmatische Gesamt-RNA für die Analyse der Genexpression von *BDNF* und *GluR2* und 2,5µg zytoplasmatische Gesamt-RNA für das *GAPDH*-Gen eingesetzt.

4.4 Induzierte Genexpression von REST-Zielgenen

Um die REST-vermittelte, zelltyp-spezifische Regulation der neuronalen Genexpression in verschiedenen Zelllinien besser analysieren zu können, wurde hier die dominant-positive REST-Mutante (DP-REST) verwendet. Das DP-REST-Protein soll nicht nur die REST vermittelte Repression der Transkription aufheben, sondern die Expression der jeweiligen Gene zusätzlich aktivieren. Mittels einer induzierbaren Form von DP-REST, namens DP-REST:ER, die durch Fusion von DP-REST mit der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors (ER) konstruiert wurde, lässt sich der Zeitpunkt der Aktivierung des Proteins frei wählen. Abb. 14A zeigt die modulären Strukturen von REST, DP-REST und DP-REST:ER. Abb. 14B zeigt schematisch den Induktionsmechanismus. Das DP-REST:ER-Protein liegt zunächst inaktiv vor, da in Abwesenheit des Hormons das *heat-shock*-Protein HSP90 an der hormonbindenden Domäne des Östrogenrezeptors bindet und so die Aktivierung der Genexpression REST-regulierter Zielgene verhindert. Durch Zugabe des Hormons kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors, das HSP90 Protein dissoziiert vom Östrogenrezeptor ab und gibt die VP16 Aktivatorodomäne frei. DP-REST:ER kann nun das endogene REST von der DNA-Bindestelle NRSE verdrängen und die Transkription REST-regulierter Gene aktivieren. Die Verwendung der Östrogenrezeptor-Mutante ER^{Tamoxifen} Mutant erlaubt die Verwendung des synthetischen Liganden 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) als aktivierendes Hormon. Eine Mutation in der hormonbindenden Domäne des Östrogenrezeptors (Aminosäureaustausch an Position 525: Glyzin → Arginin) verändert zwar nicht die Affinität des Rezeptors zu 4-OHT, die Affinität zu Östrogen reduziert sich jedoch um das 1000-fache (Littlewood *et al.*, 1995).

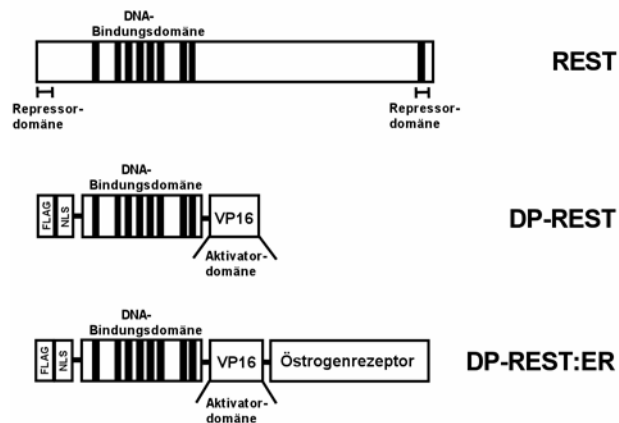
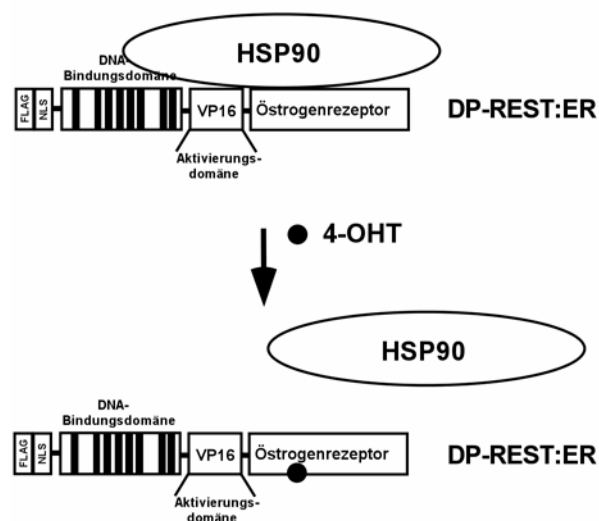
A**B**

Abb. 14: (A) Modulare Struktur von REST, DP-REST und DP-REST:ER und (B) schematische Darstellung der Induktion der dominant-positiven REST-Mutante mit 4-OHT

(A) Die funktionellen Domänen für die DNA-Bindung und die transkriptionelle Repression sind markiert. DP-REST und DP-REST:ER fehlen jeweils die C- und N-terminale Repressordomäne von REST. Die Proteine DP-REST und DP-REST:ER besitzen zusätzlich am N-Terminus die spezifische Erkennungssequenz FLAG und ein Kernlokalisierungssignal (NLS), sowie am C-Terminus die Aktivator-domäne des Herpes Simplex Virus Proteins VP16. DP-REST:ER besitzt zusätzlich die Liganden-Bindedomäne des Östrogenrezeptors. (B) Schematische Darstellung des Aktivierungsmechanismus. DP-REST:ER wird als inaktive Form exprimiert und erst durch die Zugabe von 4-OHT aktiv. In Abwesenheit des Hormonderivats bindet das heat-shock-Protein HSP90 an die hormonbindende Domäne des Östrogenrezeptors und verhindert so die Transkription REST-regulierter Gene. Durch Zugabe von 4-OHT kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors und das HSP90 Protein kann nicht weiter an den Östrogenrezeptor binden. Das DP-REST:ER Protein kann nun die Transkription REST-regulierter Gene aktivieren.

4.4.1 Generierung von Zelllinien, die dauerhaft DP-REST:ER exprimieren

Als erstes wurde die dominant-positive REST-Mutante DP-REST:ER zur Generierung von Zelllinien eingesetzt, die dauerhaft DP-REST:ER exprimieren. Mittels Retroviren wurde die REST-Mutante in die Zelllinien AtT20, SN56, α TC1-9, β TC3 und LMTK⁻ eingebracht. Dazu wurde die kodierende Sequenz von DP-REST:ER in die retroviralen Vektoren pMSCV und pLNCX kloniert und wird im folgendem als pMSCV-DP-REST:ER bzw. pLNCX-DP-REST:ER bezeichnet. pMSCV-DP-REST:ER enthält zusätzlich die kodierende Region des Puromycin-Acetyltransferase-Gens unter der Kontrolle des Phosphoglyzerat-Kinase Promotors (P_{PKG}) und das virale Verpackungssignal ψ ⁺. Die Expression des DP-REST:ER-Proteins steht unter Kontrolle der long terminal repeats (LTR). pLNCX-DP-REST:ER enthält zusätzlich zur cDNA von DP-REST:ER die kodierende Region des Neomycin-Phosphotransferase-Gens unter der Kontrolle des SV40-Promotors und das virale Verpackungssignal ϕ . Die Expression des DP-REST:ER-Proteins steht unter Kontrolle des Zytomegalievirus IE Promotor/Enhancer. Die Konstrukte wurden in die Verpackungszelllinie Phoenix-eco transfiziert und ein Virusstock erzeugt, der anschließend zur Infektion der Zellen benutzt wurde. 72 h nach Infektion wurden die Zellen mit Puromycin (0,75 μ g/ml) bzw. mit G418 (600 μ g/ml) über einen Zeitraum von drei Wochen selektiert und anschließend die resistenten Zellen analysiert. Zur Kontrolle wurden die Zelllinien mit dem Leervektor pMSCV bzw. pLNCX infiziert und analysiert. Die Kernproteine wurden präpariert und mit Hilfe eines Western-Blots immunologisch untersucht. Dazu wurden Antikörper verwendet, die spezifisch gegen das FLAG-Epitop gerichtet sind (Abb. 15).

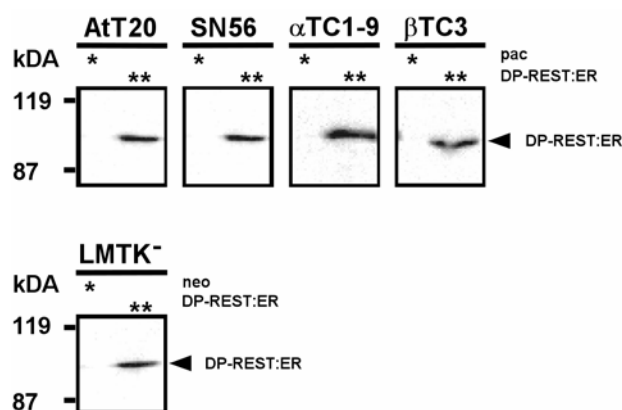


Abb.15: Expression von DP-REST:ER in AtT20-, SN56-, α TC1-9-, β TC3- und LMTK⁻-Zellen

Western-Blot Analyse der präparierten Kernproteine aus AtT20, SN56, α TC1-9, β TC3 und LMTK⁻. Die Proteine wurden mit Hilfe des Anti-FLAG-Antikörpers nachgewiesen. Als Kontrolle wurden solche Zellen analysiert, welche nur den Selektionsmarker Puromycin-Azetyltransferase (pac) bzw. Neomycin-Phosphotransferase (neo) exprimieren.

Das detektierte Protein hat das Laufverhalten eines etwa 100 kDa Proteins im SDS-Gel (Abb. 15) und konnte nur in den Zellen nachgewiesen werden, die mit pMSCV-DP-REST:ER bzw. LNCX-DP-REST:ER infiziert wurden, nicht jedoch in Zellen, die lediglich die Puromycin-Azetyltransferase (pac) bzw. Neomycin-Phosphotransferase (neo) exprimierten. Aus dieser Western-Blot-Analyse geht hervor, dass DP-REST:ER exprimiert wird. Die entstandenen Zelllinien wurden im folgendem AtT20_{DP-REST:ER}, SN56_{DP-REST:ER}, α TC1-9_{DP-REST:ER}, β TC3_{DP-REST:ER} und LMTK_{DP-REST:ER} genannt. Die Kontrollzellen, die den Leervektor beinhalten wurden AtT20_{pac}, SN56_{pac}, α TC1-9_{pac}, β TC3_{pac} und LMTK_{neo} genannt.

4.4.2 Analyse der transkriptionellen Aktivität von DP-REST:ER

Um zu prüfen, ob das dauerhaft exprimierte DP-REST:ER in den Zellen in der Lage ist, REST-regulierte Gene zu aktivieren, wurden zunächst die Reporterplasmide pSYP_{Intron}luc und pSYPNRSE²SV40luc in Transfektionsexperimente eingesetzt. Als Kontrolle diente das Plasmid pGL3-Promotor (siehe auch 4.1.1 und 4.1.2). Je eines der Reporterplasmide pSYP_{Intron}luc oder pSYPNRSE²SV40luc und das Referenzplasmid pRSV β wurden in die DP-REST:ER exprimierenden Zelllinien transfiziert und 24 h nach der Transfektion mit 4-OHT induziert. Nach insgesamt 48 h wurden die Zellextrakte präpariert und durch Messung der Lichteinheiten und der β -Galaktosidaseeinheiten analysiert. Die Ergebnisse der Transfektion sind in Abb. 16 dargestellt. Die Transfektion des Reporterplasids pSYP_{Intron}luc führte nach Zugabe von 4-OHT zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität des Reporterplasids in der Größenordnung von 1.8-fach (AtT20_{DP-REST:ER}-Zellen), 1.9-fach (SN56_{DP-REST:ER}-Zellen), 5.2-fach (α TC1-9_{DP-REST:ER}-Zellen) bzw. 10-fach (β TC3_{DP-REST:ER}-Zellen) (Abb. 16A). Die Transfektion des Reporterplasids pSYPNRSE²SV40luc, welches zwei REST-Bindestellen besitzt, führte zu einer basalen relativen Luziferaseaktivität, die nach Induktion mit 4-OHT um den Faktor 20 (AtT20_{DP-REST:ER}-Zellen), 14.5 (SN56_{DP-REST:ER}-Zellen), 12 (α TC1-9_{DP-REST:ER}-Zellen) bzw. 16 (β TC3_{DP-REST:ER}-Zellen) gesteigert wurde (Abb. 16B). Transfektionen mit dem Kontrollplasmid pGL3-Promotor zeigten keine Aktivierung der relativen Luziferaseeinheiten (Abb. 16C). Anhand dieser Ergebnisse wird klar, dass das integrierte Transgen aktiv ist und die Transkription der Reporterplasmide, die ein oder mehrere NRSE besitzen, aktivieren kann. In LMTK_{DP-REST:ER}-Fibroblasten wurde die relative Luziferaseaktivität der Reporterplasmide pSYP_{Intron}luc oder pSYPNRSE²SV40luc nicht signifikant durch die Induktion mit 4-OHT erhöht. Dies läßt sich auf den hohen endogenen REST-Level zurückführen, welcher mit der dominant-positiven Mutante DP-REST:ER um die

Bindung an die REST-Bindestelle konkurriert. Die gleichen Transfektionen wurden ebenfalls mit den Kontrollzellen AtT20pac, SN56pac, α TC1-9pac, β TC3pac und LMTK^{neo} durchgeführt. Wie erwartet konnten trotz 4-OHT Stimulation keinerlei Veränderungen in den relativen Luziferaseaktivitäten detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

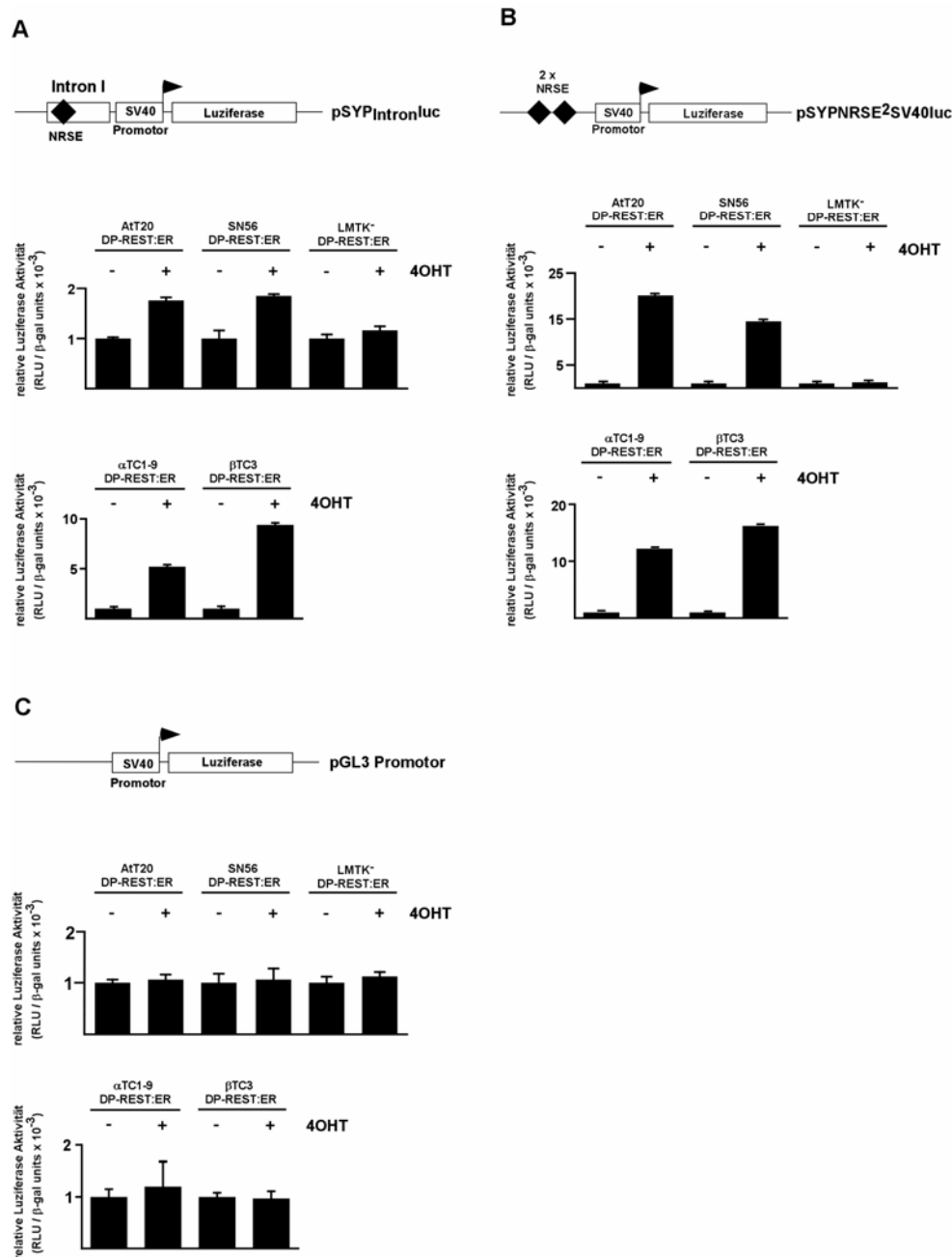


Abb. 16: Biologische Aktivität des dominant-positiven REST-Proteins DP-REST:ER

Die Reporterplasmide **(A)** pSYP_{Intron1}luc (1 μ g/Platte), **(B)** pSYPNRSE²SV40luc (1 μ g/Platte) oder **(C)** das Kontrollplasmid pGL3-Promotor (1 μ g/Platte) und das Referenzplasmid pRSV β (0,5 μ g/Platte) wurde in die Mauszelllinien transfiziert und 24 h nach der Transfektion mit 4-OHT (1 μ M) behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellextrakte präpariert und die Luziferase-, sowie die β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Daten zeigen das Verhältnis zwischen der Luziferaseaktivität (Lichteinheiten) und der β -Galaktosidaseaktivität (OD Einheiten).

Das Reporterplasmid pSyINRSE⁴luc enthält vier NRSE Kopien aus der Promotorregion des *Synapsin I*-Gens. Diese vier NRSE machen das Reporterplasmid sehr sensitiv für die Bindung von REST oder DP-REST:ER. pSyINRSE⁴luc wurde zusammen mit dem Referenzplasmid pRSV β in LMTK⁻_{DP-REST:ER} transfiziert. Als Kontrolle dient das Reporterplasmid pHIVTATALuc. Im Fall des Reporterplasmids pSyINRSE⁴luc konnten die relative Luziferaseaktivität um den Faktor 9.8 durch die Aktivierung des DP-REST:ER Proteins mit 4-OHT erhöht werden (Abb. 17A). Dies zeigte, dass das positiv-dominante REST-Protein in LMTK⁻ funktionell ist. Die Transfektion des Reporterplasmids pHIVTATALuc, welches keine REST-Bindestelle enthält, führt zu einer basalen Luziferaseaktivität, die durch Induktion mit 4-OHT nicht gesteigert werden konnte (Abb. 17B). Die gleichen Transfektion wurden ebenfalls mit den Kontrollzelllinie LMTK⁻ neo durchgeführt. Wie erwartet konnten nach 4-OHT Stimulation keinerlei Veränderungen in den relativen Luziferaseaktivitäten detektiert werden (Daten nicht gezeigt).



Abb. 17: Aktivität des dominant-positiven REST-Proteins DP-REST:ER in LMTK⁻-Zellen

(A) Das Reporterplasmid pSyINRSE⁴luc (1 μ g/Platte) oder (B) pHIVTATALuc (1 μ g/Platte) und das Referenzplasmid pRSV β (0,5 μ g/Platte) wurde in die LMTK⁻_{DP-REST:ER} Zelllinie transfiziert und 24 h nach der Transfektion mit 4-OHT (1 μ M) behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellextrakte präpariert und die Luziferase-, sowie die β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Daten zeigen das Verhältnis zwischen der Luziferaseaktivität (Lichteinheiten) und der β -Galaktosidaseaktivität (OD Einheiten).

4.5 Transkription von REST-Zielgenen durch Stimulation von DP-REST:ER mit 4-OHT

Da die Transfektionsergebnisse gezeigt haben, dass DP-REST:ER nach Induktion mit 4-OHT die Transkription von NRSE-beinhaltenen Reporterkonstrukten aktiviert, wurde in den folgenden Experimenten überprüft, ob DP-REST:ER auch die in ihre natürliche Chromatinstruktur eingebetteten REST-Zielgen zu aktivieren vermag.

DP-REST:ER exprimierende AtT20, SN56, α TC1-9, β TC3 und LMTK⁻ Zellen wurden für 24 h mit Ethanol oder mit 4-OHT behandelt, die Zellen anschließend geerntet und die zytoplasmatische Gesamt-RNA präpariert. Die zu analysierende RNA wurde mit spezifischen cRNA-Sonden gegen die mRNA der Gene *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF*, *GluR2*, *p21^{WAF/CIP}* und *GAPDH* hybridisiert und mit Hilfe des RNase Schutzexperimentes untersucht. Abb. 18 zeigt, dass die Expression der Gene *Synaptophysin* und *Secretogranin II* durch Stimulation mit 4-OHT mit Ausnahme der Fibroblastenzelllinie, in allen Zelllinien induziert werden konnte. Die Expression des *Synaptophysin*-Gens konnte durch die Aktivierung von DP-REST:ER in AtT20_{DP-REST:ER}, SN56_{DP-REST:ER}, α TC1-9_{DP-REST:ER} und β TC3_{DP-REST:ER} um das 2-fache erhöht werden. Ebenso konnte die Genexpression von *Secretogranin II* deutlich gesteigert werden. So war der *Secretogranin II* mRNA-Level in den pankreatischen Zellen α TC1-9_{DP-REST:ER} und β TC3_{DP-REST:ER} um das 3.5-fache bzw. um das 11-fache gesteigert. Die Stimulation mit 4-OHT bewirkte einen Anstieg des *Secretogranin II* mRNA-Levels in AtT20_{DP-REST:ER} um das 3-fache, in SN56_{DP-REST:ER} um das 5-fache gegenüber den mit Ethanol behandelten Zellen. Die Transkription des *Connexin36*-Gens stieg dagegen in den Pankreaszellen um den Faktor 2 (α TC1-9_{DP-REST:ER}) und den Faktor 3 (β TC3_{DP-REST:ER}) an. In AtT20_{DP-REST:ER} und SN56_{DP-REST:ER} konnte nach Induktion mit 4-OHT kein *Connexin36*-Transkript detektiert werden. *BDNF*- und *GluR2*-Transkripte konnten in keiner der untersuchten Zelllinien detektiert werden. Auch bewirkte die Aktivierung der DP-REST:ER Mutante keine Expression der REST-Zielgene in den Fibroblastenzellen LMTK⁻. Die Transkription des Kontrollgens *p21^{WAF/CIP}* wurde durch Induktion mit 4-OHT nicht beeinflusst, da dieses nicht durch REST reguliert wird.

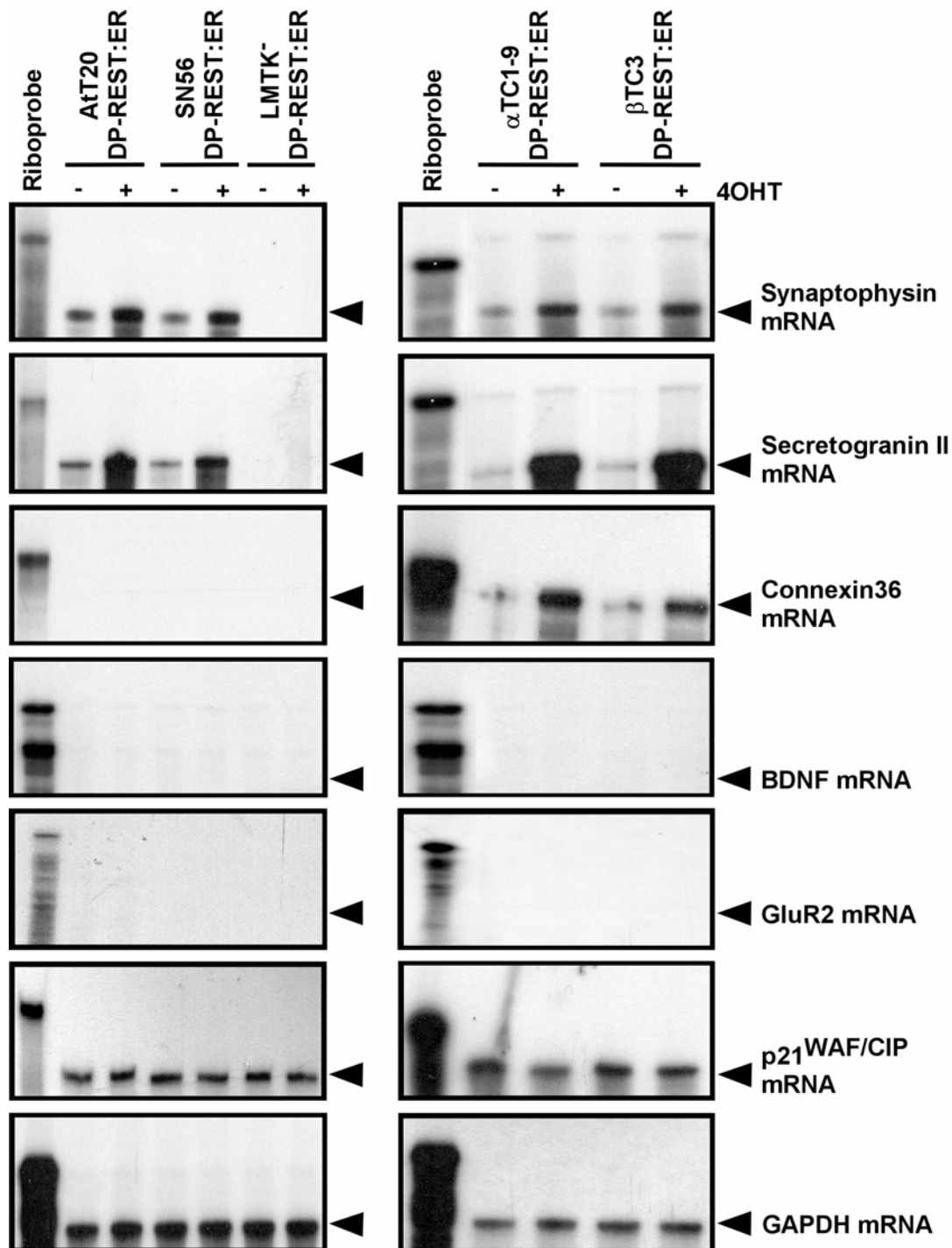


Abb. 18: Expression von REST-Zielgenen in neuronalen, neuroendokrinen und endokrinen Zellen durch Aktivierung von DP-REST:ER mit 4-OHT

Die Zellen wurden ausgesät und über einen Zeitraum von 24 h mit Ethanol (-) oder mit 4-OHT (+) (1 μ M) inkubiert. Die zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde aus den unbehandelten und den mit 4-OHT behandelten Mauszellen präpariert und mit Hilfe des RNase Schutzexperimentes und spezifischen cRNA-Sonden gegen die mRNA der Gene *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF*, *GluR2*, *p21^{WAF/CIP}* und *GAPDH* hybridisiert und analysiert. Hierzu wurden 20 μ g zytoplasmatische RNA für die Analyse der Genexpression von *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36* und *p21^{WAF/CIP}*, sowie 40 μ g zytoplasmatische Gesamt-RNA für die Analyse der Genexpression von *BDNF* und *GluR2* und 2,5 μ g zytoplasmatische Gesamt-RNA für das *GAPDH*-Gen eingesetzt.

4.6 Additiver Effekt auf die Genexpression von *Synaptophysin*, *Secretogranin II* und *Connexin36* durch gleichzeitige Inkubation mit Trichostatin A und 4-OHT

Aus den bisherigen Daten geht hervor, dass die Zugabe von Trichostatin A bzw. 4-OHT die Genexpression von *Synaptophysin*, *Secretogranin II* und *Connexin36* aktivierend beeinflusst. Im weiteren Verlauf wurde nun überprüft, welchen Einfluss die Zugabe von TSA bei gleichzeitiger Aktivierung von DP-REST:ER mit 4-OHT auf die Genexpression von *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF* und *GluR2* hat. Die Zelllinien AtT20_{DP-REST:ER}, SN56_{DP-REST:ER}, α TC1-9_{DP-REST:ER}, β TC3_{DP-REST:ER} und LMTK⁻_{DP-REST:ER} wurden für 24 h mit TSA oder DMSO inkubiert. Gleichzeitig wurde Ethanol oder 4-OHT zugefügt. Die zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels RNase Schutzexperimenten die Expression der Gene analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb. 19A und 19B dargestellt. Die Inhibierung der Histon-Deacetylasen mit TSA und die zeitgleiche Aktivierung des DP-REST:ER-Proteins mit 4-OHT zeigten einen additiven Effekt auf die Expression von *Synaptophysin* und *Secretogranin II* in AtT20, SN56 und den pankreatischen α - und β -Zellen (Abb. 19A und 19B). Die Behandlung der Zelllinien mit TSA oder 4-OHT bzw. die gleichzeitige Zugabe von TSA und 4-OHT erhöhte den mRNA-Level von *Synaptophysin* um 2.0, 2.5 und 5.0 im Fall von AtT20_{DP-REST:ER} und um 2.0, 4.0, und 7.0 im Fall von SN56_{DP-REST:ER}. In der pankreatischen Zelllinie α TC1-9_{DP-REST:ER} wurde die Expression um die Faktoren 2.0, 3.5 und 5.0 erhöht bzw. um die Faktoren 2.0, 2.5 und 4.0. in β TC3_{DP-REST:ER}. Die Behandlung mit TSA, 4-OHT oder die gleichzeitige Zugabe von TSA und 4-OHT verstärkte den *Secretogranin II* mRNA-Level um die Faktoren 2.0, 3.0 und 5.5 (AtT20_{DP-REST:ER}), um 2.5, 5.5 und 7.5 (SN56_{DP-REST:ER}), um 2.0, 3.5 und 6.0 (α TC1-9_{DP-REST:ER}) und um 2.0, 3.0 und 4.5 (β TC3_{DP-REST:ER}). Die Zugabe von TSA, 4-OHT oder die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit TSA und 4-OHT verstärkte den *Connexin36* mRNA-Level in den pankreatischen Zelllinien um die Faktoren 2.0, 2.0 und 4.0 im Fall der Zelllinie α TC1-9_{DP-REST:ER} und um die Faktoren 2.0, 3.0 und 4.5 im Fall der Zelllinie β TC3_{DP-REST:ER}, zeigte jedoch keinen Einfluss auf die anderen Zelllinien. Die Genexpression von *BDNF* und *GluR2* konnte bei keiner der behandelten Zellen detektiert werden, auch konnte keines der untersuchten REST-Zielgene in der Fibroblastenzelle LMTK⁻ durch die gleichzeitige Behandlung mit TSA und die Aktivierung der Mutante mit 4-OHT beobachtet werden. Dies zeigt, dass die Inhibition der Histon-Deacetylasen, sowie die gleichzeitige Aktivierung des Aktivatorproteins DP-REST:ER nicht in jedem Zellsystem ausreicht, um die Expression von REST-Zielgenen zu induzieren.

A

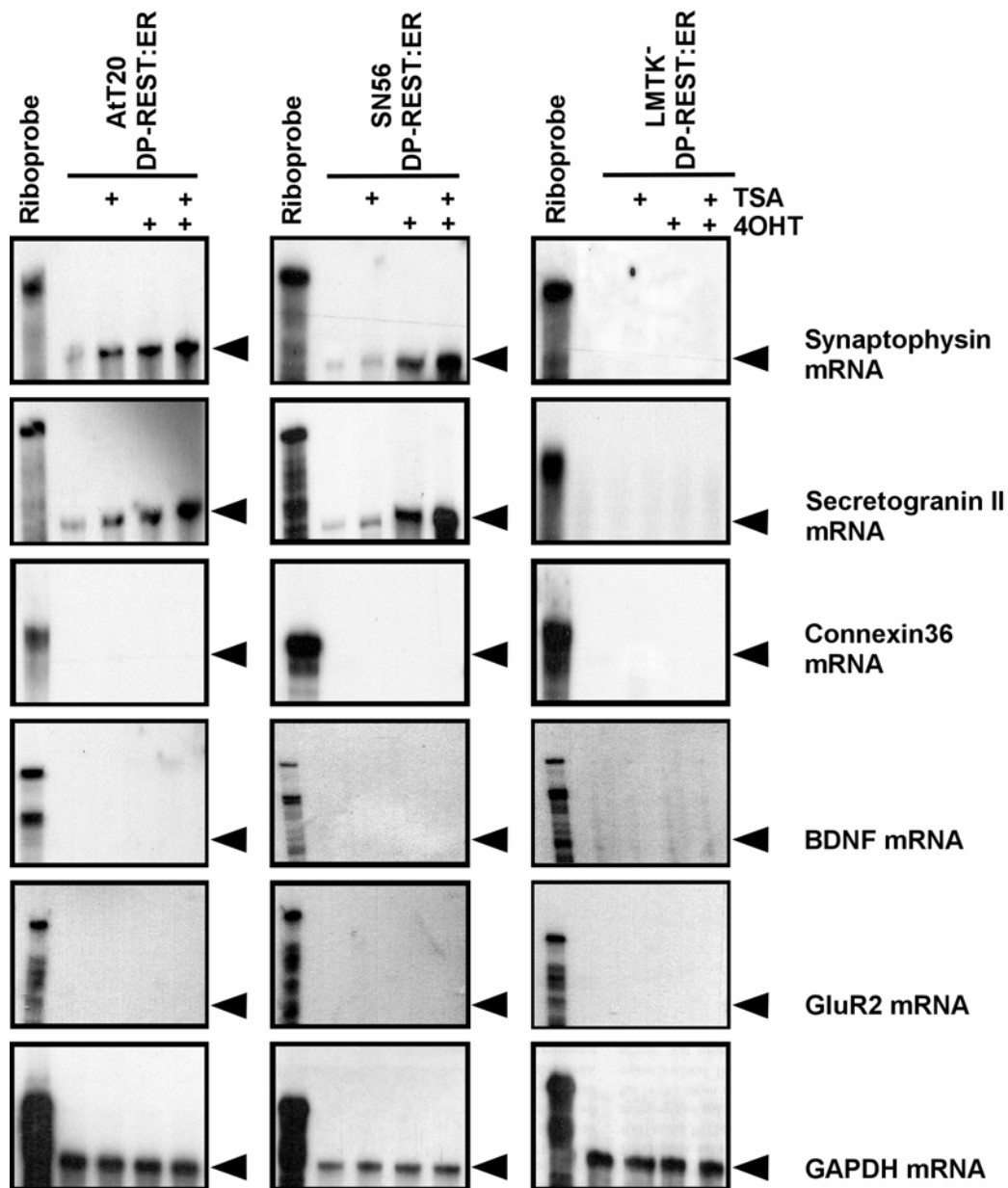


Abb. 19A: Expression von REST-Zielgenen in DP-REST:ER exprimierenden Zelllinien, nach Inkubation mit TSA, 4-OHT bzw. gleichzeitiger Zugabe von TSA und 4-OHT.

Die Zellen wurden ausgesät und über einen Zeitraum von 24 h mit TSA (100ng/ml), 4-OHT (1 μ M) oder beiden Induktoren gleichzeitig inkubiert. Die zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde aus den unbehandelten bzw. den behandelten Mauszellen präpariert und mit Hilfe des RNase Schutzexperimentes und spezifischen cRNA-Sonden gegen die mRNA der Gene *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF*, *GluR2* und *GAPDH* hybridisiert und analysiert. Hierzu wurden 20 μ g zytoplasmatische Gesamt-RNA für die Analyse der Genexpression von *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, sowie 40 μ g zytoplasmatische Gesamt-RNA für die Analyse der Genexpression von *BDNF* und *GluR2* und 2,5 μ g zytoplasmatische Gesamt-RNA für das *GAPDH*-Gen eingesetzt.

B

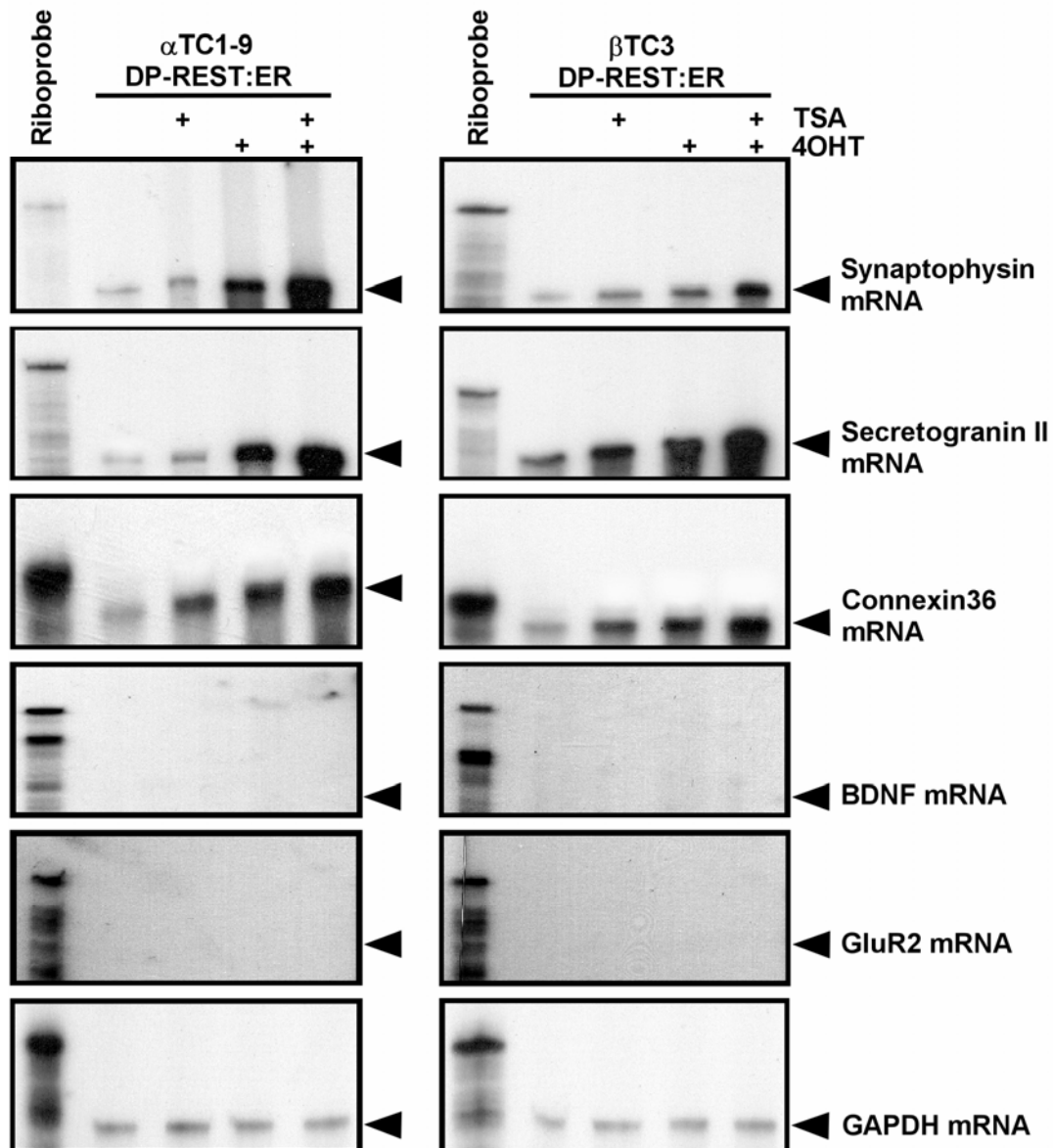


Abb. 19B: Expression von REST-Zielgenen in den DP-REST:ER exprimierenden Pankreaszellen, nach Inkubation mit TSA, 4-OHT bzw. gleichzeitiger Zugabe von TSA und 4-OHT

Die Zellen wurden ausgesät und über einen Zeitraum von 24 h mit TSA (100ng/ml), 4-OHT (1µM) oder beiden Induktoren gleichzeitig inkubiert. Die zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde aus den unbehandelten bzw. den behandelten Mauszellen präpariert und mit Hilfe des RNase Schutzexperimentes und spezifischen cRNA-Sonden gegen die mRNA der Gene *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF*, *GluR2* und *GAPDH* hybridisiert und analysiert. Hierzu wurden 20µg zytoplasmatische RNA für die Analyse der Genexpression von *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, sowie 40µg zytoplasmatische Gesamt-RNA für die Analyse der Genexpression von *BDNF* und *GluR2* und 2,5 µg zytoplasmatische Gesamt-RNA für das *GAPDH*-Gen eingesetzt.

4.7 Einfluss des DNA-Methyltransferase-Inhibitors 5-Aza-Cytidine auf die Expression REST-regulierter Gene

Wie bereits in der Einleitung (2.4) beschrieben, spielen Änderungen des Methylierungsgrads der DNA bei der transkriptionellen Reprimierung eine große Rolle. Die Methylierung des Cytosin in CpG-Dinukleotiden durch DNA-Methyltransferasen ist dabei der entscheidende Schritt, da diese C^mpG-Dinukleotide eine Bindestelle für das Repressorprotein MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2) bildet. MeCP2 reprimiert die Gentranskription durch Rekrutierung von Histon-Deacetylasen an die methylierten DNA-Abschnitte (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998). Auch für REST wurden Wechselwirkungen mit dem C^mpG-bindenden Repressorprotein MeCP2 beschrieben, wobei das Korepressorprotein CoREST als Protein-Brücke zwischen REST und MeCP2 dient (Lunyak *et al.*, 2002).

Hier wurde der Effekt des Methyltransferase-Inhibitors 5-Aza-Cytidine (5-AzaC) auf die Expression der REST-Zielgene *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF* und *GluR2* untersucht. Dazu wurden die Zelllinien AtT20, SN56, α TC1-9, β TC3 und LMTK⁻ für 72 h mit 5-AzaC inkubiert. Die zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels des RNase Schutzexperimentes die Expression der Gene *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF* und *GluR2* analysiert. Als Positivkontrolle diente in diesem Experiment das als 5-Aza-Cytidine sensitiv beschriebene Gen *p21^{WAF/CIP}* (Zuh *et al.*, 2004). Abb. 20 zeigt, dass der DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-AzaC keinerlei Einfluss auf die Transkription der untersuchten REST-Zielgene in den untersuchten Zelllinien hatte. Lediglich die Genexpression von *p21^{WAF/CIP}* konnte durch Inkubation mit 5-AzaC um den Faktor 2.0-3.0 in AtT20, SN56, α TC1-9, β TC3 und LMTK⁻ stimuliert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Methylierung der DNA in SN56, AtT20, LMTK⁻, α TC1-9 und β TC3 keine essentielle Rolle bei der Regulierung der Genexpression dieser REST-Zielgene spielt.

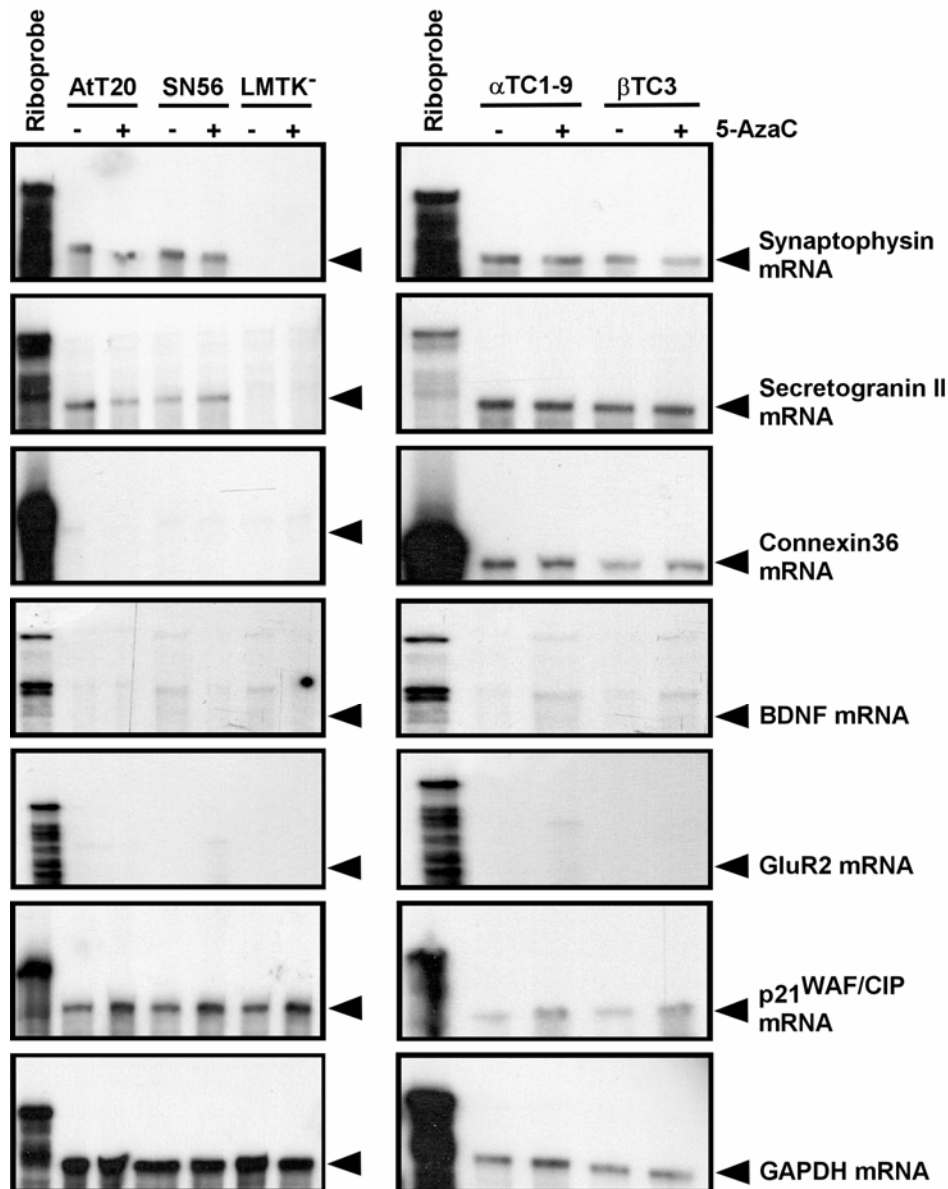


Abb. 20: Einfluss des DNA-Methyltransferase-Inhibitors 5-AzaC auf die Genexpression REST-regulierter Gene

AtT20, SN56, LMTK⁻, αTC1-9 und βTC3 Zellen wurden für 72 h mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-AzaC (1 μM) inkubiert. Die zytoplasmatische Gesamt-RNA von unbehandelten (-) und mit 5-AzaC behandelten (+) Zellen wurde präpariert und mittels RNase Schutzexperiment und spezifischen cRNA-Sonden gegen die mRNA der Gene *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF*, *GluR2*, *p21^{WAF/CIP}* und *GAPDH* hybridisiert und analysiert. Die mRNA des Gens *p21^{WAF/CIP}* diente als Positivkontrolle. Hierzu wurden 20 μg zytoplasmatische RNA für die Analyse der Genexpression von *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36* und *p21^{WAF/CIP}*, sowie 40 μg zytoplasmatische Gesamt-RNA für die Analyse der Genexpression von *BDNF* und *GluR2* und 2,5 μg zytoplasmatische Gesamt-RNA für das *GAPDH*-Gen eingesetzt.

4.8 Einfluss des DNA-Methyltransferase-Inhibitors 5-Aza-Cytidine auf die Expression REST-regulierter Gene bei gleichzeitiger Inkubation mit Trichostatin A und Aktivierung von DP-REST:ER mit 4-OHT

In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob durch Zugabe des DNA-Methyltransferase Inhibitors 5-Aza-Cytidine, als auch des Histon-Deacetylase-Inhibitors TSA in Abwesenheit und in Gegenwart von 4-OHT, eine zusätzliche Induktion der Genexpression von *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF* und *GluR2* erreicht werden kann. Die DP-REST:ER exprimierenden Zelllinien wurden 72 h mit 5-AzaC (1µM) inkubiert. Nach 48 h wurde zusätzlich der Histon-Deacetylase-Inhibitor TSA (100ng/ml) zugegeben und gleichzeitig mit 4-OHT (1µM) stimuliert. Die zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde präpariert und die oben genannten Gene mittels RNase Schutzexperiment analysiert. Wie Abb. 21A und Abb. 21B zeigen, hatte weder die gleichzeitige Inkubation mit 5-AzaC und TSA noch die zusätzliche Aktivierung von DP-REST:ER durch 4-OHT eine Änderung der Genexpression von *BDNF* und *GluR2* in den untersuchten Zelllinien zur Folge. Die Fibroblastenzelllinie LMTK⁻ exprimierte auch weiterhin keines der zu untersuchenden Gene, und es konnte auch keine Aktivierung der *Connexin36*-Genaktivität in den neuronalen SN56 oder in den kortikotrophen AtT20 detektiert werden. Diese Gene scheinen in den entsprechenden Zelllinien gänzlich abgeschaltet zu sein.

A

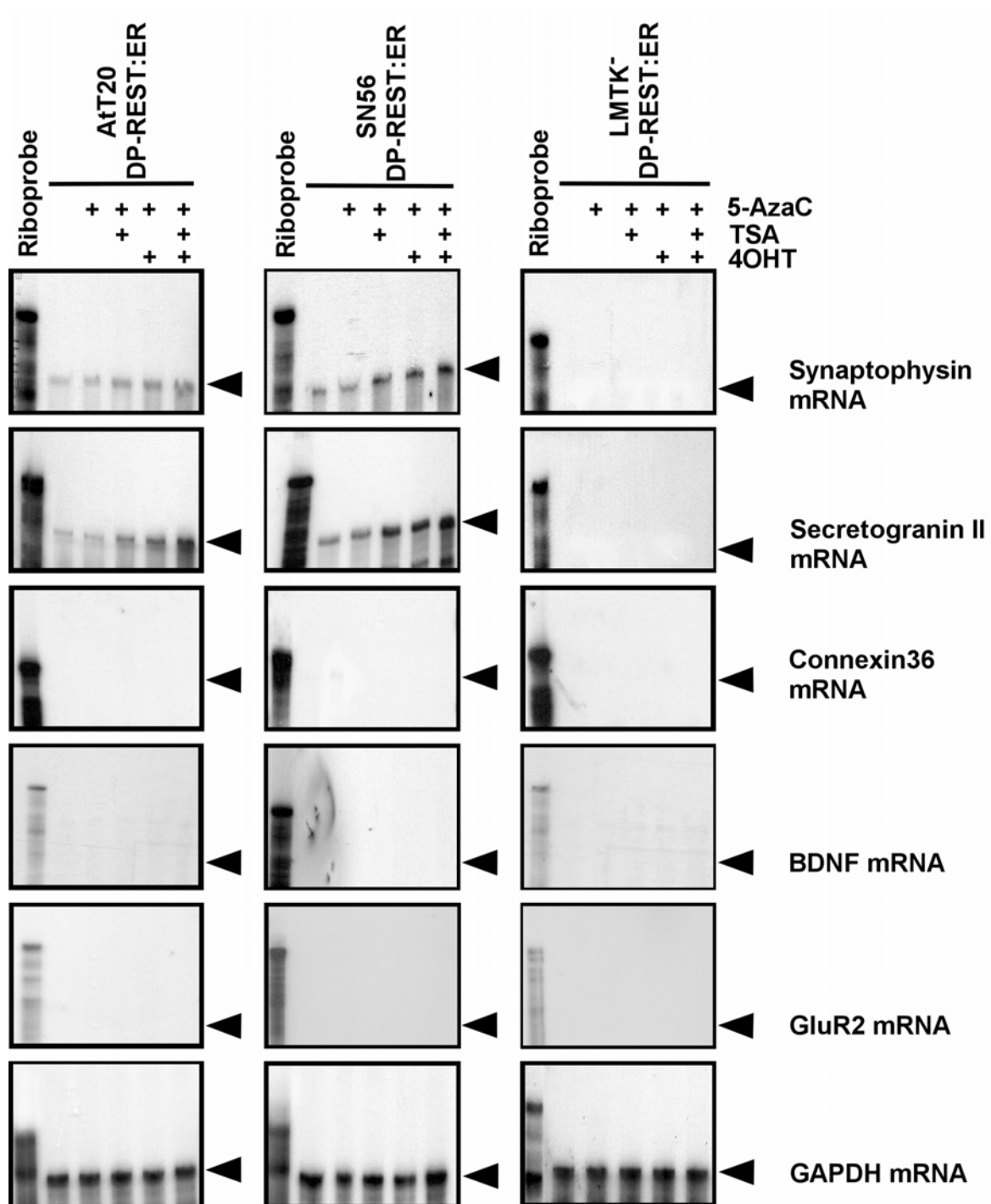


Abb. 21A: Einfluss mehrerer Inhibitoren bei gleichzeitiger Stimulation von DP-REST:ER mit 4-OHT auf die Expression REST-regulierter Gene

DP-REST:ER exprimierende AtT20, SN56 und LMTK⁻-Zellen wurden für 72 h mit 5-AzaC (1 μ M) inkubiert. Nach 48 h wurde zusätzlich der Histon-Deacetylase-Inhibitor TSA (100 ng/ml) zugegeben und gleichzeitig mit 4-OHT (1 μ M) stimuliert. Die zytoplasmatische Gesamt-RNA von unbehandelten und behandelten (+) Zellen wurde präpariert und mittels RNase Schutzexperiment und spezifischen cRNA-Sonden gegen die mRNA der Gene *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF*, *GluR2* und *GAPDH* hybridisiert und analysiert. Hierzu wurden 20 μ g zytoplasmatische Gesamt-RNA für die Analyse der Genexpression von *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, sowie 40 μ g zytoplasmatische RNA für die Analyse der Genexpression von *BDNF* und *GluR2* und 2,5 μ g zytoplasmatische Gesamt-RNA für das *GAPDH*-Gen eingesetzt.

B

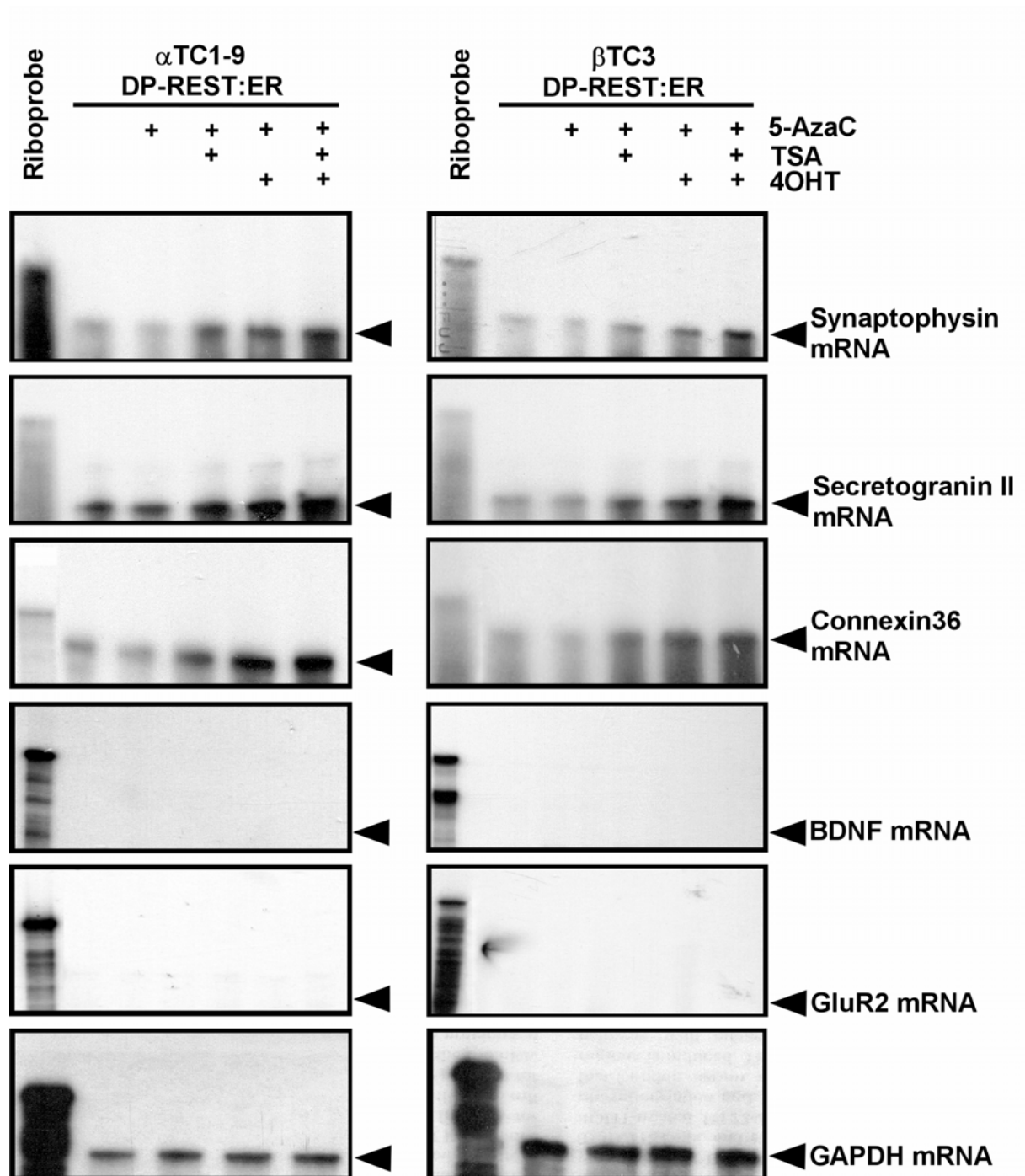


Abb. 21B: Einfluss mehrerer Inhibitoren bei gleichzeitiger Stimulation von DP-REST:ER mit 4-OHT auf die Expression REST-regulierter Gene

DP-REST:ER exprimierende α TC1-9 und β TC3-Zellen wurden für 72 h mit 5-AzaC (1 μ M) inkubiert. Nach 48 h wurde zusätzlich der Histon-Deacetylase-Inhibitor TSA (100 ng/ml) zugegeben und gleichzeitig mit 4-OHT (1 μ M) stimuliert. Die zytoplasmatische Gesamt-RNA von unbehandelten und behandelten (+) Zellen wurde präpariert und mittels RNase Schutzexperiment und spezifischen cRNA-Sonden gegen die mRNA der Gene *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF*, *GluR2* und *GAPDH* hybridisiert und analysiert. Hierzu wurden 20 μ g zytoplasmatische Gesamt-RNA für die Analyse der Genexpression von *Synaptophysin*, *Secretogranin II*, *Connexin36*, sowie 40 μ g zytoplasmatische Gesamt-RNA für die Analyse der Genexpression von *BDNF* und *GluR2* und 2,5 μ g zytoplasmatische Gesamt-RNA für das *GAPDH*-Gen eingesetzt.

4.9 Zelltyp-spezifische Bindung von DP-REST:ER an die REST-Bindestelle auf der DNA

Die Aktivierung von REST-Zielgenen durch DP-REST:ER setzt die Bindung des Proteins an die regulatorische Sequenz auf der DNA voraus. DP-REST:ER enthält die DNA-Bindedomäne von REST und bindet daher an die gleiche, spezifische Erkennungssequenz (NRSE). Kommt es nach Aktivierung von DP-REST:ER mit 4-OHT zu keiner Expression von REST-regulierten Genen, könnte dies darauf hindeuten, dass das NRSE auf der DNA für den Transkriptionsfaktor DP-REST:ER aufgrund einer geschlossenen Chromatinstruktur nicht zugänglich ist.

Mittels Chromatin-Immunoprecipitation wurde experimentell untersucht, ob DP-REST:ER an die regulatorische Sequenz NRSE bindet. Um eine zelltyp-spezifische Regulation der Genexpression von REST-Zielgenen aufzuzeigen wurden die Zelllinien AtT20_{DP-REST:ER} und β TC3_{DP-REST:ER} verwendet, da diese sich in der Expression des *Connexin36*-Gens unterscheiden. Die Zelllinien wurden für 24 h mit 4-OHT stimuliert, anschließend ein "cross-linking" zwischen DNA und Proteinen durchgeführt und das Chromatin durch Ultraschall zerkleinert. Die Immunoprecipitation des Chromatins unter Verwendung von M2-Agarose, die mit dem FLAG-tag von DP-REST:ER interagiert, sollte zeigen, ob DP-REST:ER an der DNA gebunden vorliegt. Die präzipitierten Chromatinfragmente wurden einer PCR-Reaktion unterzogen, wobei spezifische Oligonukleotide verwendet wurden, welche 5' und 3' die NRSEs der Gene *Synaptophysin*, *GluR2* und *Connexin36* flankieren. Abb. 22 zeigt die Ergebnisse der PCR. Da die Region um das NRSE des *Synaptophysin*-Gens amplifiziert werden konnte, scheint DP-REST:ER in beiden Zelllinien *in vivo* an das intronische NRSE des *Synaptophysin*-Gens (Abb. 22, links) gebunden zu sein. Die PCR zeigte keine Amplifikation der DNA für die Region um das NRSE des *GluR2*-Gen (Abb. 22, mitte). DP-REST-ER lag demnach nicht an der Transkriptionseinheit des *GluR2*-Gens gebunden vor. Dies erklärt die Beobachtung, dass die Aktivierung von DP-REST:ER mit 4-OHT keine Expression von *GluR2*-Gens zur Folge hatte. Im Fall des *Connexin36*-Gens zeigte sich hier eine zelltyp-spezifische Regulation. In der pankreatischen Zelllinie β TC3 fand eine Bindung der Mutante an das NRSE des *Connexin36*-Gens statt. In AtT20 hingegen wurde keine Bindung von DP-REST:ER an die DNA detektiert (Abb. 22, rechts). Diese Daten spiegeln die durch die RNase Schutzexperimente erhaltenen Ergebnisse wieder. In β TC3 bindet DP-REST:ER an das NRSE des *Connexin36*-Gens und induziert dessen Genexpression. In den AtT20 Zellen kommt es nicht zur Bindung des Proteins an das NRSE des *Connexin36*-

Gens und daher auch zu keiner durch DP-REST:ER-vermittelten Genexpression (Vergleiche Abb. 18).

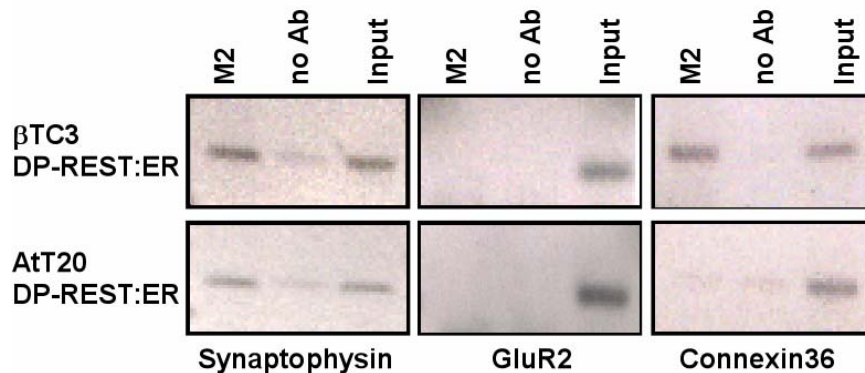


Abb. 22: Die Chromatin Immunopräzipitation zeigt eine zelltyp-spezifische Bindung von DP-REST:ER an die DNA

Die Chromatin Immunopräzipitation wurde mit M2-Agarose durchgeführt, welche mit dem FLAG-tag von DP-REST:ER interagiert. Das Chromatin wurde mittels Ultraschall zerkleinert, präzipitiert und durch PCR amplifiziert. Dazu wurden spezifische Oligonukleotide verwendet, die komplementär 5' und 3' zur REST Bindungssequenz NRSE des *Synaptophysin*-, *GluR2*- und *Connexin36*-Gens hybridisieren. Als Negativkontrolle (no Ab) wurde die Immunopräzipitation mit Sepharose A anstelle von M2-Agarose durchgeführt und ebenfalls mittels PCR amplifiziert. Als Positivkontrolle (Input) wurde ein Aliquot des Gesamtchromatins für die Immunopräzipitation verwendet und mittels PCR amplifiziert. (no Ab = no antibody)

4.10 Analyse der Chromatinstruktur

Um eine Erklärung für die zelltyp-spezifische Bindung von DP-REST:ER an die Bindungsstelle NRSE zu finden, wurde das Chromatin der beiden Zelllinien näher untersucht. Dabei wurden epigenetische Marker verwendet, die eine Unterscheidung zulassen zwischen Genabschnitten, die aktiv transkribiert werden und solchen die "inaktiv" vorliegen. Der N-Terminus des Histons H3 kann an den Lysinresten K4, K9 oder K27 durch Histone-Methyltransferasen mono-, di- oder trimethyliert werden (Rea *et al.*, 2000; Tachibana *et al.*, 2001). Je nach Ort und Anzahl der Methylgruppen entsteht "aktives" oder "inaktives" Chromatin (Strahl and Allis, 2000). Die di-Methylierung am Lysinrest 9 (diMetK9) stellt eine Bindestelle für das Heterochromatin Protein 1 (HP1) dar (Bannister *et al.*, 2001) und fungiert gleichzeitig als Marker für Regionen, die durch Bildung von Heterochromatin abgeschaltet wurden (Nielsen *et al.*, 2001).

Für die Chromatin Immunopräzipitation wurde ein Antikörper eingesetzt, der dimethyliertes H3K9 (diMetK9) bindet, so dass diese Regionen präzipitiert und mittels PCR analysiert

werden konnten. Die Amplifikation des präzipitierten Chromatins wurde mit spezifischen Oligonukleotiden, die 5' und 3' das NRSE der Gene *Synaptophysin*, *GluR2* und *Connexin36* flankieren, durchgeführt. Für das NRSE des *GluR2*-Gens konnte ein starkes PCR-Signal für diMetK9 sowohl in den AtT20-Zellen als auch in β TC3 detektiert werden. Die regulatorische Sequenz des Gens scheint in einer geschlossenen Chromatinstruktur zu liegen und ist somit abgeschaltet (Abb. 23A, mitte), gleiches konnte auch für das NRSE des *Connexin36*-Gen in AtT20 nachgewiesen werden (Abb. 23A, rechts). Im Gegensatz dazu konnte in AtT20 noch in β TC3 der Marker diMetK9 für das intronische NRSE des *Synaptophysin*-Gens detektiert werden (Abb. 23A, links). In den pankreatischen β -Zellen war für das NRSE des *Connexin36*-Gens ebenfalls kein diMetK9 nachweisbar (Abb. 23A, rechts).

Ein epigenetischer Marker für "aktiv" transkribierte Gene ist die tri-Methylierung des Lysinrests 4 (K4) des Histons H3 (triMetK4) (Strahl *et al.*, 1999; Santos-Rosa *et al.*, 2002). Ein Antikörper, der triMetK4 spezifisch bindet, wurde in den Chromatin Immunoprecipitations-Assay eingesetzt und die präzipitierte DNA durch PCR amplifiziert. Ein starkes PCR-Signals für den Marker triMetK4 zeigte, an der REST-Bindestelle NRSE des *Synaptophysin*-Gens konnte in den Zelllinien AtT20 und β TC3 detektiert werden (Abb. 24B, links). Gleiches gilt für das NRSE des *Connexin36*-Gens in β TC3-Zellen (Abb. 24B, rechts). Im Gegensatz dazu konnte kein PCR-Signal für triMetK4 für das NRSE des *Connexin36*-Gens in AtT20 noch für das NRSE des *GluR2*-Gens in AtT20 und β TC3 nachgewiesen werden. Diese Daten ergänzen die Ergebnisse aus 4.9. Konnte beispielsweise für das *Synaptophysin*-Gen in AtT20 eine offene Chromatinstruktur durch den epigenetischen Marker triMetK4 detektiert werden, so wurde dies auch durch das Binden von DP-REST:ER an das NRSE *in vivo* untermauert (vergleiche Abb. 22). Konnte dagegen der Marker diMetK9, der auf eine geschlossene Chromatinstruktur hinweist, detektiert werden, wurde keine *in vivo*-Bindung von DP-REST:ER an NRSE nachgewiesen, wie im Fall des NRSEs des *Connexin36*-Gens in der Hypophysenzelle AtT20. Ob ein REST-Zielgen exprimiert wird oder nicht, hängt von der Struktur des Chromatins ab, in welche das Gen eingebettet ist und der damit verbundenen Zugänglichkeit für entsprechende Transkriptionsfaktoren.

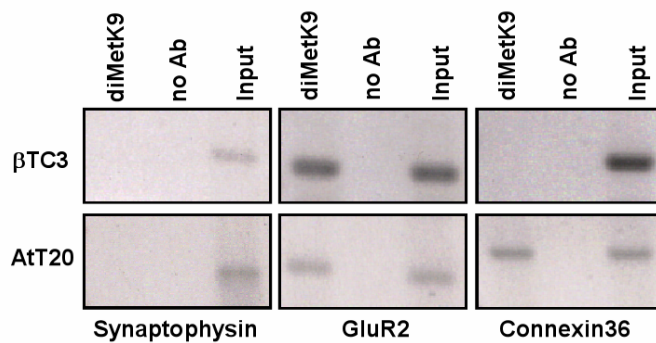
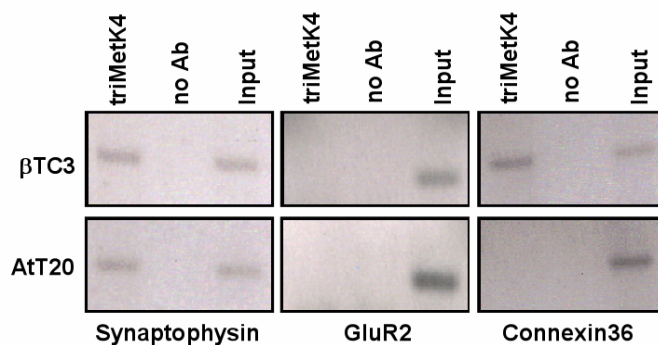
A**B**

Abb. 23: Epigenetische Modifikation von REST-Zielgenen in AtT20 und βTC3

Die Chromatin-Immunopräzipitation wurde unter Verwendung von Antikörpern, die gegen (A) diMetK9 und (B) triMetK4 gerichtet waren. Das Präzipitat wurde mittels einer PCR unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden, die 5' und 3' der REST-Bindesequenz NRSE des *Synaptophysin*-, *GluR2*- und *Connexin36*-Gens komplementär hybridisiert, amplifiziert. Als Negativkontrolle wurde die Immunopräzipitation mit Sepharose A aber ohne Antikörper (no Ab) durchgeführt und ebenfalls mittels PCR amplifiziert. Als Positivkontrolle (Input) wurde ein Aliquot des Gesamtchromatins für der Immunopräzipitation verwendet und mittels PCR amplifiziert. No Ab = no antibody

4.11 Affimetrix GenChip-Assay

Die Eigenschaft von DP-REST:ER an REST-regulierte Gene zu binden und deren Expression zu aktivieren, bietet eine gute Möglichkeit, über den Affimetrix GenChip-Assay weitere putative REST-Zielgene zu identifizieren. Dafür wurden die Zelllinien AtT20_{DP-REST:ER} und βTC3_{DP-REST:ER} für 48 h mit Ethanol oder mit 4-OHT behandelt und die RNA mittels dem RNeasy Kit (Qiagen) isoliert. In Zusammenarbeit mit der Gruppe um Frans Schuit (Catholic University of Leuven, Belgium) wurde die Genexpression der stimulierten Zellen mit der Genexpression der unstimulierten Zellen ausgewertet und verglichen.

Eine kleine Auswahl der induzierten Gene und deren Bedeutung sind in Tabelle 2 und 3 aufgeführt.

β TC3 _{DP-REST:ER}		ATT20 _{DP-REST:ER}	
ACCESSION NO.	BESCHREIBUNG	ACCESSION NO.	BESCHREIBUNG
BC022954	Synapsin I	BC022954	Synapsin I
AF387674	Neurexin 1	AF387674	Neurexin 1
NM_009497.1	Synaptobrevin 2	BC025207.1	Synaptotagmin 11
L31397.1	Dynamin I	AK012468.1	RAB3C
AF375476.1	ATF5	NM_009946.1	Complexin 2
BB821035	survival motor neuron-1	BB274960	Neurexophilin I
AK14673	Nedd8	AA986379	Neurobeachin
AK035882	Lrrtm3	BC028288	GAP43
M81444	Connexin26	AK122203	Nedd4
BC016507	Connexin30	XM_358889	Synaptojanin I
AK045561	Astrotactin I	U02982	Secretogranin III

Tab. 2: Auszug aus dem Affimetrix-Chip-Assay

Die Zelllinien AtT20_{DP-REST:ER} und β TC3_{DP-REST:ER} wurden für 48 h mit Ethanol bzw. mit 4-OHT behandelt und die RNA mittels dem RNeasy Kit (Qiagen) isoliert. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Frans Schuits wurde die RNA revers transkribiert und mit dem Affimetrix-GenChip hybridisiert.

GEN	BEDEUTUNG
Synapsin I	Ein neuronales Phosphoprotein, welches, an der Oberfläche von synaptischen Vesikel assoziiert ist. Wurde als REST-Zielgen beschrieben (Schoenherr <i>et al.</i> , 1996, Schoch <i>et al.</i> , 1996)
Neurexin I	Neuronale zelloberflächen-Proteine, die an der interzellulären Signalweiterleitung und bei der Bildung von interzellulären <i>gap-junctions</i> involviert sind.
Neurexophilin	Ligand von Neurexin. Neurexin-Neurexophilin Interaktionen scheinen bei der Entwicklung von synaptischen Verbindungen eine wichtige Rolle zu spielen (Clarris <i>et al.</i> , 2002). Wurde als putatives REST-Zielgen beschrieben (Zhang <i>et al.</i> , 2006)
Synaptobrevin 2	Wird bei der Exo- und Endozytose von synaptischen Vesikeln benötigt. Synaptobrevin ist essentiell für zwei Synapsen-spezifischen Membran-Reaktionen: Neurotransmitter-release durch Exozytose und Endozytose zur Wiederverwendung der synaptischen Vesikel (Deak <i>et al.</i> , 2004). Vamp2 wird auch in pankreatischen Zellen exprimiert (Rosado <i>et al.</i> , 2004).
Dynamin I	Ist an Endozytosis- und Exozytosis-Vorgängen und am Recycling von synaptischen Vesikeln beteiligt. Wurde von Yoo <i>et al.</i> (2001) als REST-Zielgen beschrieben.
Neurobeachin	Beteiligt an „synaptic vesicle trafficking“, Neurotransmitter-Freisetzung und

	synaptische Transmission (Su <i>et al.</i> , 2004).
GAP-43 (growth associated protein 43)	Ist an der Ausbildung von Axonen, neuronaler Plastizität und Lernfähigkeit beteiligt (Metz G.A and Schwab M.E, 2004).
Survival Motor Neuron	Spielt eine Rolle bei der Ausbildung von Neuriten, der neuronalen Differenzierung und Entwicklung (Fan L. and Simard L.R., 2002).
Complexin 2	Bindet und stabilisiert SNARE-Komplexe an synaptischen Membranen und fördert die Fusion von Vesikeln. Ist an der Ausschüttung von Neurotransmitter beteiligt.
ATF5	Gehört zur „activating transcription factor“ (ATF) Familie. Spielt bei der neuronalen Differenzierung eine Rolle.
Lrrtm3	„ <i>Leucine-rich repeat containing protein</i> “ sind an der Regulation zahlreicher zellulärer Ereignisse während der Entwicklung des ZNS beteiligt.
Rab3c	GTP-bindendes Protein und ist an der Regulation synaptischer Transmission und Plastizität beteiligt (Schluter <i>et al.</i> , 2006)
Nedd4	<i>Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated gene 4</i> ist an der Regulation von Rezeptoren und Ionen-Transporter u.a. des Natrium-Kanals 1.2 beteiligt. Möglicherweise ist Nedd4 ein Schlüsselregulator neuronaler Natrium-Kanäle (Fotia <i>et al.</i> , 2004).
Secretogranin III	In sekretorischen Granula in neuroendokrinen Zellen. Bindet an Chromogranin A in kortikotrophen AtT20 Zellen (Hosaka <i>et al.</i> , 2004)
Synaptobrevin 1	Ist beim Recycling von synaptischen Vesikeln beteiligt (Kim <i>et al.</i> , 2002)
Syntaxin III	Ist bei der Aufrechterhaltung der synaptischen Funktionen von Bedeutung
Gap junction protein, beta 2 (Connexin 26)	Protein, dass an der <i>Gap-junction</i> Bildung beteiligt ist.
Gap junction protein, beta 6 (Connexin 30)	Protein, dass an der <i>Gap-junction</i> Bildung beteiligt ist.
Astrocytin 1	Ist an der Interaktion zwischen Neuronen und Glia-Zellen beteiligt. Spielt bei der Migration von Glia-Zellen eine Rolle (Adams <i>et al.</i> , 2002)

Tab. 3: Durch Affimetrix detektierte Gene und deren Bedeutung

Die Affimetrix-Daten zeigen, dass die Expression vieler Gene, die direkt oder indirekt mit synaptischen Vesikeln in Verbindung stehen, verstärkt exprimiert wurden. Interessanterweise konnten in den untersuchten Zelllinien lediglich zwei Gene gefunden werden, die in beiden Zelllinien gemeinsam hochreguliert wurden, nämlich die Gene *Synapsin I* und *Neurexin 1*. In wie weit all diese Gene direkt durch REST reguliert werden, müssten weitere Analysen der einzelnen Gene zeigen.

4.12 Genexpression in der neuralen Stammzelllinie HNSC. 100

4.12.1 Zelltyp-spezifische Expression von Markergenen

Neurale Stammzellen sind unreife Vorläuferzellen des zentralen Nervensystems. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, 1) sich zeitlebens zu teilen, 2) sich selbst zu erneuern und 3) reife Nerven- und Gliazellen hervorzubringen (Gage, 2000; Taupin and Gage, 2002). Auf Grund dieser Eigenschaften wurde die humane neurale Stammzelllinie HNSC.100 als Modellsystem verwendet, um den Einfluss von REST auf die Differenzierung zu Neuronen zu untersuchen. Die Stammzelllinie HNSC.100 wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Alberto Martinez-Serrano (Center of Molecular Biology Severo Ochoa, Autonomous University of Madrid, 28049 Madrid, Spain) zur Verfügung gestellt.

Um eine Aussage über den Differenzierungsgrad der HNSC.100-Zellen machen zu können, wurde der Expressionslevel des Stammzellmarkers *Nestin* und des Astrozytenmarkers *GFAP* (*glia fibrillary acidic protein*) analysiert und die Genexpression in HNSC.100-Zellen mit dem der menschlichen Neuroblastomazelllinie SHSY5Y sowie dem der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293T miteinander verglichen. Dazu wurde zunächst die zytoplasmatische Gesamt-RNA aus HNSC.100, SHSY5Y und 293T präpariert und mittels RT-PCR revers transkribiert. Die erhaltene cDNA wurde in einer anschließenden PCR-Reaktion mit spezifischen Oligonukleotiden gegen die Gene *Nestin*, *GFAP* und *GAPDH* amplifiziert, über Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Zugabe von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Expression des *housekeeping*-Gens *GAPDH* diente hier als Kontrolle, um sicher gehen zu können, dass die eingesetzte Menge an cDNA in allen PCR-Ansätzen gleich groß war. Abb. 24 zeigt, dass die Genexpression des Stammzellmarkers *Nestin* in den neuralen Stammzellen am höchsten ist, daneben ließen sich aber auch geringe Mengen an *Nestin* in der Neuroblastomazelle SHSY5Y und in den embryonalen Nierenzellen 293T nachweisen. Der Astrozytenmarker *GFAP* war sowohl in HNSC.100, als auch in SHSY5Y messbar, in 293T dagegen konnte keine Expression von GFAP beobachtet werden.

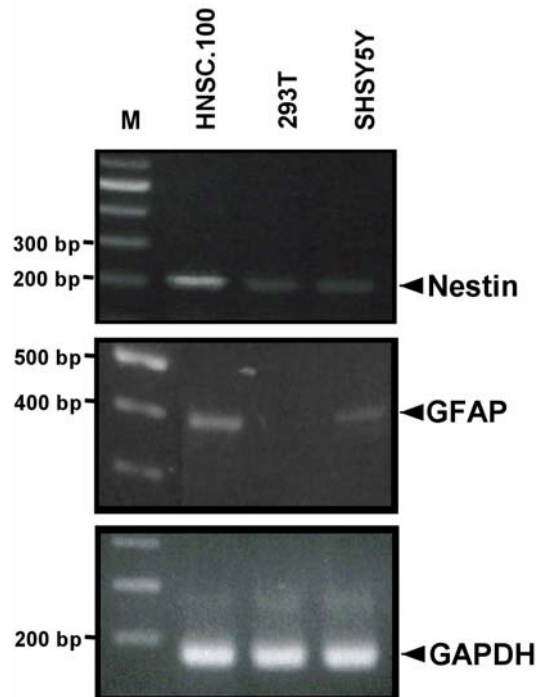


Abb. 24: Vergleich der Genexpression von *Nestin* und *GFAP* in HNSC.100, SHSY5Y und 293T-Zellen

Die zytoplasmatische Gesamt-RNA aus HNSC.100, SHSY5Y und 293T-Zellen wurde mittels RT-PCR revers transkribiert und die cDNA anschließend mit spezifischen Oligonukleotiden gegen die Gene *Nestin*, *GFAP* (je 30 Zyklen) und *GAPDH* (17 Zyklen) amplifiziert. *GAPDH* diente als Kontrolle um den Einsatz gleicher Mengen an cDNA in die PCR sicherzustellen. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt, das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht. M = 100 bp Plus Marker (MBI-Fermentas); *Nestin* = 195 bp, *GFAP* = 382 bp, *GAPDH* = 175 bp

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Differenzierung der neuronalen Stammzelle HNSC.100 zu einer neuronalen Zelle lag und die Rolle des Repressorproteins REST in diesem Prozess analysiert werden sollte, wurden nur solche Gene untersucht, deren Expression charakteristisch für eine neuronale Zelle ist. Neurone unterscheiden sich von anderen Zellen des Organismus durch ein zelltyp-spezifisches Set an Proteinen, welche die Ausübung der spezifischen Funktion einer Nervenzelle ermöglicht, wie zum Beispiel die Ausbildung von Axonen, Synapsen und synaptischer Vesikel. Als Markergene dienten die durch REST-regulierten Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* und das für die Untereinheit des AMPA Glutamat Rezeptors 2 (*GluR2*) kodierende Gen (Schoch *et al.*, 1996; Myers *et al.*, 1998; Lietz *et al.*, 2003).

Zunächst wurde die Expressionen der Gene *REST*, *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GluR2* in HNSC.100, SHSY5Y und 293T miteinander verglichen. Die zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde präpariert, revers transkribiert und die erhaltene cDNA mittels PCR mit spezifischen Oligonukleotiden gegen *REST*, *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GluR2* amplifiziert. *GAPDH* diente als Kontrolle der eingesetzten Menge an cDNA in den PCR-Ansätzen.

Abb. 25 zeigt, dass die Genexpression des transkriptionellen Repressors in den embryonalen Nierenzellen 293T am höchsten war. Die Stammzelle HNSC.100 weist ebenfalls eine starke Expression des *REST*-Gens auf. Der hohe *REST* mRNA-Level in den beiden Zelltypen korreliert mit der fehlenden Expression der neuronalen Markergene (siehe Abb. 25). In der Neuroblastomazelle SHSY5Y konnte nur ein sehr geringer *REST* mRNA-Level nachgewiesen werden. SHSY5Y exprimiert die Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GluR2*. Die Genexpression von *REST* steht also in einem umgekehrten Verhältnis zum Expressionslevel der neuronalen Markergene.

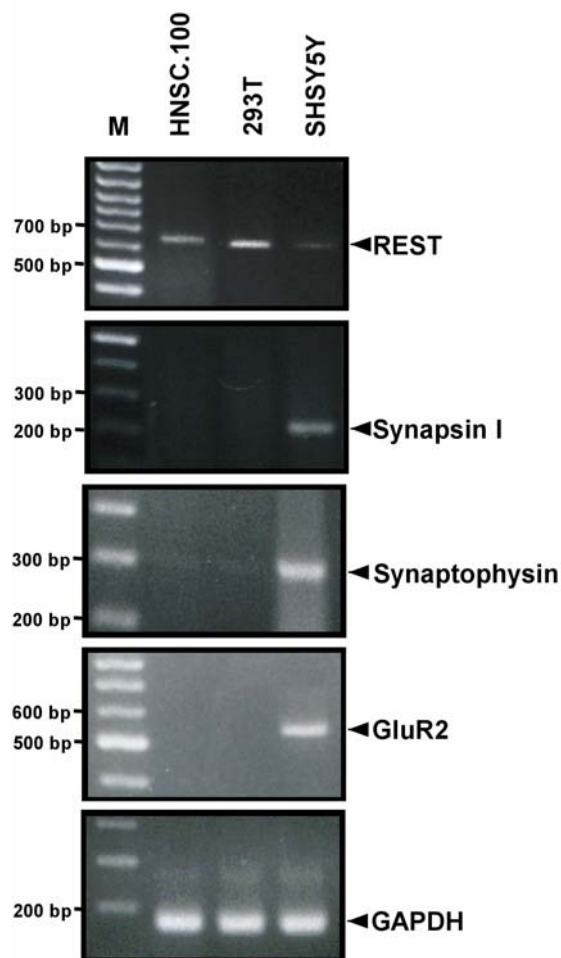


Abb. 25: Zelltyp-spezifische Genexpression von *REST* und *REST*-Zielgenen

Die zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde aus HNSC.100, SHSY5Y und 293T-Zellen präpariert und mittels RT-PCR revers transkribiert, die cDNA wurde anschließend mit spezifischen Oligonukleotiden gegen die Gene *REST*, *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *GluR2* und *GAPDH* amplifiziert. *GAPDH* diente als Kontrolle um den Einsatz gleicher Mengen an cDNA in die PCR sicherzustellen. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt, das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht. M = 100 bp Plus Marker (MBI-Fermentas), *REST* = 626 bp, *Synapsin I* = 248 bp, *Synaptophysin* = 297 bp, *GluR2* = 600 bp, *GAPDH* = 175 bp

4.12.2 Analyse der basalen Expression neuronaler Gene mittels des RNase Schutzexperimentes

Ein Teil der Ergebnisse aus 4.12.1 wurden durch RNase Schutzexperimente verifiziert, um die Genexpression direkt auf RNA-Ebene zu untersuchen. Dazu wurde die zytoplasmatische Gesamt-RNA aus HNSC.100, SHSY5Y und 293T-Zellen präpariert und mit Hilfe des RNase Schutzexperimentes mit spezifischen cRNA-Sonden gegen die mRNA der Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GAPDH* hybridisiert und analysiert.

Lediglich in den Neuroblastomazellen SHSY5Y konnte die Expression der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* nachgewiesen werden, was deren neuronalem Zellcharakter entspricht (Abb. 26). Das Experiment bestätigte die bereits erhaltenen Ergebnisse aus der RT-PCR.

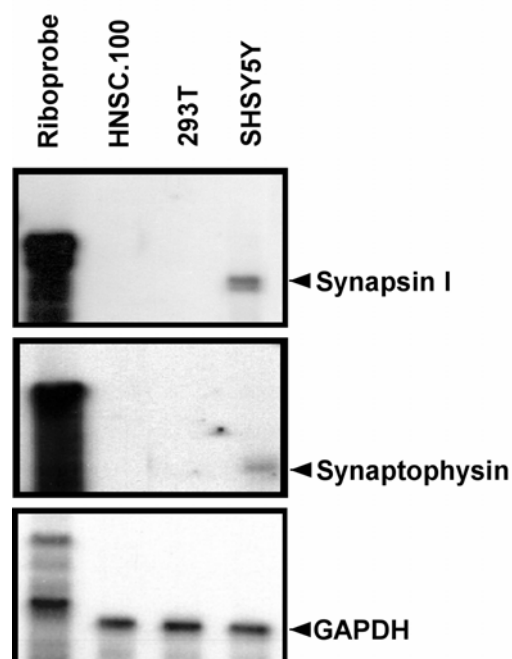


Abb. 26: Analyse der zelltyp-spezifischen Expression neuronaler Gene mittels des RNase Schutzexperimentes

Die zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde aus den Zelllinien HNSC.100, SHSY5Y und 293T präpariert und mit Hilfe des RNase Schutzexperimentes mit spezifischen cRNA-Sonden gegen die mRNA der Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GAPDH* analysiert. Hierzu wurden 20µg zytoplasmatische Gesamt-RNA für die Analyse der Genexpression von *Synapsin I* und *Synaptophysin* und 2,5µg zytoplasmatische Gesamt-RNA für das *GAPDH*-Gen eingesetzt.

4.13 Induzierte Differenzierung von HNSC.100 durch verschiedenen Kulturbedingungen

4.13.1 Induktion der neuronalen Genexpression in HNSC.100

Um sich einen *pool* aus sich teilenden und pluripotenten Zellen beizubehalten, müssen die HNSC.100-Zellen in Proliferationsmedium kultiviert werden, welches mit den Wachstumsfaktoren EGF und bFGF versetzt ist. Untersuchungen von Villa *et al.* (2000) und Kramer-Hämmerle (2004) zeigten, dass sich die humane neuronale Stammzelle HNSC.100 unter diesen Kulturbedingungen durch eine hohe Expression von *Nestin* und durch eine fehlende Expression von neuronalen Markergenen auszeichnet. Erst bei Entzug der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF stellen sie die Proliferation ein und beginnen sich zu differenzieren (Villa *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurde die Differenzierung der neuralen Stammzellen zu neuronalen Zellen untersucht, wobei unter anderem der Einfluss von all-trans Retinsäure auf die Differenzierung von HNSC.100 analysiert werden sollte. Retinsäure (RA), ein Derivat des Vitamin A, ist an der neuronalen Differenzierung beteiligt (Maden, 2001). Es wurde gezeigt, dass Retinsäure die Neurogenese in den neuronalen Vorläuferzellen NTera2 einleitet (Pleasure *et al.*, 2001, Younkin *et al.*, 1993 und Leypoldt *et al.*, 2001). Um die neuronale Differenzierung von HNSC.100 zu induzieren, wurde dem Kulturmedium die Mitogene EGF und bFGF entzogen und 1µM Retinsäure zugesetzt. Das Medium ohne die Mitogene EGF und bFGF wurde als astrozytäres Differenzierungsmedium bezeichnet. Wurde dem Medium nach Entzug der Mitogene 1µM Retinsäure zugegeben, wurde das Medium als neuronales Differenzierungsmedium bezeichnet. Zunächst wurde überprüft, ob sich das Differenzierungsprogramm der neuralen Stammzellen durch verschiedene Kulturbedingungen induzieren lässt. Dazu wurden die HNSC.100-Zellen für 14 Tage in Proliferationsmedium, in astrozytärem Differenzierungsmedium und in neuronalem Differenzierungsmedium kultiviert und zunächst der Expressionslevel der Gene *Nestin* und *GFAP* analysiert. Hierfür wurde die zytoplasmatische Gesamt-RNA präpariert, revers transkribiert und die entstandene cDNA mit spezifischen Oligonukleotiden gegen die Gene *Nestin*, *GFAP* und *GAPDH* amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über ein 2%iges Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht. *GAPDH* diente als Kontrolle, dass die eingesetzte Menge an cDNA in allen PCR-Ansätzen gleich groß war.

Die HNSC.100-Zellen, die in astrozytärem Differenzierungsmedium kultiviert wurden, zeigen eine starke Abnahme der *Nestin*-Genexpression im Vergleich zu Zellen, die in

Proliferationsmedium kultiviert wurden (Abb. 27). Wurden die Zellen in neuronalem Differenzierungsmedium kultiviert, war eine Genexpression von *Nestin* nicht mehr detektierbar. HNSC.100-Zellen die in Proliferationsmedium gehalten wurden, zeigten eine schwache Expression des Astrozytenmarker *GFAP*. Die Kultivierung der Zellen in astrozytärem Differenzierungsmedium hingegen bewirkte eine verstärkte Genexpression von *GFAP*. Im Gegensatz dazu konnte bei Zugabe von 1 μ M Retinsäure in das Differenzierungsmedium keine Expression von *GFAP* mehr nachgewiesen werden.

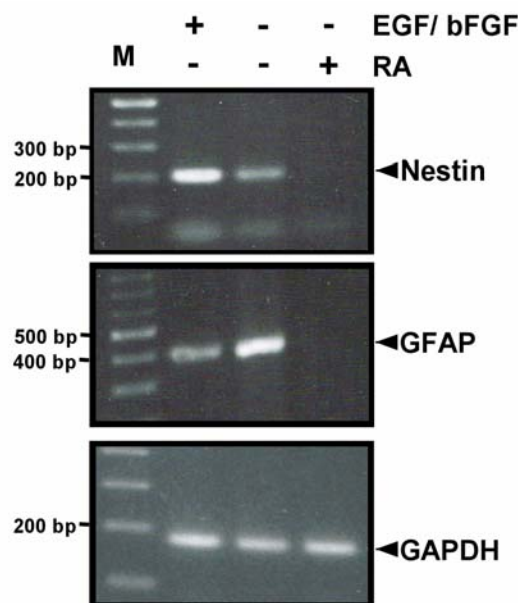


Abb. 27: Genexpression von *Nestin* und *GFAP* in HNSC.100 unter verschiedenen Kulturbedingungen

HNSC.100-Zellen wurden 14 Tage in Proliferationsmedium (+ EGF/bFGF, - RA), in astrozytärem Differenzierungsmedium (- EGF/bFGF, - RA) und in neuronalem Differenzierungsmedium (- EGF/bFGF + 1 μ M RA) kultiviert. Die zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde präpariert und mittels RT-PCR revers transkribiert, die cDNA anschließend mit spezifischen Oligonukleotiden gegen die Gene *Nestin*, *GFAP* (je 30 Zyklen) und *GAPDH* (17 Zyklen) amplifiziert. *GAPDH* diente als Kontrolle um den Einsatz gleicher Mengen an cDNA in die PCR sicherzustellen. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt, das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht. . M = 100 bp Plus Marker (MBI-Fermentas), *Nestin* = 195 bp, *GFAP* = 382 bp, *GAPDH* = 175 bp

HNSC.100-Zellen, die in Abwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF kultiviert wurden, differenzierten demnach verstärkt zu Astroglia-Zellen, die Zugabe von RA scheint diesen Weg jedoch zu verhindern.

Um den Einfluss unterschiedlicher Kulturbedingungen auf die Differenzierung der HNSC.100 zu neuronalen Zellen zu überprüfen, wurde als nächstes die Expression der neuronalen Markergene untersucht. Die cDNA wurde hierfür mit spezifischen Oligonukleotiden gegen die Gene *REST*, *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GluR2* amplifiziert und die PCR-Produkte über ein 2%iges Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA unter

UV-Licht sichtbar gemacht. Abb. 28 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches. HNSC.100-Zellen, die in Proliferationsmedium kultiviert wurden zeigten eine hohe *REST*-Genexpression. Die Kultivierung der Zellen in astrozytärem und neuronalem Differenzierungsmedium bewirkte einen leicht erniedrigten Expressionlevel des *REST*-Gens. Eine Expression der neuronalen Markergene konnte lediglich durch Zugabe von 1 μ M Retinsäure induziert werden. So konnte unter diesen speziellen Kulturbedingungen die Expression der Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GluR2* nachgewiesen werden. Die Kultivierung von HNSC.100-Zellen in astrozytärem Differenzierungsmedium zeigte keine Expression der neuronalen Marker.

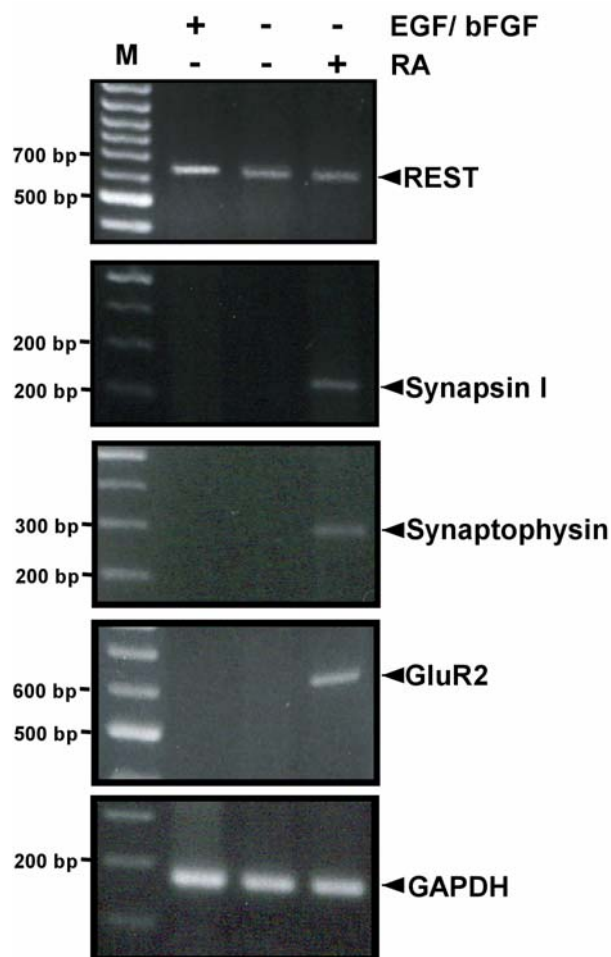


Abb. 28: Expression neuronaler Markergene unter verschiedenen Kulturbedingungen in HNSC.100-Zellen

HNSC.100-Zellen wurden 14 Tage in Proliferationsmedium (+ EGF/bFGF, - RA) in astrozytärem Differenzierungsmedium (- EGF/bFGF, - RA) und in neuronalem Differenzierungsmedium (- EGF/bFGF + 1 μ M RA) kultiviert. Die zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde präpariert und mittels RT-PCR revers transkribiert, die cDNA anschließend mit spezifischen Oligonukleotide gegen *REST*, *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *GluR2* und *GAPDH* amplifiziert. *GAPDH* diente als Kontrolle um den Einsatz gleicher Mengen an cDNA in die PCR sicherzustellen. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt, das Gel mit

Ethidiumbromid gefärbt und die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht. M = 100 bp Plus Marker (MBI-Fermentas), REST = 626 bp, Synapsin = 248 bp, Synaptophysin = 297 bp, GluR2 = 600 bp, GAPDH = 175 bp

4.13.2 Analyse der Expression neuronaler Gene in HNSC.100-Zellen mittels des RNase Schutzexperimentes

Die Expression der Gene *GFAP*, *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GAPDH* wurde zusätzlich mittels eines RNase Schutzexperiment untersucht. Dazu wurden HNSC.100-Zellen 14 Tage in Proliferationsmedium, in astrozytärem und in neuronalem Differenzierungsmedium kultiviert, anschließend die zytoplasmatische Gesamt-RNA präpariert und mit Hilfe des RNase Schutzexperimentes mit spezifischen cRNA-Sonden gegen die mRNA der Gene *GFAP*, *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GAPDH* hybridisiert und analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass in HNSC.100-Zellen, die in astrozytärem Differenzierungsmedium kultiviert wurden, ein stark erhöhter *GFAP* mRNA-Level aufwiesen (Abb. 29). Die Ergänzung des Mediums mit 1 μ M Retinsäure zeigte keine Induktion der *GFAP*-Expression in HNSC.100-Zellen. Die Expression der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* konnte nur in HNSC.100-Zellen detektiert werden, die in neuronalem Differenzierungsmedium gehalten wurden. Der *GAPDH* mRNA-Level war in allen Proben gleich hoch, sodass davon ausgegangen werden kann, dass auch die eingesetzte Gesamt-RNA für alle Proben gleich hoch war. Dies bestätigt die bereits durch die PCR erhaltenen Ergebnisse (siehe 4.6.1).

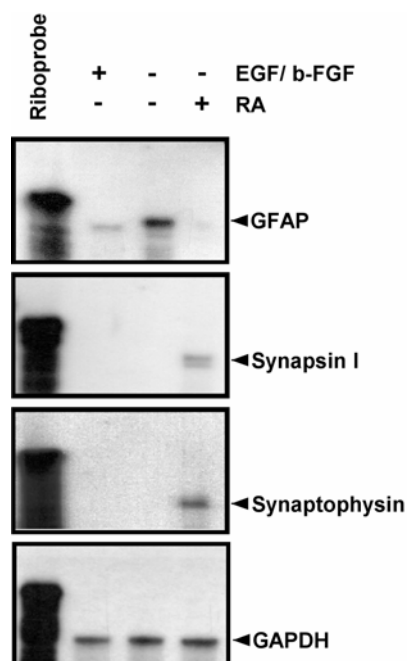


Abb. 29: Analyse der Expression neuronaler Gene mittels RNase Schutzexperiment

HNSC.100-Zellen wurden 14 Tage in Proliferationsmedium (+ EGF/bFGF, - RA) in astrozytärem Differenzierungsmedium (- EGF/bFGF, - RA) und in neuronalem Differenzierungsmedium (- EGF/bFGF +

1 μ M RA) kultiviert und anschließend die zytoplasmatische Gesamt-RNA präpariert und mit Hilfe des RNase Schutzexperimentes mit spezifischen cRNA-Sonden gegen *GFAP*, *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GAPDH* analysiert. Hierzu wurden 20 μ g zytoplasmatische Gesamt-RNA für die Analyse der Genexpression von *GFAP*, *Synapsin I* und *Synaptophysin* und 2,5 μ g zytoplasmatische Gesamt-RNA für das *GAPDH*-Gen eingesetzt.

4.14 Expression neuronaler Gene in HNSC.100-Zellen nach Hemmung der Histon-Deacetylasen

Wie bereits unter 4.3 beschrieben, vermittelt REST die Repression neuronaler Gene durch Rekrutierung von Histon-Deacetylasen (HDAC) an die entsprechende Transkriptionseinheit. Die Deacetylierung der Histone führt zu einer kompakteren Konfiguration der DNA im Nukleosom und bewirkt somit die Repression der Transkription, indem der Zugang zur DNA für Transkriptionsfaktoren versperrt ist.

In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob eine Inhibierung der Histon-Deacetylasen durch Trichostatin A (TSA) ausreichend ist, um die Expression neuronaler Gene zu induzieren. Da die Behandlung mit TSA toxisch auf Stammzellen wirken kann (Hsieh *et al.*, 2004) wurden die Stammzellen mit 25 ng/ μ l TSA über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Anschließend wurde die zytoplasmatische Gesamt-RNA isoliert und durch eine RT-PCR revers transkribiert. Die cDNA wurde in eine PCR eingesetzt und mit spezifischen Oligonukleotiden gegen die Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *GluR2* und *GAPDH* amplifiziert. Abb. 30 zeigt, dass die Expression der REST-Zielgene *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GluR2* durch die Inkubation mit TSA heraufreguliert wurden. Die bereits bekannten REST-Zielgene *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GluR2* werden demnach in HNSC.100 durch einen Histon-Deacetylasen-abhängigen Mechanismus reguliert.

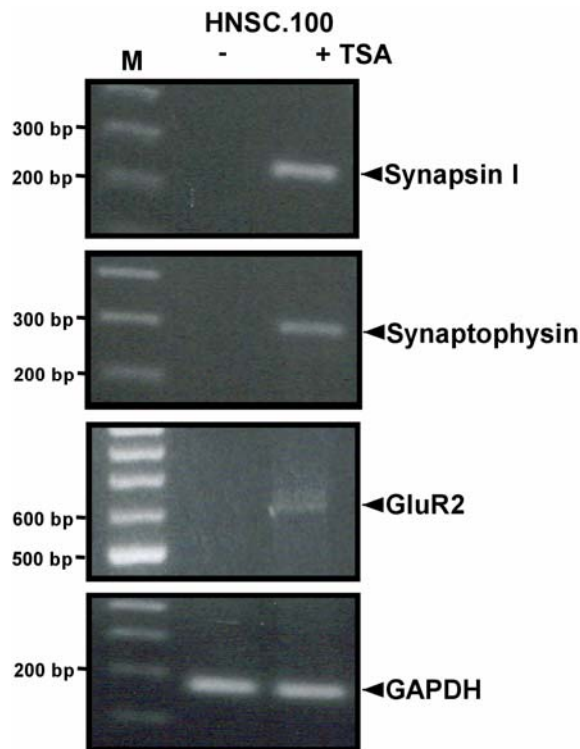


Abb. 30: Neuronal Genexpression in HNSC.100 durch Hemmung der Histon-Deacetylase mit TSA

Die Zellen wurden in HNSC-Proliferationsmedium mit DMSO (-) oder mit Trichostatin A (25 ng/μl) (+) für 24 h inkubiert. Die RNA wurde isoliert und revers transkribiert. Die erhaltene cDNA wurde mit spezifischen Oligonukleotiden gegen die Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *GluR2* und *GAPDH* amplifiziert. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte über ein 2%iges Agarosegel. Die DNA wurde nach der Färbung mit Ethidiumbromid im UV-Licht dargestellt. . M = 100 bp Plus Marker (MBI-Fermentas), Synapsin = 248 bp, Synaptophysin = 297 bp, GluR2 = 600 bp, GAPDH = 175 bp

4.15 Auswirkung der Expression von DP-REST:ER in HNSC.100

4.15.1 Herstellung von humanen Zelllinien, die dauerhaft DP-REST:ER exprimieren

Um den Einfluss von REST auf die neuronale Genexpression in HNSC.100 analysieren zu können, wurden die Auswirkungen der dominant-positive REST-Mutante DP-REST:ER auf die Expression neuronaler Gene überprüft. DP-REST:ER soll nicht nur die durch REST vermittelte Repression der Transkription aufheben, sondern zusätzlich die Expression dieser Gene aktivieren. Dazu wurde die unter 4.4 beschriebenen REST-Mutante DP-REST:ER zur Generierung humaner Zelllinien eingesetzt, die dauerhaft DP-REST:ER exprimieren. Der retrovirale Vektoren pMSCV-DP-REST:ER, der zusätzlich die kodierende Region des Puromyzin-Acetyltransferase-Gens (pac) als Selektionsmarker enthält, sowie pLNCX-DP-REST:ER, der als Selektionsmarker die kodierende Region des Neomyzin-Phosphotransferase-Gens (neo) enthält, wurden zur Infektion von HNSC.100 und der

Neuroblastomazelllinie SHSY5Y verwendet. pMSCV-DP-REST:ER und pLNCX-DP-REST:ER wurden in die Verpackungszelllinie phoenix-Ampho transfiziert und ein Virusstock erzeugt, der anschließend zur Infektion der Zellen genutzt wurde. 72 h nach Infektion wurden die Zellen mit Puromyzin (0,75µg/ml) bzw. mit G418 (600µg/ml) über einen Zeitraum von drei Wochen selektiert und anschließend die resistenten Zellen analysiert. Um eine Kontrollzelllinie herzustellen, wurden HNSC.100 und SHSY5Y auch mit dem "Leervektor" pMSCV bzw. pLNCX infiziert und analysiert. Hierzu wurden die Kernproteine präpariert und mit Hilfe des Western-Blots immunologisch untersucht. Es wurden Antikörper verwendet, die spezifisch das FLAG-Epitop erkennen (siehe Abb. 31).

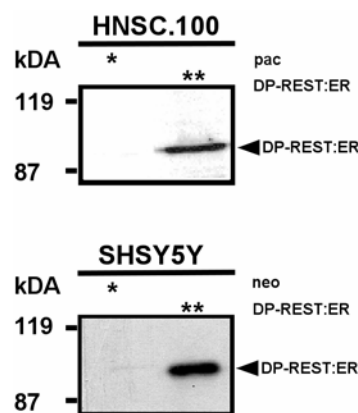


Abb. 31: Expression des DP-REST:ER-Proteins in HNSC.100 und SHSY5Y

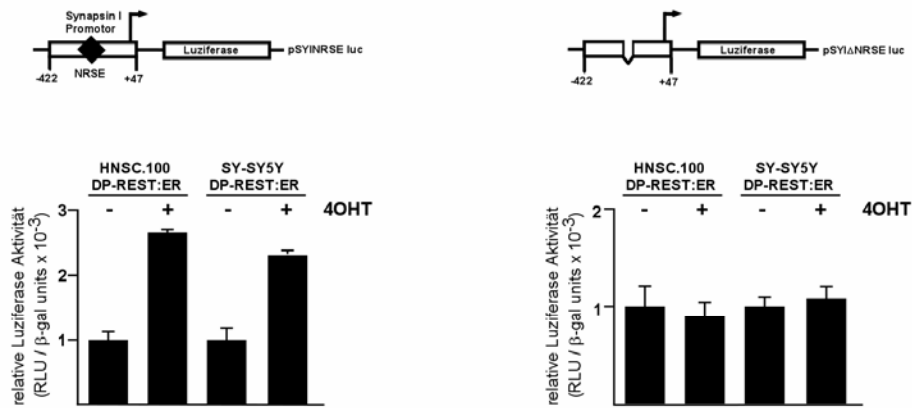
Western-Blot-Analyse der präparierten Kernproteine aus HNSC.100 und SHSY5Y. Die Proteine wurden mit Hilfe des Anti-FLAG-Antikörpers nachgewiesen. Als Kontrolle wurden die Zellen analysiert, welche nur den Selektionsmarker Puromyzin-Azetyltransferase (pac) bzw. Neomyzin-Phosphotransferase (neo) exprimieren.

Für das detektierte Protein wurde das Laufverhalten eines etwa 100 kDa Proteins im SDS-Gel bestimmt (Abb. 31) und es wurde nur in den Zellen detektiert, die mit DP-REST:ER infiziert worden waren. In den Zellen, die mit dem Leervektor infiziert wurden, und die lediglich die Puromyzin-Azetyltransferase (pac) bzw. Neomyzin-Phosphotransferase (neo) exprimierten, konnte kein DP-REST:ER nachgewiesen werden. Die Western-Blot-Analyse zeigt, dass die REST-Mutante DP-REST:ER in den Zelllinien HNSC.100 sowie SHSY5Y exprimiert wird. Diese Zelllinien wurden HNSC.100_{DP-REST:ER} und SHSY5Y_{DP-REST:ER} genannt. Die Zellen, die mit den Leervektoren infiziert wurde, erhielten den Namen HNSC.100_{pac} und SHSY5Y_{neo}.

4.15.2 Analyse der Aktivität von DP-REST:ER nach Induktion mit 4-OHT

Um zu überprüfen, ob das synthetisierte DP-REST:ER-Protein in der Lage ist, Reporterkonstrukte zu aktivieren, die eine REST-Bindestelle (NRSE) besitzen, wurden Reporterplasmide verwendet, die entweder kein NRSE (pSYIΔNRSEluc), eine (pSYINRSEluc) oder zwei NRSE Kopien aus dem *Synapsin I*-Gen (pSYINRSE²luc) enthalten (siehe Material und Methoden 3.3.1). Eines der Reporterplasmide, pSYIΔNRSEluc bzw. pSYINRSEluc, und das Referenzplasmid pRSVβ wurden in die DP-REST:ER exprimierenden Zellen transfiziert und 24 h nach der Transfektion mit 4-OHT induziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellextrakte präpariert und durch Messung der Lichteinheiten und der β-Galaktosidaseeinheiten analysiert. Die Ergebnisse der Transfektion sind in Abb. 32A gezeigt. Die Transfektion des Reporterplasmids pSYINRSEluc führte zu einer basalen Luziferaseaktivität, die durch Induktion mit 4-OHT um das 2.5-fache (HNSC.100-Zellen) bzw. das 1.3-fache (SHSY5Y-Zellen) erhöht werden konnte (Abb. 32A). Die Transfektion des Reporterplasmids pSYIΔNRSEluc, welches keine REST-Bindestelle enthält, führte nach 4-OHT Zugabe zu keiner erhöhten Luziferaseaktivität. In einem weiteren Transfektionsversuch wurde entweder das Reporterplasmid pSYINRSE²luc oder der Leervektor pHIVTATALuc und zusätzlich das Referenzplasmid pRSVβ in die DP-REST:ER exprimierenden Zellen transfiziert und 24 h nach der Transfektion mit 4-OHT induziert. Die Zellextrakte wurden nach weiteren 24 h präpariert und die Lichteinheiten gegen die β-Galaktosidaseeinheiten abgeglichen. Die Ergebnisse der Transfektion sind in Abb. 32B gezeigt. Die Transfektion des Reporterplasmids pSYINRSE²luc führte nach Induktion mit 4-OHT zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität des Reporterplasmids um den Faktor 8.7 (HNSC.100-Zellen) bzw. 4.0 (SHSY5Y-Zellen). Die Transfektionen mit dem Kontrollplasmid pHIVTATALuc zeigten eine basale Luziferaseaktivität, die nach Induktion mit 4-OHT keine Veränderung zeigte. Die dargestellten Ergebnisse beweisen, dass das integrierte Transgen DP-REST:ER funktionell war. Die gleichen Transfektionsversuche wurden auch mit den Kontrollzelllinien HNSC.100pac und SHSY5Yneo durchgeführt. Wie erwartet wurde nach Zugabe von 4-OHT kein Anstieg der Luziferaseeinheiten gemessen (Daten nicht gezeigt).

A



B

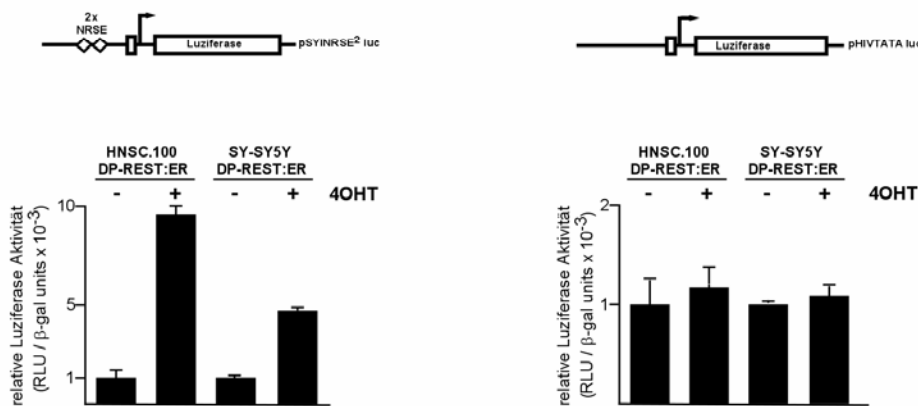


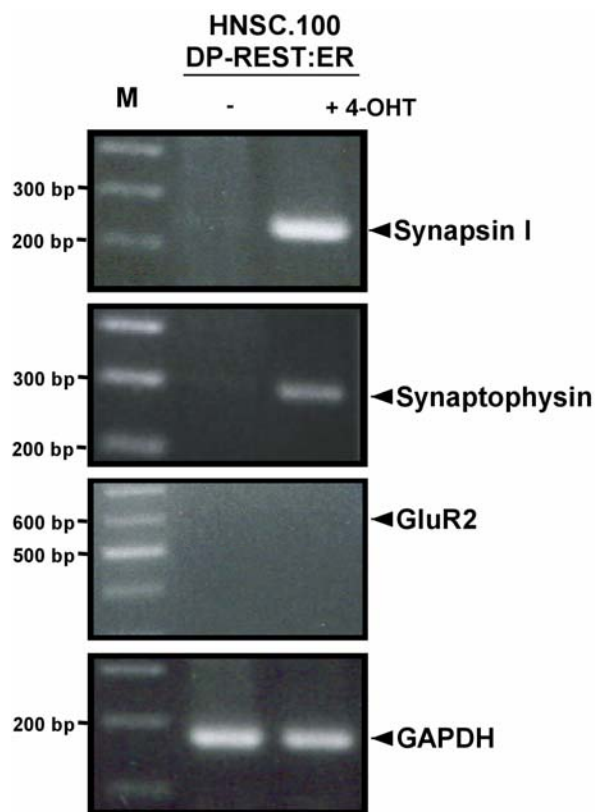
Abb. 32: Aktivität von DP-REST:ER nach Zugabe von 4-OHT

Die Reporterplasmide (**A**) pSYINRSEluc (1µg/Platte) oder pSYIANRSEluc (1µg/Platte) und (**B**) pSYINRSE²luc (1µg/Platte) oder das Kontrollplasmid pHIVTATA²luc (1µg/Platte), sowie das Referenzplasmid pRSVβ (0,5µg/Platte) wurde in die Zelllinien transfiziert und 24 h nach der Transfektion mit 4-OHT (1µM) induziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellextrakte präpariert und die Luciferase-, sowie die β-Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Daten zeigen das Verhältnis zwischen der Luciferaseaktivität (Lichteinheiten) und der β-Galaktosidaseaktivität (OD Einheiten).

4.15.3 Expression neuronaler Gene in HNSC.100_{DP-REST:ER} -Zellen nach Zugabe von 4-OHT

Die Ergebnisse der Transfektion zeigten, dass DP-REST:ER in HNSC.100_{DP-REST:ER} nach Zugabe von 4-OHT in der Lage ist, NRSE-beinhaltende Reporterkonstrukte zu aktivieren. Im folgendem wurde nun überprüft, ob DP-REST:ER die Expression von REST-Zielgenen, die in ihrer natürlichen Chromatinstruktur eingebettet sind, einleiten kann.

HNSC.100_{DP-REST:ER} Zellen wurden für 48 h entweder mit Ethanol oder mit 4-OHT behandelt, die Zellen anschließend geerntet, die zytoplasmatische Gesamt-RNA präpariert und anschließend revers transkribiert. Die cDNA wurde mittels spezifischen Oligonukleotiden gegen die Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *GluR2* und *GAPDH* über PCR amplifiziert und analysiert (Abb. 33).



2 Abb. 33: Induzierte Expression von REST-Zielgenen in HNSC.100-Zellen

HNSC.100_{DP-REST:ER} wurden ausgesät und über einen Zeitraum von 48 h mit Ethanol (-) oder mit 4-OHT (+) (1µM) inkubiert. Die zytoplasmatische RNA wurde aus den unbehandelten und den mit 4-OHT behandelten Zellen präpariert und mit Hilfe der RT-PCR revers transkribiert. Die cDNA wurden mit spezifischen Oligonukleotiden gegen *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *GluR2* und *GAPDH* über eine PCR amplifiziert, über ein 2 %iges Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die DNA wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht. . M = 100 bp Plus Marker (MBI-Fermentas), Synapsin I = 248 bp, Synaptophysin = 297 bp, GluR2 = 600 bp, GAPDH = 175 bp

Abb. 33 zeigt, dass die Expression der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* durch das aktivierte DP-REST:ER eingeleitet werden konnte. Allerdings war die Aktivierung nicht ausreichend, um die Expression des REST-Zielgens *GluR2* in HNSC.100_{DP-REST:ER} auszulösen.

4.15.4 Analyse der Expression neuronaler Gene in HNSC.100_{DP-REST:ER} mittels des RNase Schutzexperimentes

Die Expression der Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GAPDH* wurde zusätzlich mit Hilfe eines RNase Schutzexperimentes verifiziert. Dazu wurden HNSC.100_{DP-REST:ER}-Zellen ausgesät und für 48 h mit 4-OHT (1µM) inkubiert, anschließend wurde die zytoplasmatische Gesamt-RNA präpariert und mit spezifischen cRNA-Sonden gegen die mRNA der Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GAPDH* hybridisiert und analysiert. Wie Abb. 34 zeigt, konnte die Genexpression von *Synapsin I* und *Synaptophysin* durch die Aktivierung von DP-REST:ER mit 4-OHT eingeleitet werden, was die Ergebnisse aus der PCR.

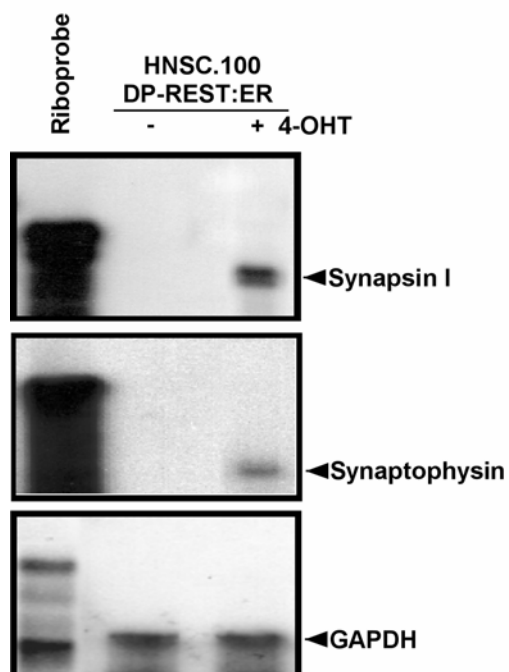


Abb. 34: Induktion der Genexpression von *Synapsin I* und *Synaptophysin* in HNSC.100_{DP-REST:ER}-Zellen nach Aktivierung der REST-Mutante DP-REST:ER

HNSC.100_{DP-REST:ER}-Zellen wurden ausgesät und über einen Zeitraum von 48 h mit Ethanol (-) oder mit 4-OHT (+) (1µM) inkubiert, die zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde präpariert und mit Hilfe des RNase Schutzexperimentes mit spezifischen cRNA-Sonden gegen die mRNA der Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GAPDH* hybridisiert und analysiert. Hierzu wurden 20µg zytoplasmatische Gesamt-RNA für die Analyse der Genexpression von *Synapsin I* und *Synaptophysin* und 2,5µg zytoplasmatische Gesamt-RNA für das *GAPDH*-Gen eingesetzt.

4.16 Zelltyp-spezifische Bindung von DP-REST:ER an die REST-Bindestelle auf der DNA

Die Aktivierung von REST-Zielgenen setzt die Bindung von DP-REST:ER an die DNA voraus. Da DP-REST:ER die DNA-Bindedomäne aus REST enthält, bindet die Mutante an die gleiche spezifische Erkennungssequenz (NRSE) auf der DNA wie das endogene REST. Zum Nachweis der DNA/Protein Wechselwirkungen *in vivo*, wurde die Methode der Chromatin-Immunopräzipitation angewandt. Dazu wurden HNSC.100_{DP-REST:ER}- und SHSY5Y_{DP-REST:ER}-Zellen ausgesät und für 24 h mit 4-OHT stimuliert, anschließend ein "cross-linking" zwischen DNA und Proteinen durchgeführt und das Chromatin mittels Ultraschall zerkleinert. Die DNA wurde unter Verwendung von M2-Agarose, welche mit dem FLAG-tag von DP-REST:ER interagiert, immunopräzipitiert und über PCR amplifiziert. Dazu wurden spezifische Oligonukleotide verwendet, die 5' und 3' der REST-Bindesequenz NRSE des *Synapsin I*-, des *Synaptophysin*-, und des *GluR2*-Gens hybridisieren. Abb. 35 zeigt die Ergebnisse dieser PCR. Die Neuroblastomazelllinie SHSY5Y diente in diesem Fall als Kontrolle, da sie bereits eine basale Expression der entsprechenden Gene aufzeigt und somit das Chromatin für Transkriptionsfaktoren zugänglich sein muss. Dies bestätigt auch die Ergebnisse der Chromatin-Immunopräzipitation, da in SHSY5Y_{DP-REST:ER} für alle untersuchten Gene eine Bindung von DP-REST:ER an das NRSE auf der DNA nachgewiesen werden konnte (Abb. 35, unten).

Im Fall der HNSC.100-Zellen konnte eine Bindung des DP-REST:ER-Proteins, nach Aktivierung durch 4-OHT, *in vivo* an die REST-Bindestelle des *Synapsin I*-Gens (Abb. 35, links) und an das intronische NRSE des *Synaptophysin*-Gens (Abb. 35, mitte) detektiert werden. Für das *GluR2*-Gen konnte nur ein sehr schwaches PCR-Signal gezeigt werden (Abb. 35, rechts).

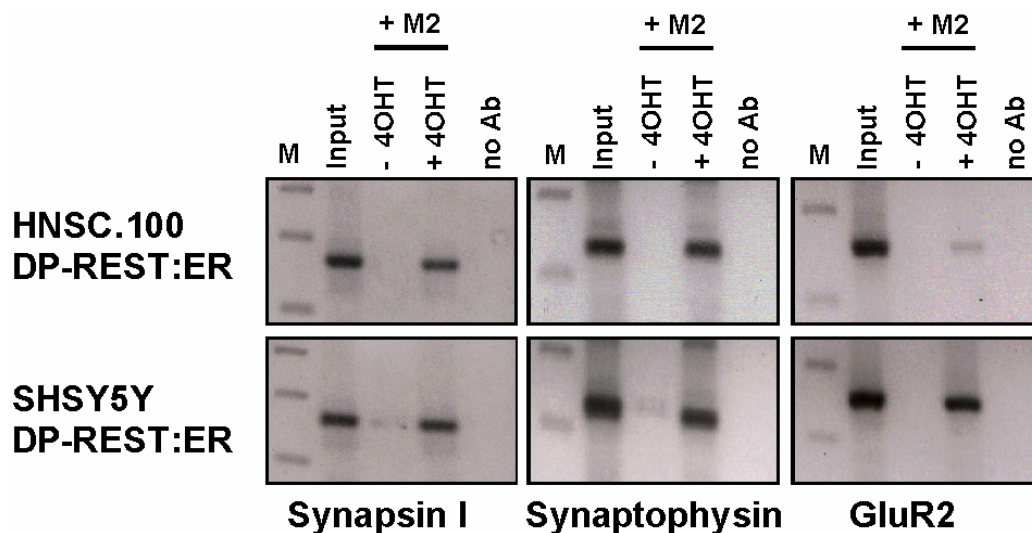


Abb. 35: Chromatin Immunopräzipitation zeigt eine zelltyp-spezifische Bindung von DP-REST:ER an die DNA

HNSC.100_{DP-REST:ER} und SHSY5Y_{DP-REST:ER} wurden für 24 h mit 4-OHT stimuliert. Die Chromatin Immunopräzipitation wurde mit M2-Agarose durchgeführt. M2-Agarose interagiert mit dem FLAG-tag von DP-REST:ER. Das präzipitierte Chromatin wurde mittels Ultraschall zerkleinert und durch PCR amplifiziert. Dazu wurden spezifische Oligonukleotide verwendet, die 5' und 3' der REST-Bindesequenz NRSE des *Synapsin I*-, des *Synaptophysin*-, und des *GluR2*-Gens hybridisieren. Die PCR-Produkte wurden über ein 2%iges Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Als Negativkontrolle wurde die Immunopräzipitation mit Sepharose A (no Ab) anstelle von M2-Agarose durchgeführt und ebenfalls mittels PCR amplifiziert. Als Positivkontrolle (Input) wurde ein Aliquot des Gesamtchromatins für die Immunopräzipitation verwendet und mittels PCR amplifiziert.

4.17 Analyse der Chromatinstruktur

Kommt es nach Aktivierung des DP-REST:ER-Proteins zu keiner Bindung an das NRSE der REST-Zielgene, könnte dies darauf hindeuten, dass die DNA für den Transkriptionsfaktor nicht zugänglich ist, da die entsprechenden Genabschnitte bereits durch Modifikation des Chromatins „abgeschaltet“ wurden. Um zu klären, in welchem Zustand sich das Chromatin befindet, wurde wieder eine Chromatin-Immunopräzipitation durchgeführt. In diesem Fall wurden epigenetische Marker verwendet, die eine Unterscheidung zwischen Genabschnitten zulassen, die aktiv transkribiert werden, und solchen die "abgeschaltet" sind. Der epigenetische Marker für "aktiv" transkribierte Gene ist der tri-methylierte Lysinrest 4 (K4) auf dem Histon 3 (triMetK4) (Santos-Rosa *et al.*, 2002). Der Marker für „abgeschaltete“ Gene ist der di-methylierte Lysinrest 9 (K9) des Histon H3 (diMetK9) (Nielsen *et al.*, 2001). Antikörper, die gegen triMetK4, oder diMetK9 gerichtet sind, wurden in den Chromatin-Immunopräzipitations-Assay eingesetzt und die präzipitierte DNA über PCR analysiert.

Die Amplifikation mit spezifischen Oligonukleotiden, die 5' und 3' des NRSEs der Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GluR2* hybridisieren, zeigte in den HNSC.100-Zellen ein

starkes PCR-Signal für triMetK4 sowohl für das NRSE des *Synapsin I*-Gen, als auch für das *Synaptophysin*-Gen (Abb. 36A, links und mitte). Demnach liegen diese REST-Bindestellen in einer offenen Chromatinstruktur. Gleichzeitig konnte auch ein schwaches Signal für diMetK9 detektiert werden. Das Ergebnis der PCR zeigt für das NRSE des *GluR2*-Gens ein Signal für diMetK9, also eine geschlossene Chromatinstruktur, und kein PCR-Signal für triMetK4 (Abb. 36A, rechts). Das erklärt, weshalb DP-REST:ER nach Aktivierung durch 4-OHT nicht in Lage war die Transkription von *GluR2* in HNSC.100 einzuleiten, denn diese Region liegt in einem inaktivem Genabschnitt. Die Neuroblastomazelle SHSY5Y zeigte für alle untersuchten Gene eine starke PCR-Bande für triMetK4 (Abb. 36B), doch kein Signal für diMetK9. Die REST-Bindestellen der Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GluR2* sind in SHSY5Y in eine offene Chromatinstruktur eingebettet, die den Zugang von Transkriptionsfaktoren an die DNA erlaubt. Diese Daten ergänzen die Ergebnisse aus 4.16. Konnte beispielsweise für das *Synapsin I*-Gen in HNSC.100 eine offene Chromatinstruktur durch den epigenetischen Marker triMetK4 detektiert werden, so konnte dies durch das Binden von DP-REST:ER an das NRSE *in vivo* untermauert werden. War der Marker diMetK9, der für eine geschlossene Chromatinstruktur steht, nachweisbar, ließ sich keine *in vivo*-Bindung von DP-REST:ER an das NRSE von *GluR2* nachweisen.

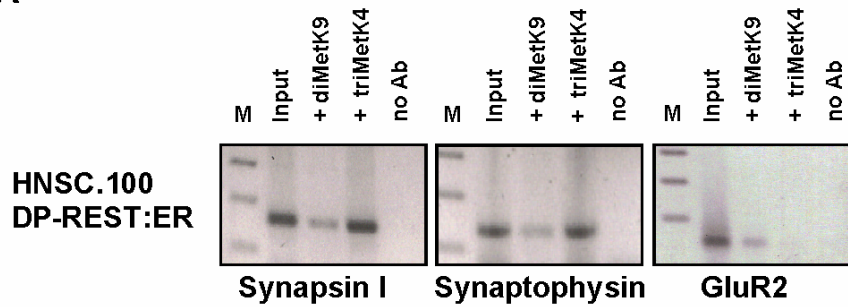
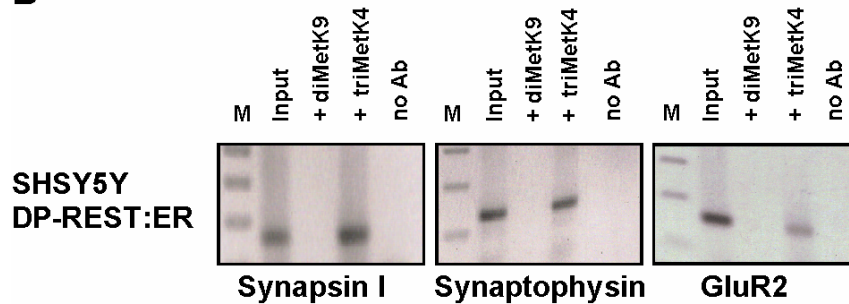
A**B**

Abb. 36: Epigenetische Modifikation des Chromatins von REST-Zielgenen in HNSC.100 und SH-SY5Y

Die Chromatinstruktur wurde bei HNSC.100_{DP-REST:ER} (A) und bei SHSY5Y_{DP-REST:ER} (B) analysiert. Die Chromatin Immunopräzipitation wurde unter Verwendung von Antikörpern, die gegen diMetK9 und triMetK4 gerichtet waren, durchgeführt. Das Präzipitat wurde mittels PCR unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden, die 5' und 3' der REST-Bindesequenz NRSE des *Synapsin I*-*Synaptophysin*- und *GluR2*-Gens komplementär hybridisieren, analysiert. Die PCR-Produkte wurden über ein 2%iges Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Als Negativkontrolle wurde die Immunpräzipitation ohne Antikörper und nur mit Sepharose A (no Ab) durchgeführt und ebenfalls mittels PCR amplifiziert. Als Positivkontrolle (Input) wurde ein Aliquot des Gesamtchromatins für die Immunopräzipitation verwendet und mittels PCR amplifiziert.

5. Diskussion

Der Transkriptionsfaktor REST ist ein Repressor neuronaler Gene in nicht-neuronalem Gewebe (Chong *et al.*, 1995; Schoenherr *et al.*, 1995). Gene, die durch REST reguliert werden, kodieren für neuronale Rezeptoren, Ionenkanäle, Neuropeptide, synaptische Vesikelpoteine und Transkriptionsfaktoren. In dieser Arbeit wurde die Regulation der *Synaptophysin*-Genexpression und weiterer putativer REST-Zielgene in unterschiedlichen Zellsystemen untersucht und miteinander verglichen. Dies sollte zur Klärung beitragen, ob es zelltyp-spezifische Unterschiede bei der Regulation der Genexpression gibt.

5.1 REST reguliert die Expression des *Synaptophysin*-Gens

Synaptophysin ist ein Polypeptid, das als integrales Membranprotein in synaptischen Vesikeln vorliegt. Es spielt eine bedeutende Rolle bei der Transmitterfreisetzung und wird in neuronalen und neuroendokrinen Zellen exprimiert (Navone *et al.*, 1986; Leube R.E., 1994). In Zusammenarbeit mit Michael Lietz konnte gezeigt werden, dass ein funktionelles NRSE im ersten Intron des menschlichen *Synaptophysin*-Gens lokalisiert ist. Die Ergebnisse der Transfektions-Experimente zeigten klar, dass dieses NRSE *in vitro* als DNA-Bindestelle für REST fungiert und für die Regulation der Genexpression essentiell ist. Zudem wurde deutlich, dass die Funktionalität des NRSEs aus dem *Synaptophysin*-Gen sich nicht von der des *Synapsin I*-Gens unterscheidet. Dies lässt den Schluss zu, dass beide Gene über den gleichen REST-vermittelten Mechanismus reguliert werden.

5.2 Zelltyp-spezifische Expression von REST-Zielgenen

Die Expression neuronaler Gene beschränkt sich nicht nur auf neuronale und neuroendokrine Zellen, auch in endokrinen, pankreatischen β -Zellen konnte die Expression der Gene *Synapsin I*, *SCG10* und *Synaptophysin* nachgewiesen werden (Atouf *et al.*, 1997; Navone *et al.*, 1986; Thomas-Reetz *et al.*, 1993). Dies ist auf die niedrige endogene REST-Konzentration in diesen Zellen zurückzuführen (Atouf *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2003; Abderrahmani *et al.*, 2001; 2004).

In dieser Studie wurde die Genexpression von *REST* und die seiner Zielgene *Synaptophysin*, *Sekretogranin II*, *Connexin36*, *BDNF* und *GluR2* in verschiedenen Zelltypen untersucht und miteinander verglichen. Für die ausgewählten Gene wurden bereits REST-Bindestellen

beschrieben und deren Regulation durch REST mittels transienter Transfektionen von Reportergenkonstrukten nachgewiesen (Myers *et al.*, 1998; Timmusk *et al.*, 1999; Roopra *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2004; Zuccato *et al.*, 2003; Lietz *et al.*, 2003). Die transkriptionelle Regulation von Reporterplasmiden entspricht nicht ihrem endogenen Gegenstück auf der DNA, welches mit Nukleosomen verbunden und in unterschiedliche Chromatinstrukturen eingebettet ist. Belyaev *et al.* (2004) beschrieben, dass ein REST-Zielgen innerhalb eines Reporterplasmids unterschiedliche REST-Korepressorkomplexe rekrutiert, verglichen mit dem gleichen Gen, welches auf dem Chromosom lokalisiert ist. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Expression der zu untersuchenden Gene direkt auf RNA-Ebene nachgewiesen.

Die endogene REST-Konzentration ist von Zelltyp zu Zelltyp verschieden und für die Regulation der Genexpression von entscheidender Bedeutung. Frühere Studien haben gezeigt, dass ein hoher Expressions-Level des *REST*-Gens mit dem Grad der Reprimierung seiner Zielgene korreliert (Atouf *et al.*, 1997; Lietz *et al.*, 1998; Palm *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2004). Beispielsweise geht ein hoher Level von REST mit der Repression des *Synapsin I*-Gens einher, ein niedriger endogener REST-Level hingegen gestattet die Genexpression von *Synapsin I* (Lietz *et al.*, 1998).

Auch in dieser Studie konnte für die analysierten neuronalen-, neuroendokrinen-, pankreatischen- und Fibroblasten-Zellen unterschiedliche hohe Konzentrationen von *REST*-mRNA nachgewiesen werden. Aus den Daten geht deutlich hervor, dass die Expression des *REST*-Gens in einem umgekehrten Verhältnis zum Expressionslevel seiner Zielgene steht. So zeigte die Fibroblasten-Zelle LMTK⁻ aufgrund eines hohen *REST*-Levels keine Expression REST-regulierter Gene. Eine starke reduzierte *REST*-mRNA Konzentration, wie sie in den neuronalen, neuroendokrinen und pankreatischen Zellen nachgewiesen werden konnte, äußerte sich in einer Transkription der neuronalen Gene *Synaptophysin* und *Secretogranin II*. Die Genexpression von *Connexin36* blieb auf die pankreatischen α und β -Zellen beschränkt, was auf eine zelltyp-spezifische Regulation dieses Gens schließen lässt. Eine niedrige Konzentration an *REST*-mRNA, korrelierte hier zwar mit der Expression der Gene *Synaptophysin*, *Sekretogranin II* und *Connexin36*, scheint aber nicht ausreichend zu sein, um die Genexpression von *BDNF* und *GluR2* auszulösen. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine alleinige Veränderung der REST-Konzentration nicht ausreichend ist, um die Transkription neuronaler Gene zu regulieren, sondern dass dazu zusätzliche zelltyp-spezifische Faktoren notwendig sind.

5.3 Die Hemmung der Histon-Deacetylasen mit Trichostatin A zeigt zelltyp-spezifische Auswirkungen auf die Genexpression von *Synaptophysin*, *Sekretogranin II* und *Connexin36*

Die N- und C-terminale Repressordomäne von REST rekrutieren unterschiedliche Korepressor-Proteine, wobei der N-Terminus mit mSin3A und der C-Terminus mit CoREST interagiert, welche ihrerseits mit Histon-Deacetylasen (HDAC) verbunden sind (Andres *et al.*, 1999; Leichter *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999; Grimes *et al.*, 2000; Roopra *et al.*, 2000; You *et al.*, 2000).

Die Deacetylierung der Histone resultiert in der dichteren Packung des Chromatins. Dadurch wird die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren an die regulatorischen Bereiche der Gene vermindert. So lässt sich durch Modifikation der Histone die Expression der Gene reprimieren. Trichostatin A (TSA) ist ein Inhibitor der Histon-Deacetylasen (Yoshida *et al.*, 1990) und verhindert die Deacetylierung der Histone, wodurch eine offene Chromatinstruktur entsteht, die den Zugang von Transkriptionsfaktoren an das genetische Material gestattet (Abb. 37).

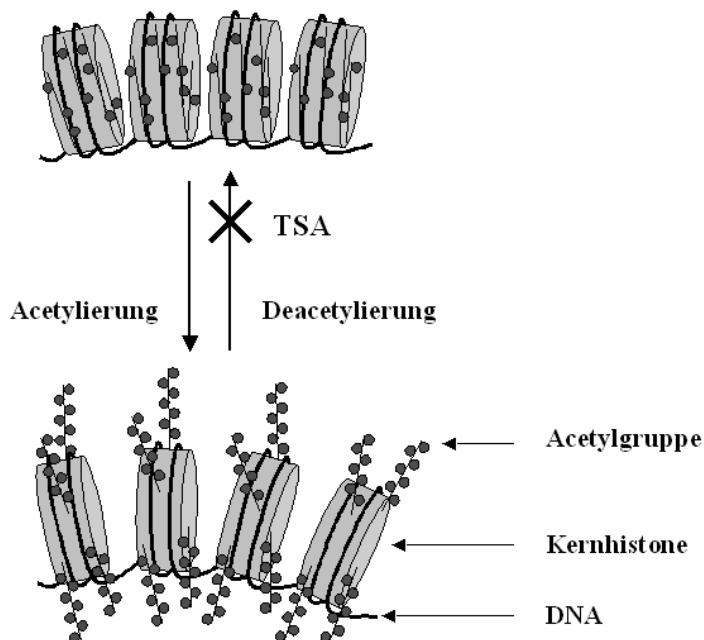


Abb. 37: Schematische Darstellung: Hemmung der Histon-Deacetylase durch Trichostatin A (TSA)

Histon-Acetyltransferasen übertragen Acetylgruppen, Histon-Deacetylasen können diese Acetylgruppen wieder entfernen. Der Acetylierungsgrad der Histone spielt eine entscheidende Rolle bei der Strukturierung des Chromatins. Sind viele Histonmoleküle im Nukleosom acetyliert, dann nimmt das Chromatin eine aufgelockerte, offene Konfiguration an, was die DNA zugänglich für Transkriptionsfaktoren macht. Werden die Acetylgruppen entfernt, dann wird das Chromatin dichter gepackt und somit unzugänglich für Transkriptionsfaktoren. Trichostatin A (TSA) verhindert die Entfernung der Acetylgruppen durch Hemmung der Histon-Deacetylasen, das Chromatin verbleibt in einer offenen Konfiguration.

Untersuchungen von Naruse *et al.* (1999) an der Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 zeigten, dass die Inhibierung der Histon-Deacetylasen mit TSA die Expression der neuronalen Gene *SCG10*, *N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor 1* (*NMDAR1*) und der *Cholinacetyltransferase* (*CHAT*) zur Folge hatte. Auch Daten von Lietz *et al.*, (2003) zeigten, dass die Behandlung von P19-Teratokarzinoma-Zellen mit TSA in der Expression der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* resultierte. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde hier der Repressionsmechanismus von REST in verschiedenen Zellsystemen untersucht. Die Inhibierung der Histon-Deacetylasen mit TSA resultiert in einer verstärkten Expression des *Synaptophysin*- und *Sekretogranin II*-Gens in den untersuchten neuronalen-, neuroendokrinen- und pankreatischen Zellen. Das *Connexin36*-Gen zeigt eine zelltyp-spezifische Regulation und konnte lediglich in den pankreatischen Zellen durch die Inhibierung der Histon-Deacetylasen dereprimiert werden. Die Gene *Synaptophysin*, *Sekretogranin II* und *Connexin36* unterliegen demnach dem gleichen HDAC-abhängigen Repressionsmechanismus und werden über Veränderungen des Chromatins reguliert. Eine solche zelltyp-spezifische Regulation durch REST wurde auch für das *Natrium-Kanals Typ II* kodierende Gen (*NaV.1.2*) beschrieben. In L6-Skelettmuskelzellen der Ratte liegt REST, CoREST und HDAC an der Transkriptionseinheit des Gens gebunden vor (Ballas *et al.*, 2001). Die Inhibierung der Histon-Deacetylasen mit TSA hatte eine Dereprimierung des Gens zur Folge. In Rat1 Fibroblastenzellen hingegen folgte der Inhibierung keine Expression des *NaV.1.2*-Gens, da hier zwar REST und CoREST an der Transkriptionseinheit vorlagen, jedoch wurden keine Histon-Deacetylasen an die Transkriptionseinheit rekrutiert (Lunyak *et al.*, 2002). In dieser Arbeit führte die Inhibierung der Histon-Deacetylasen mit TSA in den untersuchten Zelllinien zu keiner Derepression der Gene *BDNF* und *GluR2*. Auch zeigte sich die Fibroblastenzelle LMTK⁻ insensitiv auf die Behandlung mit TSA, da keines der untersuchten REST-Zielgene dereprimiert wurde. Die Gene werden hier bereits über einen Repressionsmechanismus reguliert, der unabhängig von Histon-Deacetylasen funktioniert. Die REST-vermittelte Repression scheint demnach zelltyp- und genspezifisch zu sein, und geht in einigen Fällen nicht über die alleinige Rekrutierung von Histon-Deacetylasen vonstatten.

5.4 *Synaptophysin*, *Sekretogranin II* und *Connexin36* werden in den neuronalen-, neuroendokrinen und endokrinen Zellen durch REST reguliert.

Durch Aktivierung der REST-Mutante DP-REST:ER mit 4-OHT entsteht eine Konkurrenzsituation mit dem endogen exprimierten REST-Protein um die Bindestellen auf der DNA. Bindet das Protein DP-REST:ER an die NRSEs und verdrängt dort das endogene REST, sollte es aufgrund der starken Aktivator-domäne der Mutante zur Expression der REST-Zielgene kommen. Die Ergebnisse aus den transienten Transfektionen zeigten, dass DP-REST:ER nach Zugabe des Induktors 4-OHT die Transkription der Reporterplasmide, die REST-Bindestellen beinhalten, stark zu aktivieren vermag. Ebenso wurde aus den Daten der RNase Schutzexperimenten deutlich, dass die Transkription der Gene *Synaptophysin* und *Sekretogranin II* nach Aktivierung von DP-REST:ER in den neuronalen-, neuroendokrinen- und endokrinen Zellen verstärkt werden konnte. Dieser Effekt ließ sich durch die gleichzeitige Inkubation mit dem Histon-Deacetylase Inhibitor TSA noch verstärken. Anhand dieser Daten lässt sich eindeutig sagen, dass die Gene *Synaptophysin* und *Sekretogranin II* REST-responsiv sind, und dass deren Transkription in SN56, AtT20, $\square$ TC3 und $\square$ TC1-9 durch DP-REST:ER auf chromosomaler Ebene gezielt verstärkt werden konnte. Die Transkription des *Connexin36*-Gens wurde nur in den Pankreaszellen $\square$ TC3 und $\square$ TC1-9 verstärkt. Auch hier ließ sich die Genexpression bei gleichzeitiger Zugabe von TSA noch steigern. *Connexin36* ist demnach ebenfalls ein durch REST reguliertes Gen, dessen Expression jedoch auf die endokrinen Pankreaszelllinien beschränkt ist. Die Transkription der Gene *BDNF* und *GluR2* konnte durch DP-REST:ER nicht induziert werden, selbst bei gleichzeitiger Inhibierung der Histon-Deacetylase zeigte sich kein Einfluss auf die Genexpression. Die Regulation von *BDNF* und *GluR2* wird in diesen Zelllinien nicht mehr direkt durch REST vermittelt. Auch hat REST in der Fibroblastenzelllinie LMTK⁻ keinen direkten Einfluss mehr auf die Regulation der untersuchten Gene.

5.5 Einfluss der DNA-Methylierung auf die Expression von REST-Zielgenen

Die DNA-Methylierung stellt einen weiteren Mechanismus dar, die Expression ganzer Genabschnitte zu regulieren. Die Methylierung von CpG-Dinukleotiden kann entweder zur Blockierung der DNA-Bindestelle transkriptioneller Aktivatoren führen oder als Bindestelle für Repressorproteine dienen, wie zum Beispiel für das Repressorprotein MeCP2 (*methyl-CpG-binding protein* 2). MeCP2 bindet an solche methylierten CpG-Dinukleotide (C^mpG) und vermittelt die Genrepression über die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen oder Histon-Methyltransferasen (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998; Fuks *et al.*, 2003).

Es ist bekannt, dass REST über das Korepressor-Protein CoREST (Andres *et al.*, 1999) ein alternativer Repressionsmechanismus zur Verfügung steht, wobei CoREST als Protein-Brücke zwischen REST und MeCP2 dient (Lunyak *et al.*, 2002). REST kann auf diese Weise einen zusätzlichen Repressor an die methylierten DNA-Abschnitte heranzuführen. Untersuchungen des REST-Zielgens *NaV1.2* in Rat1-Fibroblasten von Lunyak *et al.* (2002) machten deutlich, dass die Methylierung der DNA bei der Regulation des *NaV1.2*-Gens eine wichtige Rolle spielt. REST, CoREST und MeCP2 lagen an der methylierten Promotorregion des *NaV1.2*-Gens gebunden vor. Die Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Azacytidine führte zur Dereprimierung des *NaV1.2*-Gens (Lunyak *et al.*, 2002). In dieser Arbeit hingegen hatte die Inkubation mit 5-Azacytidine (5-AzaC) in keiner der analysierten Zelllinien eine Derepression der untersuchten REST-Zielgene zur Folge, auch die kombinierte Behandlung mit 5-AzaC und TSA bei gleichzeitiger Aktivierung von DP-REST:ER zeigte keine zusätzliche Veränderung der Genexpression. Die analysierten Gene werden demnach über einen Mechanismus reguliert, der unabhängig von der DNA-Methylierung ist.

Wood *et al.* (2003) beschrieb einen vergleichbaren Fall. In JTC-19 Lungenfibroblasten liegt das REST-regulierte *muskarinischen Azetylcholin Rezeptor Typ IV*-Gen inaktiv vor. Hier kommt es durch Behandlung mit 5-AzaC zu keiner Derepression des Gens. Auch die Behandlung mit TSA und 5-AzaC führte in dieser Zelllinie zu keiner Genexpression. Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass REST keinen Zugang mehr zu seinem Zielgen hatte und nicht an der Transkriptionseinheit gebunden vorlag (Wood *et al.*, 2003). Die Repression von REST-Zielgenen benötigt demnach nicht immer die permanente Bindung von REST an die Transkriptionseinheit.

5.6 Die Modulation der Chromatinstruktur bestimmt die Genexpression REST-regulierter Gene

Um die zelltyp-spezifische Regulation des REST-Zielgenes *Connexin36* genauer zu untersuchen, galt es herauszufinden, welche Rolle die Chromatinstruktur bei der Regulation der Genexpression spielt. REST rekrutiert *in vivo* über die C-terminale Repressordomäne die Methyltransferase G9a an die Transkriptionseinheit (Roopra *et al.*, 2004). Der Lysinrest 9 am Histon 3 (H3K9) dient der Methyltransferase G9a als Substrat (Tachibana *et al.*, 2001). Dimethyliertes H3K9 ist wiederum eine Bindestelle für das Heterochromatin Protein 1 (HP1) (Bannister *et al.*, 2001). HP1 spielt eine essentielle Rolle bei der Bildung von Heterochromatin und somit bei der Entstehung und Aufrechterhaltung abgeschalteter Chromatinabschnitte. Die tri-Methylierung des Lysinrestes 4 am Histon 3 gilt allgemein als Marker für eine offene Chromatinstruktur (Santos-Rosa *et al.*, 2002). Die Chromatin-Immunopräzipitation sollte im weiteren Verlauf ein genaueres Bild über den Zustand des Chromatins liefern. Hierzu wurde die Hypophysenzelle AtT20 mit der Pankreaszelle β TC3 verglichen, da diese sich in der Expression des *Connexin36*-Gens unterscheiden. Die Ergebnisse machten deutlich, dass die zelltyp-spezifische Expression des *Connexin36*-Gen auf eine unterschiedliche Konfiguration des Chromatins zurückzuführen ist. In β TC3 war die Chromatinstruktur um die REST-Bindestelle NRSE des *Connexin36*-Gens in einem „aktivem“ Zustand und gestattete die Interaktion von DP-REST:ER mit der DNA-Bindestelle. In AtT20 zeigte sich ein anderes Bild. Hier befand sich das NRSE des *Connexin36*-Gens in einem transkriptionell inaktivem, geschlossenem Chromatinabschnitt, was eine Bindung von DP-REST:ER an die DNA verhinderte. Die REST-Bindestelle des *Synaptophysin*-Gens war in beiden Zelltypen in eine offene Chromatinstruktur eingebettet, DP-REST:ER lag am NRSE gebunden vor und konnte dessen Transkription einleiten. Die REST-Bindesequenz des *GluR2*-Gens befand sich in beiden Zelltypen in einer geschlossenen Chromatinstruktur. Somit war das NRSE für DP-REST:ER unzugänglich. Die bisherigen Ergebnisse machten deutlich, dass REST seine Zielgene über Veränderungen der Chromatinstruktur zelltyp-spezifisch regulieren kann. Das Expressionsmuster einer Zelle hängt also nicht nur von der endogenen REST-Konzentration und zelltyp-spezifischen Aktivatoren ab, sondern vielmehr von der zelltyp-spezifischen Modifikation der Chromatinstruktur. Eine "offene" oder eine "geschlossene" Chromatinstruktur entscheidet letztendlich über einen möglichen Zugang der Transkriptionsfaktoren an die Transkriptionseinheit.

5.7 Identifikation weiterer REST-Zielgene mittels Genchip (Affymetrix-Assay)

Der DNA microarray erlaubt eine Genom-umfassende Analyse der Genexpression. Auf einem microarray (oder GenChip) können bis zu mehrere tausend bekannte Sequenzen des Genoms eines bestimmten Organismus vorhanden sein.

Die Eigenschaft von DP-REST:ER an REST regulierte Gene zu binden und deren Expression zu aktivieren, bietet eine gute Möglichkeit über den Affymetrix GenChip-Assay weitere putative REST-responsive Gene zu identifizieren. Mit Hilfe der induzierbaren REST-Mutante DP-REST:ER können putative REST-Zielgene verstärkt exprimiert, und dadurch besser identifiziert werden. Die Zelllinien AtT20_{DP-REST:ER} und β TC3_{DP-REST:ER} wurden mit 4-OHT oder mit Ethanol behandelt, und die Genexpression über einen Affymetrix-Genchip analysiert. Neben dem bekannten REST-Zielgen *Synapsin I* wurde auch das Gen *Neurexin I* in beiden Zelllinien verstärkt exprimiert. Neurexine sind neuronale Zelloberflächen-Proteine, die an der interzellulären Signalweiterleitung und bei der Bildung von *gap-junctions* involviert sind. Da die Expression dieses Gens in beiden Zelllinien durch die Aktivierung von DP-REST:ER induziert wurde, wäre eine genauere Analyse von *Neurexin I* als mögliches REST-Zielgen sehr interessant. In β TC3 resultierte die Aktivierung von DP-REST:ER in einer verstärkten Genexpression von *Connexin26* und *Connexin30*, die beide in den gleichen *gap-junction*-Plaques vorkommen und sich dort zusammenlagern (Ahmad *et al.*, 2003). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass *Connexin36* ein REST-Zielgen ist und zelltyp-spezifisch reguliert wird, wäre eine weiterführende Untersuchung der *Connexin*-Genexpression interessant. Synaptobrevin 2 bzw. das „vesikel associated membrane protein 2“ (Vamp2) ist essentiell für zwei Synapsen-spezifische Membran-Reaktionen: Freisetzung von Neurotransmitter durch Exozytose und Wiederverwendung der synaptischen Vesikel durch Endozytose (Deak *et al.*, 2004). Die Expression von *Vamp2* wurde bereits in pankreatischen Zellen beschrieben (Rosado *et al.*, 2004). *Vamp2* interagiert in der Vesikelmembran mit dem synaptischen Vesikelprotein Synaptophysin (Calakos N. and Scheller R., 1994; Washbourne *et al.*, 1995). Die Genexpression von *Synaptophysin* wird durch REST reguliert wird. Die GenChip-Daten deuten darauf hin, dass das *Vamp2*-Gen ebenfalls durch REST reguliert wird. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Genexpression der beiden Proteine, die miteinander interagierenden um eine spezifische Aufgabe zu erfüllen, durch den gleichen REST-vermittelt Mechanismus reguliert wird. Wie aus den Affymetrix-Daten hervorgeht, wurde die Expression vieler Gene, die direkt oder

indirekt mit der Bildung und Funktion von synaptischen Vesikeln in Verbindung stehen, durch die Inkubation mit 4-OHT heraufreguliert. Weitere Untersuchungen müssten erst zeigen, ob diese Gene durch REST oder über andere REST-unabhängige Faktoren reguliert werden. Dazu muss die REST-Bindestelle NRSE der Gene lokalisiert und funktionell analysiert werden.

5.8 Genexpression von *REST* und REST-regulierter Gene in der neuronalen Stammzelllinie HNSC.100

Neurale Stammzellen bieten die Möglichkeit den molekularen Mechanismus der Zelldifferenzierung während der Neurogenese genauer zu untersuchen. Die humane neurale Stammzelllinie HNSC.100 besitzt die Fähigkeit der Selbsterneuerung und differenziert zu den drei wichtigsten Zelltypen des ZNS: Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten. Stammzellen zeigt einen hohen endogenen Level an REST (Lorincz *et al.*, 2004; Ballas *et al.*, 2005), eine adulte Nervenzelle jedoch nur noch einen sehr geringen REST-Level (Palm *et al.*, 1998). Die Manifestation eines neuronalen Phänotyps setzt die Herabregulierung von *REST* und die Expression neuron-spezifischer Gene voraus. Die HNSC.100-Zelllinie diene in dieser Arbeit als Modellsystem, um die Rolle von REST bei der neuronalen Differenzierung untersuchen zu können.

Ein Marker für undifferenzierte, pluripotente, sich teilende Stammzellen gilt im Allgemeinen das Protein Nestin (Lehndahl *et al.*, 1990), welches zu den intermediären Neurofilamenten gehört. Dahlstrand *et al.* (1995) zeigten anhand von Untersuchungen des zentralen Nervensystems von Mäuseembryonen, dass *Nestin* bereits im frühen Embryonalstadium exprimiert wird und gilt somit als charakteristisch für undifferenzierte Stammzellen. Es wird nicht nur in neuronalen Stammzellen, sondern auch in undifferenzierten Gliazellen und in multipotenten Stammzellen exprimiert (Shin *et al.*, 2003). Als Marker für astrozytäre Vorläuferzellen und reife Astrozyten gilt das GFAP (*glia fibrillary acidic protein*). GFAP wurde aber auch für neurale Stammzellen beschrieben (Doetsch *et al.*, 1999; Sanai *et al.*, 2004; Seri *et al.*, 2001). Die hier durchgeführten Expressions-Analysen zeigten, dass die HNSC.100-Zelllinie sowohl den Stammzellmarker *Nestin* als auch den Astrozytenmarker *GFAP* exprimieren. Dieses wurde ebenfalls von Villa *et al.* (2000) und von Kramer-Hämmerle (2004) beschrieben und gilt als charakteristisches Merkmal für diese Stammzellen-Population (Villa *et al.*, 2000; Vogel *et al.*, 2003). Die Expression des Stammzellmarkers in

der Neuroblastomazelle SHSY5Y und der embryonalen Nierenzelllinie 293T macht deutlich, dass es sich bei den Zelllinien noch um Vorläuferzellen handelt, die noch nicht vollständig ausdifferenziert sind. Ein Vergleich der Expression von *REST* und die der neuronalen Markergene, *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GluR2*, die zugleich bekannte *REST*-Zielgene sind (Schoch *et al.*, 1996; Myers *et al.*, 1998; Lietz *et al.*, 2003) sollte zusätzlich Informationen über den Differenzierungsstatus der Zellen liefern. Die HNSC.100-Zelle und die Nierenzelllinie 293T weisen beide einen hohen Level an *REST*-mRNA auf, was in der Repression der neuronalen Gene resultiert. Die Neuroblastoma-Zelle hingegen hat einen niedrigen endogenen *REST*-Level, was mit der Expression von *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GluR2* korreliert. Dieses Ergebnis zeigt deutlich das inverse Verhältnis zwischen der Expression von *REST* und die seiner Zielgene. Die Daten machten deutlich, dass sich die HNSC.100-Stammzelllinie in einem sehr frühen Stadium der Differenzierung befinden, in dem das Stammzellmarkergen *Nestin* aber noch keine neuronalen Gene exprimiert werden.

5.9 Retinsäure löst in HNSC.100-Zellen die Neurogenese aus

In dieser Arbeit wurden HNSC.100-Zellen in unterschiedlichen Medien kultiviert, um die Induzierbarkeit der Zelldifferenzierung zu analysieren. Bei Zugabe der Mitogene bFGF und EGF proliferieren die HNSC.100-Zellen und erneuern fortwährend den Zellpool. Erst der Entzug der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF aus dem Kultivierungsmedium leitet die Umstellung vom proliferierenden Zellstadium zum Stopp der Proliferation und den Beginn der Differenzierung ein (Villa *et al.*, 2000). Die Kultivierung der HNSC.100-Zellen in Medium ohne EGF und bFGF bewirkte die Differenzierung der HNSC.100-Zellen in Richtung Astrozyten, was durch die erhöhte Expression des Astrozytenmarkers *GFAP* und eine verminderte Expression des Stammzellenmarkers *Nestin* deutlich wurde. Die Zugabe von 1µM Retinsäure löste in den HNSC.100-Zellen die Neurogenese aus und führt zur Transkription der Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GluR2*. Gleichzeitig nahm die Genexpression von *GFAP* und *Nestin* deutlich ab. Die Abnahme des *REST*-Levels ist für die Expression von *REST*-Zielgenen essentiell. Erst ein geringerer endogener Level an *REST*-Protein ermöglicht die Ausbildung eines neuronalen Phänotyps. Die Kultivierung der HNSC.100-Zellen in astrozytärem und neuronalem Differenzierungsmedium führte zu einer Abnahme der Genexpression von *REST* und gestattete so die Expression der untersuchten neuronalen Markergene. Daraus geht eindeutig hervor, dass die Differenzierung der HNSC.100-Zellen mit der Herunterregulierung der *REST*-Genexpression einhergeht. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen über den Einfluss von Retinsäure auf die Einleitung

der Neurogenese ergaben ähnliche Ergebnisse. Die humane Teratocarcinoma-Zelle NTera-2, die neuronalen Vorläuferzellen ähnelt, exprimierte nach Inkubation mit Retinsäure neuronale Gene, wie beispielsweise *Synapsin I*, *II*, *III* und *Neurofilament H*. Gleichzeitig wurde die Genexpression von *Nestin* und der REST-Protein-Level vermindert (Leypoldt *et al.*, 2001 und 2002; Lietz *et al.*, 2003; Bai *et al.*, 2003). In undifferenzierten embryonalen Stammzellen (ES) liegt eine hohe Konzentration an REST-Protein vor (Lorincz *et al.*, 2004; Ballas *et al.*, 2005). Wurden die Zellen mit Retinsäure behandelt, führte dies zur Expression neuronaler Gene wie *Synapsin I* und *Synaptophysin* (Guan *et al.*, 2001; Bibel *et al.*, 2004) und gleichzeitig zur Abnahme der REST-Protein Konzentration in der Zelle (Ballas *et al.*, 2005).

5.10 Histon-Deacetylasen-abhängige Repression von REST-Zielgenen in der neuralen Stammzelle HNSC.100

In der adulten Hippocampus Stammzelllinie HCN A94 bewirkt die Behandlung mit Trichostatin A die Derepression von neuronalen Markergenen, u.a. *GluR2* und *Synapsin I* (Kuwabara *et al.*, 2004). Auch Ballas *et al.* (2005) konnte in undifferenzierten ES-Zellen zeigen, dass die Inkubation mit TSA ausreichend war, um die Expression der putativen REST-Zielgene *Synaptotagmin IV* und *Calbindin* zu dereprimieren.

Hier konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der Histon-Deacetylasen mit Trichostatin A die REST-vermittelte Repression der Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GluR2* in HNSC.100 aufzuheben vermochte, diese Gene werden in HNC.100-Zellen über einen Histon-Deacetylase-abhängigen Mechanismus reguliert.

5.11 Die Genexpression von REST-Zielgenen wird in HNSC.100 über die Modulierung des Chromatins reguliert

Die Zelllinie HNSC_{DP-REST:ER} exprimiert dauerhaft die REST-Mutante DP-REST:ER. HNSC_{DP-REST:ER} diente in dieser Arbeit als Modellsystem, um die Möglichkeit einer gezielten Aktivierung von REST-Zielgenen in einer neuralen Stammzelle zu untersuchen und welche Rolle die Chromatinstruktur bei der Regulation von REST-Zielgenen spielt.

Die Inkubation der HNSC_{DP-REST:ER}-Zellen mit 4-OHT leitete die Transkription des *Synapsin I*- und des *Synaptophysin*-Gens ein, jedoch zeigte sich kein aktivierender Einfluss auf die Genexpression des *GluR2*-Gens. Ein Vergleich der HNSC.100-Zellen mit der Neuroblastoma-Zelllinie SHSY5Y zeigte eine unterschiedliche Modulation der

Chromatinstruktur an den REST-Bindestellen der Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin* und *GluR2*. In den Neuroblastoma-Zellen liegen die NRSE in einer offenen Chromatinstruktur. Das DP-REST:ER-Protein liegt am NRSE-Kontrollelement gebunden vor und die untersuchten Gene werden aktiv transkribiert. In den HNSC.100-Zellen liegen die REST-Bindestellen der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* ebenfalls in einer offenen Chromatinstruktur. Der Aktivator DP-REST:ER liegt am NRSE dieser Gene gebunden vor. Gleichzeitig konnte aber auch der Marker für eine geschlossene Chromatinstruktur detektiert werden. Dies spricht für die fehlende basale Expression dieser Gene in unbehandelten HNSC.100-Zellen. Das NRSE des *GluR2*-Gens war in den HNSC.100-Zellen noch in einem geschlossenen, inaktiven Bereich des Chromatins eingebettet, wodurch die Bindung von DP-REST:ER an die Transkriptionseinheit verhindert wurde. Die Behandlung der HNSC.100-Zellen mit TSA löst in HNSC.100 die Derepression des *GluR2*-Gens aus. Darin zeigt sich ein interessanter Unterschied zu den zuvor analysierten Mauszelllinien AtT20 und β TC3. Auch hier konnte für das NRSE des *GluR2*-Gens der Marker für eine geschlossene Chromatinstruktur detektiert werden. Dies blockierte die Bindung von DP-REST:ER an das NRSE des Gens. Die Inkubation mit TSA war jedoch nicht ausreichend, um die Genexpression von *GluR2* zu induzieren. Es muss demnach ein Unterschied im Repressionsmechanismus zwischen Stammzellen und ausdifferenzierten Zellen geben. Ein Erklärungsansatz könnten die Daten von Ballas *et al.* (2005) liefern. Die Arbeitsgruppe verglich das Expressionsmuster des *Synaptotagmin IV*- und des *Calbindin*-Gens in ausdifferenzierten Fibroblasten und in undifferenzierten embryonalen Stammzellen (ES). In beiden Zelllinien lagen REST und seine Korepressoren an der Transkriptionseinheit der Gene gebunden vor. Die Fibroblastenzelle exprimierte keines der neuronalen Gene. In den ES-Zellen hingegen konnte trotz des Vorhandenseins von REST eine schwache Expression des *Synaptotagmin IV*- und des *Calbindin*-Gens nachgewiesen werden. Genauere Analysen machten Unterschiede bei der Rekrutierung der Histon-Methyltransferase G9a an die Promotorregion der Gene deutlich. In den Fibroblasten-Zellen lag eine wesentlich höhere Konzentration der Histon-Methyltransferase an der Transkriptionseinheit der Gene vor als in den pluripotenten ES-Zellen (Ballas *et al.* 2005). Offenbar vermittelt der REST-Korepressor-Komplex in Stammzellen zwar die Repression neuronaler Gene, gleichzeitig werden diese aber in einem induzierbaren Zustand gehalten, sodass allein durch Abdissoziieren der Repressors von der Transkriptionseinheit die Expression neuronaler Gene eingeleitet werden kann.

Die Chromatinstruktur der neuralen Stammzelllinie HNSC.100 rund um die REST-Bindestelle NRSE wird derzeit im Labor von Prof. Dr. Thiel eingehend untersucht.

5.12 Ausblick

Diese Arbeit macht deutlich, wie eng die Beziehung zwischen der REST-vermittelten Repression seiner Zielgene und der Konfiguration des Chromatins ist. Daher sollten zukünftige Expressionsstudien immer mit einer Analyse der Chromatinstruktur verbunden werden. Untersuchungen über das Vorhandensein von REST, CoREST, Histon-Deacetylasen, MeCP2, der Histon-Metyltransferase G9a und des Heterochromatin Protein HP1 an der Transkriptionseinheit von REST-Zielgenen könnten zur Aufklärung der zelltyp-spezifischen Genregulation beitragen.

Diese Arbeit verdeutlichte ebenfalls, dass sich die neurale Stammzelllinie HNSC.100 als Modellsystem eignet, um den Einfluss von REST auf die Neurogenese zu untersuchen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der HNSC.100-Zellen mit Retinsäure die Neurogenese auslöst und gleichzeitig der *REST*-Level abnahm. Die Herunterregulierung des *REST*-Gens ist essentiell für die neuronale Differenzierung (Palm *et al.*, 1998), doch bleibt die Frage bis heute weitgehend unbeantwortet, wie die Regulation des *REST*-Gens vonstatten geht. Die Identifikation von Transkriptionsfaktoren, die die Expression und Regulation des *REST*-Gens während der neuronalen Differenzierung koordinieren, ist daher von besonderem Interesse.

Mit der Zelllinie HNSC.100_{DP-REST:ER} steht ein weiteres, induzierbares System zur Verfügung. Aus einer Studie von Watanabe *et al.* (2004) mit dem konstitutiv aktiven Aktivatorprotein „REST-VP16“ in C2C12-Myoblasten ging hervor, dass die Expression von REST-VP16 die Ausbildung eines physiologisch aktiven, neuronalen Phänotyps dieser Zellen zur Folge hatte. Durch Verwendung der neuralen Stammzelllinie HNSC.100_{DP-REST:ER} kann überprüft werden, ob die durch DP-REST:ER induzierte Expression neuronaler Gene ausreichend ist, um die Neurogenese auszulösen und welche Auswirkungen dies auf den endogenen REST-Level der Zelle hat.

6. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor REST ist ein Repressor neuronaler Gene in nicht-neuronalem Gewebe und undifferenzierten Stammzellen. REST bindet an einer spezifischen Erkennungssequenz auf der DNA und rekrutiert Histon-Deacetylasen und Histon-Methyltransferasen an die Transkriptionseinheit seiner Zielgene. Die daraus resultierende Veränderung der Chromatinstruktur lässt diese DNA-Abschnitte für Transkriptionsfaktoren unzugänglich werden.

In dieser Studie wurde in verschiedenen Zelltypen die Regulation der Genexpression putativer REST-Zielgene untersucht, die in ihre natürliche Chromatinstruktur eingebettet sind. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression des *Synaptophysin*-, *Sekretogranin II*- und des *Connexin36*-Gens durch REST reguliert wird, wobei die Expression des *Connexin36*-Gens über eine zelltyp-spezifische Modifikation des Chromatins gesteuert wird.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die REST-vermittelte Regulation neuronaler Gene in der neuralen Stammzelle HNSC.100 analysiert. Diese Stammzelllinie besitzt die Fähigkeit der Selbsterneuerung und differenziert zu den drei wichtigsten Zelltypen des ZNS: Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten. Die Behandlung dieser Zelllinie mit Retinsäure resultierte in der Neurogenese und induzierte die Expression des *Synapsin I*-, *Synaptophysin*- und des *GluR2*-Gens. Gleichzeitig nahm die Expression des *REST*-Gens ab. Für die untersuchten neuronalen Gene konnte in HNSC.100 ein Histon-Deacetylase-abhängiger Repressionsmechanismus nachgewiesen werden, über den REST die Genexpression reprimiert. Zudem wurde hier gezeigt, dass sich die Zelllinie HNSC.100 als Modellsystem eignet, um die Frage zu klären, welche Rolle REST bei der Einleitung der Neurogenese und der Manifestation des neuronalen Phänotyps spielt.

7. Summary

The transcription factor REST is a transcriptional repressor of neuronal genes in non-neuronal tissue. REST binds to a specific recognition site on the DNA and recruits histone deacetylases and histone methyltransferases to the transcription units of REST-target genes.

The Aim of this work was to investigate the regulation of putative REST-target genes, which are embedded in their natural chromatin structure, and to compare the neuronal gene expression in different cell-types. It was observed that the expression of the *synaptophysin*-, *secretogranin II*- and *connexin36*-gene is REST regulated by modification of the chromatin structure. The *connexin36*-gene showed a cell type-specific structure of the chromatin, indicating that transcriptional repression by REST functions in a cell type-specific manner.

Another topic of this work was to analyse the REST-mediated regulation of neuronal gene expression in the neural stem cell lineage HNSC.100. This cell line has the capacity for self-renewal and possesses the ability to differentiate into the three major cell lineages of the nervous system, neurons, astrocytes and oligodendrocytes. We observed, that the treatment of HNSC.100 with all-trans retinoic acid was sufficient to trigger the neurogenesis and to induce the expression of the neuronal genes *synapsin I*, *synaptophysin* and *GluR2*. The expression of the REST encoding gene was reduced. HNSC.100 cells treated with a histone deacetylase inhibitor started to express the neuronal genes *synapsin I*, *synaptophysin* and *GluR2*, indicating that the repression of these genes depends on a mechanism in which histone deacetylases are involved. The human neural stem cell HNSC.100 provides a mighty tool to further investigate the role of REST during neurogenesis and manifestation of the neuronal phenotype.

Literaturverzeichnis

- Abderrahmani A, Steinmann M, Plaisance V, Niederhauser G, Haefliger JA, Mooser V, Bonny C, Nicod P, Waeber G. (2001) The transcriptional repressor REST determines the cell-specific expression of the human MAPK8IP1 gene encoding IB1 (JIP-1). *Mol Cell Biol.* **21**, pp. 7256-67
- Abderrahmani A, Niederhauser G, Plaisance V, Haefliger JA, Regazzi R, Waeber G. (2004) Neuronal traits are required for glucose-induced insulin secretion. *FEBS Lett*, **565**, pp. 133-8
- Adams N.C., Tomoda T., Cooper M., Dietz G., Hatten M.E. (2002) Mice that lack astrotactin have slowed neuronal migration. *Development*. **129**(4), 965-72
- Ahmad S, Chen S, Sun J, Lin X (2003). Connexins 26 and 30 are co-assembled to form gap junctions in the cochlea of mice. *Biochem Biophys Res Commun.* **307**(2), 362-8
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1995) Molekularbiologie der Zelle
- Andrés M.E., Burger C, Peral-Rubio M.J., Battaglioli E., Anderson M.E., Grimes J., Dallman J., Ballas N., Mandel G. (1999) CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9873-9878
- Atouf F., Czernichow P. and Scharfmann R. (1997). Expression of neuronal traits in pancreatic beta cells. Implication of neuron-restrictive silencing factor/ repressor element silencing transcription factor, a neuron restricted silencer. *J. Biol. Chem.*, **272**, 1929-1934
- Bai G, Zhuang Z, Liu A, Chai Y, Hoffman PW (2003). The role of the RE1 element in activation of the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J Neurochem.* **86**(4), 992-1005
- Ballas N., Battaglioli E., Atouf F., Andres M.E., Chenoweth J., Anderson M.E., Burger, C., Moniwa, M., Davie, J.R., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Rose D.W., Rosenfeld M.G., Brehm P., Mandel, G. (2001) Regulation of Neuronal Traits by a Novel Transcriptional Complex. *Neuron* **31**, 353 - 365
- Ballas N., Grunseich C., Lu D.D., Speh J.C., Mandel G. (2005) REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell* **121**, 499 - 501.
- Bannister A.J., Zegerman P., Partridge J.F., Miska E.A., Thomas J.O., Allshire R.C., Kouzarides T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*. **410**, 120-124
- Bannister A.J., Schneider R., Kouzarides T. (2002). Histone modification: dynamic or static? *Cell* **109**, 801-806
- Belyaev N.D., Wood I.C., Bruce A.W., Street M., Trinh J.B., Buckley N.J. (2004) Distinct RE-1 Silencing Transcription Factor-containing Complexes Interact with Different Target Genes. *J. biological Chemistry* **279**, 556-561
- Bibel M, Richter J, Schrenk K, Tucker KL, Staiger V, Korte M, Goetz M, Barde YA (2004). Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat Neurosci.* **7**(9), 1003-1009

- Biedler J.L., Helson L., Spengler B.A.(1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research* **33**(11), 2643-2652
- Blau, H.M. (1992) Differentiation requires continuous active control. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 1213-1230
- Blusztajn, J.K., Venturini, A., Jackson, D.A., Lee, H.J. and Wainer, B.H. (1992) Acetylcholine synthesis and release is enhanced by dibutyryl cyclic AMP in a neuronal cell line derived from mouse septum. *J. Neurosci.*, **12**, 793-799
- Bruce A.W., Donaldson I.J., Wood I.C., Yerbury S.A., Sadowski M.I., Chapman M., Göttgens B. and Buckley N. (2004) Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *PNAS*. **101**(28), 10458-10463
- Calakos N, Scheller RH. (1994) Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. *J Biol Chem*. **269**(40), 24534-24537
- Chen, Z.-F., Paquette, A.J. & Anderson, D.J. (1998) NRSF/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. *Nature Genet.*, **20**, 136-142
- Chirgwin J.N., Przybyla A.E., MacDonald R.J., Rutter W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294 – 5299
- Chomczynski P and Sacchi N. (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, **162**, 156-159
- Chong J.A., Tapia-Ramírez J., Kim S., Toledo-Aral J.J., Zheng Y., Boutros M.C., Altshuler Y.M., Frohmann M.A., Kraner S.D., Mandel G. (1995) REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression in neurons. *Cell* **80**, 949 - 957
- Clarris H.J., McKeown S., Key B. (2002) Expression of neurexin ligands, the neuroligins and the neuropsychilins, in the developing and adult rodent olfactory bulb. *Int J Dev Biol*. **46**(4), 649-52
- Dahlstrand J., Lardelli M., Lendahl U.(1995) Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Developmental Brain Research* **84**, 109-129
- Deak F, Schoch S, Liu X, Sudhof TC, Kavalali ET. (2004). Synaptobrevin is essential for fast synaptic-vesicle endocytosis. *Nat Cell Biol*. **6**(11), 1102-1108
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1999) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**(20), 11619-11624
- Fan L., Simard L.R. (2002) Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum Mol Genet*. **11**(14), 1605-1614

- Fotia A.B., Ekberg J., Adams D.J., Cook D.I., Poronnik P., Kumar S. (2004) Regulation of neuronal voltage-gated sodium channels by the ubiquitin-protein ligases Nedd4 and Nedd4-2. *J Biol Chem.* **279**(28), 28930-28935
- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T (2003). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem.* **278**(6), 4035-4040
- Gage F.H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science.* **287**(5457), 1433-1438
- Gray P.A., Fu H., Luo P., Zhao Q., Yu J., Ferrari F., Tenzen T., Yuk D., Tsung E.F., Cai Z., Alberta J.A., Cheng L., Liu Y., Stenman J.M., Valerius M.T., Billings N., Kim H.A., Greenberg M.E., McMahon A.P., Rowitch D.H., Stiles C.D., Ma Q. (2004) Mouse Brain Organization Revealed Through Direct Genome-Scale TF Expression Analysis. *Science.* **24** Vol. 306. Nr. 5705, 2255 – 2257
- Guan K., Chang H., Rolletschek A., Wobus A.M. (2001) Embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Cell Tissue Research* **304**, 171 - 176
- Gurrola-Diaz C, Lacroix J, Dihlmann S, Becker CM, von Knebel Doeberitz M. (2003) Reduced expression of the neuron restrictive silencer factor permits transcription of glycine receptor alpha1 subunit in small-cell lung cancer cells. *Oncogene* **22**(36), 5636-5645
- Grimes JA, Nielsen SJ, Battaglioli E, Miska EA, Speh JC, Berry DL, Atouf F, Holdener BC, Mandel G, Kouzarides T. (2000) The co-repressor mSin3A is a functional component of the REST-CoREST repressor complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 9461-9467
- Gross C.G. (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 67-73
- Hake S.B., Xiao A., Allis C.D. (2004) Linking the epigenetic language of covalent histone modifications to cancer. *British Journal of Cancer*, **90**, 761-769
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids *Journal of Molecular Biology* **166**, 557 – 580
- Hawley R.G, Lieu F.H, Fong A.Z, Hawley T.S. (1994) Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene Ther.* **1**(2), 136-138
- Hohl M. und Thiel G. (2005) Cell type-specific regulation of RE-1 silencing transcription factor (REST) target genes. *Eur J. Neurosci.* **22**, 2216-2230
- Hosaka M., Suda M., Sakai Y., Izumi T., Watanabe T., Takeuchi T. (2004) Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. *J Biol Chem.* **279**(5), 3627-3634
- Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage F.H (2004). Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *PNAS.* **101**(47), 16659-16664

- Huang Y., Myers S.J., Dingledine R. (1999) Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A und histone deacetylase to neuronal genes. *Nature Neurosciences* **2**, 867 - 872
- Humphrey G.W., Wang Y., Russanowa V.R., Hirai T, Qin J., Nakatani Y., Howard B.H. (2001). Stable Histone deacetylase complexes distinguished by the presence of SANT domain proteins CoREST/kiaa0071 and Mta-L1. *J. Biol. Chem.*, **276**, 6817-6824
- International Human Genome Sequencing Consortium. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. **431**, 931-945
- Jones, P.J., Veenstra G.J.C., Wade P.A., Vermaak D., Kass S.U., Landsberger N., Strouboulis J and Wolffe A.P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruits histone deacetylases to repress transcription. *Nat. Genet.* **19**, 187-191
- Jüngling, S., Cibelli, G., Czardybon, M., Gerdes, H.-H. and Thiel, G. (1994) Differential regulation of chromogranin B and synapsin I gene promoter activity by cAMP and cAMP-dependent protein kinase. *Eur. J. Biochem.*, **226**, 925-935
- Kim W.T., Chang S., Daniell L., Cremona O., Di Paolo G., De Camilli P. (2002) Delayed reentry of recycling vesicles into the fusion-competent synaptic vesicle pool in synaptotagmin 1 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**(26), 17143-17148
- Kim C.S., Hwang C.K., Choi H.S., Song KY, Law P.Y., Wei L.N., Loh H.H. (2004). Neuron-restrictive silencer factor (NRSF) functions as a repressor in neuronal cells to regulate the mu opioid receptor gene. *J Biol Chem*. **279**(45), 46464-46473
- Knaus, P., Betz, H. and Rehm, H. (1986) Expression of synaptophysin during postnatal development of the mouse brain. *J. Neurochem.*, **47**, 1302-1304
- Kramer-Hämmerle S., Rotheaigler I., Brack-Werner R. (2004) Differenzierung einer humanen neuronalen Stammzelllinie unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. *BIOspektrum* **6**, 796 – 798
- Kraner, S.D., Chong, J.A., Tsay, H.-J. & Mandel, G. (1992) Silencing the type II sodium channel gene: a model of neural-specific gene regulation. *Neuron*, **9**, 37-44
- Kuwabara T, Hsieh J, Nakashima K, Taira K, Gage F.H (2004). A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells. *Cell*. **116**(6), 779-793
- Leclerc, N., Beesley, P.W., Brown, I., Colonnier, M., Gurd, J.W., Paladino, T. and Hawkes, R. (1989) Synaptophysin expressing during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.*, **280**, 197-212
- Leichter, M. and Thiel G. (1999) Transcriptional repression by the zinc finger protein REST is mediated by titratable nuclear factors. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 1937-1946
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. **60**(4), 585-595

- Leypoldt F, Lewerenz J, Methner A (2001) Identification of genes up-regulated by retinoic-acid-induced differentiation of the human neuronal precursor cell line NTERA-2 cl.D1. *J Neurochem.* **76**(3), 806-814
- Leypoldt F., Flajolet M., Methner A. (2002) Neuronal differentiation of cultures human NTERA-2cl.D1 cells leads to increased expression of synapsins. *Neuroscience Letters* **324**, 37 - 40
- Leube R.E. (1994) Expression of the synaptophysin gene family is not restricted to neuronal and neuroendocrine differentiation in rat and human. *Differentiation* **56**, 163-171
- Lietz, M., Cichetti, P. & Thiel, G. (1998) Inverse expression pattern of REST and synapsin I in human neuroblastoma cells. *Biol. Chem.*, **379**, 1301-1304
- Lietz, M., Bach, K. & Thiel, G. (2001) Biological activity of RE-1 silencing transcription factor (REST) towards distinct transcriptional activators. *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 1303-1312
- Lietz M., Hohl M., Thiel G. (2003) RE-1 silencing transcription factor (REST) regulates human synaptophysin gene transcription through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *European Journal of Biochemistry* **270**, 2 – 9
- Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danielian, P.S., Parker, M.G. and Evan, G.I. (1995) A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1686-1690
- Lorincz M.T., Detleff P.J, Albin R.L., O'Shea K.S. (2004) Embryonic stem cells expressing expanded CAG repeats undergo aberrant neuronal differentiation and have persistent Oct-4 and REST/NRSF expression. *Molecular and Cell Neuroscience* **26**, 135 – 143
- Lunyak V.V., Burgess R., Prefontaine G.G., Nelson C., Sze S-H., Chenoweth J., Schwartz P., Pevzner P.A., Glass C., Mandel G. and Rosenfeld M.G. (2002) Corepressor-dependent silencing of chromosomal regions encoding neuronal genes. *Science*, **298**, 1747-1752
- Maden M. (2001) Role and distribution of retinoic acid during CNS development. *Int Rev Cytol.* **209**, 1-77
- Magin, A., Lietz, M., Cibelli, G. & Thiel, G. (2002) RE-1 silencing transcription factor-4 (REST4) is neither a transcriptional repressor nor a de-repressor. *Neurochem. Int.*, **40**, 195-202
- Martin D., Tawadros T., Meylan L., Abderrahmani A., Condorelli, D.F., Waeber G. and Haefliger J-A. (2003) Critical role of the transcriptional repressor, neuronal-restrictive silencer factor in the specific control of connexin36 in insulin-producing cell lines. *J. Biol. Chem.*, **278**, 53082-53089
- Metz G.A, Schwab M.E. (2004) Behavioral characterization in a comprehensive mouse test battery reveals motor and sensory impairments in growth-associated protein-43 null mutant mice. *Neuroscience.* **129**(3), 563-574
- Miller (1989) Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *BioTechniques*, **7**, 980-990

- Mori, N., Schoenherr, C., Vandenberg, D.J. & Anderson, D.J. (1992) A common silencer element in the SCG10 and type II Na⁺ channel genes bind a factor present in nonneuronal cells but not in neuronal cells. *Neuron*, **9**, 45-54
- Morrison S.J. (2001) Neuronal potential and lineage determination by neural stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* **13**(6):666-72
- Murai K., Naruse Y., Shaul Y., Agata Y., Mori N. (2004). Direct interaction of NRSE with TBP: chromatin reorganisation and core promoter repression for neuron-specific gene transcription. *Nucleic Acids Research.* **32**, Nr. 10, pp. 3180-3189
- Myers S.J., Peters J., Huang Y., Comer M.B., Barthel F., Dingledine R. (1998) Transcriptional regulation of the GluR2 gene: neural specific expression, multiple promoters, and regulatory elements. *Journal of Neurosciences* **18**, 6723 - 6739
- Nan X., Ng H.-H., Johnson C.A., Laherty C.D., Turner B.M., Eisenman R.N., Bird A. (1998) Transcriptional repression by methylated-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature.* **393**, 386-389
- Naruse, Y., Aoki, T., Kojima, T. & Mori, N. (1999) Neural restrictive silencer factor recruits mSin3 and histone deacetylase complex to repress neuron-specific target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13691-13696
- Navone F, Jahn R, Di Gioia G, Stukenbrok H, Greengard P, De Camilli P. (1986) Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J. Cell Biol.* **103** (6 Pt 1), 2511-27
- Nielsen S.J., Schneider R., Bauer U.M., Bannister A.J., Morrison A., O'Carroll D., Firestein R., Cleary M., Jenuwein T., Herrera R.E., Kouzarides T. (2001) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature.* **412**(6846), 561-565
- Palm, K., Belluardo, N., Metsis, M. & Timmusk, T. (1998) Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene. *J. Neurosci.*, **18**, 1280-1296
- Palm, K., Metsis, M., Timmusk, T. (1999) Neuron-specific splicing of zinc finger transcription factor REST/XBR is frequent in neuroblastomas and conserved in human, mouse and rat. *Mol. Brain Res.*, **72**, 30-39
- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L. and Baltimore, D. (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8392-8396
- Plaisance V, Niederhauser G, Azzouz F, Lenain V, Haefliger JA, Waeber G, Abderrahmani A. (2005) The repressor element silencing transcription factor (REST)-mediated transcriptional repression requires the inhibition of Sp1. *J. Biol. Chem.* **280**, 401-407
- Rea S., Eisenhaber F., O'Carroll D., Strahl B.D., Sun Z.-W., Schmid M., Opravil S., Mechtler K., Ponting C.P., Allis C.D., Jenuwein T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature.* **406**(6796), 593-599.

- Rosado JA, Redondo PC, Salido GM, Sage SO, Pariente JA. (2005) Cleavage of SNAP-25 and VAMP-2 impairs store-operated Ca^{2+} entry in mouse pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* **288**(1), 214-221
- Ross S.E., Greenberg M.E., Stiles C.D. (2003) Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron.* **39**(1):13-25
- Roopra A, Qazi R, Schoenike B, Daley TJ, Morrison JF. (2004) Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Mol. Cell.* **14**, 727-738
- Roopra A, Sharling L, Wood IC, Briggs T, Bachfischer U, Paquette AJ, Buckley NJ (2000) Transcriptional repression by neuron-restrictive silencer factor is mediated via the Sin3-histone deacetylase complex. *Mol Cell Biol.* **6**, 2147-2157
- Roopra A, Huang Y, Dingleline R (2001) Neurological disease: listening to gene silencers. *Mol Interv.* **4**, 219-228.
- Rubinszein D.C. (2002) Lessons from animal models of huntington's disease. *Trends Genetics:* **18**, 202-209
- Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-Garcia Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A. (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature.* **427**(6976), 740-744
- Santos-Rosa H., Schneider R., Bannister A.J., Sherrieff J., Bernstein B.E., Emre N.C.T., Schreiber S.L., Mellor J. and Kouzarides T. (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, **419**, 407-411
- Schoch, S., Cibelli, G. & Thiel G. (1996) Neuron-specific gene expression of synapsin I. Major role of a negative regulatory mechanism. *J. Biol. Chem.*, **271**, 3317-3323
- Schoenherr, C.J. & Anderson, D. (1995) The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science*, **267**, 1360-1363
- Schoenherr, C.J., Paquette, A.J. & Anderson, D. (1996) Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9881-9886
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci.* **21**(18), 7153-7160
- Schluter O.M., Basu J., Sudhof T.C., Rosenmund C. (2006) Rab3 superprimes synaptic vesicles for release: implications for short-term synaptic plasticity. *J Neurosci.* **26**(4), 1239-1246
- Strahl B.D., Ohba R., Cook R.G., Allis C.D. (1999). Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(26), 14967-14972

Strahl B.D. and Allis C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*. **403**(6765), 41-45

Sowa, Y., Orita, T., Hiranabe-Minamikawa S., Nakano, K., Mizuno T., Nomura H. and Sakai T. (1999) Histone Deacetylase Inhibitor Activates the p21/WAF1/Cip1 Gene Promotr through the Sp1 Sites. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **886**:195-199

Su Y., Balice-Gordon R.J., Hess D.M., Landsman D.S., Minarcik J., Golden J., Hurwitz I., Liebhaber S.A., Cooke N.E. (2004) Neurobeachin is essential for neuromuscular synaptic transmission. *J Neurosci*. **24**(14), 3627-3636

Shin T.K., Lee Y.D., Sim K.B. (2003) Embryonic intermediate filaments, nestin and vimentin, expression in the spinal cords of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Veterinary Science* **4**, 9 - 13

Shimojo M., Lee J.H., Hersh L.B. (2001) The role zinc fingers of the transcription factor REST/NRSF in DNA binding and nuclear localization. *J. Biol. Chem*. **276**, 13121-13126

Shimojo M. and Hersh L.B. (2006). Characterization of the REST/NRSF-interacting LIM domain protein (RILP): localization and interaction with REST/NRSF. *J. Neurochem*. **96**, 1130-1138

Tachibana M., Sugimoto K., Fukushima T. and Shinkai Y. (2001) Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J. Biol. Chem.*, **276**, 25309-25317

Tapia-Ramírez, J., Eggen, B.J., Peral-Rubio, M.J., Toledo-Aral, J.J. & Mandel, G. (1997) A single zinc finger motif in the silencing factor REST represses the neural-specific type II sodium channel promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1177-1182

Taupin P, Gage FH. (2002) Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res*. **69**(6), 745-749

The Huntington's Disease Study Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cel*. **72**, 971-983

Thiel G., Petersohn D., Schoch S. (1996) pHIVTATA-CAT, a versatile vector to study transcriptional regulatory elements in mammalian cells. *Gene* **168**, 173 - 176.

Thiel, G., Lietz, M. & Cramer, M. (1998) Biological activity and modular structure of RE-1 silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26891-26899

Thiel G. und Lietz M. (2003) Der Transkriptionsfaktor REST: Regulation neuronaler Gene über die Änderung der Chromatinstruktur. *Biospektrum* **5**, 573-576

Thiel G. und Lietz M. (2004) Zinkfingerprotein REST. Regulator neuronaler Gene. *Biol. Unserer Zeit* **34**(2), 96-101

- Thomas-Reetz A, Hell JW, During MJ, Walch-Solimena C, Jahn R, De Camilli P. (1993) A gamma-aminobutyric acid transporter driven by a proton pump is present in synaptic-like microvesicles of pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**, 5317-5321
- Timmusk T., Palm K., Lendahl U. and Metsis M. (1999). Brain-derived neurotrophic factor expression in vivo is under the control of neuron-restricted silencer element. *J. Biol., Chem.*, **274**, 1078-1084
- Van Holde K.E. (1988). Histone Modifications. In Chromatin, Springer series in molecular biologie, pp. 111-141. Springer, New York
- Venter *et al.* (2001) The sequence of the human genome. *Science*. **291**(5507), 1304-51
- Villa A., Snyder E. Y., Vescovi A., Martinez-Serrano A. (2000) Establishment and Properties of a Growth Factor-dependent, Perpetual Neuronal Stem Cell Line from the Human CNS. *Experimental Neurology* **161**, 67 - 84
- Vogel W., Grunebach F., Messam C.A., Kanz L., Brugger W., Buhning H.J (2003) Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* **88**, 126 - 133
- Washbourne P, Schiavo G, Montecucco C. (1995) Vesicle-associated membrane protein-2 (synaptobrevin-2) forms a complex with synaptophysin. *Biochem J*. **305** (3), 721-724
- Watanabe Y., Kameoka S., Gopalakrishnan V., Aldape K.D., Pan Z.Z., Lang F.F. and Majumder S. (2004) Conversion of myoblasts to physiologically active neuronal phenotype. *Genes Dev.* **18**, 889-900
- Wood I.C., Belyaev N.D., Bruce A.W., Jones C., Mistry M., Roopra A. and Buckley N.J. (2003) Interaction of the repressor element 1-silencing transcription factor (REST) with target genes. *J. Mol. Biol.* **334**, 863-874
- Xiao B., Jing C., Wilson J.R., Walker P.A., Vasisht N., Kelly G., Howell S., Taylor I.A., Blackburn G.M., Gamblin S.J. (2003). Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. *Nature*. **421**, 652-656
- Yeo M., Lee S-K, Lee B., Ruiz E.C., Pfaff S.L., Gill G.N. (2005) Small CTD Phosphatases Function in Silencing Neuronal Gene Expression. *Science*. **307**, 596-600
- Yoo J., Jeong M.J., Lee S.S., Lee K.I., Kwon B.M., Kim D.S., Park Y.M., Han M.Y. (2001) The neuron restrictive silencer factor can act as an activator for dynamin I gene promoter activity in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **283**(4), 928-932
- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol Chem.* **265**, 17174-17179
- You A, Tong JK, Grozinger CM, Schreiber SL (2000). CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **98**(4), 1454-1458

Younkin D.P., Tang C.-M., Hardy M., Reddy U.R., Shi Q.-Y., Pleasure S.J., Lee V. M.-Y. and Pleasure D. (1993) Inducible expression of neuronal glutamate receptor channels in NT2 human cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2174-2178

Zhang Y. and Reinberg D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes and Development* **15**, 2343-2360

Zhang C., Xuan Z., Otto S., Hover J.R., McCorkle S.R., Mandel G., Zhang M.Q. (2006). A clustering property of highly-degenerated transcription factor binding sites in the mammalian genome. *Nucleic Acids Research*. **34**(8), 2238-2246

Zhu W.G., Hileman T., Ke Y., Wang P., Lu S., Duan W., Dai Z., Tong T., Villalona-Calero M.A., Plass C., Otterson G.A. (2004) 5-aza-2'-deoxycytidine activates the p53/p21Waf1/Cip1 pathway to inhibit cell proliferation. *J Biol Chem*. **279**(15), 15161-15166.

Zuccato C., Ciammola A., Rigamonti D., Leavitt B.R., Goffredo D., Conti L., MacDonald M. E., Friedlander M. R., Silani V., Hayden M. R., Timmusk T., Sipione S. and Cattaneo E. (2001) Loss of Huntingtin-Mediated BDNF Gene Transcription in Huntington's Disease. *Science*: **293**(5529), 493 – 498

Zuccato C., Tartari M., Crotti A., Goffredo D., Valenz M., Conti L., Cataudella T., Leavitt B. R., Hayden M. R., Timmusk T., Rigamonti D. and Cattaneo E. (2003) Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature genetics*: **35**(1), 76-83