

**Regulation der Genexpression
in Stammzellen und Gliazellen durch
Histon-Methylierung und
-Acetylierung
und den transkriptionellen
Repressor REST**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes**

von Myriam Ekici

Homburg/Saar

2009

Tag des Kolloquiums: 31.08.2010

Dekan: Prof. Dr. Ing. Stefan Diebels

**Berichterstatter: Prof. Dr. G. Thiel
Prof. Dr. F. Schmitz
Prof. Dr. Rolf Heumann**

Prüfungsvorsitzender: Prof.Dr. Hans Stahl

Akademischer Mitarbeiter: Dr. Katrin Kaufmann

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.

Myriam Ekici

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thiel möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Arbeit in seinem Labor angefertigt zu haben. Außerdem möchte ich mich für die gute Betreuung durch ihn und seine Förderung bedanken. Durch wissenschaftliche Diskussionen und Anregungen hat er in mir den Ehrgeiz geweckt.

Herrn Prof. Dr. Schmitz danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Ich möchte mich bei der gesamten AG Thiel bedanken, wobei ich hier besonders Herrn Prof. Thiel, Iris Dlugosch und Karl Bach für alles danken möchte.

Eine sehr lustige Zeit hatte ich natürlich mit den Mädels der AG Thiel: Sabine Mayer, Anja Keim, Isabelle Müller, Melanie Karantiakos, Mona Dellbrügge. Danke für die schöne Zeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Sabine Mayer bedanken für die immer noch währende Freundschaft, Unterstützung und Hilfe in und außerhalb des Labors.

Der AG Stahl und AG Montenarh danke ich für die freundliche Unterstützung. Hierbei möchte ich mich besonders bei Sabine Katharius, Jürgen Günther, Heike Uhlmann-Schiffler, Simone Kirmeyer, Angelika Hauch und Annamaria Bohrer für die immer währende Hilfe und Freundlichkeit bedanken.

Ganz besonders möchte ich Mathias Hohl für seine Freundschaft und Unterstützung danken. Er hat mir stets hilfreich zur Seite gestanden, war für alle Fragen offen und hat in Besonderem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Vor allem danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für ihre Unterstützung.

In besonderem Maße möchte ich mich bei Christian Ulrich bedanken, der stets Geduld und Verständnis für alles hatte. Auch in schwierigen Zeiten war er ausnahmslos immer für mich da.

Für Papa

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Einleitung	5
2.1	Die Genexpression in Eukaryonten.....	5
2.2	Die Rolle der Chromatinstruktur bei der Regulation der Genexpression	7
2.3	Der Transkriptionsfaktor REST	10
2.4	Die Identifikation REST-responsiver Gene.....	12
2.5	Der Repressionsmechanismus von REST	13
2.6	Ziel der Arbeit	15
3	Material und Methoden.....	16
3.1	Geräte	16
3.2	Verbrauchsmaterialien.....	17
3.3	Chemikalien und Feinchemikalien	18
3.4	Kits	21
3.5	Verwendete Plasmide.....	21
3.6	Zellkultur.....	22
3.6.1	Zelllinien und Kultivierungsbedingungen	22
3.6.2	Passagieren von Säugerzellen.....	27
3.6.3	Auftauen von Säugerzellen	28
3.6.4	Einfrieren von Säugerzellen	28
3.7	Antikörper	28
3.8	Primer.....	30
3.8.1	Primer für die RT-PCR	30
3.8.2	Primer für die Chromatinimmunopräzipitation.....	32
3.9	Bestimmung der Proliferationsrate.....	33
3.10	Arbeiten mit RNA.....	34
3.10.1	Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen.....	34
3.10.2	RNA-Messung.....	35
3.10.3	Synthese von cDNA aus RNA.....	35
3.11	Manipulation eukaryotischer Zellen.....	36
3.11.1	Gentransfer mittels Lentiviren.....	36
3.11.2	Die Kalziumphosphat Transfektion	37
3.11.3	Lentivirale Infektion	37

3.11.4	Reporteranalysen	38
3.12	Arbeiten mit DNA	39
3.12.1	ChIP (Chromatinimmunpräzipitation).....	39
3.12.2	Die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	41
3.12.3	Horizontale Agarosegel-Elektrophorese	42
3.12.4	Dokumentation, Quantifizierung und Analyse der amplifizierten DNA.....	43
3.13	Proteinbiochemische Methoden.....	43
3.13.1	Kernextraktion.....	43
3.13.2	Proteinbestimmung	44
3.13.3	Denaturierende diskontinuierlich Gelelektrophorese.....	45
3.13.4	Western Blot von SDS-Gelen	46
3.13.5	Immunzytochemischer Nachweis der Proteine	46
3.13.6	“Strippen” der Nitrozellulosemembran	47
4	Ergebnisse	48
4.1	REST reguliert die Expression neuronaler Gene in humanen neuronalen Stammzellen..	48
4.1.1	Expression von spezifischen Genen in der humanen neuronalen Stammzelllinie HNSC.100.....	48
4.1.2	Differenzierung der neuronalen Stammzellen HNSC.100.....	49
4.1.3	Hemmung der Differenzierung durch Blockade des ERK Signalwegs	54
4.1.4	Epigenetische Konfiguration neuronaler Gene in den neuronalen Stammzellen HNSC.100.....	57
4.1.5	Transkriptionskontrolle in HNSC.100 Zellen durch Histonacetylierung und Histondeacetylierung.....	60
4.1.6	<i>In vivo</i> Bindung von REST und HDAC1 an neuronale Gene in HNSC.100 Zellen ...	63
4.1.7	Expression einer Mutanten von REST in HNSC.100 Zellen	64
4.1.7.1	<i>In vivo</i> Bindung von DP-REST:ER an REST-regulierte Gene in HNSC.100 Zellen	67
4.1.7.2	Transkription neuronaler Gene durch DP-REST:ER in humanen neuronalen Stammzellen HNSC.100	69
4.2	Regulation der Expression der AMPA Untereinheit des Glutamaterezeptors GluR2 in den humanen Gliomazellen U87MG durch REST und Sp1.....	72
4.2.1	Epigenetische Konfiguration des <i>GluR2</i> -Gens in verschiedenen Zelllinien.....	72
4.2.2	Die <i>GluR2</i> -Genexpression wird durch den Acetylierungsgrad der Histone reguliert	75
4.2.3	<i>In vivo</i> Bindung von REST und HDAC1 an das <i>GluR2</i> -Gen	78
4.2.4	<i>GluR2</i> ist ein REST-responsoives Gen in U87MG Zellen	80
4.2.5	Reduktion der Expression von GluR2 durch eine Überexpression von REST	84

4.2.6	Regulation des <i>GluR2</i> -Gens in U87MG Zellen durch den Transkriptionsfaktor Sp1	86
4.2.7	Die Transkriptionsfaktoren REST und Sp1 agieren in U87MG Zellen unabhängig voneinander	89
4.3	Regulation der Gene <i>Synapsin I</i> und <i>Synaptophysin</i> in den retinalen Vorläuferzellen R28 durch den Transkriptionsfaktor REST	92
4.3.1	Epigenetische Konfiguration der Gene <i>Synapsin I</i> und <i>Synaptophysin</i> in den retinalen Vorläuferzellen R28	92
4.3.2	Die Hemmung von Histondeacetylasen erlaubt die Transkription der für Synapsin I und Synaptophysin kodierenden Gene in R28 Zellen	94
4.3.3	<i>In vivo</i> Bindung von REST an die Gene <i>Synapsin I</i> und <i>Synaptophysin</i> in R28 Zellen und in Rat-1 Zellen	99
4.3.4	Regulation von <i>Synapsin I</i> und <i>Synaptophysin</i> durch REST in den retinalen Vorläuferzellen R28	100
5	Diskussion	107
5.1	Verwendete Zellsysteme	108
5.1.1	Neurale Stammzellen	108
5.1.2	Retinale Vorläuferzellen	109
5.1.3	Neuroblastomazellen	110
5.1.4	Gliomazellen	111
5.2	Die Bedeutung der REST-Konzentration für die Transkription	112
5.3	Die Rolle des Methylierungsmusters bei der Transkription	114
5.4	Die Zelltyp spezifische Regulation der Genexpression durch Histondeacetylasen	116
5.5	Regulation neuronaler Gene durch REST	119
5.6	Sp1 und REST: Abhängig oder unabhängig voneinander?	121
6	Ausblick	122
7	Zusammenfassung	125
8	Summary	126
9	Literatur	127
10	Publikationen und Poster	150
10.1	Publikationen	150
10.2	Poster	151

1 Abkürzungen

A.dest.	Aqua destillatum
APS	Ammoniumpersulfat
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
CMV	Cytomegalievirus
CoA	Coenzym A
CREB	cAMP response-element binding protein
C-Terminus	Carboxyl-Terminus einer Desoxyribonukleinsäure
dbcAMP	Dibutyryl-cAMP
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
d.h.	das heisst
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMEM-F12	Dulbecco`s Modificated Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 HAM
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E. coli	Escherichia coli
EGF	Epidermal Growth Factor
ER TM	Östrogenrezeptor „Tamoxifen Mutant“
ERK	Extracellular signal related kinase
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
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	Histonacetyltransferase
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinmethan]-sulfonsäure
HDAC	Histondeacetylase
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HI	Human Immunodeficiency
HMT	Histonmethyltransferase
HP1	Heterochromatinprotein 1
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IOD	Integrated optical density
kDa	Kilodalton
LSD1	Lysine Specific Demethylase 1
LTR	long terminal repeats
M	Mol
mA	Milliampere
MeCP2	methyl-CpG-binding protein 2
MEK	MAP ERK Kinase
MEM	Minimum Essential Medium
mg	10 ⁻³ Gramm
min	Minuten
mM	Milimol (10 ⁻³ Mol)
ml	10 ⁻³ Liter
mm	10 ⁻³ Meter
mRNA	messenger RNA
NaV1.2	spannungsabhängiger Natriumkanal Typ II
ng	Nanogramm (10 ⁻⁶ g)
NLS	nuclear localisation sequence (Kernlokalisationssignal)
nm	Nanometer
no Ab	no Antibody
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
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
pac	Puromycinacetyltransferase
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
<i>P. pyralis</i>	<i>Photinus pyralis</i>
PRE	posttranscriptional regulatory element
RA	all-trans Retinsäure
RE-1	Repressor element-1
REST	RE-1-silencing transcription factor
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
Sb	Synaptobrevin
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SEM	Standard Error of the Means
Sp1	Specificity Protein 1
SV40	Simian Virus 40
Syt	Synaptotagmin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
tRNA,	Transfer-RNA
TSA	Trichostatin A
VP16	Virus Protein 16
(v/v)	Verhältnis von Volumen zu Volumen
wt	Wildtyp
(w/v)	Verhältnis von Gewicht zu Volumen
U	Unit
V	Volt
VSV	Vesikulärer Stomatitis-Virus

Vol	Volumen
µg	10 ⁻³ Milligramm
µl	10 ⁻³ Milliliter
µm	10 ⁻³ Millimeter
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel

2 Einleitung

2.1 Die Genexpression in Eukaryonten

Die Entwicklung vielzelliger Organismen ist ein bedeutender Schritt in der Evolution, der eine Vielzahl struktureller und funktioneller Erneuerungen mit sich brachte. Höhere Eukaryonten bestehen im Gegensatz zu niederen Organismen aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen, die alle im Interesse des Gesamtorganismus eine spezifische Aufgabe erfüllen. Alle Zelltypen haben den gleichen Genotyp, was bedeutet, dass sie alle das gleiche genetische Material in Form von DNA enthalten. Ihren spezifischen Phänotyp bilden die einzelnen Zelltypen aus, indem in ihnen ein spezifisches Genexpressionsprofil und damit ein bestimmtes Muster an Proteinen vorliegt. Der jeweilige Entwicklungs- und Differenzierungszustand der einzelnen Zelle wird durch ein spezielles Muster an Proteinen bestimmt, deren kodierende Gene in Abhängigkeit bestimmter Transkriptionsfaktoren exprimiert werden. Daraus wird die Bedeutung der Regulation von Genen durch Transkriptionsfaktoren deutlich. Die Regulation der Genexpression erfolgt auf allen Ebenen - von der DNA über die RNA bis hin zur Proteinsynthese (Abbildung 1) - und umfasst verschiedene Mechanismen auf der Ebene der Transkription und der Translation.

Transkriptionsfaktoren sind aus unterschiedlichen Domänen aufgebaut. Bei diesen Domänen handelt es sich beispielsweise um eine DNA-Bindedomäne, die mit spezifischen DNA-Sequenzen in Wechselwirkung tritt. Außerdem können Transkriptionsfaktoren eine Aktivierungsdomäne enthalten, die zusammen mit anderen Proteinen die Transkription stimuliert. Eukaryontische Transkriptionsfaktoren enthalten eine Vielzahl verschiedener Struktur motive, die mit bestimmten DNA-Sequenzen in Wechselwirkung treten. Der Typ der DNA-Bindungsdomäne dient zur Klassifizierung der Transkriptionsfaktoren. Zu den wesentlichen Motiven der DNA-Bindungsdomänen zählen das Zinkfinger-Motiv, das Homöodomänen-Motiv, das Helix-Loop-Helix-Motiv und das Leucin-Zipper-Motiv. Einige Transkriptionsfaktoren können Heterodimere ausbilden, wodurch sich die Möglichkeiten der Expressionsregulation erweitern. Transkriptionsfaktoren werden generell in zwei Hauptgruppen unterteilt: aktivierende Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsrepressoren. Das genau aufeinander abgestimmte Zusammenspiel der verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die entweder Zelltyp spezifisch oder ubiquitär exprimiert werden, bewirkt, dass Gene für unterschiedliche Zellfunktionen exprimiert werden. Außerdem koordiniert das komplexe Netzwerk an Transkriptionsfaktoren verschiedene

Entwicklungsprozesse miteinander. So wird die adäquate Spezifizierung von Vorläuferzellen in den verschiedenen Keimschichten, deren Ausbreitung während der Proliferation und letztlich die korrekte Differenzierung aller verschiedenen Zelltypen eines spezifischen Organs erreicht. Die Anzahl der Gene, die an der Transkriptionsregulation beteiligt sind, hat sich vom einzelligen Organismus bis hin zum hoch entwickelten Vielzeller von 319 auf 1850 regulierende Gene erhöht (Venter et al., 2001). Daraus wird deutlich, wie spezifisch die Transkription der Gene in Vielzellern im Vergleich zu einzelligen Organismus reguliert wird.

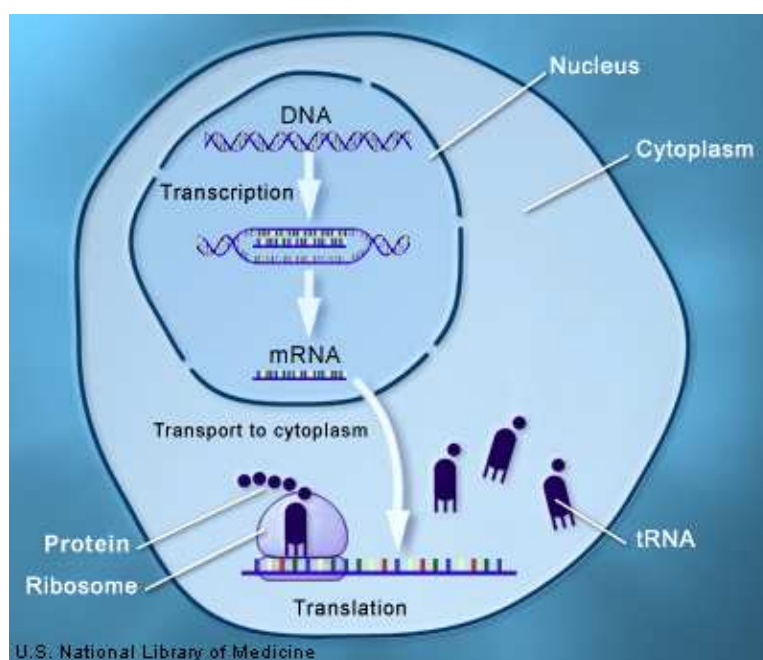


Abbildung 1: Das zentrale Dogma der Molekularbiologie

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie beschreibt den Informationsfluss von DNA zu RNA und dann zum Protein. Im Zellkern wird die DNA zu mRNA transkribiert. Die mRNA wird ins Zytoplasma transportiert, wo die Translation zu Proteinen erfolgt.

Die unterschiedliche Proteinexpression in den verschiedenen Zelltypen verleiht den Zellen ihren spezifischen Charakter und wird entscheidend durch die Regulation der Transkription bestimmt. Die Synthese der Proteine und deren Regulation erfolgt nach einem in allen Organismen identischen Weg (Abbildung 1). Dieser beginnt mit der Transkription, bei dem die auf dem kodierenden Bereich des Gens gespeicherte Information in einzelsträngige RNA (mRNA) umgeschrieben wird. Diese wird wiederum mehreren biochemischen Mechanismen unterzogen, welche man als RNA-Prozessierung bezeichnet. Neben der RNA-Prozessierung stellen der

Transport der mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma, die Beeinflussung der Translation durch Aktivierung oder Inaktivierung von mRNAs oder die posttranslationelle Modifikation der Proteine Kontrollmöglichkeiten der Genexpression dar.

Im Genom einer Zelle ist die Information zur Herstellung vieler Tausend verschiedener Proteine gespeichert. Einige Proteine werden ständig von den Zellen benötigt, um die Aufrechterhaltung von grundlegenden Stoffwechselwegen zu garantieren. Diese Gene werden konstitutiv exprimiert und als „Haushaltsgene“ bezeichnet. Im Gegensatz dazu haben viele Gene eine speziellere Aufgabe. Ihre biologische Information benötigt die Zelle in Abhängigkeit zum jeweiligen Differenzierungszustand, indem sie sich gerade befindet. Zellen müssen in der Lage sein, in den jeweiligen Entwicklungsstadien adäquat auf äußere Signale zu reagieren.

2.2 Die Rolle der Chromatinstruktur bei der Regulation der Genexpression

Im Zellkern der Eukaryonten liegt die DNA mit den Histonproteinen assoziiert in kompakter Form vor und wird als Chromatin bezeichnet. Ein entscheidender Punkt in der Regulation eukaryontischer Gene ist die strukturelle Organisation der DNA im Chromatin. Das Chromatin besteht aus Nukleosomen, die in regelmäßigen Abständen auf der DNA angeordnet sind. Nukleosome bestehen aus je zwei Molekülen jedes Histons H2A, H2B, H3 und H4, welche das Histon-Oktamer bilden (Kornberg und Lorch, 1999), wobei die internukleosomalen DNA-Bereiche mit den Linker-Histonen H1 assoziiert sind (Wolffe, 1995). Um das Histon-Oktamer ist die DNA gewunden (Abbildung 2). Die Nukleosome sind in regelmäßigen Abständen auf der DNA angeordnet. Studien über die Zugänglichkeit von Genen für die Transkriptionsmaschinerie haben gezeigt, dass das Chromatin in einer hoch organisierten, kompakten Form vorliegend die Transkription der Gene inhibieren kann. Das N-terminale Ende der Histone kann durch Methylierung, Acetylierung oder Phosphorylierung modifiziert werden (van Holde, 1988; Zhang and Reinberg, 2001).

In den letzten Jahren wurden immer mehr Faktoren entdeckt, die für die Reorganisation der Chromatinstruktur verantwortlich sind. Die Frage, wie diese Faktoren mit der im Chromatin organisierten DNA interagieren, steht immer mehr im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Bei der Regulation der Genexpression ist die Interaktion Gen spezifischer Transkriptionsfaktoren mit Chromatin modifizierenden Faktoren von besonderer Bedeutung.

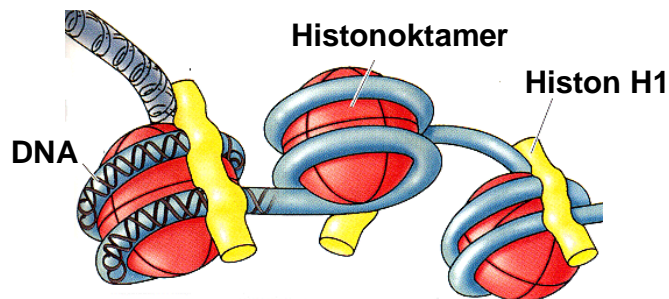


Abbildung 2: Moduläre Darstellung des Chromatins

Jedes Nucleosom besteht aus einem Histonoktamer, das aus je zwei Histonen 2A, 2B, H3 und H4 gebildet wird. Das Histon H1 dient als Linker zwischen den Histonoktameren, um die die DNA gewunden ist.

Modifizierte Abbildung aus: <http://www.palaeos.com/Eukarya/Eukarya.Origins>.

Etwa 25% der Proteinmasse der Histone machen die Aminosäuren Arginin und Lysin aus. Diese sind in den aus den Nucleosomen herausragenden N-terminalen Enden der Histone, die auch als Histonschwänze bezeichnet werden, lokalisiert (Arents et al., 1991). Diese N-terminalen Enden sind Orte posttranslationaler Modifikationen, wobei die erste Assoziation von Genaktivierung und Histonmodifikationen am Beispiel der Histonacetylierung gemacht wurde (Allfrey et al., 1964). Am Mechanismus der Histonacetylierung und der Histondeacetylierung sind zwei gegensätzlich arbeitende Proteine beteiligt: die Histonacetyltransferasen (HATs) und die Histondeacetylasen (HDACs). HATs übertragen die Acetylgruppen vom Acetyl-Coenzym A auf bestimmte Lysinreste in den aminoterminalen Enden der Histonproteine (Abbildung 3). Dadurch kommt es zu einer Verminderung der positiven Ladung der Histone, die so zu einer reduzierten Affinität der Histone zur DNA führt. Hieraus resultiert eine lokale Destabilisierung der DNA/Histon-Interaktion, so dass das Chromatin aufgelockert und den spezifischen Transkriptionsfaktoren der Zugang an die nucleosomale DNA erleichtert wird (Grunstein, 1997; Sterner und Berger, 2000). Dieser Vorgang kann durch reprimierende Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel REST wieder rückgängig gemacht werden (Urnov und Wolffe, 2001), indem HDACs rekrutiert werden. HDACs spalten die Acetylgruppen von den Lysinresten ab, so dass die negative Ladung wieder hergestellt wird und eine starke Interaktion zwischen der negativ geladenen DNA und den positiv geladenen Histonen entsteht (Abbildung 3).

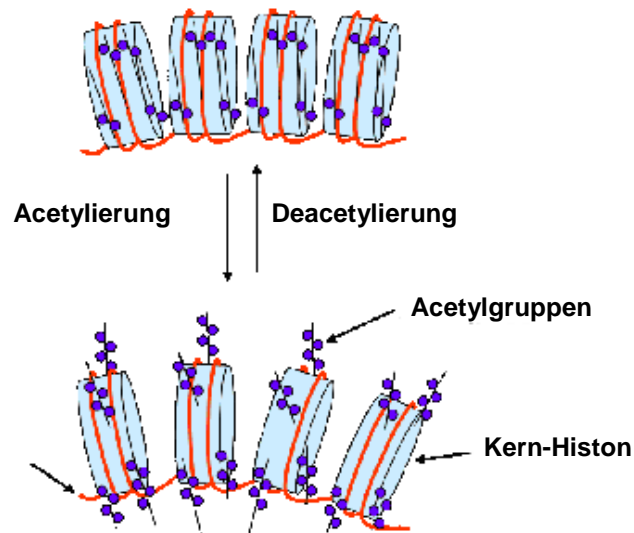


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Histonmodifikation durch HATs und HDACs

HATs übertragen Acetylgruppen auf die Lysinreste der Histone, was zu einer reduzierten positiven Ladung der Histone führt. Die negativ geladene DNA stößt sich ab und kann nicht mehr so dicht gepackt werden. Sind viele Histonmoleküle im Nucleosom acetyliert, nimmt das Chromatin eine aufgelockerte, offene Konfiguration an, was die DNA zugänglich für Transkriptionsfaktoren macht. HDACs können diese Acetylgruppen wieder entfernen. Die nun positive Ladung der Histone führt zu einer starken Bindung an die negativ geladene DNA. Das Chromatin wird dichter gepackt und somit unzugänglich für transkriptionelle Regulatoren (Thiel et al; 2004).

Neben der Acetylierung ist auch die Methylierung der Histone bei der Transkriptionskontrolle bedeutend. Die Histonmethylierung gilt im Gegensatz zur Histonacetylierung als eine vererbare Modifikation. Hierbei sind Histonmethyltransferasen (HMTs), wie zum Beispiel die Methyltransferasen SUV39H1 und G9a aktiv, die spezifisch die Lysinreste 4, 9 oder 27 des Histons H3 mono-, di- oder trimethylieren (Rea et al., 2000; Tachibana et al., 2001). Auch Histon-demethylasen wie die "Lysine Specific Demethylase 1" (LSD1) und SMCX können den Methylierungsgrad des Lysinrests 4 am Histon H3 reduzieren (Shi et al., 2004; Tahiliani et al., 2007). Strahl und Allis (2000) haben den so genannten „Histone code“ postuliert, der je nach Ort und Anzahl der Methylgruppen zwischen aktivem oder inaktivem Chromatin unterscheidet. 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). Methylierte Lysinreste 9 und 27 dienen als Bindestellen für das

Heterochromatin Protein 1 (HP1) (Bannister et al., 2001, Stewart et al., 2005), welches durch Homo- und Heterodimerisierung die Bildung von Heterochromatin initiiert. So können durch Bindung von HP1 ganze Genabschnitte unzugänglich für Transkriptionsfaktoren gemacht werden. Die Gene auf diesen Chromatinabschnitten sind „inaktiv“ und werden in diesem Zustand an die Tochterzelle weitervererbt.

2.3 Der Transkriptionsfaktor REST

Die Regulationsmechanismen, die die Genexpression in Neuronen kontrollieren, sind unentbehrlich für die Physiologie und die Funktion des zentralen Nervensystems. Die neuronale Differenzierung und die Regulation des differenzierten Zustands werden durch Transkriptionsfaktoren und durch von diesen rekrutierten Proteinen reguliert. Ein Transkriptionsrepressor, der eine Neuron spezifische Genexpression vermittelt, ist der Transkriptionsfaktor REST (RE-1 Silencing Transcription Factor). REST ist auch unter dem Namen NRSF (Neuron Restrictive Silencer Factor) bekannt.

Die REST cDNA wurde 1995 von zwei Arbeitsgruppen unabhängig von einander kloniert (Chong et al., 1995; Schoenherr und Anderson, 1995) und wird hauptsächlich in nicht neuronalen Geweben exprimiert, in denen das Protein die Expression neuronaler Gene verhindert. Erste Studien über die reprimierende Funktion von REST wurden am *Synapsin I*-Gen durchgeführt. Die Untersuchung unterschiedlicher neuronaler Gene zeigte, dass der negative Regulationsmechanismus von REST für die Neuron spezifische Transkription der REST-regulierten Gene verantwortlich ist. Auch in undifferenzierten neuronalen Vorläuferzellen wird REST stark exprimiert und verhindert hier die vorzeitige Expression des neuronalen Phänotyps während der Neurogenese (Palm et al., 1998; Ballas et al., 2005). Jedoch wird REST auch in differenzierten Neuronen exprimiert, wenn auch in geringerem Umfang (Palm et al., 1998; Lietz et al., 1998). Ein Vergleich der Genexpression von *REST* und dem REST-regulierten *Synapsin I*-Gen in Neuroblastomazellen (Schoch et al., 1996) zeigte, dass das *Synapsin I*-Gen in den Zellen trotz einer, wenn auch geringen Konzentration von REST, exprimiert wird. Hierbei steht die Expression der beiden Gene in einem inversen Verhältnis zueinander (Lietz et al., 1998). Das heißt, mit sinkender Konzentration an REST steigt die Menge an Synapsin I in den Zellen und umgekehrt. Palm et al. (1998) haben die REST-Konzentration während der neuronalen Differenzierung analysiert und festgestellt, dass bei Beginn der Neurogenese das *REST*-Gen stark exprimiert wird, wobei mit fortschreitender Differenzierung die Menge an REST immer

weiter abnimmt. Es besteht also ein direkter Zusammenhang zwischen der neuronalen Differenzierung und einer verminderten Konzentration an REST in den Zellen. REST kann folglich in nicht neuronalen Zellen die Expression neuronaler Gene nicht nur hemmen, stattdessen kann der Transkriptionsrepressor auch die Expression seines Zielgens in neuronalen Zellen modulieren. Aus diesen Fähigkeiten hat sich für REST die Bezeichnung als „Masterregulator“ der Neuron spezifischen Genexpression entwickelt (Schoenherr und Anderson, 1995). Untersuchungen an REST Knock-out Mäusen haben aber gezeigt, dass dies eine Fehleinschätzung war, und REST zwar eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung des neuronalen Phänotyps besitzt, aber keineswegs als Masterregulator bezeichnet werden kann. Es wurden von Chen et al. (1998) Untersuchungen an Mäusen durchgeführt, bei denen das *REST*-Gen ausgeschaltet war. Diese Mäuse zeigten zwischen den embryonalen Tagen 9,5 und 10 einen letalen Phänotyp, wobei zu diesem Zeitpunkt die meisten neuronalen Gene noch nicht exprimiert wurden. Jedoch haben diese Studien gezeigt, dass trotz des Fehlens von REST die Neurogenese nicht früher oder stärker ausgelöst werden konnte, und dass mit Ausnahme des neuronalen Gens *β -III-Tubulin* in nicht neuronalen Zellen keine neuronalen Gene exprimiert wurden. Dies wäre jedoch zu erwarten gewesen wäre, wenn REST tatsächlich als Masterregulator fungieren würde. Hieraus wird gefolgert, dass REST zwar bei der Aufrechterhaltung des neuronalen Status einer Zelle und für den Ablauf der neuronalen Differenzierung essentiell ist (Blau, 1992), der Transkriptionsfaktor alleine aber nicht maßgebend dafür ist, ob eine neuronale oder eine nicht neuronale Differenzierung ausgelöst wird.

Abbildung 4 zeigt die moduläre Struktur von REST. Das Protein REST besteht aus 1096 Aminosäuren und enthält acht Zinkfinger in der Nähe des N-Terminus und einen Zinkfinger am C-Terminus. Die N-terminal gelegenen Zinkfinger sind für die DNA-Bindung verantwortlich. In der C-terminalen Repressordomäne des Proteins befindet sich ein weiterer Zinkfinger. Neben einer C-terminalen Repressordomäne verfügt REST außerdem über eine N-terminale Repressordomäne (Thiel et al., 1998; Thiel und Hohl 2006).

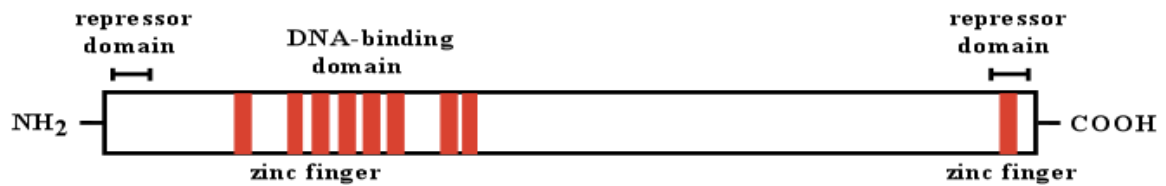


Abbildung 4: Moduläre Struktur des Transkriptionsrepressors REST

Der transkriptionelle Repressor REST verfügt über je eine Repressordomäne am N-Terminus und am C-Terminus. Die acht N-terminal gelegenen Zinkfinger sind für die Bindung an die DNA verantwortlich.

2.4 Die Identifikation REST-responsiver Gene

REST bindet an eine 21 bis 23 Basenpaar lange Sequenz, die als NRSE (Neuron Restrictive Silencer Element) oder als Repressor-Element 1 (RE-1) bezeichnet wird. Diese Sequenz wurde ursprünglich in der 5'-Region der *SCG10*- und des *Natriumkanal-Typ II-(NaV1.2)* Gens entdeckt (Schoenherr und Anderson, 1995). Die Konsensussequenz der REST-Bindestelle wurde durch Sequenzabgleiche von 25 neuronalen Genen ermittelt und lautet folgendermaßen: NNCAGCACCNNGCACAGNNNC (Schoenherr et al., 1996, Roopra et al., 2001, Bruce et al., 2004). Befinden sich in einem NRSE mehr als 6 Abweichungen von der Konsensussequenz, kann REST nicht mehr binden (Schoenherr et al., 1996).

Neben *Synapsin I* sind viele weitere Gene bekannt, die durch REST reguliert werden. Diese Gene kodieren für Proteine, die für die Bildung und den Erhalt des neuronalen Phänotyps verantwortlich sind. Zu diesen gehören Gene, die für Ionenkanäle (Kraner et al., 1992), Neurotransmittersynthetasen (Ishiguro et al., 1993; 1995), neuronale Rezeptoren (Wood et al., 1996), das neuronale Zytoskelett (Schoenherr et al., 1996), synaptosomale Proteine (Schoch et al., 1996; Li et al., 1993), neuronale Adhäsionsproteine (Kallunki et al., 1995; 1997; 1998), neurotrophe Faktoren (Tabuchi et al., 1999; Timmusk et al., 1999), mit neuronalem Wachstum assoziierte Proteine (Mori et al., 1990; 1992), Wachstumsfaktoren und Hormonen (Bruce et al., 2004), aber auch für Faktoren, die eine Rolle bei der Erregungsleitung entlang des Axons und beim Transfer der Vesikel spielen (Schoenherr et al., 1996), kodieren.

Bruce et al. (2004) haben in einer umfassenden Studie am Genom von Maus und Mensch mehr als 1900 Gene identifiziert, die ein putatives NRSE tragen, und diese unter http://bioinformatics.leeds.ac.uk/group/online/RE1db/re1db_home.htm veröffentlicht. Belyaev et al. (2004) zeigten aber, dass nicht alle Gene, die ein NRSE enthalten, auch tatsächlich durch REST

reguliert werden. So wurden durch Datenbanksuchen NRSE-Motive auch in nicht neuronalen Gensequenzen identifiziert, wie z.B. im *Cytochrom P450-11 β* - und im *Aktin*-Gen. Dies legt die Vermutung nahe, dass der NRSF nicht ausschließlich die Expression neuronaler Gene reguliert, sondern auch eine Funktion bei der Regulation nicht neuronaler Gene erfüllt (Garcia-Sanchez et al., 2003; Schoenherr et al., 1996). Umgekehrt konnte aber auch in nicht neuronalen Geweben wie z.B. in einigen Gliazelltypen und in embryonalem Herz- und Lebergewebe (Schoenherr und Anderson, 1995) kein REST-Protein nachgewiesen werden.

Es ist außerdem bekannt, dass REST auch in neuronalen Zellen synthetisiert wird und ebenfalls die Transkription NRSE-haltiger Gene inhibieren kann, wie das z.B. beim *Nav1.2*-Gen in reifen peripheren Neuronen der Fall ist (Chong et al., 1995).

2.5 Der Repressionsmechanismus von REST

REST bedient sich verschiedener Mechanismen, um die Transkription seiner Zielgene zu reprimieren. So kann der Transkriptionsrepressor über seine N-terminale Repressordomäne das Korepressorprotein mSin3A und Histondeacetylasen rekrutieren (Naruse et al., 1999; Huang et al., 1999). HDACs verändern den Acetylungsgrad der Histone und haben so Einfluss darauf, ob das Chromatin in einer offenen oder in einer geschlossenen Konfiguration vorliegt. Über die C-terminale Repressordomäne kann REST das Korepressorprotein CoREST rekrutieren (Andres et al., 1999). Daraus wird ein vielseitiger Repressionsmechanismus zur Verfügung gestellt, denn CoREST rekrutiert seinerseits HDACs und LSD1 (Humphray et al. 2001; Shi et al., 2005).

LSD1 agiert substratspezifisch an methylierten Lysinresten 4 des Histons H3 und fungiert als transkriptioneller Korepressor, der an dem Ausschalten von neuronalen Genen beteiligt ist (Shi et al., 2004). Untersuchungen von Shi et al. (2005) schlagen vor, dass HDACs und LSD1 zur Bildung einer repressiven Chromatinstruktur kooperieren. Übereinstimmend hierzu zeigte eine Behandlung mit Trichostatin A (TSA) eine Derepression von LSD1 Zielgenen. TSA hemmt Histondeacetylasen und trägt folglich zu einer Auflockerung des Chromatins bei.

Zheng et al. (2009) haben herausgefunden, dass die Rekrutierung der verschiedenen Histon modifizierenden Proteine durch REST sehr heterogen ist und sowohl vom nukleosomalen Kontext als auch von der Affinität von REST zu seiner Bindestelle auf der DNA abhängig ist. Hierbei wurden für die verschiedenen Aminosäurereste unterschiedliche Repressorproteine identifiziert, die Lysinreste der Histone H3 und H4 sind Ziele der Histondeacetylasen HDAC1

und HDAC2 (Huang et al., 1999; Naruse et al., 1999; Grimes et al., 2000; Roopra et al., 2000). LSD1 und SMCX demethylieren spezifisch den Lysinrest 4 am Histon H3 (Shi et al., 2004; Tahiliani et al., 2007). Die Methyltransferase G9a wird von CoREST an die Transkriptionseinheit herangeführt und demethyliert spezifisch die Lysinreste 9 und 27 am Histon H3 (Tachibana et al., 2001). BRG1 ist für die Acetylierung des Lysinrests 8 am Histon H4 verantwortlich (Battaglioli 2002; Ooi et al., 2006). Außerdem haben Zheng et al. (2009) weitere Histon modifizierende Proteine entdeckt, zu denen der als Histonmethyltransferase agierende Polycomb Repressorkomplex gehört.

Der methylierte Lysinrest 9 am Histon H3 dient als Bindestelle für das Heterochromatin Protein 1 (HP1) (Bannister et al., 2001), welches bei der Bildung von Heterochromatin essentiell ist. Durch diesen Mechanismus kommt es zur Entstehung und auch zur Aufrechterhaltung ganzer Bereiche auf dem Chromatin, die abgeschaltet und somit unzugänglich für die Transkriptionsmaschinerie sind. Demnach kann REST neben einer Repression von einzelnen Genen auch ganze Genabschnitte längerfristig stilllegen.

Neben Modifizierungen der Histone kann REST auch die Struktur der DNA selbst modifizieren. Hierbei handelt es sich um Mechanismen, die den Methylierungsgrad der DNA verändern, was zur transkriptionellen Repression dieses REST-regulierten Gens führt (Abbildung 5). Veränderungen des Methylierungsgrads der DNA sind meist mit transkriptioneller Reprimierung verbunden. Eine Reprimierung der Transkription eines Gens kann durch eine Blockade der Bindestelle für Transkriptionsaktivatoren auf der DNA erfolgen, oder aber durch das Heranführen von Repressorproteinen an die Transkriptionseinheit. Hierbei ist das Repressorprotein MeCP2 (methyl-CpG-binding Protein 2) von großer Bedeutung. MeCP2 bindet an methylierte Cytosine in CpG-Dinukleotiden und reprimiert durch Rekrutierung von Histondeacetylasen oder Histonmethyltransferasen die Transkription der methylierten DNA-Abschnitte (Jones et al, 1998; Nan et al., 1998; Fuks et al., 2003). Die Fähigkeit von REST, seine Zielgene über die Rekrutierung von Histondeacetylasen aber auch über Wechselwirkungen mit dem Repressorprotein MeCP2 zu regulieren, haben Thiel et al. (2004) dazu veranlasst, REST als duales Repressorprotein zu beschreiben.

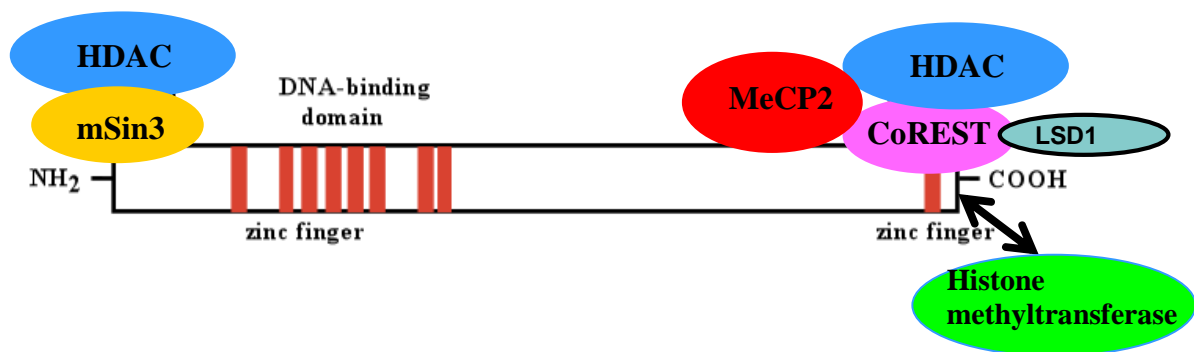


Abbildung 5: Schematische Darstellung von REST und seinen Korepressorproteinen

REST rekrutiert verschiedene Repressorproteine an seine N-terminale und seine C-terminale Repressordomänen. Es handelt sich hierbei um Proteine, die den Acetylierungsgrad (HDAC) oder den Methylierungsgrad der Histone (LSD1) verändern. MeCP2 bindet an methylierte Stellen auf der DNA und kann weitere HDACs und Methyltransferasen rekrutieren.

2.6 Ziel der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war, die Rolle von REST bei der Initiation der Neurogenese in neuronalen Stammzellen aufzuklären. Hierbei wurden verschiedene neuronale Gene ausgewählt, und der Einfluss von REST auf die Expression dieser Gene untersucht. Um die Aktivität von REST in neuronalen Stammzellen mit der in neuronalen und in nicht neuronalen Zellen vergleichen zu können, wurden Neuroblastomazellen und Keratinozyten für die Untersuchungen herangezogen. Es sollte die epigenetische Konfiguration der neuronalen Gene in den verschiedenen Zelltypen miteinander verglichen werden. Ein weiteres Ziel war, die Auswirkung verschiedener epigenetischer Modifikationen auf die Aktivität von REST zu klären.

Zur Identifikation von REST-Zielgenen in den unterschiedlichen Zellsystemen wurde eine induzierbare dominant-positive Mutante von REST, genannt DP-REST:ER, verwendet.

Das *GluR2*-Gen, das für eine Untereinheit des AMPA-Rezeptors kodiert, konnte von Hohl und Thiel (2005) im Gegensatz zu anderen Untersuchungen (Myers et al., 1998; Huang et al., 1999) nicht als ein durch REST-reguliertes Gen identifiziert werden. Da diese früheren Untersuchungen einen Einfluss von REST auf die Expression des *GluR2*-Gens zeigten, stellte sich die Frage, ob REST bei der Expression von *GluR2* in Gliomazellen eine Rolle spielt, und welchen Einfluss epigenetische Merkmale, wie die Konfiguration des Chromatins auf die Aktivität von REST haben.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Auflichtmikroskop (Stemi2000)	Zeiss, Göttingen
Autoklav	Schütt, Göttingen
Behälter für Flüssigstickstoff	diverse Hersteller
Blottingapparatur	Höfer, San Francisco
Brutschränke	diverse Hersteller
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Eigenbau, Werkstatt Biochemie
Eismaschine	diverse Hersteller
Entwicklermaschine Gevamic 60 für Röntgenfilme	Agfa-Gevaert, München
Feinwaagen	Sartorius, Göttingen
Geldokumentationsanlage	Bio-Rad , München
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler	Infors, Bottmingen, CH
Luminometer	Berthold Detection Systems
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen,
pH-Meter, inoLab pH 720	WTW, Weilheim
Mikroskop (Durchlicht) Axiovert25	Zeiss, Göttingen
Mikrowellenherd	AEG
Milliporewasser-Anlage Milli Q	Millipore, Milford, USA
Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (Gießapparatur für SDS-Polyacrylamidgel, Glasplatten, Kämme, Apparatur zum Lauf von SDS-Gelen	Bio-Rad, München
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
PCR-Cycler Master Cycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
PCR-Cycler Labcycler	Sensoquest, Göttingen
Photometer Microplate Reader Model 550	Bio-Rad, München
Photometer, bioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg;

Pipettus	Abimed, Langenfeld;
Rotator	Gilson, Middleton, USA
Rotoren für Kühlzentrifuge J2-HS: JA.10, JA.20	Hirschmann, Eberstadt
Röntgenfilmkassette	Faust GmbH, Köln
Spannungsgeräte für Agarosegel-Elektrophorese	Beckman, München
Spannungsgeräte für SDS-PAGE	Molecular Dynamics
Sterilbank	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge Biofuge pico	Bio-Rad, München
Ultraschallgerät mit Micro- und Macrotip,	Heraeus, Hanau
Sonifier Cell Disruptor B15	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge (Optima TL)	Branson, Danbury, USA
UV-Tisch	Beckman Coulter, Krefeld
Vortex-Mixer	Fröbel, Wasserburg
Wasserbäder, temperierbar	IKA Labortechnik,
Westernblot-Apparatur Mini Trans-Blot Cell	Staufen, Deutschland
Wipptische	diverse Hersteller
Zentrifuge 5810R	Bio-Rad, München
	Biometra, Göttingen
	Eppendorf, Hamburg

3.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser 24 x 24 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einmal-Spitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen	B.Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Küvetten UVette, 50-2000µl	Eppendorf, Hamburg
Nitrocellulosemembran Biotrace NT	Pall Gelman Laboratory,
	Pensacola, Mexiko
Objektträger 76 x 26 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
PCR-Reaktionsgefäße	Thermo Scientific, Karlsruhe
Plastikröhrchen („Falcon“-Röhrchen): 15 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen

Plastikröhrchen („Falcon“-Röhrchen): 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Polystyren-Röhrchen	Becton Dickensen, Heidelberg
Quiagen-tip 500 Säule	Quiagen; Hilden
Reaktionsgefäße: 1.5 ml	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter: 0.2 µm und 0,45µm	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfiltrationseinheiten	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman 3MM- Papier	Whatman, Maidstone, UK
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm ²)	Greiner Bio-one, Frickenhausen,
Zellkulturschalen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Cell ⁺ -Zellkulturmaterialien	Sarstedt, Nümbrecht

3.3 Chemikalien und Feinchemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Roche, Mannheim
Agarose ultra pure DNA Grade	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth, Karlsruhe
bFGF	Biochrom, Berlin
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, München
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Roth, Karlsruhe
CoA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Complete Proteaseinhibitoren	Roche, Mannheim
dbcAMP	Sigma-Aldrich, Steinheim
DEPC	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Roth, Karlsruhe
dNTPs (Na-Salze)	Fermentas, St.Leon-Rot
DTT	Roth, Karlsruhe

Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM)	PAA, Marburg
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Sigma-Aldrich, München
Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM:F12)	
EDTA	Roth, Karlsruhe
EGF	Biochrom, Berlin
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	VWR, Fontenay sous Bois, Frankreich
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS	Biochrom, Berlin
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Formamid	AppliChem, Darmstadt
Glutamin	PAA, Marburg
Glycerin	Biomol, ????
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumisothiocyanat	Roth, Karlsruhe
HCl	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hotstar Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
4-Hydroxytamoxifen	Sigma-Aldrich, Steinheim
IBMX	Sigma-Aldrich, Steinheim
Immolase (Hot Start Taq Polymerase)	Bioline, Lückenwalde
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Lachssperma-DNA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Luminol	Roth, Karlsruhe
Luziferin	Sigma-Aldrich, München
M2-Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
MEM non-essential Aminosäuremix	Invitrogen, Karlsruhe
MEM Vitamine	Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

Methanol	Roth, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker (Prestained Proteinmarker)	Fermentas, St.Leon-Rot
M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas, St.Leon-Rot
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumlauroylsarcosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet P40	Sigma-Aldrich, Steinheim
ONPG	Sigma-Aldrich, Steinheim
para-Coumarsäure	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA, Marburg
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polybrene	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Primer	Sigma-Genosys, Steinheim
Protein A Sepharose	GE-Healthcare, München
Puromycin	PAA, Marburg
Random-Hexamer Primer	Fermentas, St.Leon
Reporterlysepuffer	Promega, Mannheim
Retinsäure	Calbiochem-Novabiochem corporation, Merck KGaA, Darmstadt
Ribonuklease Inhibitoren	Fermentas, St.Leon-Rot
RPMI 1640	PAA, Marburg
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Fermentas, St.Leon-Rot
TEMED	Roth, Karlsruhe
Trichostatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100 (Octophenolpolyethylen-glykolether)	Roth, Karlsruhe
Trypsin 10x	PAA, Marburg
Tween20	Roth, Karlsruhe
X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3Indoyl- β -D-galaktopyranosid)	Roche, Mannheim

3.4 Kits

BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Karlsruhe
BrdU, Cell Prolifertation ELISA	Roche, Mannheim
ECLplus	GE-Healthcare, München
InvisorbR [®] RNA Kit II	Invitex, Berlin
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

3.5 Verwendete Plasmide

pHIVLTRluc: enthält die Sequenz von -120 bis +83 des LTR des HI-Virus vor der kodierenden Region des Luziferasegens aus *P. pyralis*.

pFUW: lentiviraler Transfervektor ohne kodierende Region für ein Transgen (Lois et al., 2002)

pFUWluc: lentiviraler Transfervektor mit der kodierenden Region des Luziferasegens aus *P. pyralis*

pFUWGlur2luc: enthält vor der kodierenden Region des Luziferasegens aus *P. pyralis* den proximalen Bereich des humanen Glur2-Promotors. In dieser Promotorregion befinden sich das NRSE und die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Sp1.

pFWSylluc: enthält einen Bereich (-422 bis +47) des menschlichen Synapsin I Promotors vor der kodierenden Region des Luziferasegens aus *P. pyralis*

pFUWSp1ΔN: Kodiert für eine dominant-negative Mutante von Sp1

Alle verwendeten Plasmide wurden freundlicherweise von Prof. Thiel zur Verfügung gestellt.

3.6 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 5%CO₂ und 37°C in einer feuchten Atmosphäre kultiviert. Die verschiedenen Zellen wurden mit den ihnen eigenen Medien und entsprechenden Zusätzen kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die entsprechenden Medien und Zusätze wurden vor ihrem Gebrauch auf 37°C vorgewärmt.

3.6.1 Zelllinien und Kultivierungsbedingungen

Sofern nicht anders beschrieben wurden die Zelllinien in folgendem Medium kultiviert:

DMEM

10% FCS
25 mM Glukose
2mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

R28 Zellen wurden in folgendem Medium kultiviert:

DMEM

10% NCS
1 x MEM Vitamine
1 x MEM non-essential Aminosäuremix

0,37% Natriumbikarbonat
2mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

HNSC.100 Zellen wurden in folgendem Medium kultiviert:

DMEM-F12

0,5% FCS
1% N2-Supplements
1% BSA
20ng/ml bFGF
20ng/ml EGF
6g/l Glukose
1% 1 x MEM non-essential Aminosäuremix

SH-SY5Y

Diese Neuroblastomazelllinie des Menschen ist ein Klon der SK-N-SH Zelllinie, die im Original aus einem metastasierenden Neuroblastom eines 4-jährigen Mädchens gewonnen wurde (Biedler et al., 1973). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von J. Biedler (Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, New York, USA) zur Verfügung gestellt. Außerdem wurden die Zellen von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen.

HepG2

Diese humane Hepatomazelllinie wurde bei der DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Deutschland gekauft. HepG2 Zellen wurden 1979 von Aden et al. aus einer Leberbiopsie eines Kindes, das an einem primären Hepatoblastom erkrankt war, isoliert.

293T17

Diese menschliche embryonale Nierenzelllinie (293) wurde freundlicherweise von D. Baltimore (Rockefeller University, New York, USA) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden mit dem T-Antigen SV40 transformiert (DuBridge et al., 1987; Graham et al., 1977).

HNSC.100

Diese humane neurale Stammzelllinie (Villa et al., 2000) wurde freundlicherweise von A. Martinez-Serrano (Center of Molecular Biology Severo Ochoa, Madrid, Spain) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden aus dem Gehirn eines 10,5 Wochen alten humanen Fötus isoliert und durch eine Infektion mit einem für einen für v-myc kodierenden Retrovirus immortalisiert.

HNSC.100pac

Diese Zellen wurden von Gerald Thiel zur Verfügung gestellt. HNSC.100 Zellen wurden von Gerald Thiel mit einem Retrovirus infiziert, der für die Puromycinacetyltransferase (pac) kodiert. Hierzu wurde der retrovirale Vektor pMSCVpac verwendet, der die Kodierregion für das *Puromycinacetyltransferase*-Gen unter der Kontrolle des Phosphoglyzerat-Kinase Promotors und das Verpackungssignal ψ enthält (Hawley et al., 1994).

HNSC.100 DP-REST:ER

HNSC.100 Zellen wurden von Gerald Thiel mit einem Retrovirus infiziert, der für die dominant-positive Mutante von REST kodiert. Der retrovirale Vektor pMSCV-DP-REST:ER enthält die kodierende Region für die DNA-Bindungsdomäne von REST unter der Kontrolle des Cytomegalievirus Gen-Promotors/Enhancers. Proximal zur kodierenden Region für die REST DNA-Bindungsdomäne wurde zusätzlich die kodierende Region für das Flag-Epitop und für ein Kernlokalisierungssignal (NLS) angefügt.

HNSC.100 Δ Raf-1:ER

HNSC.100-Zellen wurden von Gerald Thiel mit einem Retrovirus infiziert, der für das Fusionsprotein Δ Raf-1 kodiert. Δ Raf-1 kann durch Hormonzugabe aktiviert werden (Thiel et al., 2009).

HaCaT

HaCaT Zellen (human adult low calcium temperature keratinocytes) sind menschliche Keratinozyten, die freundlicherweise von N.E.Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden.

R28

Die retinalen Vorläuferzellen R28 wurden freundlicherweise von Dr. Gail M. Seigel zur Verfügung gestellt (Department of Ophthalmology, Physiology and Biophysics, SUNY Universität Buffalo, USA).

R28pac

R28 Zellen wurden von Gerald Thiel mit einem Retrovirus infiziert, der für die Puromycinacetyltransferase (pac) kodiert. Hierzu wurde der retrovirale Vektor pMSCVpac verwendet, der die Kodierregion für das *Puromycinacetyltransferase*-Gen unter der Kontrolle des Phosphoglyzerat-Kinase Promotors und das Verpackungssignal ψ enthält (Hawley et al., 1994).

R28DP-REST:ER

R28 Zellen wurden mit einem Retrovirus infiziert, der für die dominant-positive Mutante von REST, DP-REST:ER, kodiert. Die Zellen wurden von Gerald Thiel zur Verfügung gestellt.

Rat-1

Rat-1 Zellen sind Fibroblastenzellen aus der Ratte. Diese Zelllinie wurde von Gerald Thiel zur Verfügung gestellt.

U87MG

Die humane neuronale Glioblastom-Astrozytom Zelllinie U87MG stammt von einer 44 Jahre alten weiblichen Patientin aus dem Kaukasus. Die Zellen wurden bezogen von der European Collection of Cell Cultures (ECACC).

U87MGpac

U87MG Zellen wurden mit einem Retrovirus infiziert, der für die Puromycinacetyltransferase (pac) kodiert. Hierzu wurde der retrovirale Vektor pMSCVpac verwendet, der die Kodierregion für das *Puromycinacetyltransferase*-Gen unter der Kontrolle des Phosphoglyzerat-Kinase Promotors und das Verpackungssignal ψ enthält (Hawley et al., 1994).

U87MG Flag-REST

U87MG Zellen wurden von Gerald Thiel mit einem Retrovirus infiziert, der für das Protein Flag-REST kodiert. Dieses besteht aus der kodierenden Sequenz für menschliches REST und einer proximal gelegenen Sequenz für das Flag-Epitop. Der retrovirale Vektor pMSCV-Flag-REST wurde von Lietz et al. konstruiert (2003).

U87MG DP-REST:ER

U87MG Zellen wurden mit einem Retrovirus infiziert, der für die dominant-positive Mutante von REST kodiert. Der retrovirale Vektor pMSCV-DP-REST:ER enthält die kodierende Region für die DNA-Bindungsdomäne von REST unter der Kontrolle des Cytomegalievirus Gen-Promotors/Enhancers. Proximal zur kodierenden Region für die REST DNA-Bindungsdomäne

wurde zusätzlich die kodierende Region für das Flag-Epitop und für ein Kernlokalisierungssignal (NLS) angefügt.

3.6.2 Passagieren von Säugerzellen

Je nach Zelltyp wurde nach einer lichtmikroskopischen Beurteilung der Zellen über eine weitere Subkultivierung entschieden. Die Zellen wurden in beschichteten Zellkulturgefäßen (Flaschen und Platten) kultiviert. Bei der neuronalen Stammzelllinie HNSC.100 wurde entweder zusätzlich das Zellkulturmaterial mit Poly-L-Lysin (10µg/ml) beschichtet, oder es wurde speziell beschichtetes Zellkultivierungsmaterial (Cell⁺, Sarstedt) verwendet. Zur Beschichtung von Zellkulturgefäßen wurden die Gefäße mit Poly-L-Lysin bedeckt und circa zwei Stunden bei RT auf einer Wippe inkubiert. Danach wurde das Poly-L-Lysin abgenommen, die Gefäße wurden zweimal mit 1xPBS (170mM NaCl, 3,35mM KCL, 4mM Na₂HPO₄, 1,84mM KH₂PO₄ pH 7,2) und einmal mit sterilem A.dest. gewaschen. Nachdem die Gefäße getrocknet waren, wurden sie steril verpackt und bis zum Gebrauch aufgehoben. Zur Subkultivierung von adhären Zellen wurde das Kultivierungsmedium abgenommen, der Zellrasen einmal mit 1xPBS gewaschen und mit 1xTrypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, bis die Zellen sich vom Boden gelöst haben. Es wurde frisches Medium zugegeben, die Zellaggregate in der Suspension wurden durch mehrmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gelöst, und die Zellen wurden in neuen Kultivierungsgefäßen ausgesät.

Da die HNSC.100 Zellen auf Grund ihres neuronalen Stammzellcharakters sowohl adhären als auch als schwimmende Zellaggregate kultiviert wurden, wurde hier das gesamte Medium samt schwimmender Aggregate abgenommen und bei 200 x g 3 min lang zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde der verbleibende Zellrasen mit 1xPBS gewaschen und mit 1xTrypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, bis die Zellen sich gelöst haben. Die Zellen wurden in neuen Kultivierungsgefäßen ausgesät. Nach dem Zentrifugenlauf wurde der Überstand der zentrifugierten Stammzellen abgenommen, das Pellet mit 1xTrypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren gelöst und in neuen Kultivierungsgefäßen ausgesät.

3.6.3 Auftauen von Säugerzellen

Das Auftauen von Zellen erfolgte möglichst rasch. Hierbei wurde die gefrorene Zellsuspension in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt und unverzüglich in ein steriles Röhrchen überführt. In das Röhrchen war zu Beginn der Prozedur schon 10 ml warmes Medium vorgelegt worden. Die Zellsuspension wurde danach 3-4 Minuten lang bei 200 x g zentrifugiert, in 5 ml Medium resuspendiert und in eine Gewebekulturflasche überführt. Am anderen Tag sollte das Medium in der Gewebekulturflasche abgesaugt und frisches Medium zugegeben werden.

3.6.4 Einfrieren von Säugerzellen

Die Zellen wurden mit 1xTrypsin/EDTA vom Boden der Gewebekulturschale gelöst, in Medium resuspendiert und vier Minuten lang bei 200 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden danach in 1,8 ml eiskaltem FCS mit 10% DMSO resuspendiert und sofort in ein eisgekühltes Kryokonservierungsröhrchen überführt, in Papiertücher eingewickelt (um den Abkühlungsprozess zu verlangsamen) und über Nacht bei -20°C zwischengelagert. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C gelagert. Für eine Lagerung über einen längeren Zeitraum empfiehlt sich jedoch das Überführen der Zellen in flüssigen Stickstoff (-196°C).

3.7 Antikörper

Für die Western-Blot Analysen wurden folgende Antikörper verwendet:

Primärantikörper:

- Anti-FLAG-M2: (Sigma # F3165)
Der Antikörper wurde in der Verdünnung von 1:5.000 eingesetzt.
- Anti-ER (Santa Cruz, # sc-542)
Der Antikörper wurde in einer Verdünnung 1:1000 eingesetzt.

Sekundärantikörper:

- Goat-Anti-Maus IgG HRP Konjugat ist ein polyklonaler Antikörper, der von der Firma Sigma (#A-4416) bezogen und in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt wurde.
- Goat-Anti-Kaninchen-IgG HRP Konjugat. Dieser polyklonale Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt (Dianova, #111-035-003).

Für die Chromatinimmunopräzipitationsanalysen wurden folgende Antikörper verwendet:

- Anti-Flag M2 affinity gel (Sigma, # A2220)
Der Antikörper wurde entsprechend der Gebrauchsinformationen verwendet, wobei pro Probe 40-50µl Antikörperlösung eingesetzt wurden.
- Anti-HDAC-1 (Upstate, # 05-100)
Für die Analysen wurden 10µg des Antikörpers eingesetzt.
- Anti-Histon H3 dimethyl K9 (Abcam, Cambridge, # ab7312)
Für die Chromatinimmunopräzipitationen wurden 5µg des Antikörpers eingesetzt.
- Anti-Histon H3 trimethyl K4 (Abcam, Cambridge, # ab8580)
Von diesem Antikörper wurden 5µg eingesetzt.
- Anti-Histon H3 dimethyl K4 (Upstate, # 07-030)
Von diesem Antikörper wurden 5µg eingesetzt.
- Anti-NRSF (Santa Cruz, # sc-25398)
Von diesem Antikörper wurden 10 µg eingesetzt.
- Anti-Sp1 (Santa Cruz, # sc-59)
Von diesem Antikörper wurden 20 µg eingesetzt.

3.8 Primer

3.8.1 Primer für die RT-PCR

Tabelle 1: Auflistung der Nukleotidsequenzen und der Produktgrößen der Primer, die für die RT-PCR verwendet wurden.

Gen	Primer	Produktgröße
GAPDH (Mensch)	Forward Primer: TTC CAG GAG CGA GAT CCC T Reverse Primer: CAC CCA TGA CGA ACA TGG G	175nt
GAPDH (Ratte)	Forward Primer: CCCTGCATCCACTGGTGCTGC Reverse Primer: CATTGAGAGCAATGCCAGCCC	303nt
GFAP (Mensch)	Forward Primer: CTG TTG GCC AGA GAT GGA GGT T Reverse Primer: TCA TCG CTC AGG AGG TCC TT	382nt
GluR2 (Mensch)	Forward Primer: CAC ACT GAG GAG TTT GAA GAT GGA Reverse Primer: TTA GTA CTG CGA GGT TAA CCG CAT	600nt
Nestin (Mensch)	Forward Primer: GAG AGG GAG GAC AAA GTC CC Reverse Primer: TCC CTC AGA GAC TAG CGC AT	195nt
Ribeye(A)-domain (Ratte)	Forward Primer: TTT GAA TTC TTA TGC CGG TTC CCA GCA G Reverse Primer: TTT CTC GAG TAG AGT CAA CGG GTC TTT C	646nt
Ribeye(B)-domain /CtBp2 (Ratte)	Forward Primer: TTT TTA AGC TTA GCC ACC AAT GAT CCC ATC TGC TGC AGT Reverse Primer: TTT TTT GGA TCC TTG TGT ACC AGG CTG TGT	661nt
REST (Mensch)	Forward Primer: TTT GAA GTT GCT TCT ATC TGC TGT Reverse Primer: GAA TCT GAA GAA CAG TTT GTG CAT	626nt
Syanptotagmin I (Mensch)	Forward Primer: AGT CTT TGT GGG CTA CAA CAG C Reverse Primer: CAG GAT TCC AAG TAC CAC TGA	250nt

Syanptotagmin II (Mensch)	Forward Primer: TGA TGG CTG TGT GAG GAG AG Reverse Primer: GCT GCA AGT TTG TGC CAG TA	169nt
Syanptotagmin IV (Mensch)	Forward Primer: CCA GCA CTT CCC TTA CTT CAG Reverse Primer: TCC CGA GAG AGG AAT TAG AAC	400nt
Syanptotagmin VII (Mensch)	Forward Primer: GAT CGT CCA TCA CCT GAC CT Reverse Primer: GGC AGA GAA ACC ACA GCT TC	179nt
Synaptobrevin 1 (Mensch)	Forward Primer: CCC CTG GCC CTC CTC CTA ACA Reverse Primer: CAC GAT GAT GGC ACA GAT GGT TCC	265nt
Synaptobrevin 2 (Mensch)	Forward Primer: CAT CTT GGG AGT GAT TTG CGC Reverse Primer: GGA GAG GGA CTA TTG CAT AGC	406nt
Synapsin I (Mensch)	Forward Primer: CA CGT CCT GGC TGG GTT TCT GGG Reverse Primer: AGG CTA CCC GTC AGA CAT CCG TCT C	248nt
Synapsin I (Ratte)	Forward Primer: GCACGTCCTGGCTGGGTTTCTGGG Reverse Primer: AGGCTACCCGTCAGACATCCGTCTC	248nt
Synaptophysin (Mensch)	Forward Primer: TGC AGA ACA AGT ACC GAG AG Reverse Primer: CTG TCT CCT TAA ACA CGA ACC	297nt
Synaptophysin (Ratte)	Forward Primer: CAGTGGGTCTTTGCCATCTT Reverse Primer: TTCAGCCGACGAGGAGTAGT	222nt
Synaptoporin (Mensch)	Forward Primer: GG CCC ACT CAT TGA CTT CAT Reverse Primer: GAG TGC TTC TCC ATT GGA TCT G	321nt

3.8.2 Primer für die Chromatinimmunopräzipitation

Tabelle 2: Auflistung der Nukleotidsequenzen und der Produktgrößen der Primer, die für den ChIP verwendet wurden.

Gen	Primer	Produktgröße
GFAP (Mensch)	Forward Primer: GAG AGG GTC CTC TTG CTT CAG Reverse Primer: TGA AGG AGT GGG CTA GAC TGG	238nt
GluR2 (Mensch)	Forward Primer: CCA GGT TGG AGC ATC TCC GCA GC Reverse Primer: TAG CCG CTG TCC CTC CGC GAG A	150nt
Synapsin I (Mensch)	Forward Primer: GGG GAA ACA GGA TGC GGC GAG Reverse Primer: AAG GTG GCC GGG AAG GGG AGT	163nt
Synaptophysin (Mensch)	Forward Primer: ATG CTG CTG CTG GCG GAC ATG GG Reverse Primer: TGG CCA CCA CCT CCC AGA GTC	128nt
Synaptotagmin II (Mensch)	Forward Primer: ATC CTT CCG TAG CAC CCT TGA Reverse Primer: TCC ATC ACC CGA GCA CTC AGC	155nt
Synaptotagmin IV (Mensch)	Forward Primer: GAG ACG AGC TTC TCA GAA GC Reverse Primer: CAG TCC ACC CCA GAG TAT TCA	316nt
Synaptotagmin VII (Mensch)	Forward Primer: TGTTTCAGCACCAAGGACAA Reverse Primer: GCTGGAATGCAGGGTCTAGA	174nt
Synapsin I (Ratte)	Forward Primer: GAG CCT TAC TAC GGG TCC AG Reverse Primer: GGT GAG GTA GGG GAG TTT GG	246nt
Synaptophysin (Ratte)	Forward Primer: ACG TGG TGA ATC AGG TAC GC Reverse Primer: TTC TCC ACC TCC CTC CTT CC	193nt

3.9 Bestimmung der Proliferationsrate

Um die Proliferation von Zellen untersuchen zu können, wurde der Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Kit der Firma Roche verwendet. Die Durchführung dieses Assays erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Die Proliferation von Zellen kann gemessen werden, indem statt des Nukleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin das chemische Analogon 5-Bromo-2'-desoxyuridin während der S-Phase der Zelle in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird. Nach der dem jeweiligen Versuch entsprechenden Stimulation oder Behandlung der Zellen, wurden diese fixiert und die DNA denaturiert. Die Detektion des BrdU erfolgte mittels eines Peroxidase gekoppelten Antikörpers. Der erste polyklonale und auch der erste monoklonale Antikörper gegen BrdU wurde von Gratzner et al. (1982) entwickelt. Nach der Inkubation des Antikörpers wurde Wasserstoffperoxid zugegeben, dieses wurde durch die Peroxidase gespalten. Die Peroxidasereaktion hatte eine Gelbfärbung des Inkubationsmediums zur Folge. Hatte dieses sich kräftig gefärbt, wurde eine weitere Färbung durch Zugabe von 1M Schwefelsäure gestoppt und der Färbungsgrad bei 450nm gegen 650nm kolorimetrisch bestimmt.

In dieser Arbeit wurde das Wachstumsverhalten der neuralen Stammzellen HNSC.100 Δ Raf-1:ER in Gegenwart beziehungsweise Abwesenheit von Wachstumsfaktoren im Kultivierungsmedium untersucht. Es wurden 8.000 Zellen pro Well in eine 96-Lochplatte ausgesät. Am folgenden Tage wurde das Medium der Zellen gewechselt, wobei es 3 voneinander abweichende Kultivierungsbedingungen gab: Ein Teil der Zellen wurde in DMEM-F12 Kultivierungsmedium mit Wachstumsfaktoren, ein andere Teil wurde in DMEM-F12 Kultivierungsmedium ohne Wachstumsfaktoren kultiviert, und beim letzten Versuchsansatz wurden die Zellen in DMEM-F12 Kultivierungsmedium ohne Wachstumsfaktoren aber mit 1 μ M 4-OHT kultiviert. Es wurde von jeder Versuchsbedingung ein vierfacher Ansatz analysiert, um eine statistische Auswertung durchführen zu können. Nach 48 Stunden wurde den Zellen das BrdU-POD zugegeben und dieses 4 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 min lang fixiert. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern, wurden die fixierten Zellen 30 min lang unter Wippen mit 2%igem BSA in H₂O geblockt. Anschließend erfolgte die Antikörperinkubation. Hierfür wurde der Antikörperlösung BSA in einer Endkonzentration von 1% zugegeben, so dass erneut der unspezifische Hintergrund minimiert werden konnte. Nach einer Inkubation von 90 min wurden die Zellen dreimal gewaschen, das Substrat wurde zugegeben und dessen Umsatz wurde am Photometer (Microplate Reader Model 550, Biorad) gemessen.

3.10 Arbeiten mit RNA

3.10.1 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen

Das Grundprinzip der RNA-Isolation besteht aus folgenden Schritten: Die Zellen werden lysiert, schnellst möglich werden die schädlichen RNAsen inhibiert und die Gesamt-RNA wird isoliert. Diese besteht aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA), messenger RNA (mRNA) und anderen RNA-Arten. Die mRNA hat dabei nur einen Anteil von ca. 2 %, was für viele Anwendungen, wie zum Beispiel RT-PCR und Northern Blot Hybridisierung ausreicht.

In dieser Arbeit wurde die Gesamt-RNA der Zellen aus Abschnitt 4.1. und 4.2. mittels der sauren Guanidiniumisothiocyanat-Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt. Zur Isolation der RNA aus den Zellen, die bei den Untersuchungen in Abschnitt 4.3. verwendet wurden, wurde der Invitex RNA Isolationskit (Invisorb) verwendet.

Beim Aufschluss von RNA aus Zellen werden immer sehr viel RNAsen frei. Guanidiniumisothiocyanat ist ein potenter RNase Inhibitor. Bei der hier durchgeführten sauren Guanidiniumisothiocyanat-Methode wurde die RNA aus den Zellen mittels eines Puffers, der Guanidiniumisothiocyanat enthält, isoliert und anschließend mittels einer Phenol-Chloroform Extraktion von der DNA und den Proteinen getrennt. Eine Fällung der RNA mit Isopropanol diente der Konzentrierung der RNA.

Es wurden je nach Versuch 1×10^6 bis 2×10^6 Zellen auf 60mm Zellkulturschalen ausgesät. Nach Beendigung der Applikation wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen einmal vorsichtig mit 1xPBS. gewaschen. Dieses wurde sofort wieder abgenommen, pro Kulturschale wurden 500µl frisch hergestellte und Licht geschützte Guanidiniumisothiocyanatlösung (4M Guanidiniumisothiocyanat, 25mM Natriumcitrat pH 7,0, 0,5 % (w/v) N-Lauroylsarkosyl, 1 % β -Mercaptoethanol) zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von den Schalen abgelöst und in einem 1,5ml Reaktionsgefäß aufgenommen. Nachdem die Suspension 3 x in einer 22G 1 1/2 Kanüle auf- und abgezogen wurde, wurden pro 500µl-Ansatz 50µl 2M Na-Acetat pH 4,0 zugegeben und kurz gevortext. Dann erfolgte eine Extraktion mit 500µl einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohollösung (1:1:24). Die Proben wurden gevortext und 30 min lang auf Eis inkubiert. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation (4°C, 9500 x g) konnte die wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein frisches, RNase freies Reaktionsgefäß überführt werden. Es folgte eine Fällung mit 0,8Vol Isopropanol über Nacht bei -20°C. Am folgenden Tag wurde die Suspension erneut bei 16.000 x g zentrifugiert (20 min, 4°C), das Pellet wurde mit 500µl 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (20 min, 4°C, 16.000 x g). Nachdem das Pellet getrocknet war, wurde die RNA je nach Pelletgröße in 50-100µl DEPC-

H₂O gelöst und im Spektralphotometer quantifiziert. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Alle Lösungen, die für die Isolation oder die Weiterverarbeitung von RNA verwendet wurden, wurden in DEPC-H₂O angesetzt. DEPC inhibiert RNAsen durch kovalente Modifikationen der Histidinreste. DEPC-H₂O wurde hergestellt, indem Wasser mit 0,1% DEPC versetzt und bei RT unter Rühren inkubiert wurde. Nach mindestens 4 h wurde die Lösung für mindestens 15 min autoklaviert.

3.10.2 RNA-Messung

Um die Konzentration und die Reinheit der extrahierten RNA bestimmen zu können, wurde die optische Dichte (OD) der RNA gemessen. Es wurde eine 1:50 Verdünnung der RNA hergestellt und die Messung mit dem Photometer (Biophotometer, Eppendorf) bei Wellenlängen von 260nm und 280nm in 2ml Plastikkuvetten von Eppendorf durchgeführt. Als Gradmesser der Reinheit sollte der Quotient von 260/280nm über 1,6 liegen. Quotienten unter 1,6 lassen auf eine Kontamination der RNA mit Proteinen oder mit Phenol zurück schließen. Eine Extinktionseinheit bei 260nm (E_{260}) entspricht etwa 40µg RNA.

3.10.3 Synthese von cDNA aus RNA

Die cDNA Synthese erfolgte durch eine reverse Transkription und wurde nach dem Standardprotokoll zur M-MuLV-Transkriptase (Moloney-Maus-Leukämie-Virus) von Fermentas durchgeführt. Es wurden 2µg RNA als Template eingesetzt. Dieser wurden 1µl Random-Hexamer Primer zugesetzt und mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 10µl aufgefüllt. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 70°C wurde das Gemisch auf Eis kurz abkühlen gelassen. Anschließend wurde der RNA ein Mix aus 5 x M-MuLV Reaktionspuffer (250mM Tris-HCl pH 8,3, 250mM KCl, 20mM MgCl₂, 50mM DTT), 1mM dNTPs, 200U M-MuLV Reverse Transkriptase [200 U], 20U RNase Inhibitor und 1,5µl DEPC-H₂O zugegeben. Dieser Mix wurde zunächst bei 20°C für 10 min, danach bei 37°C für 59 min und abschließend 5 min lang bei 95°C inkubiert. Nach einem 10 minütigen Abkühlen bei 4°C wurde die cDNA bis zur weiteren Verarbeitung in der PCR (3.12.2) bei -20°C gelagert.

3.11 Manipulation eukaryotischer Zellen

3.11.1 Gentransfer mittels Lentiviren

Lentiviren gehören zur Gruppe der Retroviren. Unter diesen haben die Lentiviren die Fähigkeit, gleichermaßen teilungsfähige sowie auch postmitotische Zellen infizieren können. Aus diesem Grund dienen Lentiviren als optimale Vehikel für den Transfer von Genen in verschiedene Zelllinien. Das Genom der Retroviren ist nur etwa 10.000 Basenpaare groß und weist folgende drei Genbereiche auf: *gag* (*group-specific antigen*; kodiert für den Proteinmantel des Virus), *pol* (*polymerase*; kodiert für die virale Polymerase) und *env* (*envelope*; kodiert für das Hüllprotein). Zusätzlich haben Lentiviren noch akzessorische Gene, die für die Replikation nicht essentiell sind. Die LTRs (*long terminal repeats*) sind repetitive DNA-Sequenzen, die sich am 5'- und am 3'-Ende der Nukleinsäure von Viren befinden. Sie schützen die revers transkribierte DNA vor hydrolytischem Abbau bevor es zum Einbau in das Wirtsgenom kommt und fördern die Integration. Das am 5'-Ende der Nukleinsäure befindliche Repeat agiert als starker Promotor, der bevorzugt die Transkription viraler Gene unterstützt. Das Verpackungssignal ψ sorgt dafür, dass das retrovirale Genom in einen Proteinmantel gehüllt wird. Damit das Virus die Zellen verschiedener Spezies infizieren kann, wurden die lentiviralen Vektoren mit dem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) pseudotypisiert (Burns et al., 1993, Naldini et al., 1996). Das Glykoprotein des VSV benutzt einen Phosphattransporter als Rezeptor, damit das Virus in der Lage ist, Zellen von verschiedenen Spezies zu infizieren. Um das zum Gentransfer notwendige lentivirale Grundgerüst herstellen zu können, ist eine Kotransfektion mit den folgenden drei Konstrukten nötig: Das Verpackungsplasmid enthält die Gene *gag* und *pol*, das VSV-G Expressionsplasmid enthält Gene für die *env*-Proteine. Um die Wahrscheinlichkeit zufälliger homologer Rekombinationen zu minimieren, werden die *gag*-, *pol*- und *env*-Expressionskonstrukte auf zwei Plasmide aufgeteilt. Das dritte Plasmid wird als selbst inaktivierender Transfektor bezeichnet und enthält die cDNA des gewünschten Gens. Dieses wird von LTRs und vom Verpackungssignal ψ flankiert. Der verwendete lentivirale Transfektor steht unter der Kontrolle des humanen Ubiquitinpromotors (Lois et al., 2002). Er enthält außerdem verschiedene regulatorische Elemente, die die Expression und die Stabilität des lentiviralen Transgens erhöhen. Hierzu gehört das PRE (posttranscriptional regulatory element) des Woodchuck Hepatitis B-Virus (Zufferey et al., 1998). WPRE ist ein posttranskriptionelles, regulatorisches Element, das den Transport von Provirus-RNA ins Zytosol fördert. Ein weiteres unterstützendes Element ist das HIV-flap, das den Kerntransport der Viren-DNA katalysiert (Sirven et al., 2000) und damit den Virentiter erhöht.

Um infektiöse Partikel herstellen zu können, werden die Verpackungszellen 293T mit den genannten drei Plasmiden mittels einer Kalziumphosphat-Transfektion (3.11.2) kotransfiziert. Nach 72 Stunden werden die sich im Überstand befindlichen Virenpartikel auf die zu infizierenden Zellen gegeben, so dass der eigentliche Gentransfer vollzogen werden kann.

3.11.2 Die Kalziumphosphat Transfektion

Die Virenpartikel werden mittels der Methode der Kalziumphosphat-Transfektion hergestellt. Hierzu werden 24 h vor der Transfektion $2,1 \times 10^6$ 293T Zellen auf 60mm Zellkulturschalen ausgesät und 24 h lang in DMEM mit 10% FCS kultiviert. Für jeden Transfervektor wurde eine Kalziumphosphat-Transfektion angesetzt. Hierzu wurde pro Transfervektor ein Ansatz aus zwei Lösungen verwendet. Lösung 1 besteht aus der benötigten Menge an DANN in Form der verschiedenen Plasmide, die mit der entsprechenden Menge Wasser auf 250µl aufgefüllt wurden. Zusätzlich wurde zur Lösung 1 27,5µl CaCl_2 (2,5mM) zugegeben. Es wurden 5µg des Packungsplasmids, 2,3µg des VSV-G Expressionsplasmids und 6,6µg des Transfervektors zur Transfektion verwendet. Lösung 2 bestand aus 2xHBSS (274mM NaCl, 25mM KCl, 3,75mM Na_2HPO_4 , 27,75mM Glukose und 105mM HEPES pH 7,05-7,12). Lösung 2 wurde Lösung 1 zugegeben, wobei Lösung 1 vorsichtig besprudelt wurde.

Das Medium der 293T Zellen wurde abgenommen und durch Medium, das 25µM Chloroquin enthielt, ersetzt. Dann wurden den Zellen 500µl des Gemisches aus Lösung 1 und Lösung 2 zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 für acht Stunden. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Nach zwei bis drei Tagen konnten die Virenpartikel aus Mediumüberstand, geerntet und weiter verwendet werden.

3.11.3 Lentivirale Infektion

Die zu infizierenden Zellen wurden 24 Stunden vor der Infektion in 60mm Zellkulturschalen ausgesät. Am Tag der Infektion wurden die virenhaltigen Überstände der Verpackungszelllinie 293T bei 1000rpm und 4°C 10min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend durch Zellulosefilter mit einer Porengröße von 45µm (Sarstedt) filtriert, um eine Kontamination der

Zielzellen mit den Verpackungszellen zu vermeiden. Nach Zugabe von 8µg/ml Polybrene zum virenhaltigen Überstand wurde dieser auf die am Tag zuvor ausgesäten Zielzellen gegeben. Polybrene sollte die Adsorption der Virenpartikel an die Oberfläche der Zielzellen erleichtern. Nach 8-24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Virenüberstände abgenommen und durch frisches Kultivierungsmedium ersetzt. Nach 24 Stunden waren die Zellen nicht mehr infektiös, die weiteren Versuche wurden 48 h nach der Infektion durchgeführt.

3.11.4 Reporteranalysen

Mit Hilfe von Reporteranalysen können genregulatorische DNA-Sequenzabschnitte in Säugerzellen untersucht werden (Alam und Cook, 1990). Hierzu werden bestimmte Enhancer- und Promotorelemente vor sogenannte Reportergene kloniert, so dass bei Aktivität des Promotors das Enzym Luziferase gebildet wurde. Gibt man nun das Substrat D-Luziferin hinzu, wurde die Oxidation des Oxyluciferin durch die Luziferase katalysiert. Diese resultierte in der Emission von Licht ($\lambda = 562 \text{ nm}$) dessen Intensität bei Substratüberschuss proportional zur Luziferasekonzentration im Ansatz war (de Wet et al., 1987). Die bei der Reaktion frei werdenden Photonen wurden in einem Luminometer (Berthold Detection Systems) gemessen. Anhand der gemessenen Luziferaseaktivität konnte ein Rückschluss auf die Promotoraktivität gezogen werden. Die zu untersuchenden Reportergene wurden in dieser Arbeit mittels lentiviralem Gentransfers in das Genom der Wirtszelle integriert. So konnte die Transkription der eingebrachten Gene im natürlichen chromosomalen Umfeld untersucht werden. Die Infektionen wurden in einem vierfachen Ansatz durchgeführt, und für jede Einzelprobe wurde die Luziferaseaktivität bestimmt. Die lentiviral infizierten Zellen wurden zweimal mit 1xPBS gewaschen und anschließend in 50-100µl Reporterlysepuffer aufgeschlossen. Je 10µl des erhaltenen Gesamtzellextrakts wurden in eine Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert mit 100µl Working Luciferase Assay Reagent (9Vol. Luciferase Assay Reagent Stock (22mM Tricine pH 7,8, 1,177mM (MgCO₃)4Mg(OH) 2x 5 H₂O, 2,94mM MgSO₄ x 7 H₂O, 0,11mM EDTA (Natriumsalz), 36,3mM DTT, 297µM Coenzym A, 583µM ATP) +1Vol. 4,7mM Luziferin) versetzt. Sofort wurde die Luziferaseaktivität im Luminometer der Firma Berthold Detection Systems gemessen. Die gemessenen Lichteinheiten wurden mittels des Programms Simplicity-Fotocounter erfasst. Die relative Luziferaseaktivität wurde bestimmt, indem die gemessenen Luziferaseaktivitäten in Beziehung zur jeweiligen Proteinkonzentration der Probe gesetzt wurden. Aus den vier gemessenen Werten pro Ansatz wurde ein Mittelwert gebildet und eine

Standardabweichung errechnet. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Balkendiagrammen.

3.12 Arbeiten mit DNA

3.12.1 CHIP (Chromatinimmunpräzipitation)

Die Chromatinimmunopräzipitation ermöglicht es, die Bindung bestimmter Proteine an die DNA *in vivo* nachweisen zu können. Zunächst wurden die Proteine mittels einer Fixierung durch Formaldehyd an die DNA gebunden. Anschließend wurde das Chromatin samt der gebundenen Proteine mittels Ultraschall in Fragmente einer Größe von 400-600bp zerkleinert. Eine Inkubation mit spezifischen Antikörpern erlaubte nun eine Präzipitierung der DNA, an die das gewünschte Protein gebunden war. Durch einen Verdau mit Proteinase K konnte die präzipitierte DNA von Proteinen befreit und in der PCR Reaktion amplifiziert werden.

Die Zellen wurden in 100mm Zellkulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 80-90% wachsen gelassen. Hierbei wurden abhängig von der jeweiligen Zelllinie unterschiedlich viele Schalen verwendet: Von den HNSC.100 Zellen wurden 4 Schalen pro Ansatz verwendet. Für die ChIPs, die an U87MG Zellen durchgeführt wurden, wurden zwei zu 80% konfluente Schalen mit Zellen benötigt. Dies galt ebenso für SH-SY5Y, HepG2, R28 und Rat-1 Zellen. Für ChIP-Assays, die mit HaCaT Zellen durchgeführt wurden, wurde nur eine Schale mit Zellen verwendet, da bei diesen Zellen ansonsten der unspezifische Hintergrund zu groß war. Nachdem die Zellen ausgesät und gemäß der durchzuführenden Untersuchungen behandelt worden waren, wurde Formaldehyd (37%) in einer Endkonzentration von 1% direkt in das Medium gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Um das „cross-linking“ zu stoppen, wurde Glycin in einer Endkonzentration von 125mM hinzu pipettiert und weitere 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen 3 x mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1ml 1xPBS mit Protease Inhibitoren mittels eines Zellschabers von der Zellkulturschale gelöst und in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 700 x g und 4°C wurde das Zellpellet in 1ml Zellysepuffer (5mM Pipes (KOH) pH 8.0, 85mM KCl, 0,5% NP-40) mit 1xProtease Inhibitoren resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei 8000 x g für 5 min bei 4°C sedimentiert, in Kernlysepuffer (50 mM Tris pH 8.1, 10 mM EDTA, 1% SDS) mit 1x Protease Inhibitoren resuspendiert und 10 min lang auf Eis inkubiert. Das Chromatin der Zellen

wurde anschließend mittels Ultraschall auf eine Größe von etwa 400 bis 600 Basenpaaren zerkleinert, indem die Zellen 3-4 mal pro Probe, je 30 Sekunden lang sonifiziert und dann eine Minute lang auf Eis gekühlt wurden. Das Chromatin wurde durch Zentrifugation bei 16.000 x g für 10 min und bei 4°C von den Zelltrümmern und den größeren Fragmenten getrennt und in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80°C aufbewahrt oder sofort weiter verarbeitet. Hierzu wurde der Überstand 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. Um den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren, wurde den Proben 80µl Protein A Sepharose zugegeben und für mindestens 2-3 Stunden bei 4°C auf dem Rotator gedreht. Anschließend wurde die Protein A Sepharose sedimentiert (16.000 x g, 1 min, 4°C) und der Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. 20% des Überstandes wurden abgenommen und für die spätere „Input Kontrolle“ bei -20°C gelagert. Der restliche Überstand wurde in zwei oder drei Fraktionen geteilt, wobei nicht mehr als zwei Antikörper gleichzeitig untersucht wurden. War dies doch der Fall, wurde im Verhältnis mehr Chromatin als Ausgangsmaterial eingesetzt. Es wurden eine bzw. zwei Fraktionen gebildet, denen Antikörper zugegeben wurde. Als Negativkontrolle diente eine Fraktion des Chromatins, der kein Antikörper zugegeben wurde. Sie wurde im Weiteren als no Ab (no Antibody) Probe bezeichnet. Die Antikörperinkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Rotator. Für die Präzipitation wurde Protein A Sepharose verwendet. Protein A Sepharose sind quervernetzte Agarosekügelchen, die mit Protein A, einem 40-60 kDa großen Protein aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, beschichtet sind. Protein A bindet an die F_c-Region der Immunglobuline durch Interaktion mit der schweren Kette. Um die Immunkomplexe zu sammeln, wurden die Proben mit 80µl Protein A Sepharose versetzt und bei 4°C 1-2 Stunden auf dem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die Proben nacheinander je dreimal je 5 min lang mit je 1ml des Low salt Waschpuffers (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris pH 8.1, 150mM NaCl), des High salt Waschpuffers (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris pH 8.1, 500mM NaCl), des LiCl Waschpuffers (0,25M LiCl, 1% NP40, 1% Deoxycholat, 1mM EDTA, 10mM Tris pH 8.0) und dann mit 1ml TE 2mal gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Proben bei 4000 x g 1 min lang zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das Protein A Sepharose Pellet erneut gewaschen. Anschließend wurden die sedimentierten Immunkomplexe von der Protein A Sepharose gelöst, indem sie mit 250µl Elutionspuffer (1% SDS, 0,1M NaHCO₃) 30 min lang unter schütteln inkubiert wurden. Die Proben wurden bei 16.000g und bei RT 3 min lang zentrifugiert, die Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet erneut mit Elutionspuffer versetzt. Die beiden Fraktionen wurden vereint, und um das Cross-linking der

Proteine an die DNA aufzulösen, wurden die Proben mit 1µl RNase A (10mg/ml) und 20µl 5M NaCl in einer Endkonzentration von 0,3M versetzt und für 5-6 Stunden bei 65°C unter Schütteln inkubiert. Auch die "Input Kontrolle" wurde diesem Schritt unterzogen. Es folgte die Präzipitation über Nacht bei -20°C durch Zugabe von 2,5Vol. 100%igem Ethanol. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 16.000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert und in 100µl A.dest resuspendiert, das 10mM EDTA, 40mM Tris pH 6,5 und 20µg Proteinase K enthielt. Die Proben wurden für 2 Stunde bei 45 °C unter Schütteln inkubiert, um die Proteine von der DNA zu lösen. Die DNA wurde mit Hilfe des QiaQuick Spin PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Amplifikation der DNA erfolgte mittels PCR mit spezifischen Primer für das jeweilige zu untersuchende Gen. Es wurde das in 3.12.2. beschriebene PCR-Programm verwendet. Die Annealingtemperatur, die Zyklenzahl und die Elongationszeit wurden an die Produktgröße, an die Primer und an die Qualität der Proben der jeweiligen Untersuchung angepasst. Konnten aufgrund ungünstiger Bindungsbedingungen für Primer, geringer Mengen an präzipitierter DNA und unspezifischer Banden keine eindeutigen Ergebnisse durch die PCR ermittelt werden, wurde statt der Taq Polymerase von Fermentas eine Hotstart Taq Polymerase (Qiagen, Bionline) eingesetzt, welche aufgrund verschiedener chemischer Modifikationen der Polymerase eine höhere Effizienz und Spezifität der PCR erlaubte.

3.12.2 Die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation beliebiger Nukleinsäure-Abschnitte *in vitro* (Saiki et al., 1988). Sie ermöglicht, durch Amplifizierung geringster Mengen an cDNA das Expressionsprofil von Genen genau zu analysieren. In dieser Arbeit diente die in der reversen Transkriptionsreaktion (RT) in cDNA umgeschriebene RNA als Template (3.10.3) in der PCR. Es wurde die Methode der semiquantitativen RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden 2µl cDNA mit 2,5mM MgCl₂, 1xTaq Puffer (100mM Tris-HCl pH 8,8, 500mM KCl, 0,8% Nonidet P40), 500nM forward Primer, 500nM reverse Primer, 0,25mM dNTPs und 0,5U Taq Polymerase in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Die PCR-Reaktionen wurden im „Eppendorf Mastercycler Gradient“ und im „Labcycler“ (Sensoquest) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	45 sec] x n Zyklen
Annealing	x°C	45 sec	
Elongation	72°C	60 sec	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Programms „Primer3 Input“ des Whitehead Institute Center for Genome Research (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) hergestellt. Die Anzahl der Zyklen wurde bei den verschiedenen Genen durch mehrere Test PCR-Läufe dahingehend optimiert, dass die Plateauphase der Amplifikation nicht erreicht wurde. Jedoch musste die Zyklenzahl auch an das Expressionsprofil der verschiedenen Gene angepasst werden. Außerdem wurden die Zeiten für die Denaturierung, das Annealing und die Elongation an die Produktgröße angepasst. Die amplifizierte DNA wurde wie in 3.12.3. beschrieben elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt.

3.12.3 Horizontale Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese. Agarosegele wurden durch Einwiegen einer entsprechenden Menge Agarose in 1xTAE-Puffer (40mM Tris, 20mM Essigsäure, 2mM EDTA pH 8.0) und Aufkochen hergestellt. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 1,5%ige bis 2,0%ige Agarosegele (w/v) hergestellt. Nach Abkühlen der 50ml Agaroselösung auf „handwarm“ wurden 3µl Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml) zugegeben, das Gemisch wurde danach in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegossen. Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA, was zur Folge hat, dass die DNA-Fragmente im Gel bei Anregung mit UV-Strahlung (254nm) sichtbar gemacht werden können. Nach der Auspolymerisation wurde das Agarosegel mit 1xTAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit einer entsprechenden Menge 6-fach konzentriertem DNA-Probenpuffer versetzt (0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol FF, 40% (w/v) Saccharose) und auf der Kathodenseite in die Geltaschen geladen. Danach wurde eine Spannung von 70V angelegt, was zur Auftrennung der DNA-Fragmente führte. Als Größenmarker diente der 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas).

3.12.4 Dokumentation, Quantifizierung und Analyse der DNA

Die Agarosegele, welche die in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente zeigten, wurden mittels einer Polaroidkamera oder mittels eines Geldokumentationssystems (Biorad) fotografiert. Eine Bearbeitung der Bilder erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop 7.0. Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Im Fall der RT-PCR Untersuchungen wurden Polaroids, die die Agarosegele mit der amplifizierten DNA zeigten, mittels des Programms XnView von Pierre e.Gougelet eingescannt. Die Intensität der DNA-Banden in den Agarosegelen wurde mittels LabWorks 4.6 von UVP Bioluminescence Systems oder mittels des Programms QuantityOne von BioRad gemessen. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism 3.02 (Prism) ausgewertet, wobei der Standardfehler in Form des SEM (Standard Error of the Means) gezeigt wurde.

Des Weiteren wurden Plasmidpräparationen, enzymatische Reaktionen zur Überprüfung der Plasmide, Transformationen, Bestimmung der DNA-Konzentration, und andere Analysen nach den allgemeinen Standardmethoden der Molekularbiologie durchgeführt.

3.13 Proteinbiochemische Methoden

3.13.1 Kernextraktion

Um die Präsenz verschiedener Kernproteine zu analysieren, wurden zunächst die Kerne der Zellen extrahiert. Hierzu wurden die Zellen am Ende des dem jeweiligen Versuchs entsprechenden Behandlungszeitraums zweimal mit kaltem 1xPBS gewaschen, in 1ml 1xPBS mit Protease Inhibitoren (Roche) mittels eines Zellschabers geerntet und resuspendiert. Die Zellen wurden sedimentiert (Zentrifugation bei 4°C, 16.000 x g, 5 min) und das Pellet wurde in 100µl kaltem Puffer A (10mM HEPES/KOH pH 7,9, 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl) resuspendiert und insgesamt 20 min lang auf Eis inkubiert. Zu dem Puffer A wurden vor Gebrauch 0,5mM DTT, 0,2mM PMSF, 2% Nonidet P40 und 1xProtease Inhibitoren frisch dazugegeben. Hierbei erfolgte alle 5 min ein mechanischer Aufschluss der Zellen, indem diese mehrmals über ein Drahtgestell gezogen wurden. Um die Zellhülle, das Zytoplasma und weitere Organellen von den Kernen zu trennen, folgte eine Zentrifugation bei 16.000 x g, 4°C und 5 min. Das Kernpellet wurde in 30µl

kalttem Puffer C (10mM HEPES/KOH pH 7,9, 25% Glycerol, 20mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM EDTA und immer frisch dazu gegeben 0,5mM DTT und 0,2mM PMSF) resuspendiert und 20 min lang auf Eis inkubiert. Auch hier erfolgte alle 5 min ein Aufschluss der Kerne durch mechanische Scherkräfte. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 16.000 x g und 4°C wurde der Überstand mit den Kernproteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nachdem eine Proteinbestimmung durchgeführt worden war, wurden die Proben mit 2xSDS-Stoppuffer (Stock: 125mM Tris/HCl pH 6,8; 3mM EDTA; 20% (v/v) Glycerol; 9% SDS; 0,05% Bromphenolblau. (Gebrauchslösung: 9Vol. 2xSDS-Stoppuffer +1Vol. β-Mercaptoethanol)) versetzt.

3.13.2 Proteinbestimmung

Um die Menge an präparierten Proteinen quantifizieren zu können, wurde ein BCA-Assay durchgeführt. Dieser Assay besteht aus einer Kombination aus Biuret-Assay und Bicinchonisäure (BCA). Hierbei reagieren zweiwertige Kupferionen mit Protein zu einwertigen Kupferionen. Einwertige Kupferionen bilden mit zweiwertigen Kupferionen einen Farbkomplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562nm kalorimetrisch detektiert werden kann. Die Absorption ist direkt proportional zur Proteinkonzentration. Zur Proteinbestimmung wurden 2,5µl des Proteinextrakts mit 200µl BCA-Lösung versetzt und in eine 96-well Platte pipettiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C sollten sich die Proben violett angefärbt haben. Diese werden bei 562nm gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Interpolation der Standardkurve. Hierbei wurden BSA Lösungen in einer Konzentration von 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1200 und 2000µg/ml verwendet.

3.13.3 Denaturierende diskontinuierlich Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt, um die Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennen zu können. Als ein Vorteil der diskontinuierlichen Gelelektrophorese gilt eine hohe Bandenschärfe. Die Bezeichnung „Diskontinuierliche Gelelektrophorese“ bezieht sich auf die unterschiedlichen pH-Werte, die unterschiedlichen Porengrößen des Trenngels und des Sammelgels und die Art und Konzentration der Ionen in den verschiedenen Puffern.

Dazu wurden ein engporiges Trenngel und darüber ein weitporiges Sammelgel in eine Minigelkammer gegossen. Aufgrund des entsprechenden Molekulargewichts der in dieser Arbeit detektierten Proteine, wurden nur 10%ige Trenngele verwendet. Die mit 2xSDS-Stoppuffer versetzten Proben wurden 5 min lang bei 95°C gekocht. Anschließend wurden 10 -20µg Protein auf die Gele geladen. Solange die Proteine sich noch im Sammelgel befanden, wurde eine Spannung von 60V angelegt. Bei Erreichen des Trenngels wurde die Spannung erhöht auf 90V. Für den Gellauf wurde SDS-Laufpuffer verwendet (250mM Tris pH 8,3, 2,5M Glyzin, 1% SDS). Als Marker wurden gefärbte Proteine bekannten Molekulargewichts verwendet.

Zusammensetzung des 10%igen Trenngel

4ml H₂O

3,3ml 30% Acryl/Bisacrylamid Mix (Rotiphoresegel 30, Roth)

2,5ml 1,5M Tris pH 8,8

100µl 10% SDS

200µl APS

20µl TEMED

Zusammensetzung des Sammelgels

1,8ml H₂O

750µl 30% Acryl/Bisacrylamid Mix (Rotiphoresegel 30, Roth)

350µl 0,5M Tris pH 6,8

30µl 10% SDS

30µl Ammonium Persulfat

3µl TEMED

3.13.4 Western Blot von SDS-Gelen

Nach der Auftrennung der denaturierten Proteine im SDS-Gel wurden die Proteine im Western Blot Verfahren auf eine synthetische Membran übertragen. Ziel dieser Methodik war, von den aufgetrennten Proteinen ein genaues Abbild des Elektrophoresemusters zu erhalten. So konnte im weiteren Versuchsablauf ein immunologischer Nachweis der Proteine durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde das Flüssigtransfer-Verfahren in einer Blottingapparatur (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) durchgeführt. Bei einer Stromstärke von etwa 200mA und einer Laufzeit von etwa 120 min wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,2 μm übertragen. Für den Transfer wurde luftblasenfrei ein „Sandwich“ aus einem Schwamm, 3 Lagen 2 mm Wattman-Papier, der Nitrocellulose-Membran, dem SDS-Gel, erneut 3 Lagen Wattman-Papier und einem Schwamm in die mit Transferpuffer (25mM Tris, 192mM Glyzin, 20% Methanol) befüllte Blottingapparatur gespannt. Die Membran war zu der Anoden- und das SDS-Gel zu der Kathodenseite orientiert. Die Schwämme, Wattman-Papiere und die Nitrocellulose-Membran wurden vor dem Zusammenbau mit Transferpuffer befeuchtet.

3.13.5 Immunzytochemischer Nachweis der Proteine

Nachdem der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran erfolgt war, wurde diese mittels einer Ponceau-S-Färbelösung (Ponceau-S-Konzentrat, die Herstellung erfolgte gemäß den Herstellerangaben von Sigma-Aldrich) angefärbt. Durch mehrmaliges Waschen der Membran mit 1xTBS (10mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl) wurde diese wieder entfärbt. Um den unspezifischen Hintergrund möglichst zu minimieren, wurde die Membran über Nacht bei 4°C in 5% Magermilchpulver in TBS inkubiert. Diesem Schritt folgte die Inkubation der Membran mit dem in TBS verdünnten Primärantikörper für 2h bei RT oder über Nacht bei 4°C unter Schwenken. Danach wurde die Membran 3 x 5 min lang unter Schwenken mit TBS-Puffer gewaschen, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen. Anschließend folgte die Inkubation der Membran mit dem ebenfalls in TBS verdünnten Sekundärantikörper für 2h bei RT. Dieser Antikörper war gegen den F_C-Teil des Primärantikörpers gerichtet und mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt. Nach diesem Inkubationsschritt wurde die Membran erneut 2 x 5 min lang unter Schwenken mit TBS-Puffer und einmal 5 min lang unter Schwenken mit TBST-Puffer (TBS mit 0,1% Tween 20) gewaschen. Zum Nachweis des entstandenen Komplexes aus dem zu detektierenden Protein, Primär- und Sekundärantikörper wurde entweder das ECL-System (Firma Amersham Biosciences, Buckinghamshire) oder selbst

hergestelltes ECL verwendet. Bei Verwendung des ECL Systems von Amersham Biosciences wurde 1 ml der ECLplus-Gebrauchslösung (40 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B ,ECLplus-Kit) gleichmäßig auf der Nitrocellulose-Membran verteilt und 5 min inkubiert. Wurde das ECL selbst hergestellt wurden die beiden Lösungen ECL1 (100mM Tris pH 8,5) und ECL2 (5,4mM H₂O₂, 2,5mM Luminol, 100mM Tris pH 8,5, 400µM para-Coumarsäure (Roth)) im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt und ebenfalls gleichmäßig auf der Membran verteilt und für 5 min inkubiert. Das Prinzip der „Enhanced Chemoluminescence Reaction“ (ECL) besteht darin, dass durch eine Peroxidase katalysierte Oxidation von Luminol Licht emittiert wird. Diese Chemilumineszenz kann durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert werden. Die Membran wurde mit Wattman-Papier trocken getupft, und unmittelbar danach wurde die durch die Peroxidase katalysierte Chemilumineszenz durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert. Die Expositionszeit wurde an die jeweilige Signalstärke angepasst.

3.13.6 “Strippen” der Nitrozellulosemembran

Das Strippen von Membranen erlaubt es, einen Immunoblot entweder mit verschiedenen Antikörpern zu untersuchen oder auch den Nachweis desselben Antikörpers erneut durchzuführen. Zunächst muss der gebundene Antikörper des vorherigen Detektionsversuchs von der Membran entfernt werden. Hierzu wird diese 30 min lang bei 50°C mit Stripping-Puffer (62,5mM Tris pH 6,7; 2 % SDS; 100µl β-Mercaptoethanol) inkubiert und anschließend 3 mal 10 min lang mit TBST gewaschen. Um die unspezifische Bindung des Antikörpers zu minimieren, wurde die Membran mit 5 % Magermilchpulver über Nacht geblockt. Im Folgenden konnte eine erneute Inkubation der Membran mit einem Antikörper der Wahl durchgeführt werden.

4 Ergebnisse

4.1 REST reguliert die Expression neuronaler Gene in humanen neuralen Stammzellen

4.1.1 Expression von spezifischen Genen in der humanen neuralen Stammzelllinie HNSC.100

Neurale Stammzellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Möglichkeit zur ständigen Selbsterneuerung haben, sich dauerhaft teilen und zu Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen differenzieren können (Cattaneo und McKay, 1991; Reynolds und Weiss, 1992; Temple and Davis, 1994; Gage und Fisher, 1995; McKay, 1997; Gage et al., 2000). In dieser Arbeit wurde die Expression verschiedener Gene in den humanen neuralen Stammzellen HNSC.100 untersucht. Als Kontrollen dienten einerseits die embryonale Nierenzelllinie 293T, die keine neuronalen Gene exprimieren sollte, und andererseits die Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y, die neuronale Gene exprimieren (Abbildung 6). HNSC.100 Zellen exprimieren den Stammzellmarker Nestin (Abbildung 6), wobei eine schwache Expression von Nestin sowohl in den 293T- als auch in den SH-SY5Y-Zellen beobachtet werden konnte. Nestin ist ein Intermediärfilament-Protein, dessen Expression charakteristisch für Vorläuferzellen ist (Messam et al., 2000; 2002; Dahlstrand et al., 1995). Des Weiteren zeigten die Untersuchungen, dass die neuralen Stammzellen HNSC.100 das für das „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) kodierende Gen exprimieren. Um den Einfluss des Transkriptionsrepressors REST auf die Differenzierung neuraler Stammzellen analysieren zu können, wurde zunächst der mRNA Level von REST in den verschiedenen Zellen verglichen. Den höchsten Level an REST mRNA zeigten die embryonalen Nierenzellen 293T. Auch die neuralen Stammzellen HNSC.100 exprimierten REST, wohingegen in den Neuroblastomazellen SH-SY5Y nur sehr geringe Mengen an REST mRNA detektiert wurden (Abbildung 6).

HNSC.100 Zellen wurden in früheren Untersuchungen als Modellsystem für neurale Stammzellen verwendet (Villa et al., 2000). Um den Einfluss des Transkriptionsfaktors REST auf die Differenzierung neuraler Stammzellen analysieren zu können, wurden die Zellen zunächst auf die Expression verschiedener REST-regulierter Gene untersucht. Hierzu gehörten die Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin*. RT-PCR Analysen zeigten, dass diese Gene nur in den

Neuroblastomazellen SH-SY5Y und nicht in den neuralen Stammzellen oder in den embryonalen Nierenzellen exprimiert wurden.

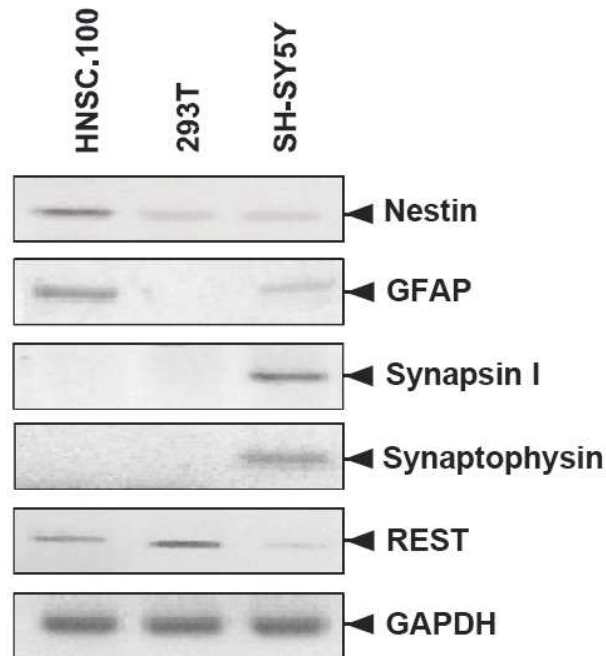


Abbildung 6: Expression von spezifischen Genen in verschiedenen Zellen

Die Gesamt-RNA der Zellen wurde isoliert, 2µg RNA wurden revers transkribiert und die cDNA mittels spezifischer Primer amplifiziert. *GAPDH* diente als interne Kontrolle. Die Expression von *Nestin* und *REST* konnte in allen untersuchten Zellen detektiert werden, wohingegen *GFAP* nur in HNSC.100 und sehr schwach in SH-SY5Y Zellen zu finden war. Die beiden neuronalen Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* wurden nur in der Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y exprimiert.

4.1.2 Differenzierung der neuralen Stammzellen HNSC.100

In neuralen Stammzellen kann die Differenzierung der Zellen durch den Entzug der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF initiiert werden (Reynolds et al., 1992, Gage et al., 2000). Dies haben Villa et al. (2000) in der neuralen Stammzelllinie HNSC.100. in Form einer starken Morphologieveränderung und an einer verstärkte Expression der neuronalen Markergene *β-Tubulin*, *MAP2* und dem Astrozytenmarker *GFAP* beobachtet.

In dieser Arbeit wurden die neuralen Stammzellen 12 Tage lang in Medium ohne die Wachstumsfaktoren EGF und bFGF kultiviert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert, revers transkribiert und PCR-Analysen mit spezifischen Primern durchgeführt. Die

Abbildung 7 A zeigt, dass ein Entzug der Mitogene in einer verstärkten Expression des Astrozytenmarkers GFAP und in einer verminderten Expression des Stammzellmarkers Nestin resultierte. Gleichzeitig sank die Konzentration an REST mRNA in den ohne Mitogene kultivierten Zellen, neuronale Markergene wurden aber nicht exprimiert (Abbildung 7 D). Nach Behandlung der Zellen mit Retinsäure konnte keine mRNA der Gene Nestin und GFAP mehr detektiert werden.

A

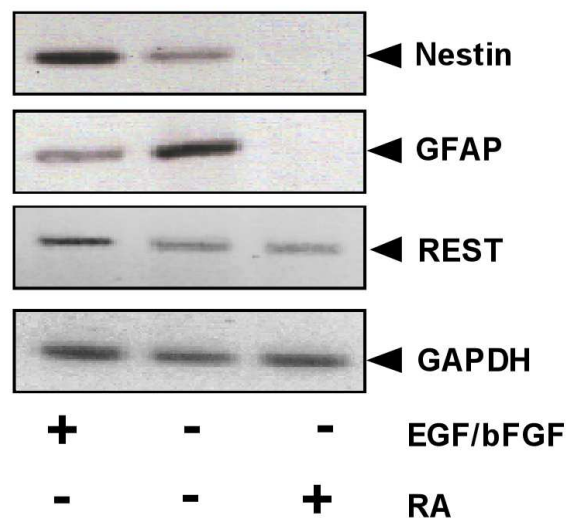


Abbildung 7 A: Differenzierung neuraler Stammzellen

Die neuralen Stammzellen wurden 12 Tage lang ohne die Wachstumsfaktoren EGF/bFGF kultiviert. In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Wachstumsfaktoren dem Kultivierungsmedium entzogen, und die Zellen mit Retinsäure (RA, 1 μ M) stimuliert. RT-PCR Analysen zeigen, dass der Entzug der Wachstumsfaktoren eine verminderte Expression des *Nestin*-Gens und eine verstärkte Expression von *GFAP* zur Folge hatte. Die Behandlung der HNSC.100 Zellen mit Retinsäure verhinderte die Expression dieser beiden Gene vollständig. Ebenso wurde die Expression von *REST* durch die initiierte Differenzierung vermindert. Eine Analyse der GAPDH Expression diente als interne Kontrolle.

Eine Stimulation von Stammzellen mit Retinsäure konnte die Differenzierung in eine neuronale Richtung induzieren (McBurney, 1988; Takahashi et al., 1998). So konnte in adulten neuralen Stammzellen die Expression der neuronalen Markergene *TuJ1* und *Map2ab* durch eine Behandlung der Zellen mit Retinsäure induziert werden (Takahashi et al., 1997). Abbildung 7 B zeigt, dass in den neuralen Stammzellen HNSC.100 ein Entzug der Wachstumsfaktoren aus dem Kultivierungsmedium und eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Retinsäure die

Morphologie der Zellen stark veränderte. Im Gegensatz zu den undifferenzierten Stammzellen, die vor allem als Neurosphären wachsen, setzten sich die Zellen vorwiegend ab und nahmen die Morphologie neuronaler Zellen an.

B

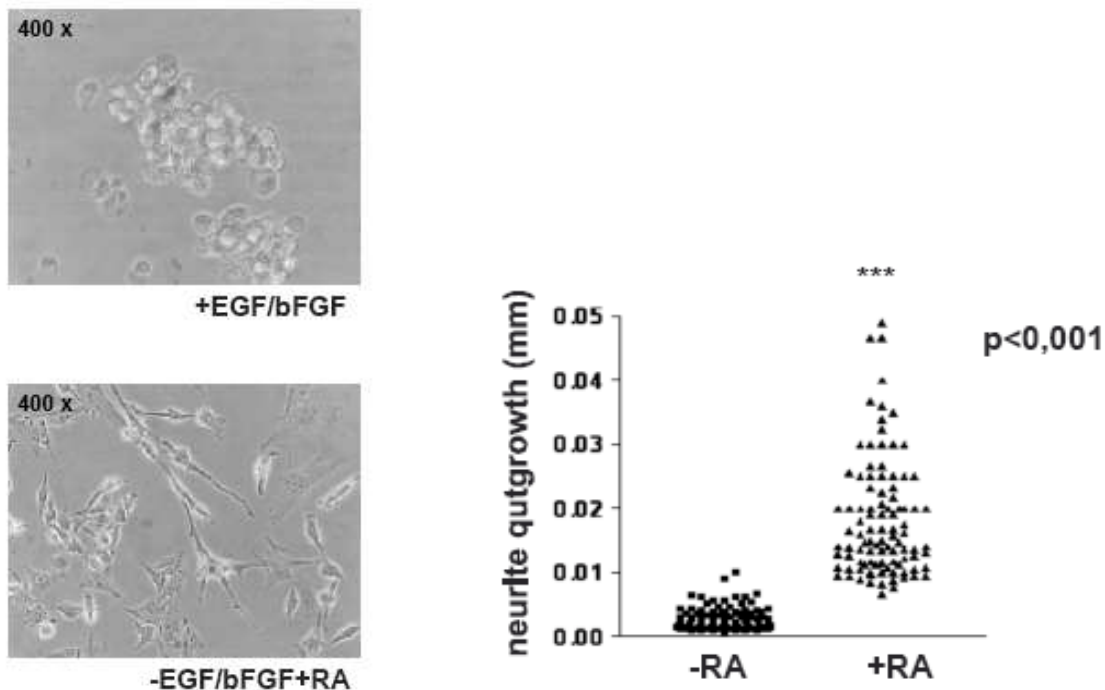


Abbildung 7 B: Neuritenwachstum nach Behandlung mit Retinsäure

HNSC.100 Zellen wurden 12 Tage lang ohne die Wachstumsfaktoren EGF/bFGF und mit Retinsäure (1 μ M) kultiviert. Die Kontrollzellen (oberes Bild) zeigen vorwiegend frei schwimmende Neurosphären. Das untere Bild zeigt eine deutliche Differenzierung der Zellen in Form von adhärenenten Zellen, die Neuriten unterschiedlicher Längen aufweisen. In einer statistischen Analyse wurde sowohl die Anzahl der Neuriten bildenden Zellen als auch die Längen der Neuriten und die Signifikanz in Form des p-Werts berechnet (rechtes Bild). Ein Wert unter 0,001 bedeutet, dass die hier erhaltenen Daten stark signifikant sind.

Neben einer Morphologieveränderung konnte auch auf mRNA Ebene ein starker Anstieg der Expression verschiedener neuronalen Markergene beobachtet werden. Die für die synaptischen Vesikelproteine Synapsin I, Synaptophysin, Synaptotagmin I, II, IV und VII, Synaptobrevin 1 und 2 und Synaptoporin kodierenden Gene wurden durch die Zugabe von Retinsäure zum Mitogen freien Medium in den neuralen Stammzellen HNSC.100 exprimiert (Abbildung 7 C).

C

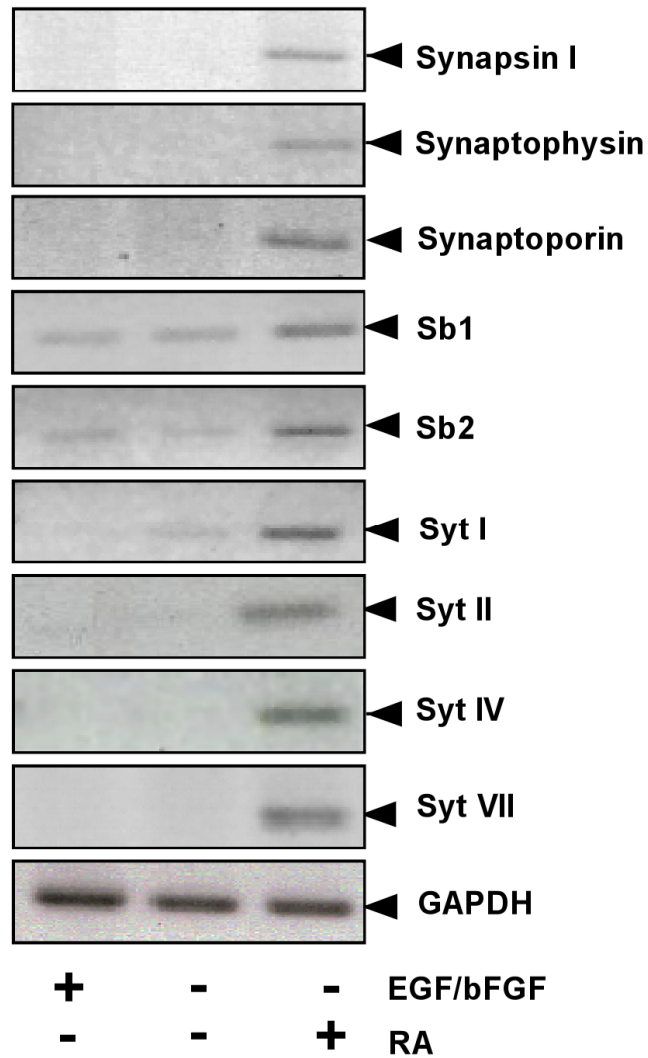


Abbildung 7 C: Expression neuronaler Gene in HNSC.100 nach Zugabe von Retinsäure

HNSC.100 Zellen wurden 12 Tage lang in Medium ohne Wachstumsfaktoren EGF/bFGF und mit Retinsäure (1 μ M) kultiviert. RT-PCR Analysen zeigen, dass eine Kultivierung mit Retinsäure in den HNSC.100 Zellen die Expression verschiedener neuronaler Markergene auslöste. Als interner Standard wurde die Expression des *GAPDH*-Gens untersucht.

D

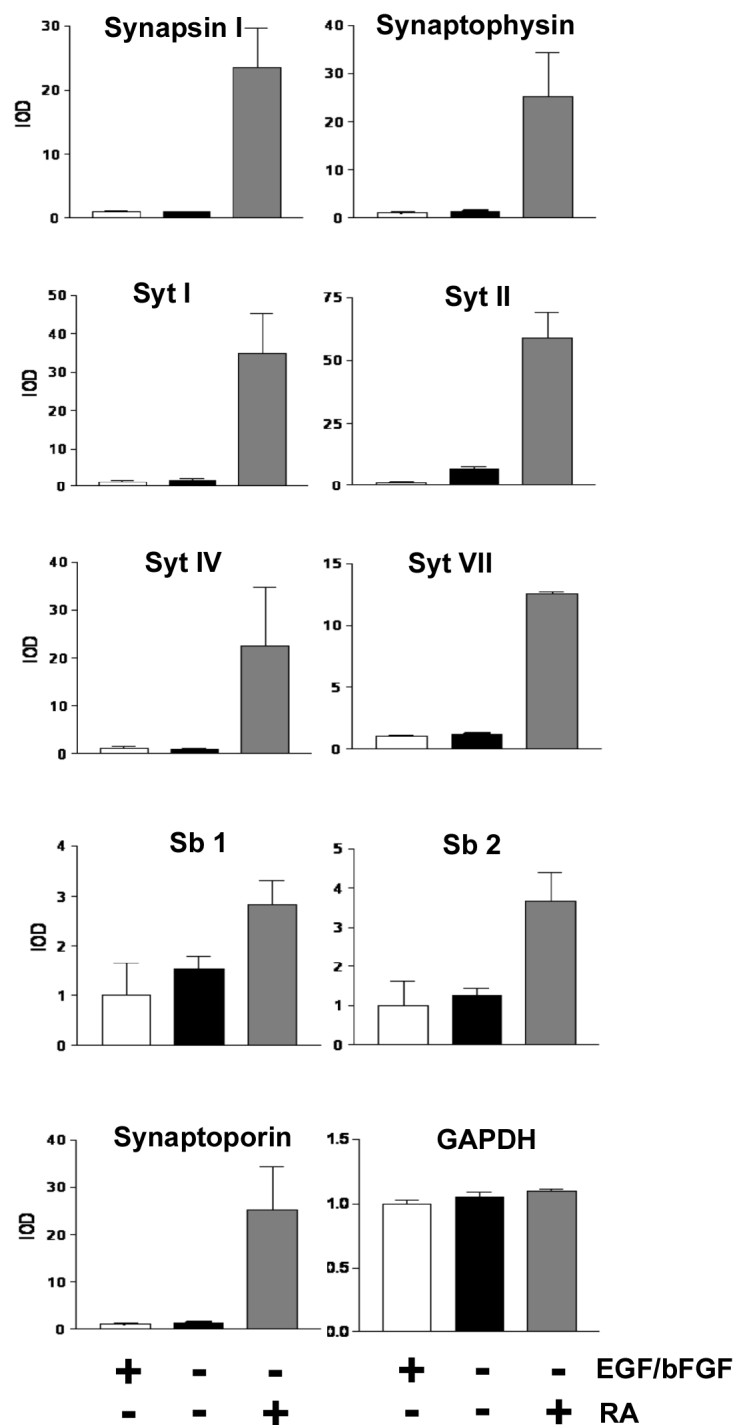


Abbildung 7 D: Quantifizierung der Expression neuronaler Gene in HNSC.100

Diese Abbildung zeigt eine statistische Analyse der Daten aus Abbildung 7 C. Die Bandenintensität der amplifizierten DNA wurde gemessen und der Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen in einem Balkendiagramm gezeigt. Die Standardabweichung wurde in Form des SEM dargestellt.

4.1.3 Hemmung der Differenzierung durch Blockade des ERK Signalwegs

Die Mitogene EGF und bFGF sind Liganden der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die nach Bindung zur Aktivierung der Mitogen Aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen), des PI3-Kinase- und des Phospholipase C-Signalwegs führen. Zu den MAP-Kinasen gehört auch die „*extracellular signalrelated kinase*“ (ERK). Der ERK-Signalweg reguliert die Differenzierung, Proliferation und das Zellwachstum. Auch bei der Differenzierung von Stammzellen wird dem ERK-Signalweg eine Funktion zugesprochen. So wurde gezeigt, dass sowohl die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (Salaszyk et al., 2004) als auch die Differenzierung von Stammzellen aus dem Knochenmark (Xu et al., 2008) durch den ERK Signalweg reguliert werden. Bei der Aktivierung des ERK-Signalwegs sind die Raf-Proteine (*rapidly growing fibrosarcoma* oder *rat fibrosarcoma*) beteiligt. Raf-Proteine bilden eine Familie von Proteinkinasen, welche die Isoformen A-Raf, B-Raf und C-Raf (oder Raf-1) umfassen. Werden Raf-Proteine aktiviert, aktivieren diese selbst wiederum über MEK den ERK-Signalweg (Pearson et al., 2001) (Abbildung 8).

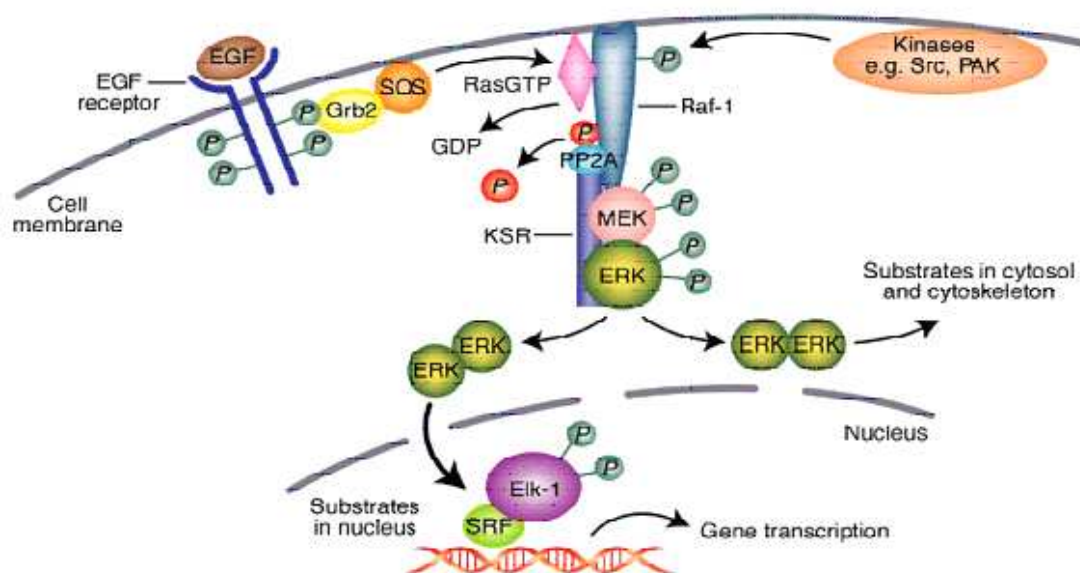


Abbildung 8: Schematische Darstellung des ERK Signalwegs

In dieser Abbildung wird das Zusammenspiel der verschiedenen Proteinkinasen, die zur Aktivierung des ERK Signalwegs führen, schematisch dargestellt.

„The organisation and function of the Ras-Raf-MEK-ERK pathway.“

Expert Reviews in Molecular Medicine© 2002 Cambridge University Press

Ich habe den Einfluss des ERK-Signalwegs auf die astrozytäre Differenzierung neuraler Stammzellen untersucht. Hierfür wurde in den HNSC.100 Zellen die induzierbare Mutante Δ Raf-1:ER, stabil exprimiert (Abbildung 9 A, B).

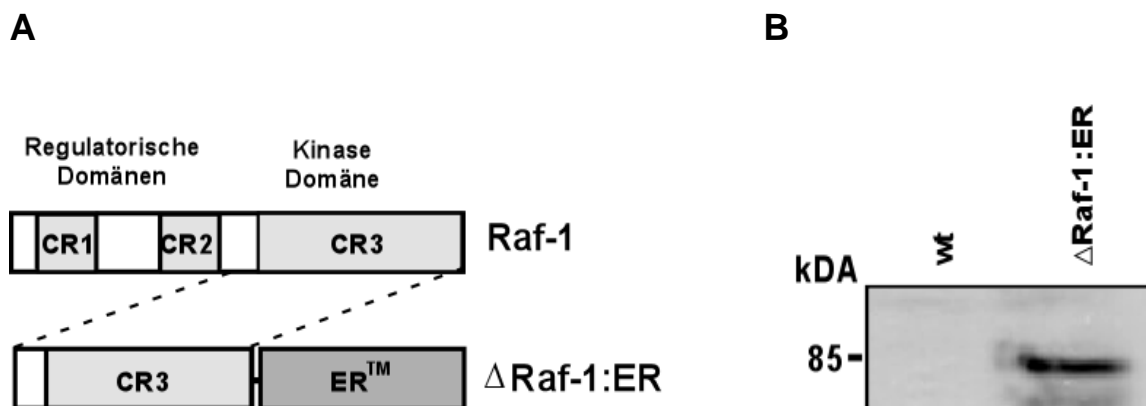


Abbildung 9: Expression von Δ Raf-1:ER in HNSC.100 Zellen.

A. Modulare Struktur von Raf-1 und Δ Raf-1:ER.

Raf-1 besteht aus 2 regulatorischen Domänen und einer Kinase Domäne. Bei der induzierbaren Mutante von Raf-1 wurden die regulatorischen Domänen von Raf-1 durch die Hormonbindungsdomäne des Östrogenrezeptors (ERTM) ersetzt.

B. Nachweis der Expression der Mutante Δ Raf-1:ER in HNSC.100 Zellen.

Es wurden die Kernproteine aus HNSC.100 Δ Raf-1:ER Zellen isoliert und eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Für die Detektion des Transgens wurden Antikörper verwendet, die gegen das Flag-Tag gerichtet waren. Als Kontrolle wurden Wildtyp (wt) Zellen verwendet.

Neurale Stammzellen benötigen die Mitogene bFGF und EGF, damit sie wachsen können und nicht differenzieren (McKay, 1997; Villa et al., 2000). Ein Entzug der Mitogene aus dem Medium führte zu einem Stopp des Zellzyklus und zur Differenzierung der Zellen zu Astrozyten (Abbildung 7 A). Abbildung 10 A zeigt, dass auch in HNSC.100 Δ Raf-1:ER Zellen ein Entzug der Wachstumsfaktoren aus dem Medium eine gesteigerte Expression des Astrozytenmarkers GFAP und eine verminderte Expression des Stammzellmarkers Nestin bewirkte. Wurde das Protein Δ Raf-1:ER durch Stimulation der Zellen mit 4-OHT aktiviert, konnte die Differenzierung der Zellen auch in Abwesenheit von Mitogenen im Kultivierungsmedium blockiert werden. So sank die Expression von GFAP, während jedoch Nestin stark exprimiert wurde.

Da Differenzierung auch Wachstumsstopp bedeutet (Stein et al., 1996), wurde des Weiteren untersucht, welchen Einfluss ein Entzug der Mitogene und eine Aktivierung von Δ Raf-1:ER auf

das Wachstumsverhalten der HNSC.100 Zellen haben. Um das Proliferationsverhalten der HNSC.100 Δ Raf-1:ER Zellen untersuchen zu können, wurde die DNA-Syntheserate mittels Inkorporation des Thymidinanalogon BrdU in die DNA untersucht. Hierbei diente die Menge an eingebautem BrdU als Maß für die DNA-Replikation. Abbildung 10 B zeigt, dass ein Entzug der Wachstumsfaktoren zu einem stark verminderten Einbau an BrdU in die DNA führte, wohingegen eine Stimulation der Zellen mit 4-OHT den Einbau von BrdU in die DNA erhöhen konnte. Die Zellen stoppten demnach die Proliferation nach Entzug der Wachstumsfaktoren. Wurde jedoch der ERK-Signalweg mittels Aktivierung von Δ Raf-1:ER durch 4-OHT angeschaltet, proliferierten selbst die Zellen, denen Mitogene in ihrem Kultivierungsmedium fehlten. Diese Daten zeigen, dass die Aktivierung des ERK- Signalwegs durch die Mutante Δ Raf-1:ER in den HNSC.100 Zellen die Differenzierung zu Astrozyten hemmen konnte. Eine Blockade des ERK-Signalwegs ist folglich während der Differenzierung neuraler Stammzellen essentiell.

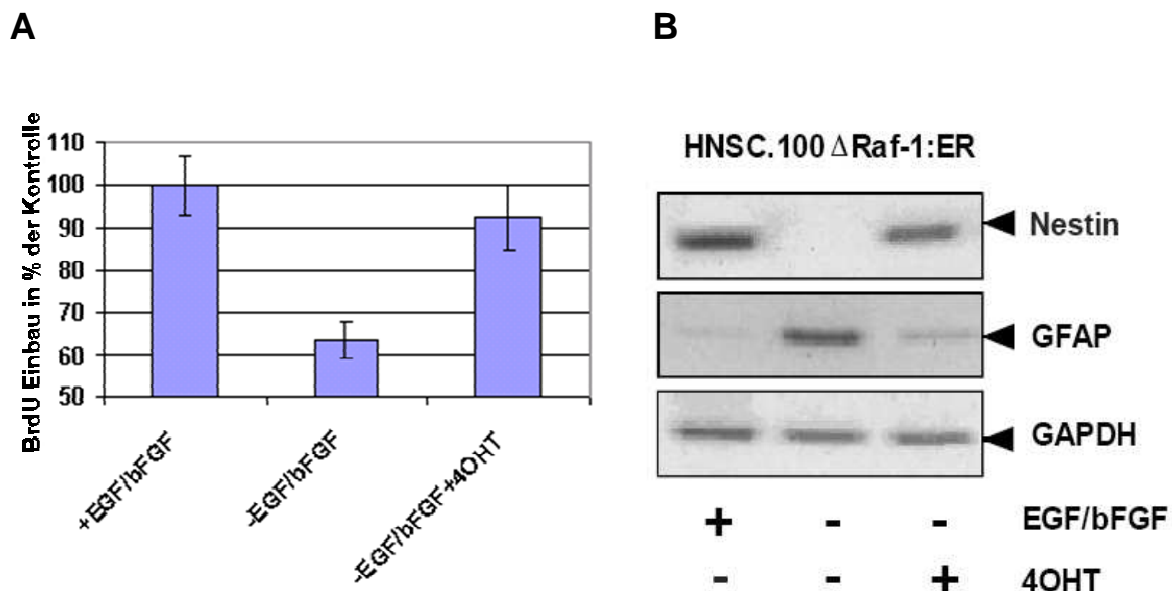


Abbildung 10: Aktiviertes Δ Raf-1:ER kann in HNSC.100 Zellen die Differenzierung hemmen

A. Einfluss von Δ Raf-1:ER auf die Expression von Markergenen in Stammzellen.

HNSC.100 Δ Raf-1:ER Zellen wurden in An-/Abwesenheit von Mitogenen mit und ohne 4-OHT kultiviert. Nach 3 Tagen wurde die RNA der Zellen isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Der Entzug der Mitogene verstärkte die Expression des Astrozytenmarkers GFAP, diese wurde jedoch durch aktiviertes Δ Raf-1:ER aufgehoben. Genauso wurde eine verminderte Expression des Stammzellmarkers Nestin in den Zellen, denen Mitogene im Kultivierungsmedium fehlten, durch eine Aktivierung von Δ Raf-1:ER ausgeglichen. Die Expression von GAPDH wurde als interner Standard analysiert.

B. Hemmung der Differenzierung der HNSC.100 Δ Raf:ER Zellen durch Aktivierung des ERK- Signalwegs.

HNSC.100 Δ Raf-1:ER Zellen wurden mit den Mitogenen EGF/bFGF, ohne Mitogene und ohne Mitogene aber mit 4-OHT (1 μ M) kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Wachstumsverhalten der Zellen über die DNA-Syntheserate ermittelt, indem der BrdU- Einbau in die DNA bestimmt wurde.

4.1.4 Epigenetische Konfiguration neuronaler Gene in den neuronalen Stammzellen HNSC.100

Embryonale Karzinomazellen der Maus wurden durch eine Behandlung mit Retinsäure zu funktionellen Neuronen differenziert (McBurney et al., 1988). Auch eine Behandlung der neuronalen Stammzellen HNSC.100 Zellen mit Retinsäure konnte die Expression von Genen auslösen, die für synaptische Vesikelproteine kodieren (Abschnitt 4.1.2). In eukaryotischen Zellen ist die DNA um die Histone gewunden, um mit weiteren modifizierenden Proteinen das Chromatin zu bilden. Eine Modifizierung der Histone in Form von Methylierung, Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitinierung resultiert in einem bestimmten Muster, welches zur Formulierung des hypothetischen Histon-Codes führte (Stahl und Allis, 2000; Jennuwein und Allis, 2001). Diese epigenetischen Mechanismen bewirken eine Konformationsänderung des Chromatins und regulieren so die Transkription von Genen. Hierbei sind unterschiedliche Modifikationen an den Aminosäureresten charakteristisch für geschlossenes oder offenes Chromatin. Am Histon H3 definiert die Methylierung der Lysinreste 4, 36 und 79 aktives Chromatin, während die Methylierung der Lysinreste 9 und 27 für reprimierte Chromatinbereiche spezifisch ist (Fischle et al., 2003; Lachner et al., 2003). Um die epigenetische Konfiguration der hier untersuchten neuronalen Gene analysieren zu können, wurden Chromatinimmunopräzipitationsanalysen (ChIPs) durchgeführt. Diese ermöglichten, die Bindung verschiedener Proteine an die DNA zu untersuchen, und die Modifikationen des Chromatins in undifferenzierten und differenzierten Zellen miteinander zu vergleichen.

Zunächst wurde die epigenetische Konfiguration von REST-Zielgenen analysiert. Hierzu wurde der Fokus auf Marker gelegt, die zwischen aktiv transkribierten und reprimierten Genen unterscheiden. Abbildung 11 zeigt die epigenetische Konfiguration des Histons H3 in den neuronalen Genen *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II*, *IV* und *VII*. Es wurden ChIPs durchgeführt, bei denen Antikörper verwendet wurden, die entweder gegen den dreifach methylierten Lysinrest 4 (α H3K4me3) oder gegen den zweifach methylierten Lysinrest 9 (α H3K9me2) am Histon H3 gerichtet waren. Die präzipitierte DNA wurde mit Primern amplifiziert, die die Bindestelle des Transkriptionsfaktors REST auf den für die synaptischen Vesikelproteine kodierenden Genen umspannten. In undifferenzierten neuronalen Stammzellen war der Lysinrest 9 des Histons H3 in allen analysierten neuronalen Genen zweifach methyliert, was auf geschlossenes, nicht transkribiertes Chromatin deutet (Abbildung 11). Die Bindestelle für den Repressor REST lag also in allen untersuchten neuronalen Genen in einem kondensierten, transkriptionell inaktiven Bereich des Chromatins. Jedoch kam es zu einer Änderung des Methylierungsgrades des Lysinrests 4, sobald die HNSC.100 Zellen ohne

Wachstumsfaktoren, aber mit Retinsäure kultiviert wurden: Die induzierte Differenzierung der Zellen bewirkte eine Veränderung des Methylierungsmusters. Das zuvor kondensierte Chromatin war in einen offenen, für Transkriptionsfaktoren zugänglichen Zustand übergegangen, im Gegensatz zum Methylierungsmuster in undifferenzierten Zellen war der Lysinrest 4 des Histons H3 nun dreifach methyliert (Abbildung 11).

Als Kontrolle wurde außerdem der chromosomale Kontext des *GFAP*-Gens untersucht. *GFAP* wurde in neuronalen Stammzellen exprimiert, wohingegen eine durch Retinsäure induzierte Differenzierung der Zellen, die *GFAP* Expression blockierte (Abbildung 7 A).

ChIPs machen deutlich, dass die Ergebnisse der RT-PCR Untersuchungen mit den epigenetischen Studien korrelierten. In den undifferenzierten neuronalen Stammzellen HNSC.100 war im distalen Promoterbereich des *GFAP*-Gens der Lysinrest 4 am Histon H3 dreifach methyliert, wohingegen eine Differenzierung der Zellen mit Retinsäure eine Veränderung des Methylierungsmusters in einer Methylierung des Lysinrests 9 des Histons H3 resultierte (Abbildung 11).

Das epigenetische Profil der hier untersuchten REST Zielgene wurde zusätzlich in den humanen Neuroblastomazellen SH-SY5Y und in den humanen Keratinozyten HaCaT analysiert. Diese beiden Zelllinien wurden ausgewählt, da sie der Erwartung nach gegensätzliche Methylierungsmuster in den neuronalen Genen aufweisen müssten: die Neuroblastomazellen exprimieren neuronale Gene, wobei in den Keratinozyten keine Expression neuronaler Gene zu erwarten war. Demnach müsste in den SH-SY5Y Zellen das Chromatin offen, der Lysinrest 4 also methyliert sein. Im Gegensatz hierzu sollten Keratinozyten keine neuronalen Gene exprimieren, die Chromatinstruktur sollte geschlossen und der Lysinrest 9 methyliert sein. Wie erwartet zeigen die Ergebnisse der ChIP-Analysen, dass das Chromatin der verschiedenen REST-Zielgene in den HaCaT Keratinozyten in einer geschlossenen Konformation vorlag, der Lysinrest 9 war zweifach methyliert. Dagegen waren in den SH-SY5Y Zellen eine bivalente Chromatinmodifikation zu beobachten: sowohl der Lysinrest 9 als auch der Lysinrest 4 des Histons H3 waren methyliert (Abbildung 12). In den Neuroblastomazellen lag das Chromatin in einer offenen Konfiguration vor, so dass die neuronalen Gene exprimiert werden konnten. Das Methylierungsmuster undifferenzierter neuraler Stammzellen stimmte mit dem von Keratinozyten und das von differenzierten neuronalen Stammzellen stimmte mit dem Methylierungsmuster von Neuroblastomazellen überein.

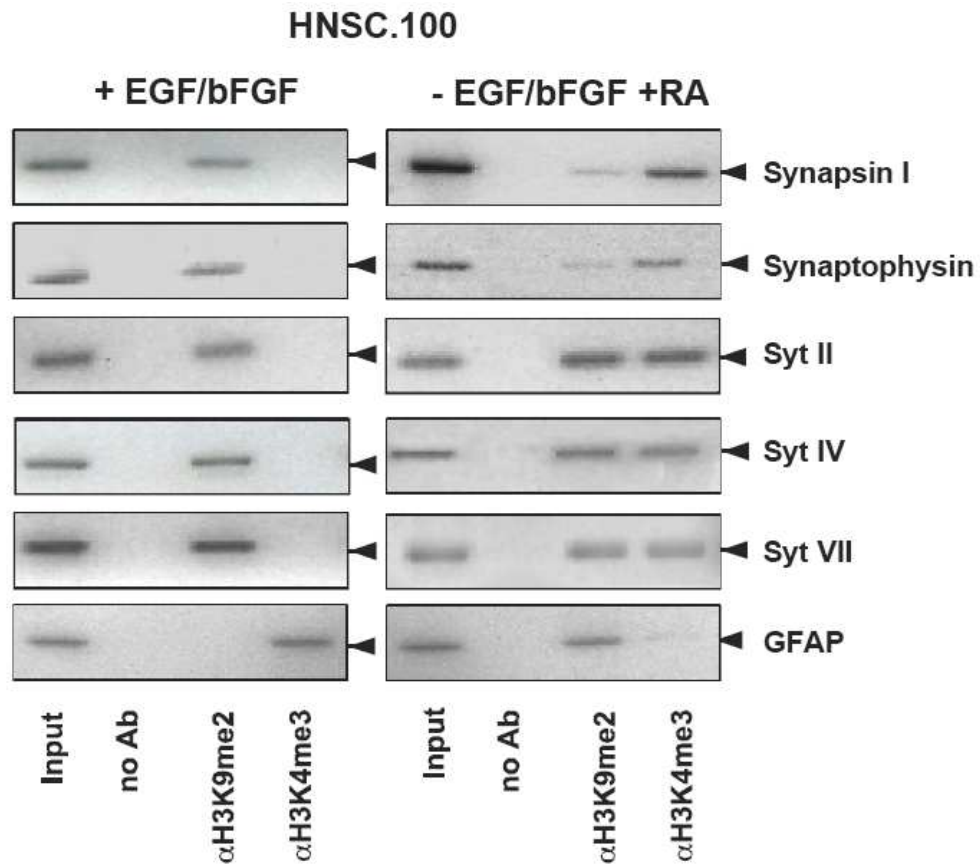


Abbildung 11: Epigenetische Modifikationen von REST Zielgenen in differenzierten und undifferenzierten humanen neuronalen Stammzellen HNSC.100

HNSC.100 Zellen wurden entweder in Kultivierungsmedium mit den Mitogenen EGF/bFGF oder ohne Mitogene aber mit Retinsäure (1 μ M) 12 Tage lang kultiviert. Es wurden ChIPs durchgeführt, wobei Antikörper verwendet wurden, die entweder gegen den zweifach methylierten Lysinrest 9 oder gegen den dreifach methylierten Lysinrest 4 am Histon H3 gerichtet waren. Die präzipitierten Chromatinfragmente wurden mit Primern amplifiziert, die den Bereich der neuronalen Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II*, *IV* und *VII*, umspannten. Als Negativkontrolle (no Ab) diente Chromatin, dem kein Antikörper zugegeben wurde. Als Positivkontrolle wurde ein Aliquot des Gesamtchromatins (Input) in der PCR amplifiziert. Des Weiteren wurde auch das Methylierungsmuster im Promotorbereich des *GFAP*-Gens in differenzierten und in undifferenzierten neuronalen Stammzellen miteinander verglichen.

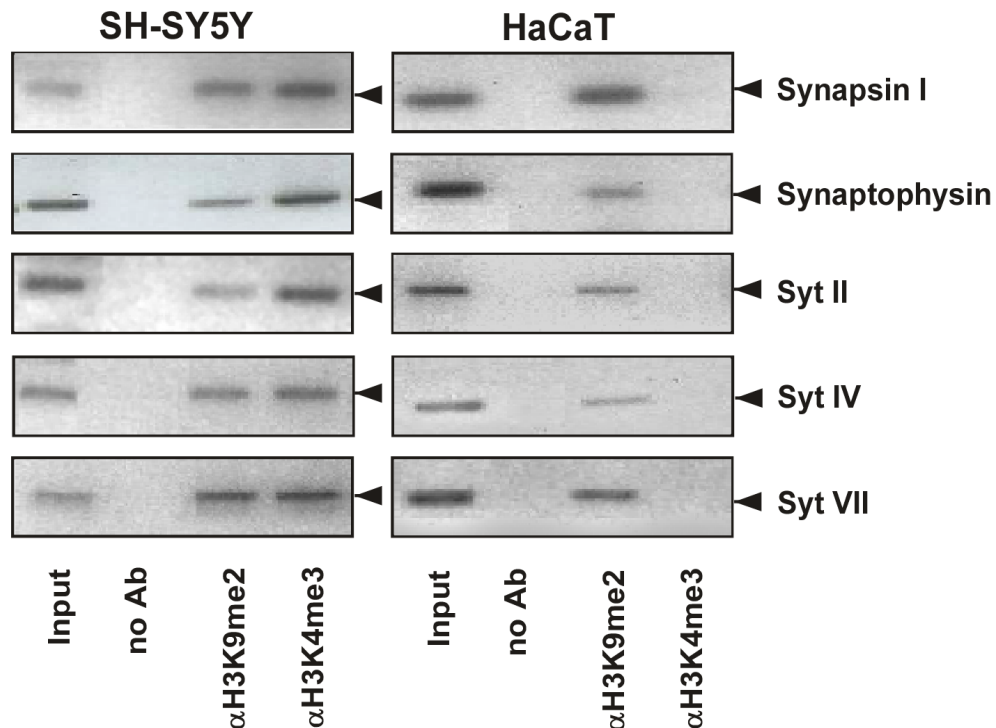


Abbildung 12: Epigenetische Analyse von REST Zielgenen in Neuroblastomazellen und in Keratinozyten

Das Chromatin der Zellen wurde präpariert und mit Antikörpern, die spezifisch gegen den zweifach methylierten Lysinrest 9 und gegen den dreifach methylierten Lysinrest 4 des Histons H3 gerichtet waren, inkubiert. Das präzipitierte Chromatin wurde mittels spezifischer Primer für die Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II*, *IV* und *VII* amplifiziert. Als Negativkontrolle diente die no Ab Probe, als Positivkontrolle wurde ein Aliquot des Gesamtchromatins analysiert.

4.1.5 Transkriptionskontrolle in HNSC.100 Zellen durch Histonacetylierung und Histondeacetylierung

Hsieh et al. 2004 haben gezeigt, dass eine Hemmung von Histondeacetylasen eine Differenzierung neuraler Stammzellen auslöste. Eine verstärkte Histonacetylierung induzierte in weiteren Untersuchungen die Expression verschiedener neuronaler Gene, wie *Synapsin I*, *NeuroD* und *SCG10* (Schoenherr et al., 1995; Roopra et al., 2001; Lunyak et al., 2002) gehörten.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Hemmung der Histondeacetylasen mittels Trichostatin A (TSA) eine Expression der für die verschiedenen synaptischen Vesikelproteine kodierenden

neuronalen Gene in den neuronalen Stammzellen HNSC.100 auslösen konnte. Abbildung 13 zeigt, dass die neuronalen Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptobrevin 2* und auch die *Synaptotagmine II, IV* und *VII* durch Hemmung von Histondeacetylasen in den neuronalen Stammzellen HNSC.100 exprimiert wurden.

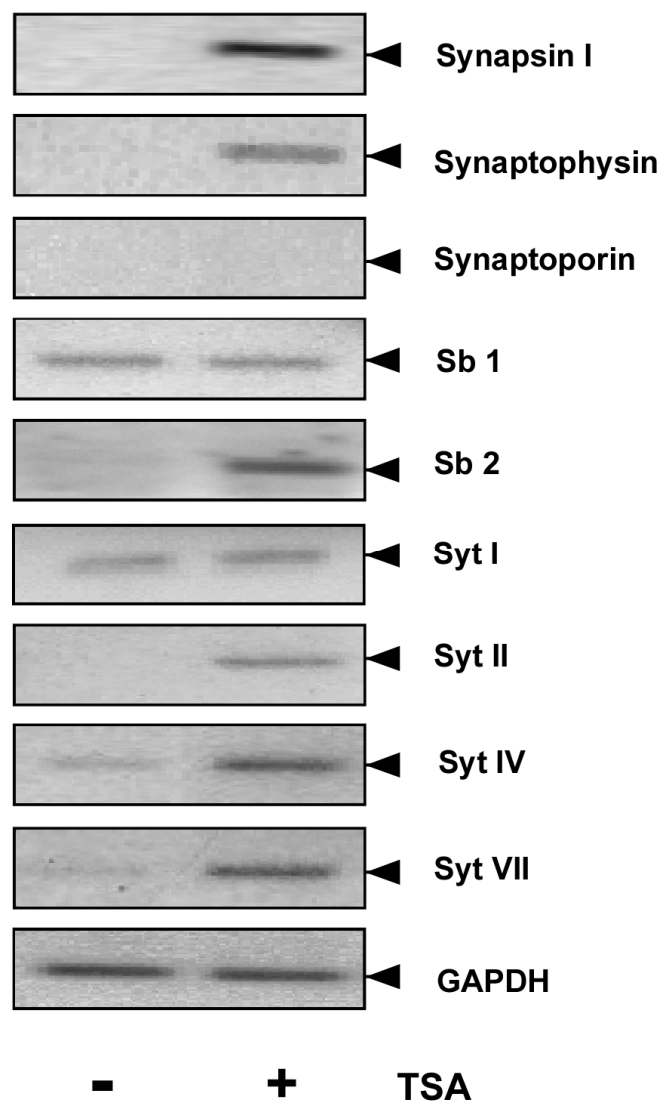
A

Abbildung 13 A: Expression neuronaler Gene in HNSC.100 Zellen nach Hemmung von Histondeacetylasen mittels TSA

HNSC.100 Zellen wurden 24 Stunden lang mit TSA (+) oder mit dem Lösungsmittel DMSO (-) kultiviert. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert, revers transkribiert, und es wurden PCR Analysen durchgeführt. Eine Behandlung mit TSA führte zu einer Expression der Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptobrevin 2*, *Synaptotagmin II, IV* und *VII*. Also Kontrolle diente das *GAPDH*-Gen.

B

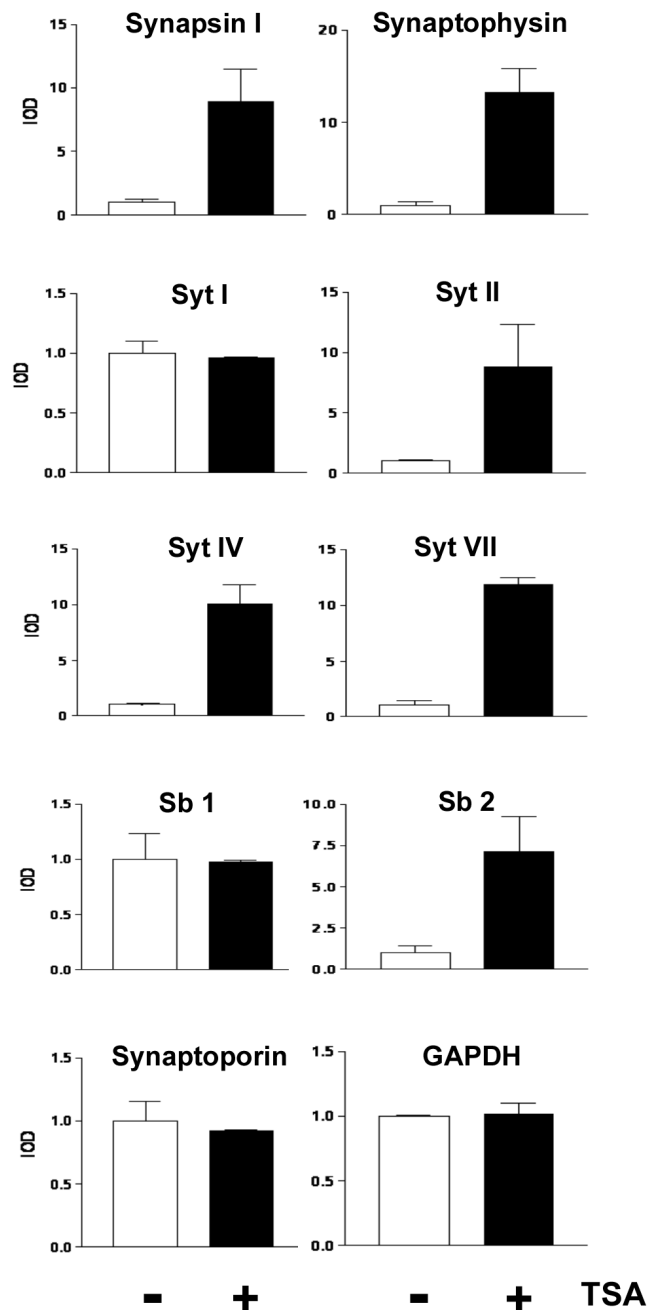


Abbildung 13 B: Quantitative Analyse der Genexpression in HNSC.100 Zellen nach einer Hemmung der Histondeacetylasen mit TSA

Es wurde eine statistische Analyse der in Abbildung 13 A erhaltenen Daten durchgeführt. Nach Durchführung der RT-PCR wurde die amplifizierte DNA in einem 2%igen Agarosegel dargestellt, die Intensität der Banden wurde gemessen. Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen dar. Die Standardabweichung wurde in Form des SEM dargestellt.

4.1.6 *In vivo* Bindung von REST und HDAC1 an neuronale Gene in HNSC.100 Zellen

Eine Behandlung der neuronalen Stammzellen HNSC.100 mit Retinsäure hat die Expression verschiedener neuronaler Gene initiiert. Die Expression neuronaler Gene korreliert mit einer verminderten Expression von REST (Palm et al., 1998; Ballas et al., 2005), so dass zu erwarten war, dass die REST-Bindung in den mit Retinsäure behandelten Zellen reduziert war. Zur Verifizierung dieser Überlegungen wurden ChIPs durchgeführt, um unter physiologischen Bedingungen die Bindung des Transkriptionsrepressors REST an die DNA der neuronalen Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II*, *IV* und *VII* zu untersuchen. REST rekrutiert unter anderem die Histondeacetylase 1 (HDAC1) zu seinen Zielgenen. Auf diese Weise wird die durch REST ausgelöste Entfernung von Acetylgruppen an den Histonen katalysiert (Roopra et al., 2000) und das Chromatin als Resultat einer Ladungsänderung enger verpackt. Daraus folgt, dass eine Transkription der betroffenen Gene nicht mehr möglich ist.

HNSC.100 Zellen wurden entweder 12 Tage lang in Medium kultiviert, das die Wachstumsfaktoren EGF und bFGF enthielt, oder es erfolgte eine Kultivierung der Zellen ohne die Wachstumsfaktoren aber mit Retinsäure (1µM). Mittels ChIP-Analysen wurde der Bereich der neuronalen Gene analysiert, der die REST-Bindestelle auf der DNA trägt. In undifferenzierten neuronalen Stammzellen HNSC.100 waren sowohl REST als auch HDAC1 an die regulatorische Region der für die synaptischen Vesikelproteine kodierenden Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II*, *IV* und *VII* gebunden. Wurden die Zellen mit Retinsäure differenziert, war eine deutliche Reduktion der REST-Bindung und ebenfalls eine verminderte oder auch fehlende Bindung von HDAC1 zu beobachten (Abbildung 14). Dieser Zustand begünstigte die Expression der neuronalen Markergene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II*, *IV* und *VII* in den differenzierten HNSC.100 Zellen.

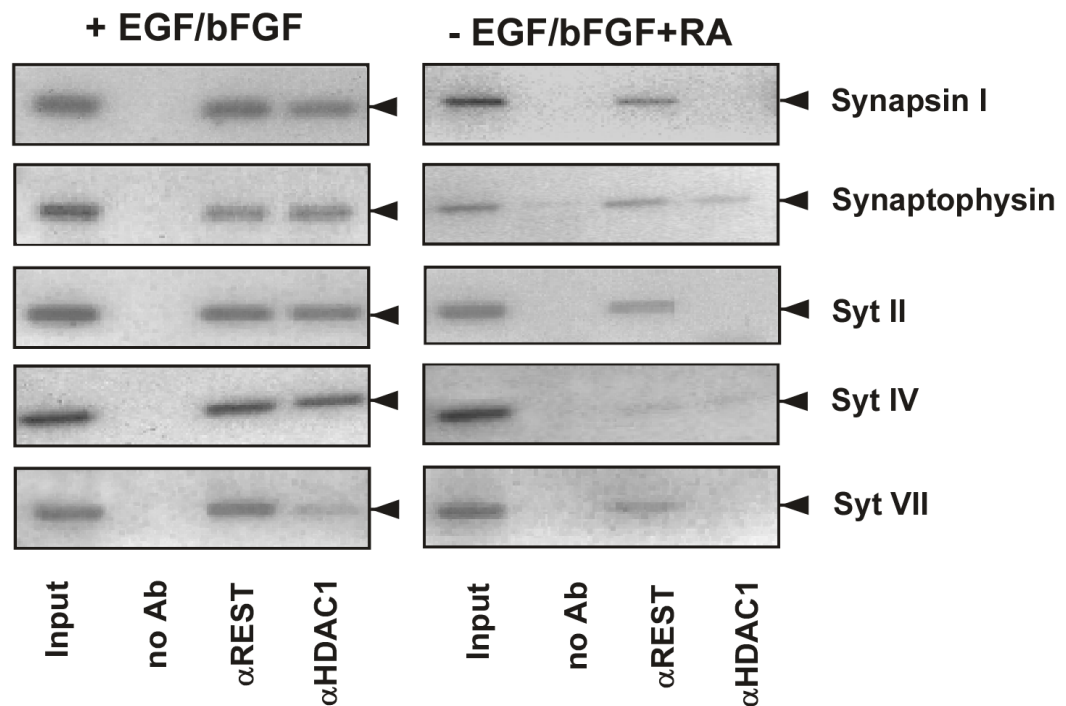


Abbildung 14: In vivo Bindung von REST und HDAC1 in differenzierten und undifferenzierten neuronalen Stammzellen

Um die Bindung von REST und HDAC1 an die regulatorischen Regionen der neuronalen Gene zu untersuchen, wurden Chromatinimmunopräzipitationsanalysen durchgeführt. Es wurden zwei Szenarien analysiert, wobei ein Ansatz eine Kultivierung der HNSC.100 Zellen in Medium, das Mitogene enthielt, beinhaltete. Bei dem anderen Ansatz dagegen wurden die Zellen 12 Tage lang in Medium kultiviert, das keine Mitogene, aber Retinsäure (1 μ M) enthielt. Es wurden Antikörper verwendet, die gegen REST und gegen HDAC1 gerichtet waren. Immunopräzipitierte Chromatinfragmente wurden mit spezifischen Primern amplifiziert, die die REST Bindestelle auf den Genen *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II*, *IV* und *VII* umspannten. Als Positivkontrolle wurde ein Aliquot des gesamten Chromatins, das nicht immunopräzipitiert wurde (Input), in der PCR eingesetzt, als Negativkontrolle diente mit Protein A Sepharose aber ohne Antikörper behandeltes Chromatin. Durch die Differenzierung der HNSC.100 mit Retinsäure nahm die Bindung von REST und HDAC1 in den untersuchten neuronalen Genen stark ab.

4.1.7 Expression einer Mutante von REST in HNSC.100 Zellen

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass eine verminderte Expression von REST in den neuronalen Stammzellen HNSC.100 essentiell für die Expression der untersuchten neuronalen Gene war. Als nächstes hat sich die Frage aufgetan, ob es durch eine Mutante von REST, die nicht hemmend sondern aktivierend wirkte, möglich sein könnte, die Expression der neuronalen Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II*, *IV* und *VII* zu induzieren.

Es wurden HNSC.100 Zellen verwendet, die eine dominant-positive Mutante von REST, das DP-REST:ER exprimierten. Hierfür wurden HNSC.100 Zellen mit einem rekombinanten Retrovirus infiziert, welcher für DP-REST:ER kodiert (Hohl und Thiel, 2005). Als Kontrolle wurden HNSC.100pac Zellen verwendet, welche durch Infektion von HNSC.100 Zellen mit einem für die Puromycinacetyltransferase kodierenden Retrovirus, hergestellt wurden. Beide stabile Zelllinien wurden von Gerald Thiel zur Verfügung gestellt. In Abbildung 15 A ist die moduläre Struktur von REST und von der Mutante DP-REST:ER schematisch dargestellt. In früheren Untersuchungen war die Mutante DP-REST:ER nach Aktivierung mittels 4-OHT in der Lage, die Expression bestimmter REST-Zielgene auszulösen oder zu verstärken (Hohl und Thiel, 2005). DP-REST:ER enthielt die DNA-Bindedomäne von REST, wodurch es an dessen Bindestelle NRSE auf der DNA der Zielgene binden konnte. Die beiden N- und C-terminalen Repressordomänen von REST wurden entfernt. Stattdessen befand sich am N-terminalen Ende von DP-REST:ER ein dem immunzytologischen Nachweis dienendes Flag-Epitop und ein Kernlokalisierungssignal (NLS). Am C-terminalen Ende wurde an Stelle der Repressordomäne die transkriptionelle Aktivierungsdomäne des Herpes-Simplex Virus Proteins VP16 angefügt. Um die Aktivität von DP-REST:ER regulieren zu können, enthielt das Protein am C-terminalen Ende die Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors (ER). Da hier die Östrogenrezeptor-Mutante ER^{Tamoxifen Mutant} verwendet wurde, konnte an Stelle des Östrogens der synthetische Ligand 4-OHT als aktivierendes Hormon verwendet werden. Die Mutation in der Hormon bindenden Domäne des Östrogenrezeptors erfolgte durch einen Austausch der Aminosäure Glyzin gegen Arginin an der Position 525 und reduzierte die Affinität des Rezeptors zu Östrogen um das 1000fache, wohingegen die Affinität zu 4-OHT nicht beeinflusst wurde (Littlewood et al., 1995). DP-REST:ER wird in einem inaktiven Zustand in den Zellen exprimiert, bei dem in Abwesenheit des Hormons das *Heat-shock*-Protein HSP90 an der Hormonbindenden Domäne des Östrogenrezeptors gebunden vorliegt. Die Expression des Proteins DP-REST:ER in HNSC.100 Zellen konnte immunologisch mit einem Antikörper, der gegen das Flag-Epitop gerichtet ist, nachgewiesen werden (Abbildung 15 B). Durch Zugabe von 4-OHT kam es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, so dass das HSP90 Protein vom Östrogenrezeptor dissoziierte und die Aktivierungsdomäne des VP16 frei gegeben wurde. Das aktive DP-REST:ER konkurrierte nun mit dem endogenen REST um die Bindung auf der DNA und konnte die Transkription der Zielgene von REST aktivieren. Der Aktivierungsmechanismus von DP-REST:ER ist in Abbildung 15 C dargestellt.

A

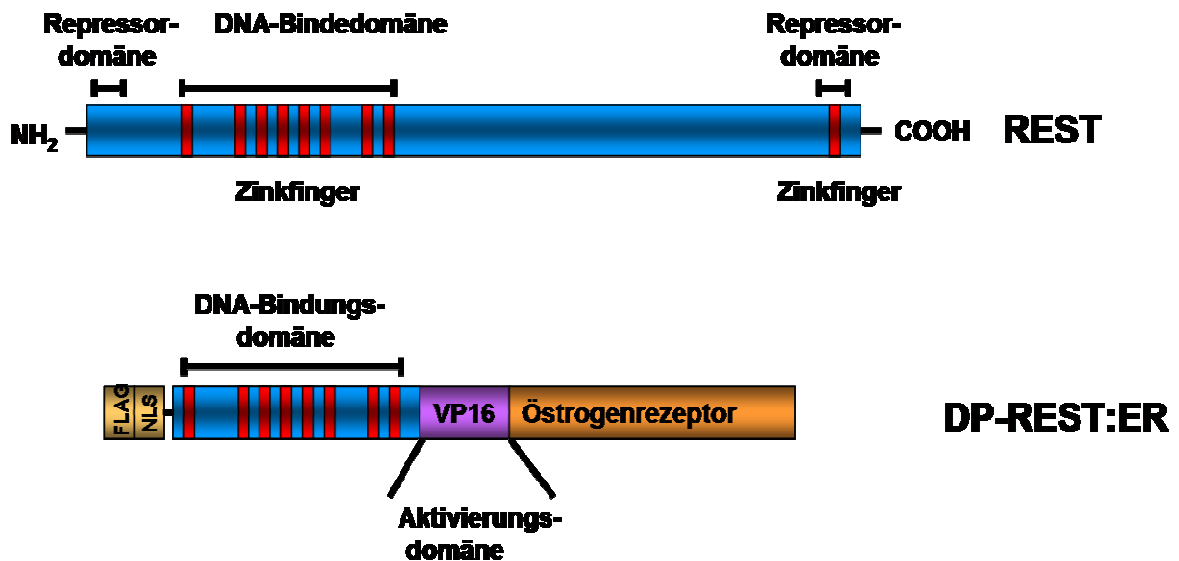


Abbildung 15 A: Schematische Darstellung der dominant-positive Mutante DP-REST:ER

Endogenes REST besitzt eine DNA-Bindedomäne, eine N-terminale und eine C-terminale Repressordomäne. Diese beiden Repressordomänen wurden bei der Mutante DP-REST:ER am N-terminalen Ende durch die spezifische Erkennungssequenz Flag und durch ein Kernlokalisierungssignal (NLS) ersetzt. Am C-terminalen Ende von DP-REST:ER befindet sich die Aktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus Proteins VP16 und zusätzlich eine Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors.

B

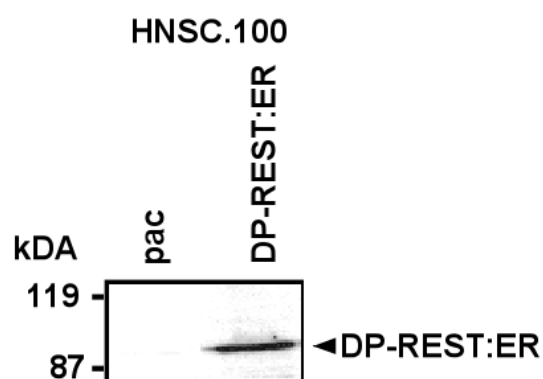


Abbildung 15 B: Expression von DP-REST:ER in HNSC.100 Zellen

Es wurden Zellkernextrakte von HNSC.100pac und HNSC.100 DP-REST:ER Zellen hergestellt und mit Antikörpern, die gegen das Flag-Tag gerichtet waren, im Western Blot untersucht. Eine Detektion des Flag-Tags war nur in den HNSC.100 DP-REST:ER Zellen möglich, die HNSC.100pac Zellen dienten hier als Kontrolle.

C

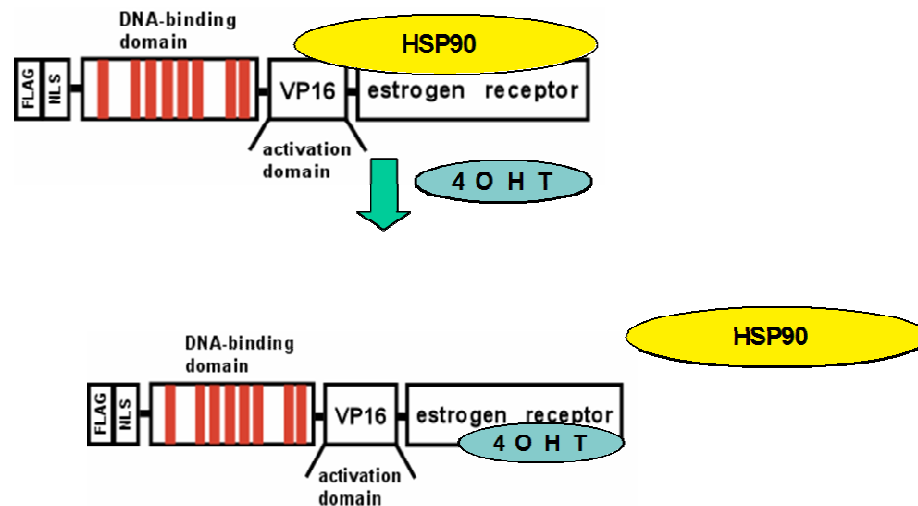


Abbildung 15 C: Schematische Darstellung des Aktivierungsmechanismus von DP-REST:ER

Das Protein DP-REST:ER wird in einem inaktiven Zustand exprimiert, bei dem das Heat-shock Protein HSP90 an die Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors bindet und die Aktivierungsdomäne VP16 belegt. Durch Zugabe des Hormonderivats 4-OHT kommt es zu einer Konformationsänderung des Östrogenrezeptors (ER), das *Heat-shock*-Protein HSP90 dissoziiert ab und gibt die Aktivierungsdomäne frei. Das Protein DP-REST:ER befindet sich nun in einem aktiven Zustand und kann die Transkription REST-regulierter Gene auslösen.

4.1.7.1 *In vivo* Bindung von DP-REST:ER an REST-regulierte Gene in HNSC.100 Zellen

Um die Zielgene von REST zu aktivieren, muss DP-REST:ER an die regulatorische Sequenz auf der DNA der Gene binden. ChIP-Analysen wurden durchgeführt, um diese Bindung detektieren zu können. Hierzu wurden HNSC.100 DP-REST:ER Zellen 24 Stunden lang mit 4-OHT stimuliert. Anschließend wurde ein Cross-linking zwischen der DNA und den Proteinen der Zellen durchgeführt, das Chromatin wurde mittels Ultraschall zerkleinert. Die Immunopräzipitation selbst erfolgt mittels M2-Agarose, welche mit dem Flag-Tag des DP-REST:ER interagieren sollte. Die präzipitierten Chromatinfragmente wurden mittels PCR amplifiziert und in einem Agarosegel sichtbar gemacht. Es wurden spezifische Primer verwendet, die das NRSE der jeweiligen Gene flankierten. Abbildung 16 zeigt, dass in den mit 4-

OHT stimulierten Zellen das Protein DP-REST:ER an das NRSE der neuronalen Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II*, *IV* und *VII* binden konnte. In den unstimulierten Zellen fand keine Bindung von DP-REST:ER statt. Das Hitzeschockprotein HSP90 blockierte im inaktiven DP-REST:ER nicht nur die Aktivierungsdomäne VP16 des Herpes Simplex Virus, sondern wahrscheinlich auch die DNA-Bindedomäne von DP-REST:ER. Genauso wie das endogene REST (Abbildung 14) hatte DP-REST:ER in undifferenzierten HNSC.100 Zellen trotz geschlossener Chromatinstruktur (Abbildung 16) Zugang zur regulatorischen Region der Gene.

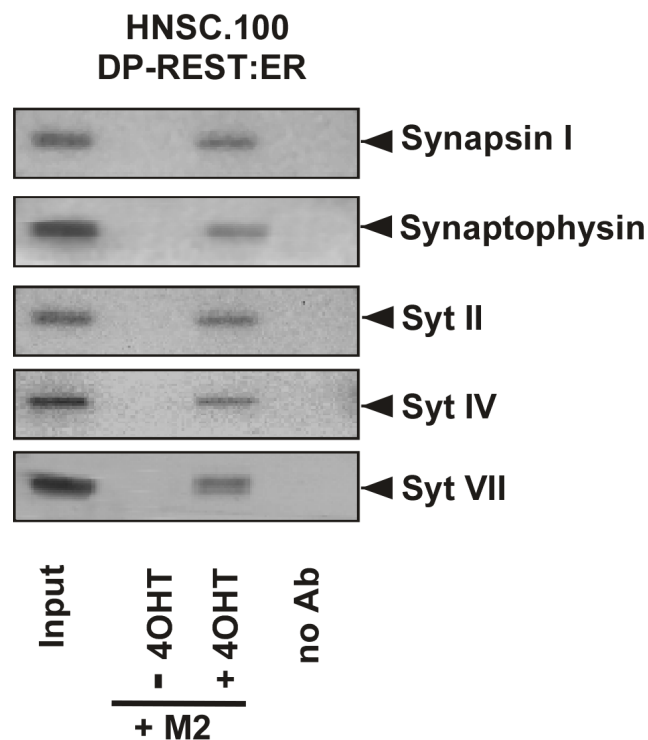


Abbildung 16: *In vivo* Bindung von DP-REST:ER an REST-regulierte Gene in HNSC.100 DP-REST:ER Zellen

HNSC.100 DP-REST:ER Zellen wurden 24 Stunden lang mit 1 μ M 4-OHT inkubiert. Anschließend wurde ein Crosslinking zwischen DNA und Proteinen durchgeführt, das Chromatin wurde mittels Ultraschall zerkleinert und DP-REST:ER bindende DNA wurde mittels M2-Agarose präzipitiert. Diese wurde mittels spezifischer Primer amplifiziert, die die REST-Bindestelle NRSE auf den Genen *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II*, *IV* und *VII* umspannten. DP-REST:ER konnte in den mit 4-OHT inkubierten Zellen an die DNA der Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II*, *IV* und *VII* binden. Als Positivkontrolle wurde ein Aliquot nicht präzipitierten Chromatins verwendet (Input), als Negativkontrolle diente Chromatin, das ohne Zugabe von Antikörpern diesen Versuch durchlief (no Ab).

4.1.7.2 Transkription neuronaler Gene durch DP-REST:ER in humanen neuronalen Stammzellen HNSC.100

Da die bisherigen Versuche gezeigt haben, dass die Mutante DP-REST:ER durch Bindung an das NRSE auf der DNA von REST Zielgenen die Transkription von Reportergenen auslösen konnte, wurde als nächstes untersucht, ob eine Aktivierung von DP-REST:ER in HNSC.100 Zellen auch die Transkription neuronaler Gene verstärken konnte.

HNSC.100 DP-REST:ER Zellen wurden 24 Stunden lang mit 4-OHT (+) oder mit Ethanol (-) behandelt. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert, revers transkribiert und PCRs durchgeführt. In Abbildung 17 sind die Resultate der Untersuchungen dargestellt. Die Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II*, *IV* und *VII* wurden durch eine Aktivierung von DP-REST:ER verstärkt exprimiert. Die Transkription der für die synaptischen Vesikelproteine kodierenden Gene *Synaptobrevin 1* und *Synaptotagmin I* blieb jedoch unbeeinflusst. Diese Gene werden in den humanen neuronalen Stammzellen HNSC.100 Zellen also nicht durch den Transkriptionsfaktor REST reguliert. Trotzdem spielt REST folglich eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Expression verschiedener neuronaler Gene in neuronalen Stammzellen.

A

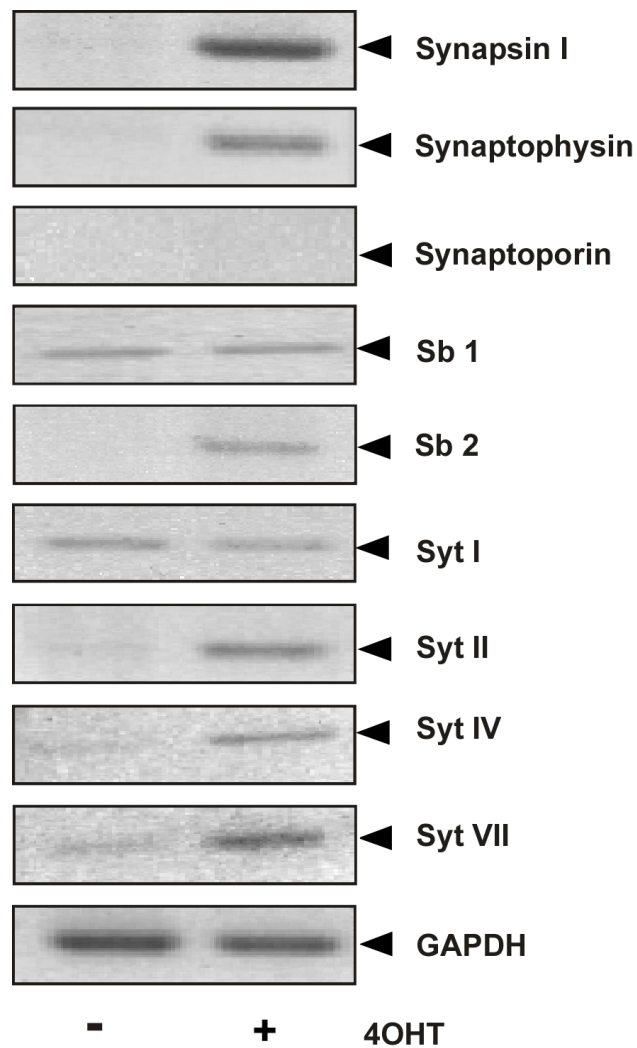


Abbildung 17 A: Verstärkte Expression neuronaler Gene in HNSC.100DP-REST:ER Zellen

Die Zellen wurden 24 Stunden lang mit 4-OHT (+) behandelt. Die RNA der Zellen wurde isoliert, revers transkribiert und anschließend mittels RT-PCR analysiert. GAPDH diente als interne Kontrolle, um sicher zu stellen, dass gleiche Mengen an RNA bei der reversen Transkription eingesetzt wurden. Die Transkription der Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II*, *IV* und *VII* wurde nach Stimulation der neuronalen Stammzellen mit 4-OHT verstärkt.

B

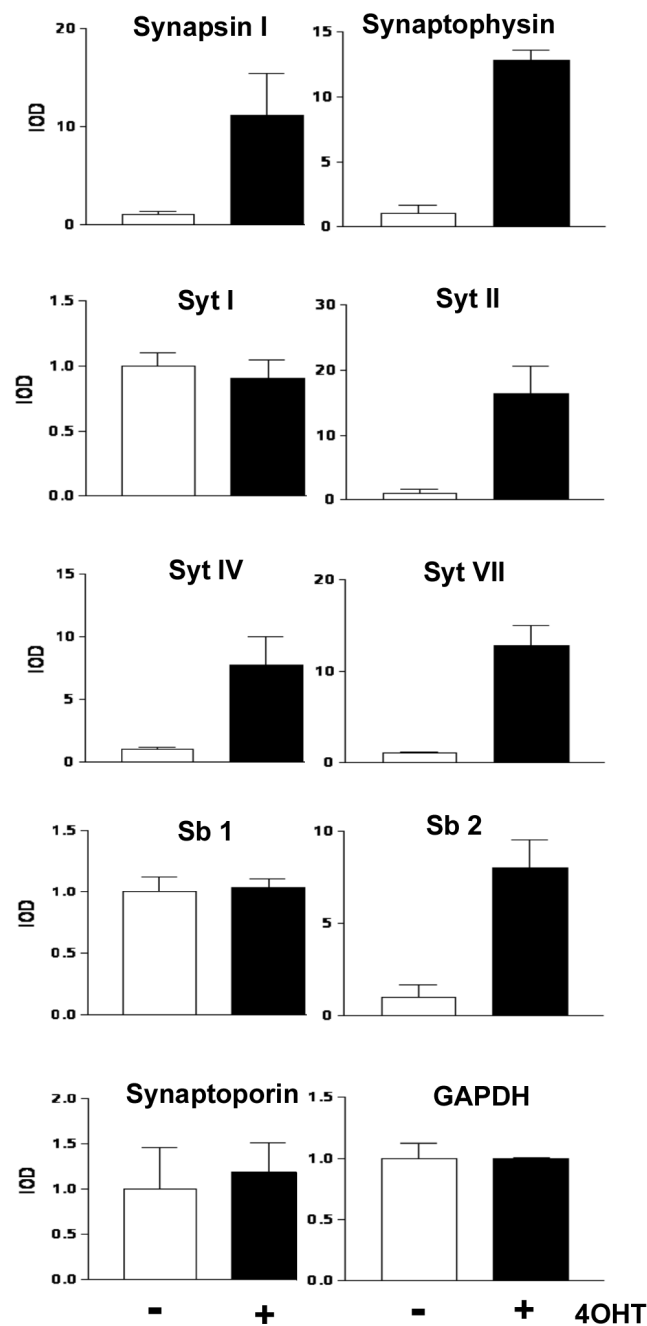


Abbildung 17 B: Quantifizierung und statistische Analyse der RT-PCR Daten nach Behandlung von HNSC.100DP-REST:ER Zellen mit 4-OHT

Es wurde eine statistische Analyse der in Abbildung 17 A erhaltenen Daten durchgeführt. Nach der RT-PCR wurde die amplifizierte DNA in einem Agarosegel aufgetragen und die Bandenintensität gemessen. Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen dar. Die Standardabweichung wurde in Form des SEM dargestellt.

4.2 Regulation der Expression der AMPA Untereinheit des Glutamatrezeptors GluR2 in den humanen Gliomazellen U87MG durch REST und Sp1

4.2.1 Epigenetische Konfiguration des *GluR2*-Gens in verschiedenen Zelllinien

In U87MG Zellen wird die AMPA Untereinheit des Glutamatrezeptors 2 exprimiert (Yoshida et al., 2006; Stepulak et al., 2009; van Vurden et al., 2009). Verschiedene Untersuchungen weisen dem *GluR2*-Gen eine Regulation durch REST zu (Kuwabara et al., 2004; Huang et al., 1999; Myers et al., 1998), jedoch konnte weder in neuronalen SN56-Zellen, noch in den Hypophysenzellen AtT20 oder in den pankreatischen β TC3-Zellen ein Einfluss von REST auf die *GluR2*-Genexpression erkannt werden (Hohl und Thiel, 2005). Zunächst wurde die epigenetische Konfiguration des *GluR2*-Gens untersucht. Es wurde eine ChIP-Analyse durchgeführt, bei der der Fokus auf Marker für eine geschlossene oder eine offene Chromatinstruktur gelegt wurde.

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der Chromatinimmunopräzipitationen, die an humanen Gliomazellen U87MG, humanen Neuroblastomazellen SH-SY5Y, humanen Keratinozyten HaCaT und humanen Hepatomazellen HepG2 durchgeführt wurden. Es wurden Primer verwendet, die die REST-Bindestelle auf dem *GluR2*-Gen umspannten. In Abbildung 18 ist eine schematische Darstellung der Promotorregion samt Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren REST und Sp1 zu sehen. In den U87MG Zellen liegt das *GluR2*-Gen in einem offenen für Transkriptionsfaktoren zugänglichen chromosomalen Bereich, der Lysinrest 4 ist zweifach und dreifach methyliert. Eine schwache Methylierung des Lysinrests 9 wurde ebenfalls detektiert. Wie das *GluR2*-Gen ist auch das für GFAP kodierende Gen in einer offenen Chromatinstruktur lokalisiert. Als Marker für Gliazellen (Strakova et al., 2004) wird GFAP in den Gliomazellen U87MG exprimiert, das chromosomale Umfeld des für GFAP kodierenden Gens ähnelt dem des *GluR2*-Gens. Als Kontrolle wurde die epigenetische Konfiguration des *GluR2*- und des *GFAP*-Gens in Neuroblastomazellen, in Keratinozyten und in Hepatomazellen untersucht. Sowohl in den Keratinozyten als auch in den Hepatomazellen sind am Histon H3 die Lysinreste 9 des *GluR2*- und des *GFAP*-Gens methyliert, die Chromatinstruktur beider Gene ist demnach geschlossen. Im Gegensatz hierzu ist das Chromatin des *GluR2*-Gens in den Neuroblastomazellen offen und zugänglich für Transkriptionsfaktoren, was an einer Methylierung des Lysinrests 4 des Histons H3 ersichtlich ist. Wie in den U87MG Zellen ist auch hier der

Lysinrest 9 schwach methyliert, wohingegen das Chromatin des *GFAP*-Gens in den Neuroblastomazellen in einer geschlossenen Konfiguration vorliegt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus 4.1.1. exprimieren die Neuroblastomazellen SH-SY5Y bei diesen Untersuchungen kein GFAP. Die beiden Gene *GluR2* und *GFAP* als Marker für Gliazellen werden also gleichzeitig nur in den Gliomazellen U87MG exprimiert.

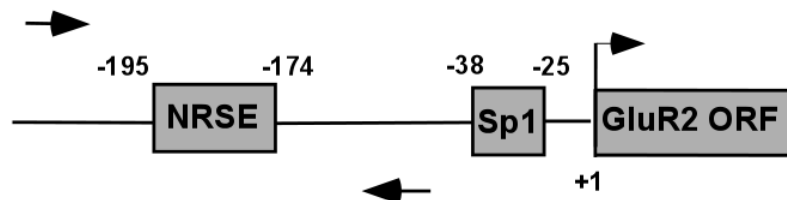


Abbildung 18: Schematische Darstellung der 5'-Region des *GluR2*-Gens

Dargestellt ist der Promotorbereich mit Transkriptionsstart des *GluR2*-Gens (+1). Die Primer, die für den CHIP verwendet wurden, umspannen das NRSE und sind als Pfeile (\leftarrow , \rightarrow) dargestellt. Die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 liegt zwischen dem Transkriptionsstart und dem NRSE.

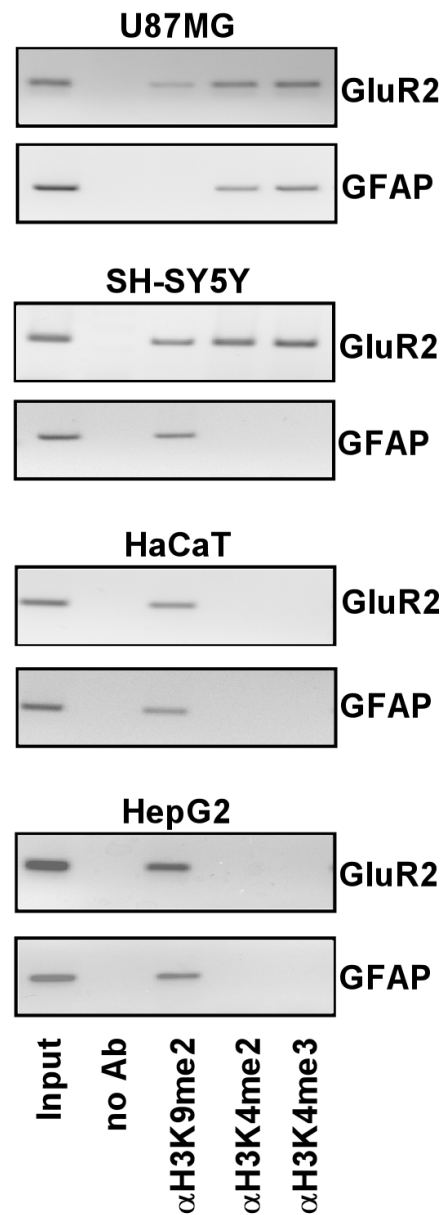


Abbildung 19: Epigenetische Konfiguration der für GluR2 und GFAP kodierenden Gene

Das Chromatin der Zellen wurde mit den an der DNA gebundenen Proteinen durch Formaldehyd vernetzt, mittels Ultraschall zerlegt und anschließend mit Antikörpern, die gegen den zweifach methylierten Lysinrest 9 (α H3K9me2) und gegen den zweifach (α H3K4me2) und den dreifach (α H3K4me3) methylierten Lysinrest 4 am Histon H3 gerichtet waren, immunpräzipitiert. Die präzipitierte DNA wurde mit spezifischen Primern amplifiziert. Als Kontrolle wurde die no Ab Probe verwendet. Als Positivkontrolle dient ein Aliquot des unbehandelten Chromatins (Input).

4.2.2 Die *GluR2*-Genexpression wird durch den Acetylierungsgrad der Histone reguliert

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Hemmung von Histondeacetylasen zu einer verstärkten Expression des *GluR2*-Gens in C6 Gliomazellen, in Astrozyten (Huang et al., 1999) und in der adulten Stammzelllinie HCN A94 aus dem Hippokampus (Kuwabara et al., 2004) führen kann. Jedoch zeigten Huang et al. (1999) auch, dass in kortikalen Neuronen das basale Acetylierungslevel der Histone H3 und H4 so hoch ist, dass der Histondeacetylasehemmer TSA diesen nicht signifikant erhöhen und auch die *GluR2* Expression nicht beeinflussen konnte. Auch Hohl und Thiel (2005) konnten die Expression des *GluR2*-Gens durch eine Hemmung der HDACs in den neuronalen Zellen SN56 und in verschiedenen neuroendokrinen Zellen nicht verstärken. Da aber sowohl von Huang et al. (1999) als auch von Kuwabara et al. (2004) gezeigt wurde, dass das *GluR2*-Gen in einigen Zelllinien unter anderem durch den Histonacetylierungsgrad reguliert wird, wurde im Weiteren untersucht, ob eine Hemmung der HDACs in den hier untersuchten Zelllinien die Expression des *GluR2*-Gens verstärken konnte. Die Zellen wurden 24 Stunden lang mit TSA behandelt. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert, revers transkribiert und mittels RT-PCR analysiert. In Abbildung 20 ist zu sehen, dass durch eine Hemmung der Histondeacetylasen die Genexpression von *GluR2* in den Gliomazellen U87MG und auch in den Neuroblastomazellen SH-SY5Y verstärkt werden konnte. In diesen beiden Zelllinien spielt der Histonacetylierungsgrad demnach bei der Regulation der *GluR2*-Genexpression eine bedeutende Rolle. Jedoch konnte eine Hemmung von Histondeacetylasen weder in den Keratinozyten noch in den Hepatomazellen die Expression des *GluR2*-Gens induzieren. Hier scheint die Genexpression von *GluR2* unabhängig vom Acetylierungsgrad der Histone reguliert zu sein.

A

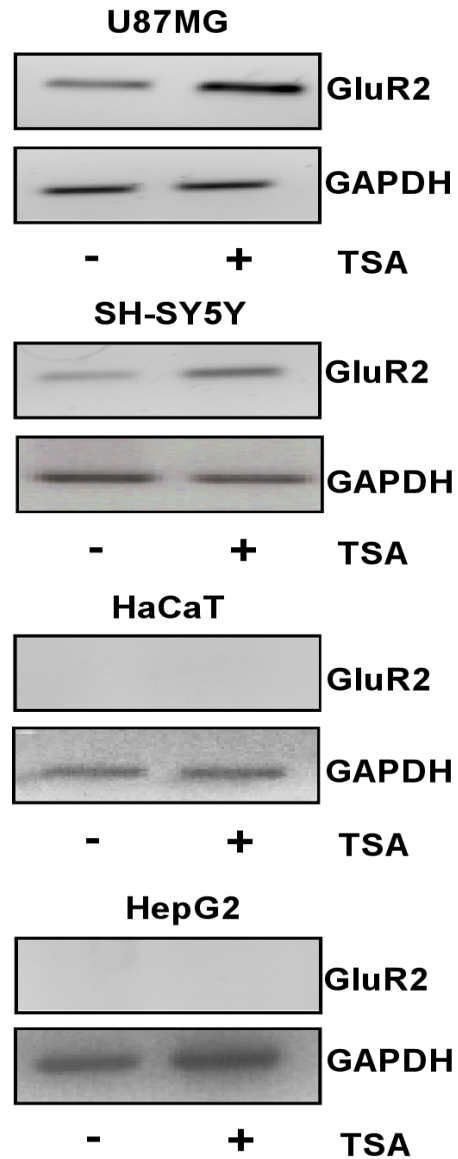


Abbildung 20 A: Expression von GluR2 nach Histondeacetylasehemmung mittels TSA

U87MG, SH-SY5Y, HaCaT und HepG2 Zellen wurden 24 Stunden lang mit TSA (100ng/ml) behandelt. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und mittels PCR analysiert. Als Kontrolle diente die GAPDH Expression. Die Expression des *GluR2*-Gens wurde durch TSA in den U87MG und in den SH-SY5Y Zellen verstärkt. In HaCaT und in HepG2 Zellen konnte eine Behandlung der Zellen mit TSA keine *GluR2*-Genexpression auslösen.

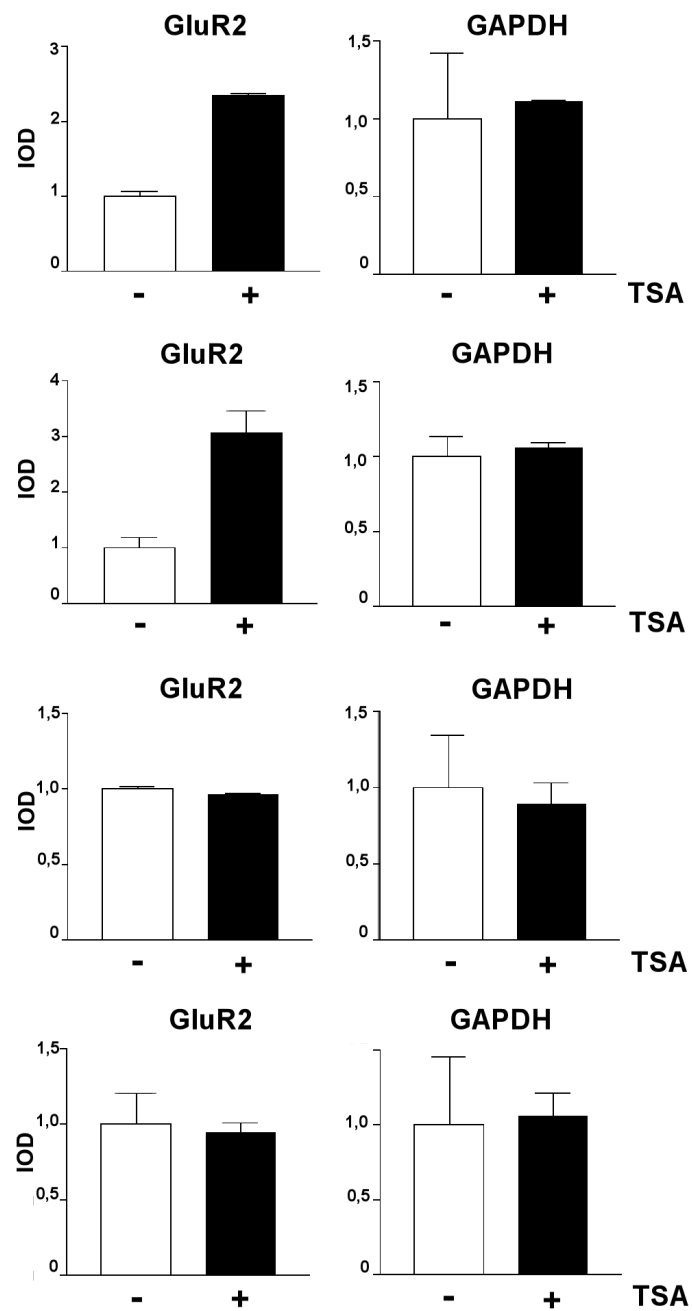
B

Abbildung 20 B: Quantifizierung und statistische Analyse der RT-PCR Daten.

Die Bandenintensität der Ergebnisse aus 20 A wurde gemessen. Die Balkendiagramme stellen jeweils den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Der Standardabweichung wurde in Form des SEM dargestellt.

4.2.3 *In vivo* Bindung von REST und HDAC1 an das *GluR2*-Gen

Obwohl *GluR2* als REST-reguliertes Gen beschrieben wurde (Kuwabara et al., 2004; Huang et al., 1999; Myers et al., 1998), konnten Hohl und Thiel (2005) die Expression des *GluR2*-Gens durch Verwendung der dominant-positiven Mutante DP-REST:ER weder in neuronalen SN56 noch in neuroendokrinen oder pankreatischen Zellen auslösen. Dies zeigt, dass die Regulation der Zielgene von REST in einer zelltypspezifischen Art und Weise abläuft. Um nun herauszufinden, ob REST die Genexpression von *GluR2* in U87MG Glioblastomazellen reguliert, wurde zunächst mittels ChIP-Analysen untersucht, ob REST an seine Bindestelle NRSE auf dem *GluR2*-Gen gebunden war. Es wurde neben der Bindung von REST auch die Bindung von HDAC1 an das *GluR2*-Gen untersucht (Abbildung 21). Die Ergebnisse des ChIPs zeigen, dass REST und HDAC1 auch in SH-SY5Y Neuroblastomazellen, in HaCaT Keratinozyten und in HepG2 Hepatomazellen an das *GluR2*-Gen gebunden waren. Die Bindung von REST und HDAC1 an die DNA des *GluR2*-Gens in den verschiedenen Zelllinien konnte erfolgen, obwohl das chromosomale Umfeld von *GluR2* und die Reaktion auf den Histondeacetylasehemmer TSA so unterschiedlich waren (Abbildung 20). REST und HDAC1 hatten in keiner der Zelllinien an den regulatorischen Bereich des *GFAP*-Gens gebunden.

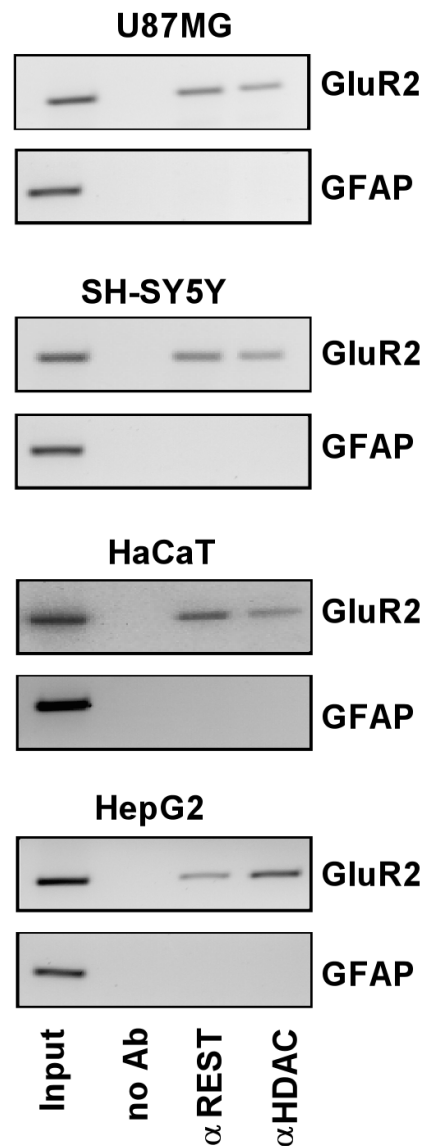


Abbildung 21: Bindung von REST und HDAC1 an das *GluR2*-Gen in verschiedenen Zelllinien

Um die Bindung von REST und HDAC1 an die regulatorischen Regionen des *GluR2*-Gens und des *GFAP*-Gens zu untersuchen, wurden ChIP-Analysen durchgeführt. Die DNA der verschiedenen Zellen wurde mit gebundenen Proteinen vernetzt, das Chromatin wurde mittels Ultraschall zerkleinert. Es wurden Antikörper verwendet, die gegen REST und gegen HDAC1 gerichtet waren. Immunopräzipitierte Chromatinfragmente wurden mit spezifischen Primern amplifiziert, die die REST Bindestelle auf dem *GluR2*-Gen und die regulatorische Region des *GFAP*-Gens umspannten. Als Positivkontrolle wurde ein Aliquot des gesamten Chromatins, das nicht immunopräzipitiert wurde, in der PCR eingesetzt (Input), als Negativkontrolle diente mit Protein A Sepharose aber ohne Antikörper behandeltes Chromatin.

4.2.4 *GluR2* ist ein REST-responsoives Gen in U87MG Zellen

Die Mutante von REST, DP-REST:ER, konnte die Expression verschiedener neuronaler Gene in humanen neuralen Stammzellen (Abbildung 17) und in neuronalen und neuroendokrinen Zellen (Hohl und Thiel, 2005) aktivieren. Um feststellen zu können, ob DP-REST:ER in der Lage war, die Expression von *GluR2* in den Glioblastomazellen U87MG zu verstärken, wurden diese Zellen mit einem für DP-REST:ER kodierenden rekombinanten Retrovirus infiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem für die Puromycinacetyltransferase (*pac*) kodierenden Retrovirus infiziert. Die Zellen, die die Transgene exprimierten, wurden im Folgenden als U87MG*pac* und U87MG DP-REST:ER Zellen bezeichnet (Abbildung 22). Die gleiche Prozedur erfolgte mit den Hepatomazellen HepG2, welche kein *GluR2* exprimierten und folglich eine optimale Kontrolle darstellten. Diese stabilen Zellen wurden von Gerald Thiel hergestellt.

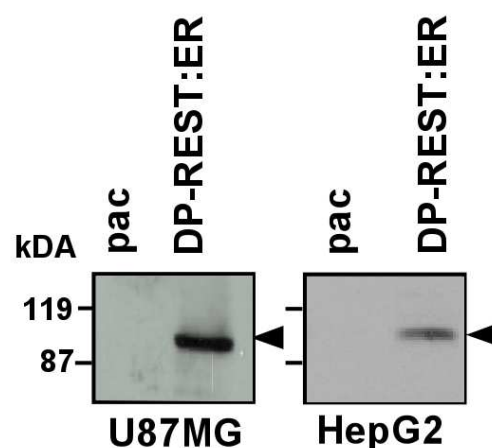


Abbildung 22: Expression von DP-REST:ER in U87MG und in HepG2 Zellen

Aus den infizierten U87MG und HepG2 Zellen wurden Kernextrakte hergestellt. Diese wurden mit Antikörpern, die gegen das Flag-Epitop gerichtet waren, im Western Blot untersucht. Eine Detektion des Flag-Epitops war nur in den U87MG DP-REST:ER und in den HepG2 DP-REST:ER Zellen möglich, die Puromycinacetyltransferase (*pac*) exprimierenden Zellen dienten hier als Kontrolle.

4.2.4.1 Bindung von DP-REST:ER an das *GluR2*-Gen in vivo

Um die *in vivo* Bindung von DP-REST:ER an das *GluR2*-Gen untersuchen zu können, wurden ChIPs mit DP-REST:ER exprimierenden U87MG Zellen durchgeführt. Das Chromatin von stimulierten und unstimulierten Zellen wurde mit den an der DNA gebundenen Proteinen vernetzt und mit Ultraschall zerkleinert. Anschließend erfolgte die Immunopräzipitation mit M2-Agarose. Die präzipitierte DNA wurde mit spezifischen Primern, die das NRSE auf dem *GluR2*-Gen umspannten, amplifiziert. Aktiviertes DP-REST:ER war in den U87MG DP-REST:ER Zellen an das *GluR2*-Gen gebunden (Abbildung 23). In unstimulierten U87MG Zellen konnte DP-REST:ER nicht an das für GluR2 kodierende Gen binden; folglich maskiert das Hitzeschockprotein HSP90 in unstimulierten Zellen nicht nur die VP16 Aktivierungsdomäne von DP-REST:ER, sondern auch die DNA-Bindedomäne des Proteins. Weitere Untersuchungen (unveröffentlichte Daten) haben gezeigt, dass in HepG2 Zellen das aktivierte DP-REST:ER nicht an das *GluR2*-Gen binden konnte. Hier befand sich das für GluR2 kodierende Gen in einer geschlossenen, für Transkriptionsfaktoren unzugänglichen chromosomalen Umgebung, so dass das aktivierte DP-REST:ER im Gegensatz zum endogenen REST (Abbildung 21) keinen Zugang zur DNA hatte.



Abbildung 23: Bindung von DP-REST:ER an das *GluR2*-Gen in vivo

U87MG DP-REST:ER Zellen wurde 24 Stunden lang mit oder ohne 4-OHT behandelt. Das präparierte Chromatin der Zellen wurde mit M2-Agarose inkubiert, bei der der gegen das Flag-Epitop gerichtete Antikörper an Agarose gekoppelt war. Die präzipitierte DNA wurde mit spezifischen Primern, die das NRSE auf dem *GluR2*-Gen umspannten, amplifiziert. Als Positivkontrolle diente der Input, die Negativkontrolle stellte ein Aliquot des gesamten Chromatins dar, das mit Protein A Sepharose behandelt wurde, dem aber kein Antikörper zugegeben wurde.

4.2.4.2 Verstärkte *GluR2*-Genexpression durch die Mutante von REST

Um zu überprüfen, ob DP-REST:ER die Expression von *GluR2* in den Zellen beeinflussen konnte, wurden DP-REST:ER exprimierende U87MG Zellen und HepG2 Zellen 24 Stunden lang mit 4-OHT stimuliert. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert und revers transkribiert. Die erhaltene cDNA wurde mit spezifischen Primern amplifiziert. Die Expression des *GluR2*-Gens konnte in den Gliomazellen mittels der dominant-positiven REST-Mutante verstärkt werden. In den Hepatomazellen konnte die Mutante DP-REST:ER jedoch auch nach Aktivierung durch 4-OHT die *GluR2*-Genexpression nicht auslösen (Abbildung 24 A).

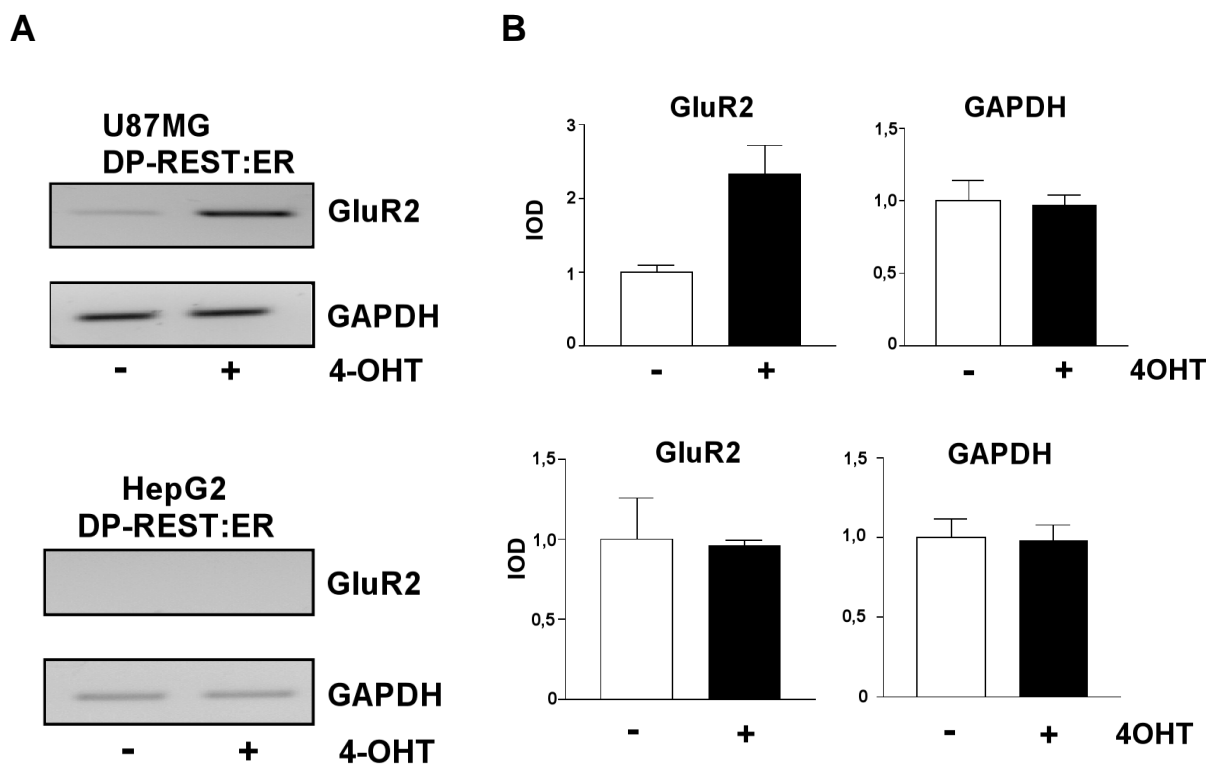


Abbildung 24: Verstärkung der *GluR2*-Genexpression durch die dominant-positive Mutante DP-REST:ER

A. U87MG DP-REST:ER und HepG2 DP-REST:ER Zellen wurden 24 Stunden lang mit $1\mu\text{M}$ 4-OHT (+) oder mit Ethanol (-) kultiviert. Die RNA der Zellen wurde isoliert und revers transkribiert. Die cDNA wurde mit spezifischen Primern amplifiziert. Als Kontrolle wurde die Expression von GAPDH analysiert.

B. Quantifizierung und statistische Auswertung der Daten

Die Bandenintensität aus drei unterschiedlichen Experimenten wurde gemessen und ausgewertet. Die Balkendiagramme stellen jeweils den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Standardabweichung wurde in Form des SEM dargestellt.

4.2.4.3 Transkription eines *GluR2* *Luziferase* Reportergens durch die Mutante von REST

Die aktivierte Mutante von REST konnte die Expression des *GluR2*-Gens in U87MG Gliomazellen verstärken. Nun wurde der Einfluss von DP-REST:ER auf die Transkription eines durch den *GluR2*-Promotor kontrollierten *Luziferase*-Gens untersucht. Um die Daten aus 4.2.6 zu bestätigen, wurde mittels lentiviralem Gentransfer ein *Luziferase*-Gen, das unter der Kontrolle des *GluR2*-Promotors stand, in das Chromatin von U87MG DP-REST:ER Zellen inseriert. Als Kontrolle wurde außerdem ein unter der Kontrolle des Ubiquitinpromotors stehendes *Luziferase*-Reportergen (pFUWluc, hier als mock bezeichnet) in das Chromatin der Zellen eingebracht. Die U87MG DP-REST:ER Zellen wurden mit 4-OHT (1 μ M) stimuliert. Nach 24 Stunden wurden Ganzzellextrakte präpariert, und es wurde die Luziferaseaktivität gemessen. Die Aktivierung der Mutante konnte die Transkription des Reportergens um das 2,8 fache steigern. U87MG DP-REST:ER Zellen, bei denen das *Luziferase*-Gen nicht unter der Kontrolle des *GluR2*-Promotors stand, zeigten nach Stimulation mit 4-OHT keine transkriptionelle Aktivierung des Reportergens (Abbildung 25).

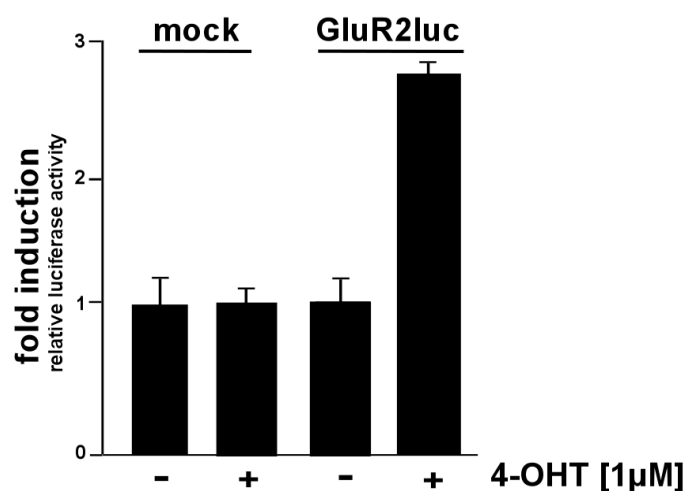


Abbildung 25: DP-REST:ER aktiviert die Transkription des *Luziferase*-Gens in den U87MG DP-REST:ER Zellen

U87MG DP-REST:ER Zellen wurden mit einem für ein *GluR2*-Promotor/*Luziferase*-Gen kodierenden Lentivirus infiziert. Die Zellen wurden mit 4-OHT (1 μ M) oder mit dem Lösungsmittel Ethanol stimuliert. Als Kontrolle wurden mock infizierten Zellen analysiert. Nach 24 Stunden wurden Ganzzellextrakte hergestellt, die Luziferaseaktivitäten der einzelnen Proben gemessen und über deren Proteinkonzentrationen normalisiert (relative Luziferaseaktivität (RLU)/ μ g Protein). Der Versuch wurde in vierfacher Ausführung durchgeführt, um eine statistische Auswertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

4.2.5 Reduktion der Expression von GluR2 durch eine Überexpression von REST

Aus den bisherigen Ergebnissen hat sich die Frage gestellt, welche Auswirkungen eine Überexpression von REST auf die GluR2 Expression haben könnte. U87MG Zellen wurden von Gerald Thiel mit einem rekombinanten Retrovirus infiziert, der für ein Flag-REST Protein kodierte. In Abbildung 26 A ist die Expression von Flag-REST in den U87MG im Western Blot dargestellt. Um agieren zu können, muss das Flag-REST Protein an das NRSE des *GluR2*-Gens binden. ChIP-Experimente konnten zeigen, dass Flag-REST an das NRSE im *GluR2*-Gen der U87MG Wildtyp (wt) und der U87MG Flag-REST Zellen gebunden hatte (Abbildung 26 B).

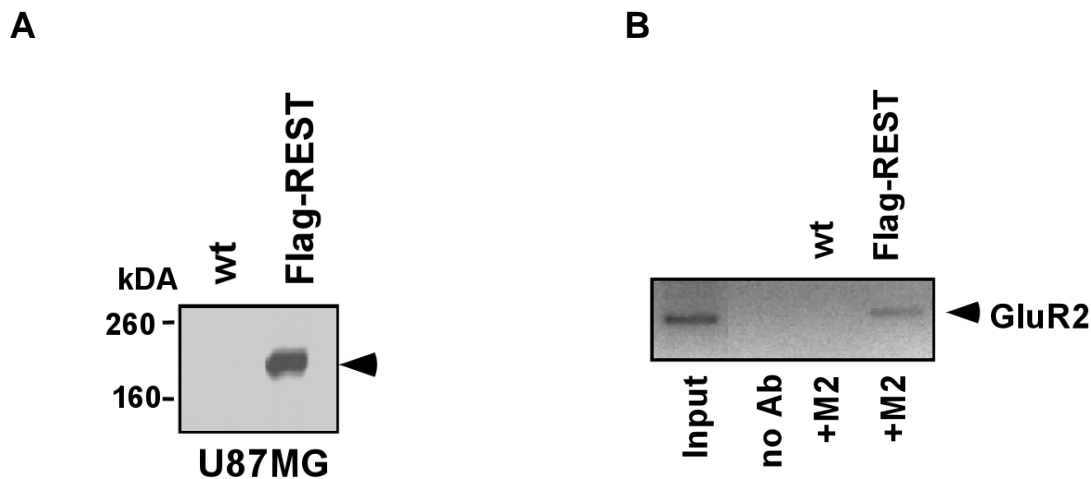


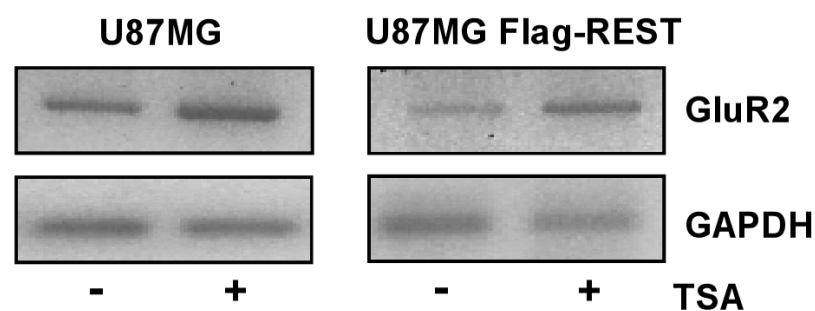
Abbildung 26: Überexpression von REST in U87MG Zellen

A. Es wurden Kernextrakte aus U87MG wt und U87MG Flag-REST Zellen hergestellt. Western Blot Analysen mit einem gegen das Flag-Epitop gerichteten Antikörper zeigen, dass das Protein Flag-REST in den Zellen exprimiert wurde.

B. Es wurden ChIP-Analysen durchgeführt, um die Bindung von Flag-REST an das NRSE auf dem *GluR2*-Gen zu untersuchen. Das Chromatin der Zellen wurde mittels Ultraschall zerkleinert und mit M2-Agarose präzipitiert. Als Kontrolle dienten U87MG Zellen. Die Negativkontrolle wurde durch die no Ab Probe und die Positivkontrolle durch die Input-Probe dargestellt. Die immunopräzipitierte DNA wurde mit spezifischen Primern, die das NRSE auf dem *GluR2*-Gen umspannen, amplifiziert.

In Abbildung 20 konnte gezeigt werden, dass in U87MG Zellen die *GluR2*-Genexpression durch den Acetylierungsgrad der Histone reguliert wurde. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob auch bei einer verstärkten Expression von REST eine Hemmung von HDACs die *GluR2*-Genexpression verstärken konnte. U87MG und U87MG Flag-REST Zellen wurden mit TSA inkubiert, die RNA der Zellen wurde isoliert und es wurden RT-PCRs durchgeführt. Abbildung 27 zeigt, dass eine verstärkte Expression von REST den Expressionslevel von *GluR2* in U87MG Zellen reduzieren konnte, durch eine verstärkte Acetylierung der Histone konnte aber auch in den REST überexprimierenden Zellen die *GluR2*-Genexpression erhöht werden (Abbildung 27).

A



B

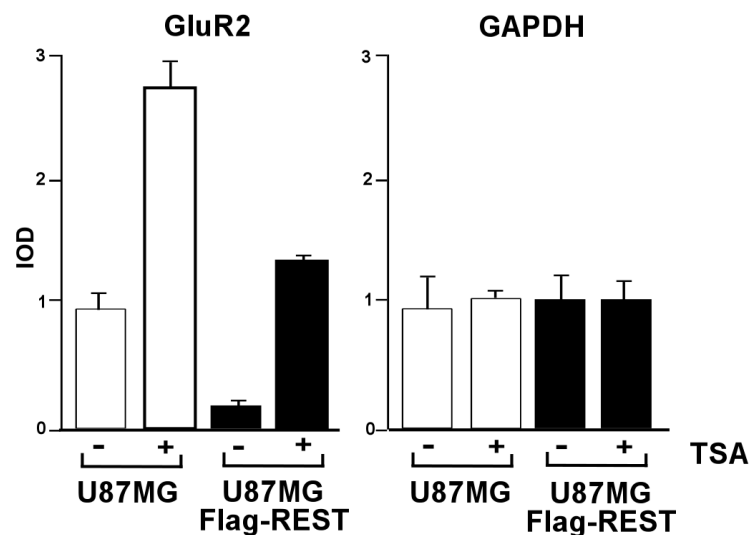


Abbildung 27: Verstärkte *GluR2*-Genexpression durch eine TSA-Behandlung in U87MG Flag-REST Zellen

A. U87MG und U87MG Flag-REST Zellen wurden 24 Stunden lang mit 100 ng/ml TSA (+) oder mit dem Lösungsmittel DMSO (-) behandelt. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert und eine RT-PCR durchgeführt.

B. Quantifizierung und statistische Auswertung der Daten. Die Bandenintensität der DNA im Agarosegel aus drei unterschiedlichen Experimenten wurde gemessen und der Mittelwert in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Die Standardabweichung wurde in Form des SEM dargestellt.

4.2.6 Regulation des *GluR2*-Gens in U87MG Zellen durch den Transkriptionsfaktor Sp1

Sp1 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription vieler Gene aktiviert, und an spezifische GC-reiche DNA-Sequenzen verschiedener Gene bindet. Bindestellen für Sp1 sind in vielen REST-regulierten Genen zu finden (Plaisance et al., 2005). Verschiedene Untersuchungen der letzten Jahre haben dem Transkriptionsfaktor Sp1 eine Rolle bei der Expression von REST-regulierten Genen zugeordnet (Myers et al., 1998; Plaisance et al., 2005; Park et al., 2007). Aus diesem Grunde hat sich die Frage gestellt, welche Bedeutung Sp1 bei der Expression des *GluR2*-Gens in den U87MG Gliomazellen hat.

Chromatinimmunopräzipitationsexperimente haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Sp1 an das *GluR2*-Gen gebunden hatte (Abbildung 28).

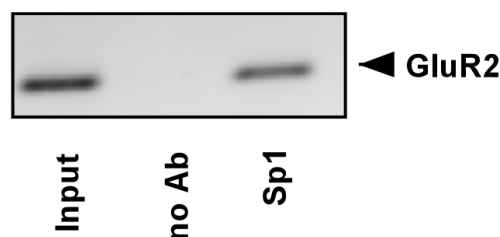


Abbildung 28: Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 an das *GluR2*-Gen

Es wurden ChIP-Analysen durchgeführt, um die Bindung von Sp1 an seine Bindestelle auf dem *GluR2*-Gen zu untersuchen. Hierzu wurde das Chromatin der Zellen präpariert und mit einem gegen Sp1 gerichteten Antikörper inkubiert. Als Negativkontrolle diente die no Ab Probe, die Input Probe stellte ein Aliquot des gesamten Chromatins dar und wurde als Positivkontrolle verwendet. Die präzipitierte DNA wurde mit Primern amplifiziert, die das NRSE auf dem *GluR2*-Gen umspannten und sehr nahe an der Sp1 Bindestelle lagen.

Um die Funktion einer Bindung von Sp1 an das *GluR2*-Gen analysieren zu können, wurde eine dominant-negative Mutante von Sp1 verwendet. Dieser Mutante fehlte die N-terminale Aktivierungsdomäne von Sp1. Da die Mutante aber die als DNA-Bindedomäne fungierenden Zinkfinger des endogenen Sp1 enthielt, konnte sie mit diesem um die Bindung an die DNA konkurrieren. Um den Eintritt des Proteins in den Zellkern zu ermöglichen, wurde im N-terminalen Bereich eine Kernlokalisationssequenz (NLS) angefügt. Sp1 Δ N enthielt außerdem ein Flag-Epitop, was den immunologischen Nachweis des Proteins in lentiviral infizierten Zellen ermöglichte (Abbildung 30). Um die biologische Aktivität von Sp1 Δ N zu testen, wurden Reporteranalysen durchgeführt. Hierzu wurden U87MG Zellen mit einem Lentivirus infiziert, bei dem das *Luziferase*-Gen unter der Kontrolle des HIV LTR Promotors stand. Außerdem wurden die Zellen mit einem für Sp1 Δ N und mit einem für einen Leervektor (mock) kodierenden

Lentivirus infiziert. RT-PCR Analysen zeigen, dass die Mutante Sp1 Δ N die Transkription des *GluR2*-Gens in U87MG Zellen stark reduzieren konnte (Abbildung 30 B, C). Vergleicht man die Luziferaseaktivitäten in mock infizierten und in Sp1 Δ N infizierten Zellen, ist zu sehen, dass auch die Expression des Reportergens durch Sp1 Δ N sehr stark vermindert wurde (Abbildung 30 D).

A

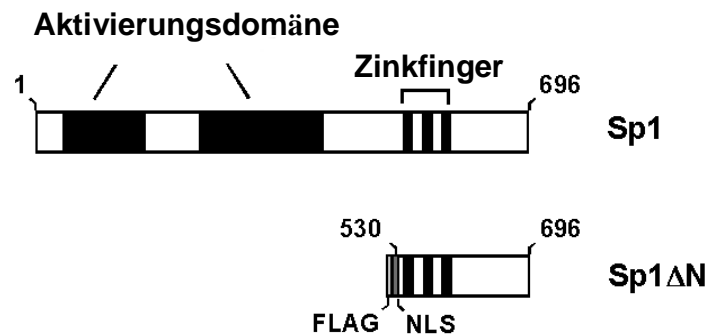


Abbildung 29 A: Schematische Darstellung von Sp1 Δ N und von dem Provirus

A. Das endogene Sp1 enthält neben der Aktivierungsdomäne die aus Zinkfingern bestehende DNA-Bindedomäne. Der Mutanten Sp1 Δ N fehlt die Aktivierungsdomäne, sie enthält jedoch eine Kernlokalisationssequenz (NLS) und ein dem immunologischen Nachweis dienendes Flag-Epitop.

B

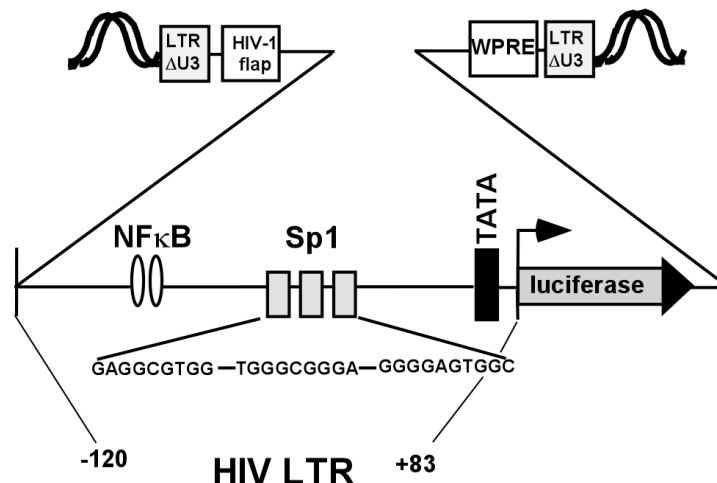


Abbildung 29 B: Modulare Struktur des integrierten Provirus, der für ein HIV LTR/Luziferase Reporter gen kodiert

Der Transfervektor pFWHIVLTRluc enthält die HIV LTR Promotorregion von -120 bis +83. In diesem Bereich befinden sich zwei NF κ B und drei Sp1 Bindestellen. Hinter der TATA-Box wurde ein für Luziferase kodierendes Gen angefügt.

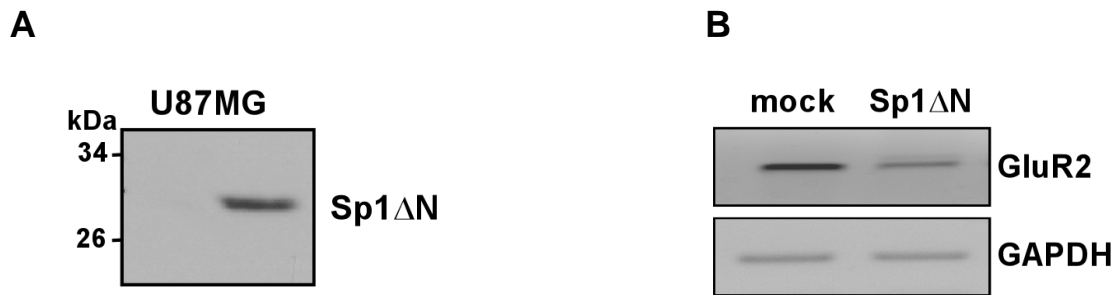


Abbildung 30: Die Expression einer dominant-negativen Mutante von Sp1 hemmt die Expression Sp1 regulierter Gene

A. U87MG Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für Sp1ΔN kodieren. Als Kontrolle dienten mock infizierte Zellen. Kernextrakte wurden präpariert und das Transgen mittels spezifischer Antikörper, die gegen das Flag-Epitop gerichtet waren, im Western Blot detektiert.

B. U87MG Zellen wurden mit einem Leervektor (mock) oder mit einem für Sp1ΔN kodierenden Lentivirus infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurde die RNA der Zellen isoliert, und es wurden RT-PCR Analysen durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Expression des *GAPDH*-Gens in mock infizierten und in Sp1ΔN infizierten Zellen untersucht.

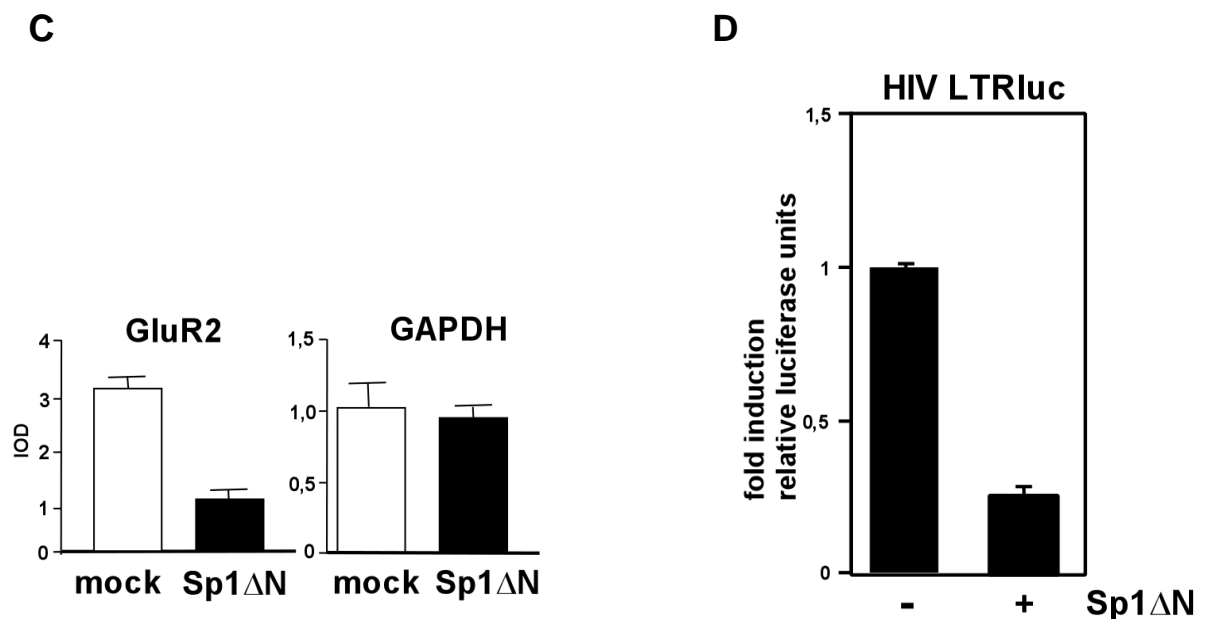


Abbildung 30 C: Die Bandenintensität der DNA im Agarosegel aus drei unterschiedlichen Experimenten wurde gemessen und der Mittelwert in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Die Standardabweichung wird in Form des SEM gezeigt.

Abbildung 30 D: U87MG Zellen wurden mit einem für das HIV LTR *Luziferase*-Gen kodierenden Lentivirus infiziert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit einem Leervektor oder mit einem für Sp1ΔN kodierenden Lentivirus infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und Ganzzellextrakte hergestellt. Die gemessene Luziferaseaktivität wurde an der Proteinkonzentration der Proben normalisiert.

4.2.7 Die Transkriptionsfaktoren REST und Sp1 agieren in U87MG Zellen unabhängig voneinander

In früheren Untersuchungen haben Plaisance et al. (2005) gezeigt, dass einerseits eine Hemmung der Expression von REST Zielgenen auch die Hemmung des Transkriptionsfaktors Sp1 voraussetzt und, dass andererseits eine Überexpression von REST die transkriptionelle Aktivität von Sp1 hemmen konnte. Um nun herauszufinden, welche Bedeutung Sp1 bei der Transkriptionsrepression durch REST zugesprochen werden kann, wurde in dieser Arbeit in U87MG und in U87MG Flag-REST Zellen mittels lentiviralem Gentransfer die Mutante Sp1 Δ N exprimiert. Reporteranalysen zeigten, dass die Transkription eines HIV LTR *Luziferase*-Reportergens unabhängig von der REST-Konzentration durch Sp1 Δ N gehemmt wurde (Abbildung 31 A). Ähnliche Beobachtungen wurden gemacht, wenn ein *Luziferase*-Reportergen unter der Kontrolle des GluR2-Promotors selbst stand. Auch in diesem Fall wurde sowohl in U87MG Zellen als auch in U87MG Flag-REST Zellen die Transkription des *Luziferase*-Reportergens bei Expression der Mutante Sp1 Δ N reduziert (Abbildung 32).

Die Expression des *GluR2*-Gens wird in U87MG Zellen durch ein Gleichgewicht von Histonacetylasen und Histondeacetylasen reguliert (Abbildung 20). Auch in Zellen, die den Transkriptionsrepressor REST überexprimieren, wurde das *GluR2*-Gen verstärkt exprimiert, wenn die Histondeacetylasen mittels TSA gehemmt wurden (Abbildung 27). RT-PCR Analysen zeigen, dass eine Hemmung von Sp1 keinen Einfluss auf die Induzierbarkeit der Genexpression von *GluR2* hat, wenn die Histondeacetylasen mittels TSA gehemmt wurden (Abbildung 31 B, C). Wie in den U87MG Zellen konnte auch in U87MG Flag-REST Zellen eine verstärkte Acetylierung der Histone die Expression des *GluR2*-Gens verstärken.

A

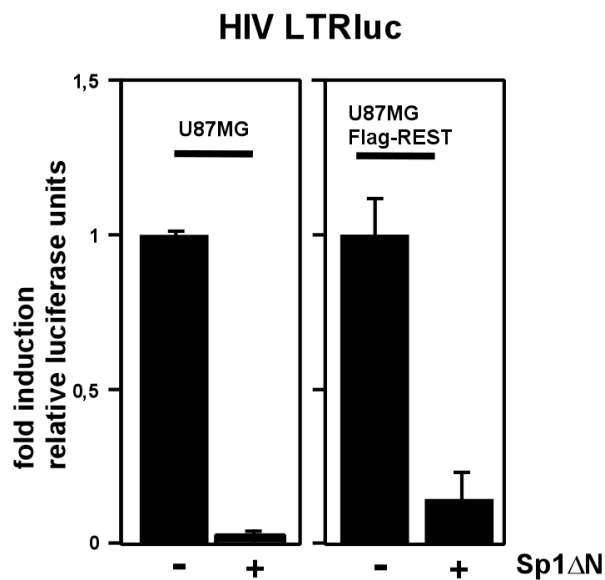


Abbildung 31 A: Der Transkriptionsfaktor Sp1 spielt keine Rolle bei der TSA induzierten Expression des *GluR*-Gens in U87MG Zellen

U87MG und U87MG Flag-REST Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, der für ein *Luziferase*-Gen kodiert, das unter der Kontrolle des HIV LTR Promotors steht. Gleichzeitig wurden die Zellen mit einem Leervektor (mock) oder mit einem für Sp1ΔN kodierenden Lentivirus infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und Ganzzellextrakte hergestellt. Die gemessene Luziferaseaktivität wurde an der Proteinkonzentration normalisiert.

B

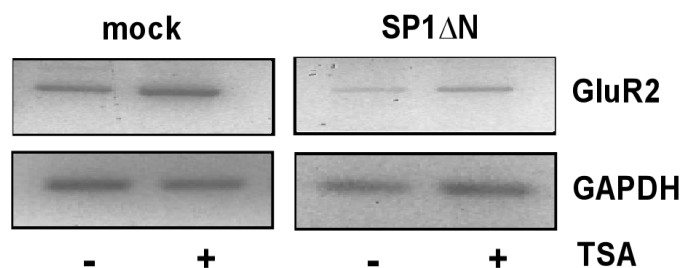


Abbildung 31 B: U87MG Flag-REST Zellen wurden mit einem für die dominant-negative Mutante von Sp1 (Sp1ΔN) oder für den Leervektor (mock) kodierenden Lentivirus infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit (+) TSA in einer Konzentration von 100ng/ml oder mit dem Lösungsmittel DMSO stimuliert. Nach 24 Stunden wurde die RNA der Zellen isoliert und revers transkribiert. RT-PCR Analysen wurden durchgeführt, um die *GluR2*-Genexpression zu ermitteln.

C

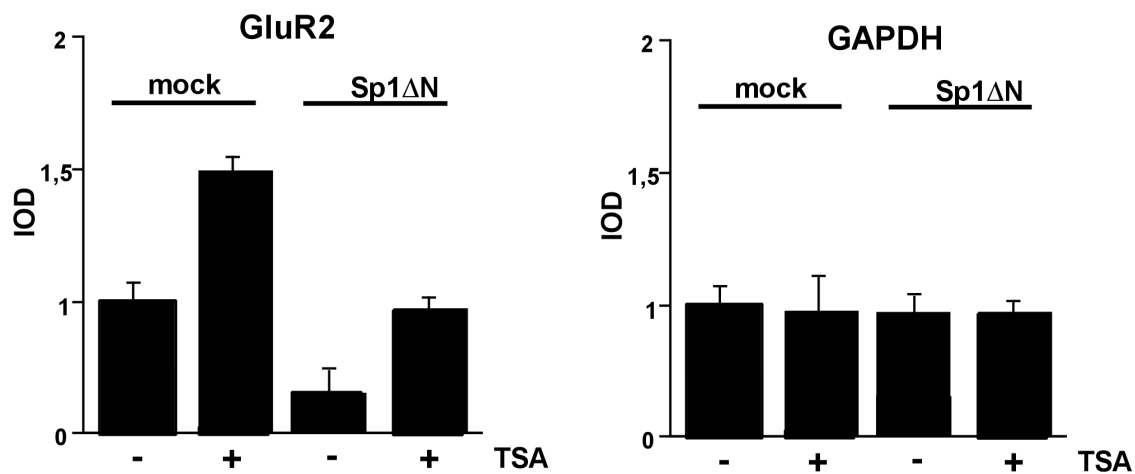


Abbildung 31 C: Quantifizierung und statistische Analyse der RT-PCR Daten

Die Bandenintensität der DNA aus drei unterschiedlichen Experimenten wurde gemessen und der Mittelwert in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Die Standardabweichung wurde in Form des SEM gezeigt.

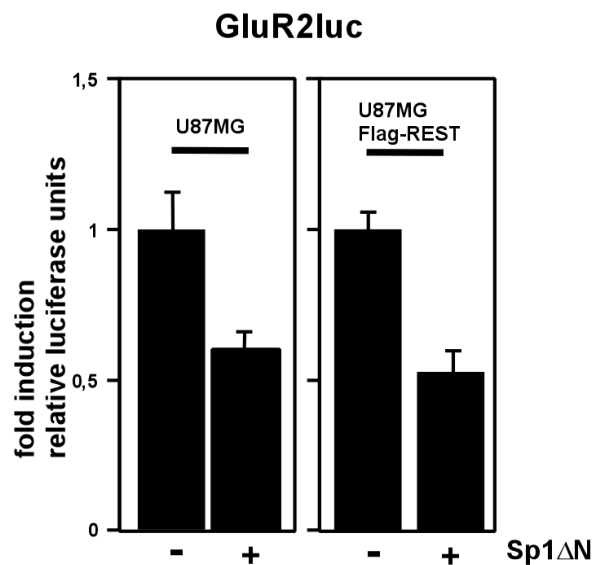


Abbildung 32: Sp1 reguliert die Genexpression von *GluR2* in U87MG Gliomazellen unabhängig von REST

U87MG Zellen und U87MG Flag-REST Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, der für ein *Luziferase*-Gen kodiert, das unter der Kontrolle des *GluR2*-Promotors steht. Gleichzeitig wurden die Zellen mit einem Leervektor (mock) oder mit einem für *Sp1ΔN* kodierenden Lentivirus infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und Ganzzelextrakte hergestellt. Die gemessene *Luziferase*aktivität wurde an der Proteinkonzentration normalisiert.

4.3 Regulation der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* in den retinalen Vorläuferzellen R28 durch den Transkriptionsfaktor REST

Da die Rolle von REST in der Regulation neuronaler Gene im visuellen System bisher noch weitgehend unerforscht ist, war noch nicht bekannt, ob die Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* in Zellen der Retina durch REST reguliert werden.

Die äußere plexiforme Schicht (OPL) der Retina stellt die Verbindung zwischen den synaptischen Enden der Photorezeptoren und den Bipolarzellen dar. Hier erfolgt eine erste Verarbeitung der erzeugten Impulse innerhalb der Retina. Obwohl das Protein Synapsin I eine tragende Rolle bei der Ausschüttung von Neurotransmittern spielt (Rosahl et al., 1993), konnte in der OPL der Retina der Ratte kein Synapsin I detektiert werden (von Kriegstein et al., 1999). Im Gegensatz hierzu ist Synaptophysin in den terminalen Bereichen der Photorezeptoren des OPL aber auch in denen der inneren plexiformen Schicht (IPL) zu finden (Brandstätter et al., 1996).

Um die Regulation der für die synaptischen Vesikelproteine Synapsin I und Synaptophysin kodierenden Gene im visuellen System zu untersuchen, wurde die Expression dieser beiden Gene in der retinalen Vorläuferzellen R28 aus der Ratte untersucht. R28 sind Ganglienzelle. Sie bilden als Ausgang aus der Retina den Sehnerv und stellen ein ideales Modellsystem für retinale Vorläuferzellen dar.

4.3.1 Epigenetische Konfiguration der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* in den retinalen Vorläuferzellen R28

Um einen ersten Einblick in die Regulation der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* in der retinalen Vorläuferzelle R28 zu bekommen, wurde die epigenetische Konfiguration dieser Gene untersucht. Hierbei wurde durch Analyse des Methylierungsstatus des Lysinrests 9 und des Lysinrests 4 am Histon H3 zwischen reprimiertem und aktiv transkribiertem Chromatin unterschieden. Es wurden ChIP-Analysen durchgeführt, wobei Antikörper verwendet wurden, die entweder gegen den dreifach methylierten Lysinrest 4 oder gegen den zweifach methylierten Lysinrest 9 am Histon H3 gerichtet waren. Die präzipitierte DNA wurde mit spezifischen Primern amplifiziert, die so gelegt wurden, dass sie auf den Genen *Synapsin I* und *Synaptophysin* den Bereich umfassten, der die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor REST auf der DNA enthielt (Abbildung 33 A). Die Ergebnisse der Chromatinimmunopräzipitation zeigen, dass in R28 Zellen

die Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* in dem Bereich, wo die REST-Bindestelle liegt, durch eine dreifache Methylierung des Lysinrests 4 am Histon H3 gekennzeichnet sind (Abbildung 33 B). Das Chromatin liegt hier demnach in einer offenen, für Transkriptionsfaktoren zugänglichen Form vor. Im Gegensatz dazu liegt in der Fibroblastenzelllinie Rat-1 die Bindestelle für REST auf den Genen *Synapsin I* und *Synaptophysin* in einem chromosomalen kondensierten Bereich, der Lysinrest 9 des Histons H3 ist zweifach methyliert (Abbildung 33 C).

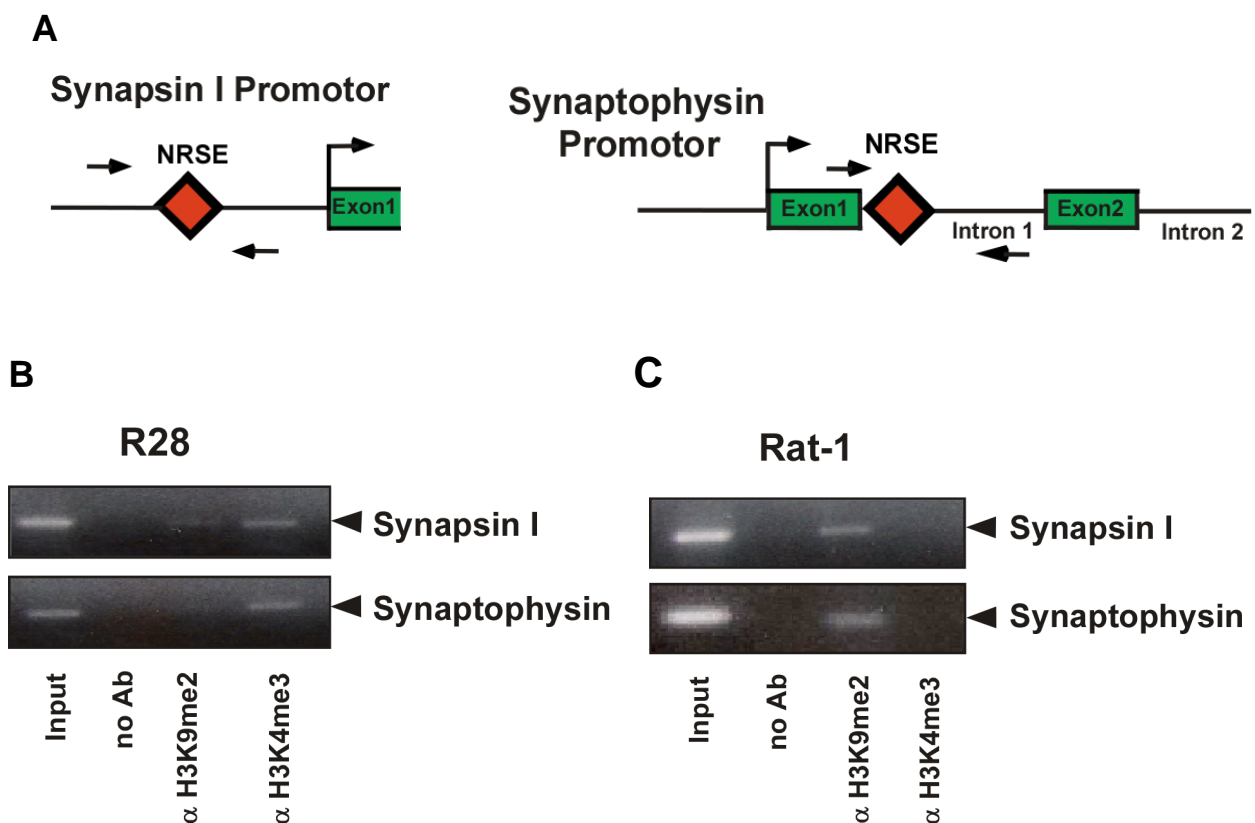


Abbildung 33: Epigenetische Konfiguration der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* in den retinalen Vorläuferzellen R28

A. Schematische Darstellung der 5'-Bereich der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin*. Gezeigt wird Promotorbereich mit Transkriptionsstart und Anfang des Exons 1 des *Synapsin I*-Gens. Die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor REST (NRSE) wird in Form einer Raute, die Primer werden als Pfeile dargestellt. Außerdem ist der Promotorbereich des *Synaptophysin*-Gens zu sehen. Dargestellt sind die Exone 1 und 2 sowie der Transkriptionsstart. Das NRSE liegt im Intron 1, die umfassenden Primer werden als Pfeile dargestellt.

B, C. Es wurden ChIP-Analysen der retinalen Vorläuferzellen R28 und der Fibroblasten Rat-1 mit Antikörpern, die gegen den zweifach methylierten Lysinrest 9 (α H3K9me2) oder gegen den dreifach methylierten Lysinrest 4 des Histons H3 (α H3K4me3) gerichtet waren, durchgeführt. Die präzipitierten DNA Fragmente wurden mit spezifischen Primern amplifiziert. Als Negativkontrolle diente die no Ab Probe, als Positivkontrolle wurde das Input verwendet.

4.3.2 Die Hemmung von Histondeacetylasen erlaubt die Transkription der für Synapsin I und Synaptophysin kodierenden Gene in R28 Zellen

Neben dem Methylierungsstatus spielt auch der Acetylierungsgrad der Histone eine tragende Rolle bei der Regulation der Genexpression (Rice JC und Allis CD, 2001). Um die Histone stärker zu acetylieren, wurden im Folgenden die Histondeacetylasen mittels TSA gehemmt. So sollte analysiert werden, ob durch eine verstärkte Acetylierung der Histone die Transkription der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* in der retinalen Vorläuferzelle R28 ausgelöst werden konnte. Die retinalen Vorläuferzellen R28 wurden 24 Stunden lang mit TSA behandelt. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert und die Genexpression mittels RT-PCR-Analysen untersucht. In Abbildung 34 wird gezeigt, dass durch die Hemmung der Histondeacetylasen die Expression der für Synapsin I und Synaptophysin kodierenden Gene gesteigert werden konnte. Zusätzlich wurde die Expression des *Ribeye*-Gens untersucht. Ribeye ist eines der Hauptproteine der so genannten „synaptic ribbons“, die eine Ansammlung von synaptischen Bläschen darstellen und nur in Nervenzellen des sensorischen Systems zu finden sind (Schmitz et al., 2000). Das Protein Ribeye besteht aus einer A- und einer B-Domäne, wobei die A-Domäne nur in Photorezeptorzellen zu finden ist, die B-Domäne jedoch identisch mit dem transkriptionellen Repressorprotein CtBP2 ist.

Eine Hemmung der Histondeacetylasen durch TSA hat in den R28 Zellen die Expression des *Ribeye*-Gens nicht beeinflusst. In den Rat-1 Fibroblastenzellen wurden die für Synapsin I, Synaptophysin und für die A-Domäne von Ribeye kodierenden Gene auch nach Hemmung der Histondeacetylasen nicht exprimiert. Die B-Domäne des *Ribeye*-Gens wird in Rat-1 Zellen zwar exprimiert, eine Verstärkung der Expression konnte jedoch nach einer Behandlung der Zellen mit TSA nicht induziert werden (Abbildung 35). Demnach wird in Rat-1 Zellen anders als in R28 Zellen die Expression der untersuchten Gene nicht durch den Acetylierungsgrad der Histone reguliert.

A

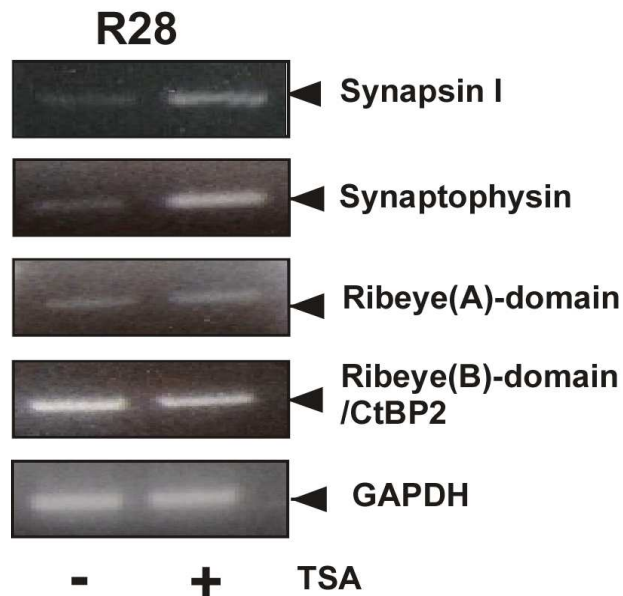


Abbildung 34 A: Verstärkung der Genexpression synaptischer Vesikelproteine nach Hemmung von Histondeacetylasen

R28 Zellen wurden 24 Stunden lang mit TSA (100ng/ml) oder mit DMSO behandelt. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert und RT-PCR Analysen durchgeführt. GAPDH diente als interne Kontrolle, um zu zeigen, dass gleiche Mengen an RNA für die reverse Transkription eingesetzt wurden. Die Abbildung zeigt, dass die Expression der Gene, die für Synapsin I und Synaptophysin kodieren, durch eine Hemmung der Histondeacetylasen verstärkt werden konnte. Dagegen hatte eine Hemmung der Histondeacetylasen keinen Effekt auf die Expression des für das Protein Ribeye kodierenden Gens.

B

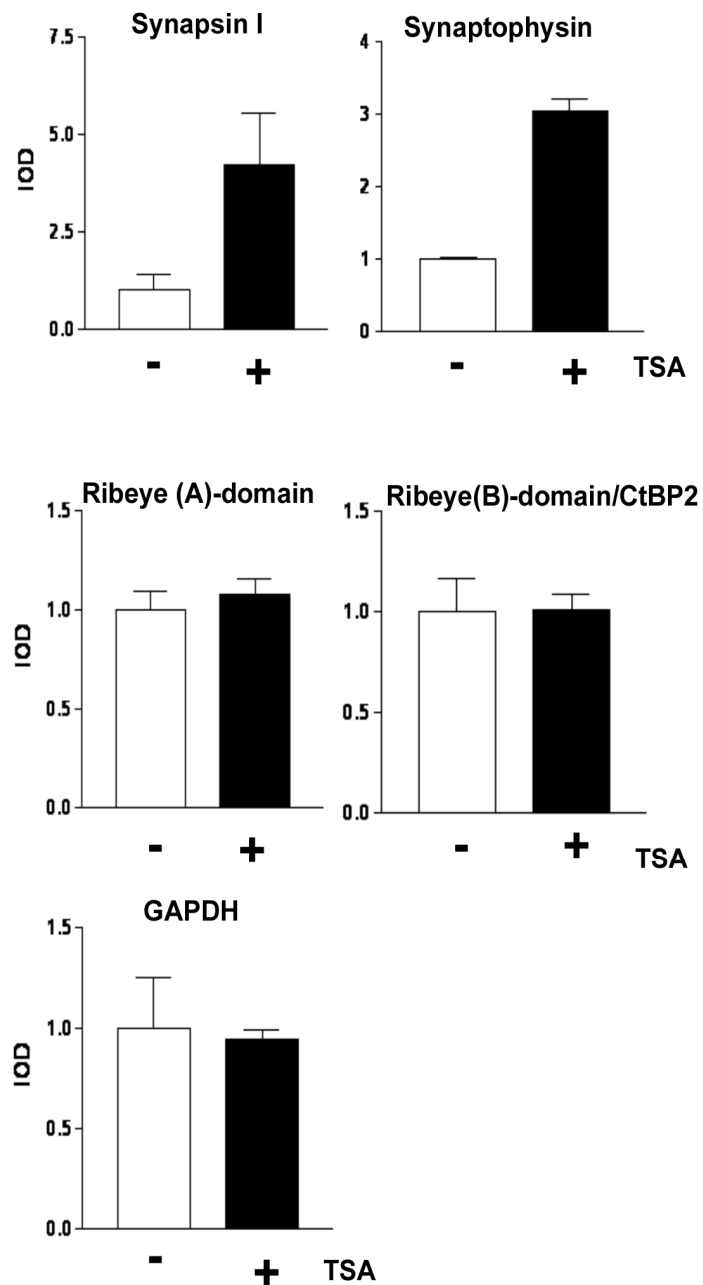


Abbildung 34 B: Quantifizierung und statistische Analyse der RT-PCR Daten

Die Ergebnisse der RT-PCR Daten aus Abbildung 34 A wurden durch Messung der Bandenintensität quantifiziert. Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen dar. Die Standardabweichung wurde in Form des SEM dargestellt.

A

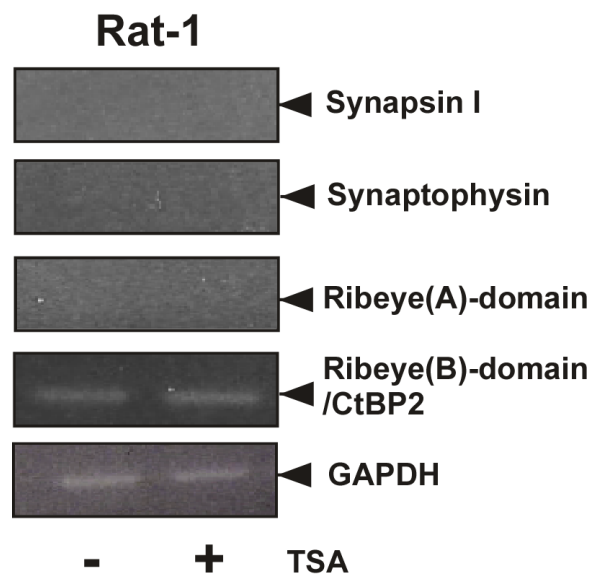


Abbildung 35 A: Hemmung von Histondeacetylasen in Rat-1 Fibroblastenzellen.

Rat-1 Zellen wurden mit TSA (100ng/ml) oder mit dem Lösungsmittel DMSO inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die RNA der Zellen isoliert und RT-PCR Analysen durchgeführt. Es konnte keine Expression der Gene, die für Synapsin I, Synaptophysin oder für die A-Domäne von Ribeye kodieren, induziert werden. Ebenso hatte eine Hemmung von Histondeacetylasen keinen Einfluss auf die Expression des für die B-Domäne von Ribeye kodierenden Gens. Das Expressionsprofil von GAPDH in den stimulierten (+) und in den unstimulierten Zellen (-) zeigt, dass gleiche Mengen an RNA für die reverse Transkription eingesetzt wurden.

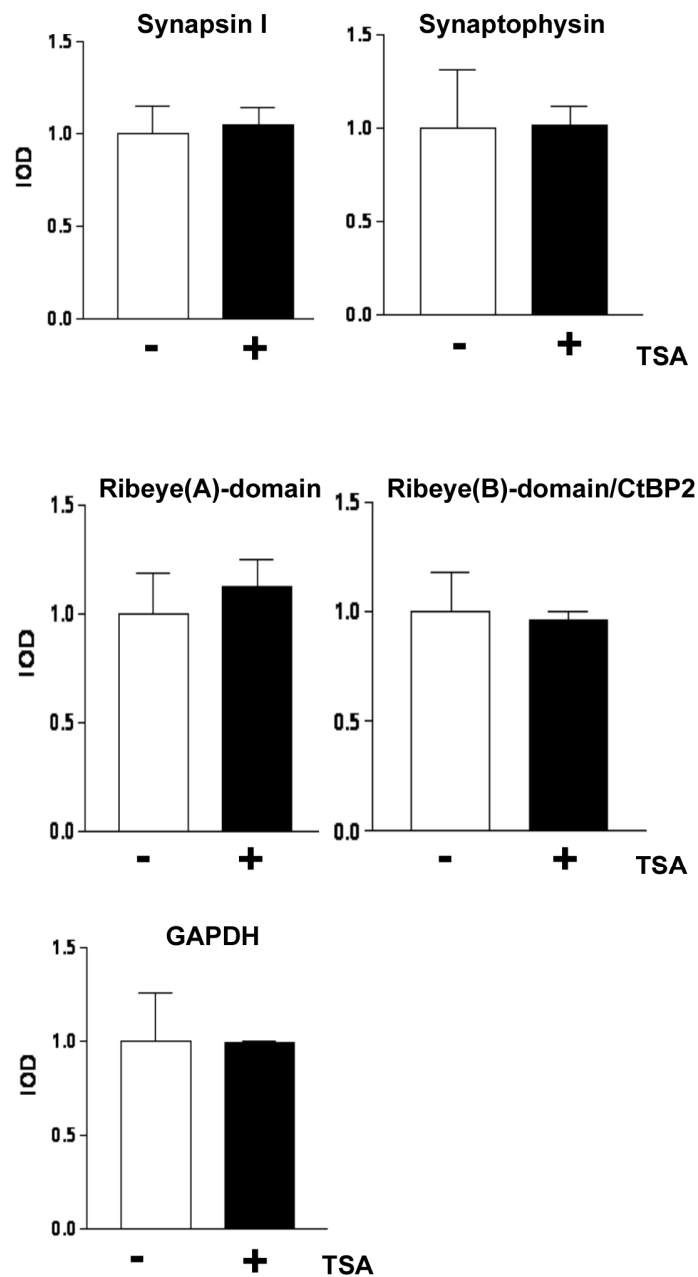
B

Abbildung 35 B: Quantifizierung und statistische Analyse der RT-PCR Daten

Die amplifizierte DNA der stimulierten (+) und der unstimulierten (-) Rat-1 Zellen wurde aufgetragen und die Intensität der DNA-Banden wurde gemessen. Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen dar. Die Standardabweichung wurde in Form des SEM dargestellt.

4.3.3 *In vivo* Bindung von REST an die Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* in R28 Zellen und in Rat-1 Zellen

Es sollte untersucht werden, ob REST an seine DNA-Bindestelle auf den Genen *Synapsin I* und *Synaptophysin* in R28 Zellen bindet. Damit ein Transkriptionsfaktor die Expression eines Gens regulieren kann, ist eine Interaktion mit diesem Voraussetzung. Um diese Interaktion analysieren zu können, wurde eine Chromatinimmunopräzipitation durchgeführt. Die Ergebnisse der Chromatinimmunopräzipitationen, die an den retinalen Vorläuferzellen R28 und den Fibroblastenzellen Rat-1 durchgeführt wurden, zeigen, dass REST in beiden Zelllinien an die DNA der neuronalen Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* gebunden war (Abbildung 36).

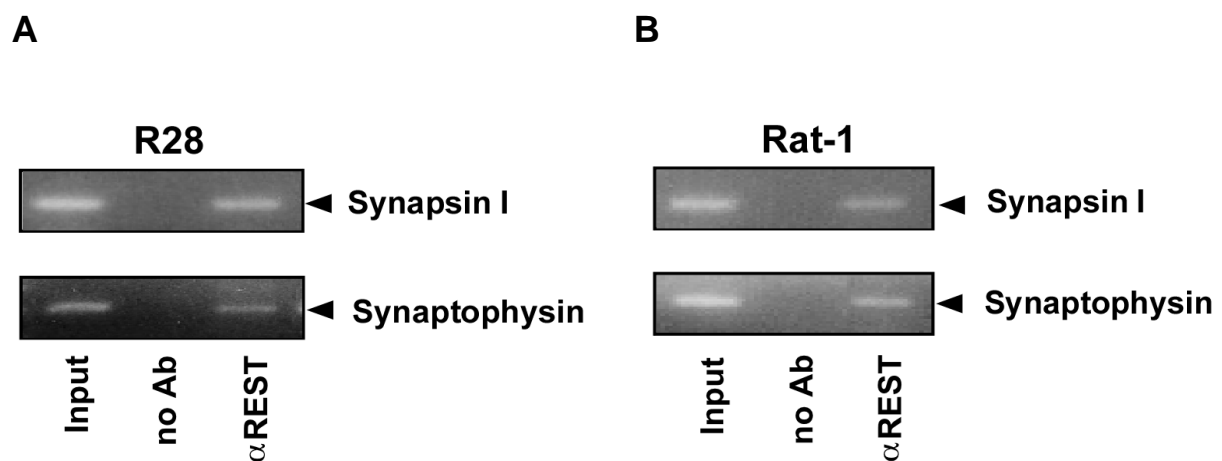


Abbildung 36: *In vivo* Bindung von REST an die Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin*

Chromatin aus R28 Zellen (A) und aus Rat-1 Zellen (B) wurde verwendet, um eine Chromatinimmunopräzipitation durchzuführen. Das Chromatin der Zellen wurde mit den gebundenen Proteine vernetzt, zerkleinert und mit einem Antikörper, der gegen REST gerichtet war, immunopräzipitiert. Als Negativkontrolle diente die no Ab Probe. Sie stellt Chromatin dar, das mit Protein A Sepharose behandelt wurde, dem aber kein Antikörper zugegeben wurde. Die Positivkontrolle stellte ein Aliquot des Inputs dar. Spezifische Primer, die die Bindestelle von REST auf der DNA umspannten, wurden für die PCR eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass in beiden Zelllinien der Transkriptionsfaktor REST an die Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* gebunden war.

4.3.4 Regulation von *Synapsin I* und *Synaptophysin* durch REST in den retinalen Vorläuferzellen R28

4.3.4.1 Expression und Bindung von DP-REST:ER

R28 Zellen wurden von Gerald Thiel mit einem rekombinanten Retrovirus, der für die dominant-positive Mutante von REST, DP-REST:ER, kodiert, infiziert. Als Kontrolle wurden R28 Zellen mit einem Retrovirus infiziert, der für die Puromycinacetyltransferase (pac) kodiert. Da sich im N-terminalen Bereich von DP-REST:ER ein Flag-Epitop befindet, konnte die Expression des Proteins durch Western Blot Analysen immunologisch in den R28DP-REST:ER Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 37).

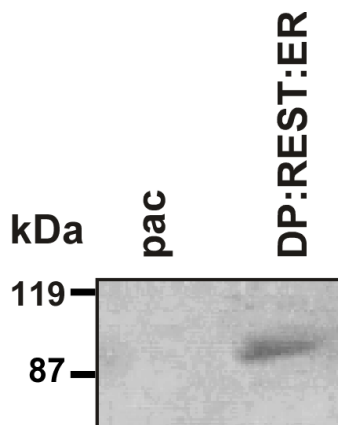


Abbildung 37: Expression von DP-REST:ER in der retinalen Vorläuferzelle R28

Es wurden Kernextrakte aus R28pac und aus R28DP-REST:ER Zellen hergestellt. Western Blot Analysen mit einem gegen das Flag-Tag gerichteten Antikörper zeigten, dass das Protein DP-REST:ER in den R28DP-REST:ER Zellen aber nicht in den R28pac Zellen exprimiert wurde.

In Abbildung 36 wurde gezeigt, dass REST an die DNA der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* in der retinalen Vorläuferzelle R28 gebunden hatte. Um die Expression dieser beiden Gene beeinflussen zu können, muss DP-REST:ER an die Bindestelle des endogenen REST auf der DNA der beiden neuronalen Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* binden. Um die Bindung von DP-REST:ER an die DNA unter physiologischen Bedingungen nachweisen zu können, wurde ein ChIP durchgeführt. R28 Zellen wurden 24 Stunden lang mit 4-OHT stimuliert. Anschließend wurde das Chromatin stimulierter und unstimulierter Zellen mit den gebundenen Proteinen vernetzt, zerkleinert und mit M2-Agarose immunopräzipitiert. In Abbildung 38 ist zu sehen, dass

durch 4-OHT aktiviertes DP-REST:ER an die regulatorische Region der für Synapsin I und Synaptophysin kodierenden Gene bindet. Eine leichte Bindung ist auch in den unstimulierten Zellen zu erkennen.

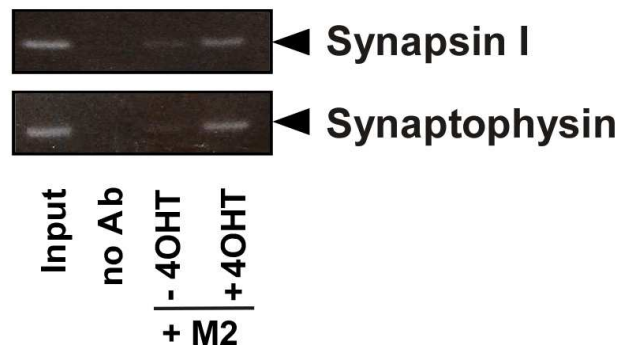


Abbildung 38: Bindung von DP-REST:ER an die Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* in R28 Zellen

Die R28DP-REST:ER Zellen wurden 24 Stunden lang mit 4-OHT (+) in einer Konzentration von 1µM oder mit Ethanol (-) behandelt. Anschließend wurde eine Chromatinimmunopräzipitation durchgeführt. Als Negativkontrolle diente die no Ab Probe. Diese stellt Chromatin aus R28 Zellen dar, die mit 4-OHT stimuliert wurden, denen aber kein Antikörper zugegeben wurde. Ein Aliquot des Input diente als Positivkontrolle.

4.3.4.2 Transkription eines *Synapsin I* Luziferase Reportergens durch die Mutante von REST

Da sowohl die Expression (Abbildung 37) als auch Bindung (Abbildung 38) der Mutante von REST in der retinalen Vorläuferzelle gezeigt werden konnte, wurde im Folgenden überprüft, ob DP-REST:ER auch biologisch aktiv war. Hierzu wurde die Transkription eines *Luziferase*-Gens untersucht, das unter der Kontrolle des Synapsin I Promotors stand. Um testen zu können, ob DP-REST:ER die Transkription von REST-regulierten Genen beeinflussen kann, wurde mittels lentiviralem Gentransfer ein *Luziferase*-Gen, das unter der Kontrolle des Synapsin I Promotors stand, in das Genom von R28 Zellen und R28DP-REST:ER Zellen inseriert. Die R28 Zellen sowie die R28DP-REST:ER Zellen wurden mit 4-OHT stimuliert, nach 24 Stunden wurden Ganzzellextrakte präpariert und die Luziferaseaktivität wurde gemessen. In den R28DP-REST:ER Zellen wurde durch Stimulation der Zellen mit 4-OHT die Transkription des Reportergens um das 4,2 fache gesteigert (Abbildung 39 B).

A

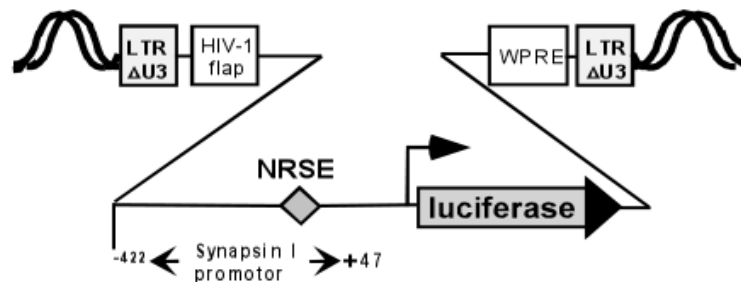
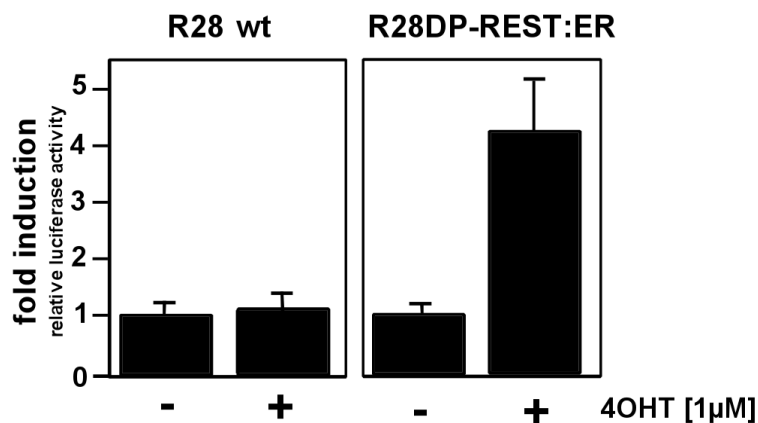


Abbildung 39: Die Mutante DP-REST:ER aktiviert die Transkription des *Luziferase*-Gens in den retinalen Vorläuferzellen R28

A Schematische Darstellung des integrierten Provirus, der für ein Synapsin I-Promotor/*Luziferase*-Reporter gen kodiert. Vor den Transkriptionsstart des *Luziferase*-Gens wurden die Nukleotide -422 bis +47 des humanen *Synapsin I*-Gens inseriert. In diesem Bereich befindet sich die REST-Bindestelle.

B



B: R28wt Zellen und R28DP-REST:ER Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, der für ein Synapsin I Promotor/*Luziferase*-Gen kodiert. Die Zellen wurden mit 4-OHT (1μM) oder mit Ethanol stimuliert. Nach 24 Stunden wurden Ganzzellextrakte hergestellt, die Luziferaseaktivitäten der einzelnen Proben gemessen und über deren Proteinkonzentrationen normalisiert. Der Versuch wurde in vierfacher Ausführung durchgeführt, um eine statistische Auswertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

4.3.4.3 DP-REST:ER verstärkt die Expression der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* in R28 Zellen

Die Mutante DP-REST:ER konnte die Transkription eines Reportergens, das sich unter der Kontrolle des Synapsin I Promotors befand, verstärken. Nun hat sich die Frage gestellt, ob das Protein auch die Transkription der beiden REST-regulierten Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* in den R28 Zellen verstärken konnte. Um dies zu untersuchen, wurden R28DP-REST:ER Zellen 24 Stunden lang mit 4-OHT stimuliert. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert, revers transkribiert und PCR-Analysen durchgeführt. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Expression der Gene, die für die A- und die B-Domäne von Ribeye kodieren, durch aktiviertes DP-REST:ER beeinflusst werden konnte. Während die Expression der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* durch Stimulation der R28DP-REST:ER Zellen gesteigert werden konnte, wurde die Expression des für Ribeye kodierenden Gens nicht beeinflusst (Abbildung 40).

A

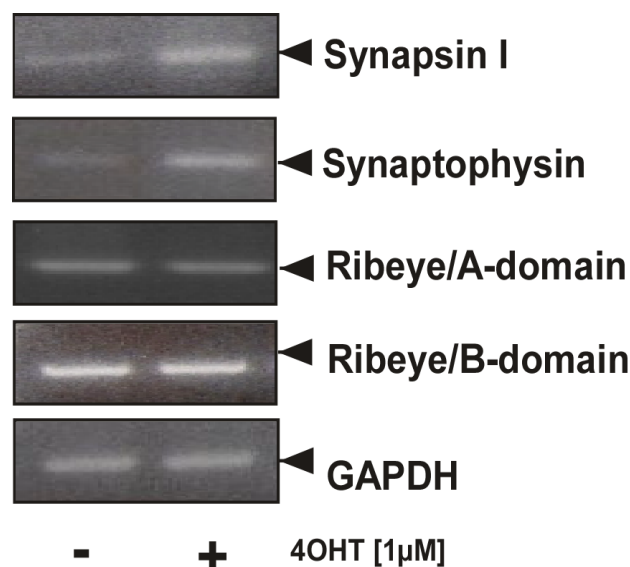
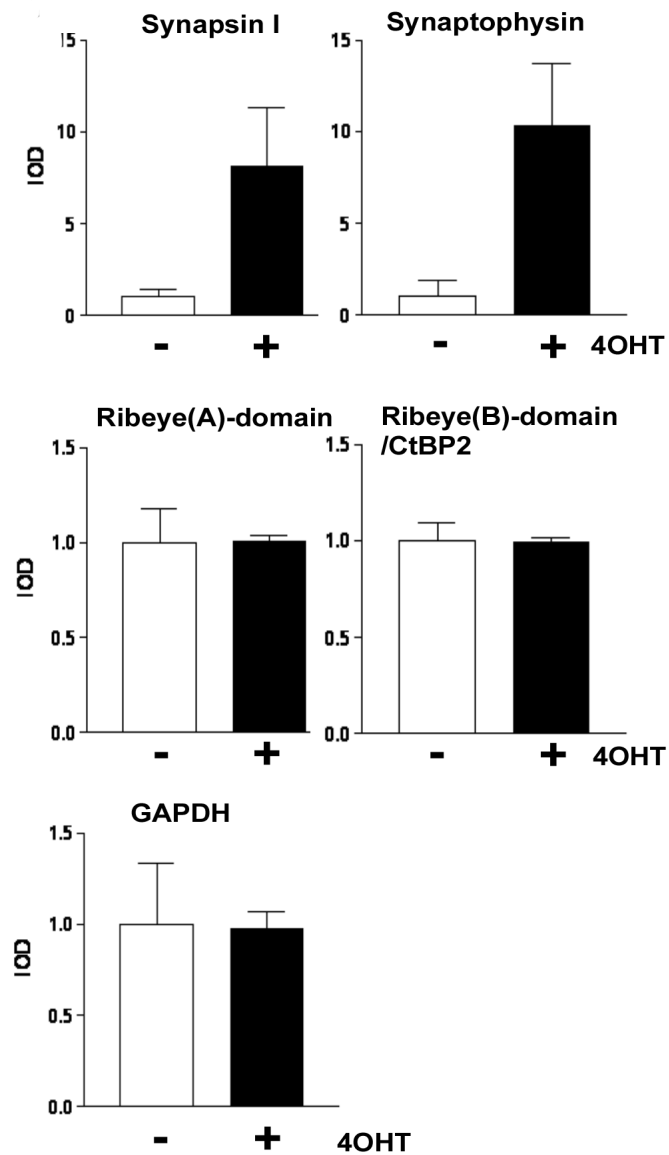


Abbildung 40: Regulation der Genexpression von *Synapsin I* und *Synaptophysin* in R28 Zellen durch REST

A: R28DP-REST:ER Zellen wurden mit 4-OHT (+) in einer Konzentration von 1µM oder mit Ethanol (-) 24 Stunden lang stimuliert. Es wurden RT-PCR Analysen durchgeführt. Um sicher zu gehen, dass gleiche Mengen an RNA bei der reversen Transkription eingesetzt wurden, wurde die Expression des *GAPDH*-Gens untersucht.

B**B: Quantifizierung und statistische Analyse der RT-PCR Daten**

Die amplifizierte DNA der stimulierten (+) und der unstimulierten (-) Zellen wurde in einem Agarosegel aufgetragen und die Intensität der DNA-Banden wurde gemessen. Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen dar. Die Standardabweichung wurde in Form des SEM dargestellt.

4.3.4.4 Differenzierung von R28 Zellen durch cAMP

R28 Zellen exprimieren sowohl neuronale als auch gliale Marker (Seigel et al., 1996). Barber et al. (2001) zeigten, dass eine Kultivierung von R28 Zellen in der Gegenwart von cAMP die Differenzierung von R28 zu neuronalen Zellen so weit verstärken konnte, dass diese Neuriten ausbildeten und neuronale Marker wie die für Neuronen spezifische γ -Enolase und ein 250kDa großes Neurofilament exprimierten.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine mittels dem cAMP Analogon Dibutyryl-cAMP (dbcAMP) induzierte Differenzierung der R28 Zellen, die Expression der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* verstärken konnte. Eine Kultivierung der neuralen Stammzellen HNSC.100 in Gegenwart von Retinsäure hatte sowohl die Morphologie der Zellen stark veränderte, als auch die Expression verschiedener neuronaler Gene induziert (Abbildung 7). Im Gegensatz hierzu konnte eine Behandlung von R28 Zellen mit dbcAMP zwar die Ausbildung von Neuriten auslösen, die Expression der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* wurde jedoch nicht verstärkt (Abbildung 41 A, B).

A

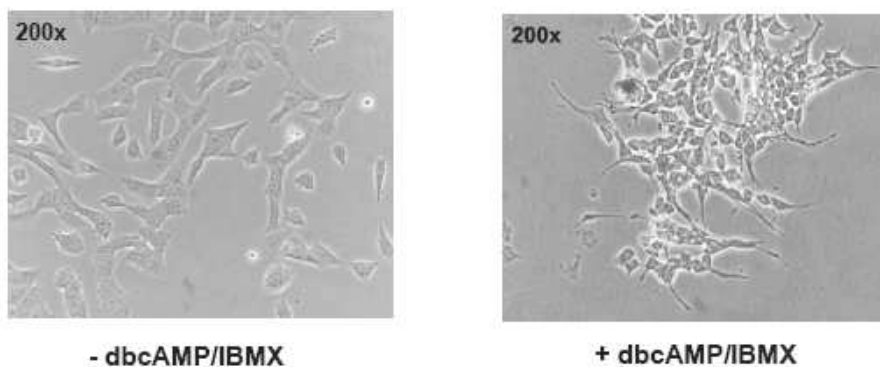
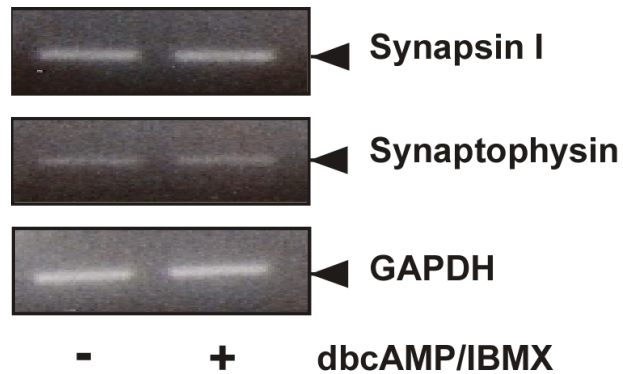


Abbildung 41: Differenzierung von R28 Zellen durch dbcAMP

A: Die R28 Zellen wurden 24 Stunden lang mit dbcAMP (1mM) und dem Proteaseinhibitor IBMX (0,5mM) stimuliert. Die stimulierten Zellen zeigten eine starke Morphologieveränderung in Form einer Ausbildung von Neuriten.

B

B: R28 Zellen wurden 24 Stunden lang mit dbcAMP (1mM) und mit IBMX (0,5mM) stimuliert. Die RNA der Zellen wurde mittels RT-PCR analysiert. Als Kontrolle wurde die Expression des *GAPDH*-Gens untersucht.

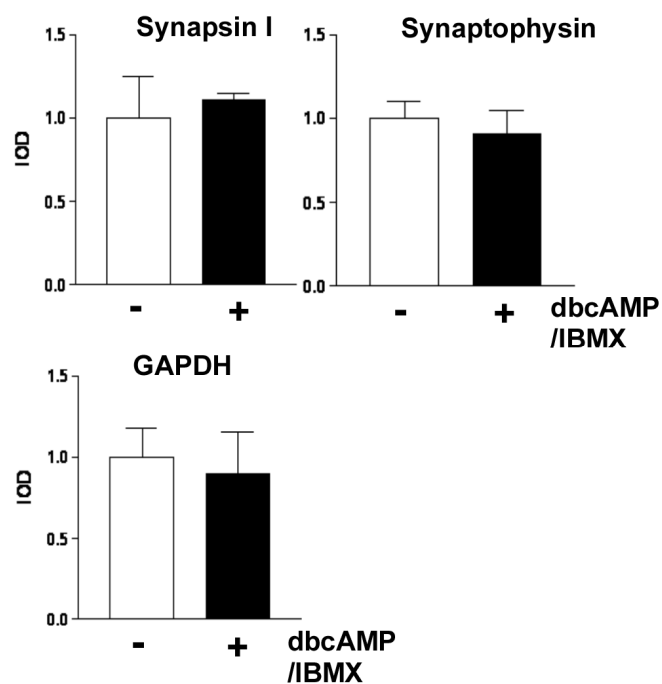


Abbildung 41 C: Quantifizierung und statistische Analyse der RT-PCR Daten

Die Intensität der im Agarosegel sichtbar gemachten DNA Banden wurde gemessen und quantifiziert. Die gezeigten Balkendiagramme stellen den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Standardabweichung wurde in Form des SEM dargestellt.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Regulation der neuronalen Genexpression in verschiedenen Zellsystemen gelegt. Hierbei wurde analysiert, welchen Einfluss Zelltyp- und Gen-spezifische Merkmale auf die Funktion des transkriptionellen Repressors REST bei der Regulation neuronaler Gene hat.

Das zentrale Nervensystem besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher hoch spezialisierter Zelltypen, die entsprechend ihrer Funktion in bestimmten Bereichen des ZNS exprimiert werden. Um die ihr zugewiesene Aufgabe erfüllen zu können, benötigt eine Nervenzelle eine bestimmte Zusammensetzung an für Neurone spezifischen Proteinen. Diese spezifische Genexpression wird in Nervenzellen – wie in anderen Zellen auch- durch Transkriptionsfaktoren kontrolliert. REST ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Neuron spezifische Genexpression vermittelt. REST wird in nicht neuronalen Zellen (Schönherr et al., 1995) und in neuronalen Vorläuferzellen (Chong et al., 1995) exprimiert und verhindert dort die Expression neuronaler Gene. Die Ausbildung des neuronalen Phänotyps erfordert eine verminderte Expression von REST (Palm et al., 1998), jedoch haben neben der REST-Konzentration auch andere Faktoren, wie die Konformation des Chromatins und die Methylierung der DNA starken Einfluss auf die Expression der Gene (Hohl und Thiel, 2005). Diese Beobachtungen haben den Anlass gegeben, in verschiedenen Zelltypen den Einfluss epigenetischer Merkmale auf die Expression von REST-Zielgenen zu untersuchen.

5.1 Verwendete Zellsysteme

5.1.1 Neurale Stammzellen

Neurale Stammzellen sind als Vorläuferzellen essentielle Elemente des ZNS. Reynolds und Weiss beschrieben 1992 erstmals die Isolation von neuronalen Stammzellen aus der subventrikulären Zone des adulten Säugerhirns. Diese Zellen können sich durch Zellteilung selbst erneuern und sind pluripotent, d.h. sie können als Reaktion auf intrinsische als auch extrinsische Stimuli sowohl zu Astrozyten, als auch zu Oligodendrozyten oder zu Neuronen differenzieren (San et al., 1997; Gage, 1995; 2000; Villa et al., 2000; Taupin und Gage, 2002; Bibel et al., 2004; Hsieh et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde als experimentelles Modellsystem für neurale Stammzellen die humane neurale Zelllinie HNSC.100 verwendet. Diese ist eine immortalisierte Stammzelllinie, die aus humanem Gehirngewebe eines 10,5 Wochen alten Fötus gewonnen wurde (Villa et al., 2000). Ein Vorteil gegenüber primären neuronalen Vorläuferzellen ist, dass HNSC.100 Zellen unbegrenzt in Kultur gehalten werden können (Villa et al., 2000). Diese Fähigkeit ergibt sich aus der Immortalisierung der Zellen mit dem v-myc Onkogen. Wenn Zellen differenzieren, erfolgt ein Stopp des Zellzyklus und somit ein Wachstumsstopp (Stein et al., 1996). Ein Entzug der Wachstumsfaktoren löst in neuronalen Stammzellen die Differenzierung aus, was für die neuronalen Stammzellen HNSC.100 in einer Differenzierung vor allem zu Astrozyten beobachtet wurde (Villa et al., 2000). Eigene Untersuchungen konnten zeigen, dass für diese Differenzierung eine Blockade des ERK-Signalwegs essentiell ist (Ekici et al., 2008). Bezüglich der Rolle des ERK-Signalwegs bei der Differenzierung neuraler Stammzellen gibt es aber gegensätzlich Beobachtungen: Während einige Analysen ergaben, dass eine Hemmung des ERK-Signalwegs für die Differenzierung essentiell ist (Learish et al. 2000, Ekici et al., 2008), gibt es auch Untersuchungen, die das Gegenteil zeigen. So hat die Arbeitsgruppe um Rueda et al. (2002) beobachtet, dass eine Hemmung des ERK-Signalwegs wiederum den Differenzierungsprozess der neuronalen Stammzellen negativ beeinflusst. Auch in mesenchymalen Stammzellen konnte dem ERK-Signalweg (Salaszyk et al., 2004; Xu et al., 2008) beziehungsweise dem Raf- Protein eine tragende Rolle bei der Regulation der Differenzierung zugesprochen werden (McMahon et al., 1996).

Interessant für diese Arbeit ist, dass in HNSC.100 Zellen durch eine Stimulation mit Retinsäure die Expression neuronaler Gene initiiert werden konnte (Kramer-Hämmerle, 2004). Diese Beobachtung konnte in früheren Studien auch am Beispiel adulter neuraler Stammzellen

(Takahashi et al., 1999) und an neuronalen Vorläuferzellen gemacht werden (Leypoldt et al., 2001).

HNSC.100-Zellen stellen demnach ein induzierbares System zur Analyse der Neurogenese dar. Da eine Ausbildung des neuronalen Phänotyps die Expression neuronaler Gene voraussetzt, wurde der Fokus auf die Rolle von REST bei der Differenzierung von neuronalen Stammzellen gelegt. Während eine undifferenzierte neurale Stammzelle einen hohen Gehalt an REST-Protein exprimiert, nimmt die REST-Konzentration im Laufe der Differenzierung bis hin zur differenzierten neuronalen Zelle so weit ab, dass diese nur noch sehr geringe Mengen an REST enthält (Ballas et al., 2005). Diese Beobachtung wurde von Bai et al. (2003) an embryonalen Stammzellen bestätigt, in denen die REST-Konzentration bei Initiation der Differenzierung sukzessiv gesunken ist.

5.1.2 Retinale Vorläuferzellen

In dieser Arbeit wurden die retinalen Vorläuferzellen R28 aus der Ratte verwendet. Diese Zellen bilden als Ganglienzellen den Sehnerv und wurden hergestellt, indem retinale Zellen der Ratte postnatal am Tag 6 mit einem für 12S E1A kodierenden Adenovirus immortalisiert wurden (Graham et al., 1977; Whyte et al., 1988; Brockmann und Esche, 1995). Entscheidend für diese Arbeit ist, dass R28 Zellen neben verschiedenen Markern für Fotorezeptoren (Seigel, 1996) auch Marker für Gliazellen und neuronale Zellen exprimieren. Die Expression glialer und neuronaler Marker lässt sich damit erklären, dass die Zellen zu den glialen neuronalen Vorläuferzellen gehören (Nakanishi et al., 2006) (Abbildung 42). So konnten als Marker für Gliazellen spezifische Proteine wie GFAP, Vimentin und S-100 detektiert werden, wohingegen charakteristisch für neuronale Zellen in den R28 Zellen Neurotransmitterrezeptoren für NMDA, Dopamin, GABA-A-Alpha 2, Kainat, Serotonin und Acetylcholin (Seigel et al., 1996; 2004) exprimiert werden.

Die Rolle, die REST bei der Regulation neuronaler Gene in der Retina spielt, ist Gegenstand dieser Arbeit. Dabei wurden als neuronale Markergene die Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* ausgewählt, die in den neuronalen Stammzellen HNSC.100 einer Regulation durch REST unterliegen. (Ekici et al., 2008).

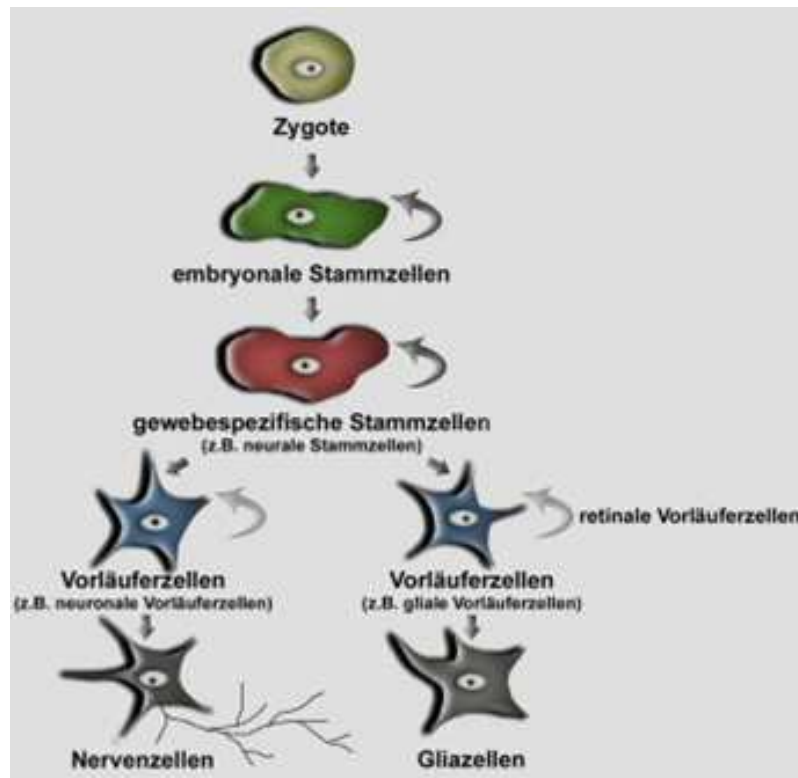


Abbildung 42: Die Differenzierung neuraler Stammzellen

Aus der befruchteten Zygote entwickeln sich embryonale Stammzellen. Aus diesen differenzieren sich gewebsspezifische Stammzellen, zu denen neurale Stammzellen gehören. Aus den gewebsspezifischen Stammzellen bilden sich unter anderem neuronale und retinale Vorläuferzellen.

(Abbildung stammt von www.uke.de/kliniken/augenkliniken/index)

5.1.3 Neuroblastomazellen

Neuroblastomazellen gehen aus der embryonalen Neuralleiste hervor und sind nicht vollständig ausdifferenzierte Neurone (Lopez-Carballo et al., 2002). Als Vertreter für Neuroblastomazellen wurden in dieser Arbeit SH-SY5Y-Zellen verwendet. Diese sind neuronale Zellen, die während ihrer Differenzierung transformiert wurden und demnach auf dem Weg zu vollständig ausdifferenzierten Neuronen gestoppt wurden (Biedler et al., 1973). SH-SY5Y-Zellen exprimieren als neuronale Zellen das Gen *Synapsin 1* und weitere REST-regulierte neuronale Gene. Trotz der Expression neuronaler Gene konnte aber auch die Expression von REST gezeigt werden (Lietz et al., 1998). Interessant hierbei ist, dass ein inverses Verhältnis zwischen der Konzentration an Synapsin I und an REST in den Zellen vorliegt (Lietz et al., 1998).

Da frühere Untersuchungen gezeigt haben, dass Retinsäure in den Neuroblastomazellen SH-SY5Y die Neurogenese auslöste (Simpson et al., 2001), wurde ein Vergleich molekularbiologischer und epigenetischer Vorgänge während der Neurogenese neuraler Stammzellen und nicht ausdifferenzierter Neurone angestellt.

5.1.4 Gliomazellen

Gliomazellen stammen aus Hirntumoren, die histologisch den Gliazellen ähnlich sind und so Zellen des ZNS darstellen.

In dieser Arbeit wurde die Gliomazelllinie U87MG ausgewählt, um die Frage zu klären, ob das *GluR2*-Gen, das für die AMPA-Untereinheit des Glutamatrezeptors kodiert, in den Zellen durch REST reguliert wird. Diese Frage beruht auf unterschiedlichen Beobachtungen von Huang et al. (1999) und Hohl und Thiel (2005). Während Huang et al. (1999) in C6 Gliomazellen eine Regulation des *GluR2*-Gens durch REST beobachteten, konnten Hohl und Thiel (2005) weder in der neuronalen Zelllinie SN56 noch in neuroendokrinen Zellen einen Einfluss von REST auf die Expression des Gens detektieren. Diese kontroversen Beobachtungen gaben Hinweise darauf, dass die Expression des *GluR2*-Gens in den unterschiedlichen Zellen nicht nur abhängig von REST sondern auch von Zelltyp-spezifischen Merkmalen war. Dingledine et al. (1999) haben für das *GluR2*-Gen eine eingeschränkte Regulation durch den Transkriptionsrepressor REST gezeigt. Es wird dem Repressor zwar eine Beteiligung an der Regulation der Genexpression von *GluR2* zugesprochen, da das Gen aber sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen (Calderone et al., 2003; Huang et al., 1999) exprimiert wird, scheint die Aktivität von REST abhängig von zellulären Faktoren zu sein.

U87MG Zellen exprimieren das *GluR2*-Gen (Stepulak et al., 2009; van Vurden et al., 2009) und sollten in dieser Arbeit dazu beitragen, die Zelltyp-abhängige Repressoraktivität von REST zu klären.

5.2 Die Bedeutung der REST-Konzentration für die Transkription

Der Transkriptionsfaktor REST ist ein Repressor neuronaler Gene in nicht neuronalem Gewebe (Schoch et al., 1996; Otto et al., 2007). Jedoch werden neuronale Gene nicht nur in neuronalen und neuroendokrinen Zellen exprimiert, sondern auch in endokrinen pankreatischen β -Zellen (Navone et al., 1986; Atouf et al., 1997; Thomas-Reetz et al., 1993). Dies wird auf eine erniedrigte Konzentration von REST in diesen Zellen zurückgeführt (Martin et al., 2003; Abderrahmani et al., 2001; 2004). Die endogene REST-Konzentration variiert von Zelltyp zu Zelltyp, und ist bei der Regulation der Genexpression von großer Bedeutung. So haben Studien gezeigt, dass die Reprimierung von REST-Zielgenen mit dem Grad der Expression des *REST*-Gens selbst korreliert (Atouf et al., 1997; Lietz et al., 1998; Palm et al., 1998; Kim et al., 2004). Auch in Lungenkrebszellen wird die Expression der Alpha Untereinheit des Glyzinrezeptors als Folge einer verminderten Konzentration an REST verstärkt (Gurrola-Diaz et al., 2003; Neumann et al., 2004). Jedoch ist die zelluläre Konzentration von REST alleine nicht immer maßgebend dafür, ob der Transkriptionsrepressor die Expression seiner Zielgene beeinflussen kann. So konnten Hohl und Thiel (2005) die Expression der *Synaptophysin*- und *Sekretogranin II*-Gene in neuronalen und neuroendokrinen Zellen detektieren. Aber obwohl die REST-Konzentration in diesen Zellen sehr niedrig war, blieb die Expression des *Connexin36*-Gens auf die pankreatischen β -Zellen beschränkt. Das *Connexin36*-Gen wurde demnach unabhängig von der REST-Konzentration aber abhängig von Zelltyp-spezifischen Faktoren reguliert. Eine alleinige Veränderung der REST-Konzentration ist also nicht immer ausreichend, um die Transkription neuronaler Gene zu regulieren. In U87MG Gliomazellen dagegen war die REST-Konzentration ausschlaggebend für die Transkriptionskontrolle des neuronalen Gens *GluR2*. Die Expressionskontrolle des *GluR2*-Gens sowie die des *Synaptophysin*-Gens erfolgt in U87MG Zellen durch REST, die Konzentration an REST-Protein lässt demnach die Expression dieser beiden Gene zu. Ich aber konnte zeigen, dass in diesen Zellen eine erhöhte Menge an REST-Protein die Expression des *GluR2*-Gens verminderte. Dieses inverse Verhältnis zwischen der Konzentration an REST und der seines Zielgens wurde von Lietz et al. (1998) am Beispiel des *Synapsin I*-Gens in menschlichen Neuroblastomazellen beobachtet. Hier wurde ein inverses Verhältnis zwischen der Expression des REST-regulierten Gens *Synapsin I* (Thiel et al., 1994; Schoch et al., 1996) und der Expression des *REST*-Gens selbst gezeigt. Auch in den neuralen Vorläuferzelle NTERA-2cl.D1 und den embryonalen Teratokarzinomazellen P19 wurde eine induzierte Expression verschiedener neuronalen Gene wie zum Beispiel *Synapsin I*, *II* und *III* von einer verminderten endogenen REST-Konzentration begleitet (Leypoldt et al., 2001 und 2002; Lietz et al., 2003; Bai et al., 2003).

Meine Untersuchungen zur Retinsäure induzierten Differenzierung neuraler Stammzellen haben ein inverses Verhältnis zwischen der Konzentration an REST und der Expression verschiedener neuronaler Markergene gezeigt. Die Initiation der Neurogenese resultierte hier in einer Expression verschiedener neuronaler Gene, zu denen die REST-responsiven Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II*, *IV* und *VII* gehörten. Die Neurogenese wurde sowohl begleitet von einer verminderten Expression an REST als auch von einer Abnahme der REST-Bindungsaktivität an das NRSE neuronaler Gene. Die Expression der neuronalen Gene in den neuralen Stammzellen unterliegt demnach einem durch REST vermittelten Regulationsmechanismus. Die Expression der Gene konnte nur erfolgen, wenn die REST-Konzentration im Zuge der Differenzierung der Zellen gesunken war. Dies haben verschiedene Arbeitsgruppen (Ballas und Mandel, 2005; Majumder; 2006; Coulson; 2005; Ooi und Wood, 2007) ebenso beobachtet und durch einen proteosomalen Abbau des REST-Proteins erklärt. REST spielt also bei der Differenzierung neuraler Stammzellen eine entscheidende Rolle. Eine starke Expression von REST in embryonalen Stammzellen wurde in frühen Studien auch von Lorincz et al. (2004) entdeckt. Ebenso zeigten Greenway et al. (2007) und Singh et al. (2008), dass REST in neuralen Stammzellen zur Bildung einer repressiven Chromatinstruktur und so zur Beibehaltung des Stammzellstatus der Zellen beiträgt. Dies wird durch neuere Studien bestätigt. So haben Johnson et al. (2008) herausgefunden, dass REST eine Schlüsselfunktion beim Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog hat. Die Gene *Oct4*, *Sox2* und *Nanog* liefern die transkriptionelle Grundlage für die Beibehaltung des pluripotenten Status embryonaler Stammzellen, indem sie sich gegenseitig regulieren, aber auch andere wichtige transkriptionelle Regulatoren beeinflussen (Wang et al., 2006). Da aber nicht in allen Zelltypen die REST-Konzentration ausschlaggebend für die Expressionskontrolle von REST-responsiven Genen war (Hohl und Thiel, 2005), wurde gefolgert, dass Zelltyp- und Gen-spezifische Faktoren die Transkriptionskontrolle durch REST beeinflussen. Hierzu zählen unter anderem die Konfiguration des Chromatins und auch die spezifische Rekrutierung von Repressorproteinen durch REST. Auch ich habe beobachtet, dass REST zwar in den verschiedenen analysierten Zelllinien an das NRSE aller untersuchten neuronalen Gene gebunden war, die Reaktion auf eine Hemmung von Histondeacetylasen oder auf die aktivierende Mutante von REST von Zelltyp zu Zelltyp aber Unterschiede zeigte. Der Repressionsmechanismus von REST erfolgt demnach charakteristisch für den jeweiligen Zelltyp. Zelltyp-spezifische Faktoren sind entscheidend dafür, welche Korepressoren von REST rekrutiert werden und sie sind charakteristisch für das Genexpressionsmuster des Zelltyps. So kann ein endgültiges Stilllegen der betroffenen Gene oder eine reversible Repression ausgelöst werden.

Das Korepressorprotein CoREST dient als Protein-Brücke zwischen REST und MeCP2 (Lunyak et al., 2002; Andres et al., 1999). MeCP2 bindet an methylierte CpG-Dinukleotide und rekrutiert wiederum Histondeacetylasen und Histonmethyltransferasen (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998; Fuks et al., 2003; Zheng et al., 2009). Auf diese Art kann REST weitere Korepressoren an die methylierte DNA heranführen. Dies resultiert in einer Bildung von Heterochromatin und einem längerfristigen Stilllegen ganzer Genabschnitte. Untersuchungen von Lunyak et al. (2002) haben gezeigt, dass das *NaV.1.2*-Gen in Fibroblastenzellen der Ratte durch eine Methylierung der DNA aber nicht durch eine Deacetylierung der Histone reprimiert wurde. Also kann REST eine aktive Repression mittels spezifischer Histondeacetylasen und ein „Silencen“ der Gene mittels eines über den Co-REST-MeCP2-vermittelten Repressorkomplexes vermitteln. Auch Ballas et al. (2005) haben gezeigt, dass neben der REST-Konzentration selbst auch weitere Faktoren, wie zum Beispiel die vom jeweiligen Zelltyp abhängige Rekrutierung verschiedener Repressorproteine entscheidend für die Frage ist, ob die Expression eines Gens in einem bestimmten Zelltyp durch REST beeinflusst wird oder nicht.

5.3 Die Rolle des Methylierungsmusters bei der Transkription

Neben der Acetylierung, Phosphorylierung oder Ubiquitinierung der Lysin, Arginin- und Serinreste von Histonen resultiert die Methylierung der Histone in einem bestimmten Muster, das letztlich zur Hypothese des „Histon codes“ führte (Strahl und Allis, 2000; Jennuwein und Allis 2001). Dabei wird zwischen epigenetischen Markern für offenes oder für reprimiertes Chromatin unterschieden, wobei eine Methylierung der Lysinreste 4, 36 und 79 am Histon H3 aktives Chromatin definiert, und eine Methylierung der Lysinreste 9 und 27 am Histon H3 für reprimierte Chromatinbereiche charakteristisch ist (Santos-Rosa et al., 2002; Fischle et al., 2003; Lachner et al., 2003, Snowden et al., 2002).

Histonmodifikationen dienen als eine lokale Transkriptionskontrolle und entscheiden darüber, ob ein Gen transkribiert wird oder nicht (Kouzarides, 2002).

Arbeiten von Hohl und Thiel (2005) haben gezeigt, dass neben der zellulären Konzentration von REST auch die Chromatinstruktur der analysierten Gene von entscheidender Bedeutung für die Genexpression ist. Durch Rekrutierung von Histondemethylasen und Histonmethyltransferasen (Rea et al., 2000) kann REST die Chromatinstruktur „öffnen“ oder „schließen“ und so die Genexpression regulieren. Reprimiert REST seine Zielgene mit Hilfe von Histonmethyltransferasen oder Histondemethylasen, sind typische epigenetische Methylierungsmuster für geschlossenes Chromatin zu finden, was hier am Beispiel des

methylierten Lysinrests 9 zu sehen sind. Untersuchungen haben gezeigt, dass Chromatinmodifikationen, die durch eine Veränderung des Methylierungsmusters erfolgen, stabiler sind als Modifikationen des Acetylierungsgrads der Histone (Rice und Allis, 2001; Zheng et al., 2009). Dies wäre eine Erklärung für die Beobachtung, dass in dieser Arbeit in Zellen, in denen das *GluR2*-Gen oder auch die *Synapsin I*- und *Synaptophysin*-Gene in einem offenen chromosomalen Kontext liegen, eine Hemmung von Histondeacetylasen die Genexpression verstärken kann. Dagegen kann eine Hyperacetylierung der Histone die Expression der Gene nicht induzieren, wenn diese sich in einem chromosomalen Umfeld befinden, das geschlossen und unzugänglich für Transkriptionsfaktoren ist. Diesen Beobachtungen widersprechend habe ich gezeigt, dass in neuronalen Stammzellen HNSC.100 die neuronalen Gene zwar auch in einer geschlossenen Konfiguration vorliegen, der Methylierungszustand der Gene scheint aber so wenig stabil zu sein, so dass die Genexpression durch eine Veränderung des Acetylierungsgrads induzierbar war.

Auch Hohl und Thiel (2005) konnten in neuronalen, neuroendokrinen und in pankreatischen β -Zellen durch eine verstärkte Acetylierung der Histone die Expression der Gene *Synaptophysin* und *Sekretogranin II* positiv beeinflussen, wobei die Chromatinstruktur der Gene in diesen Zellen offen war. Dem gegenüber stand das *GluR2*-Gen, das sich in einem geschlossenen chromosomalen Kontext befand und durch Histondeacetylasenhemmung in keiner der untersuchten Zellen induziert werden konnte. Das *GluR2*-Gen wurde in diesen Zellen also über einen Repressionsmechanismus reguliert, der das Methylierungsmuster der Histone so veränderte, dass eine Expression des Gens nicht induziert werden konnte.

Epigenetische Untersuchungen an den neuronalen Genen *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II*, *IV* und *VII* haben gezeigt, dass diese neuronalen Gene in undifferenzierten neuronalen HNSC.100 Stammzellen von Markern für eine geschlossene Chromatinstruktur gekennzeichnet waren, was exakt der Konfiguration des Chromatins der Gene in nicht neuronalen Keratinozyten entsprach. Wurde in den Zellen die Neurogenese initiiert, kam es zu einer Umwandlung von geschlossenem zu aktiv transkribierbarem Chromatin, so dass die Chromatinstruktur der Gene der Konfiguration der Gene in Neuroblastomazellen ähnelte. Jedoch wies hier das Chromatin ein bivalentes Methylierungsmuster auf. Die Korrelation zwischen den für offenes, zugängliches und geschlossenes Chromatin verwendeten epigenetischen Markern war sowohl in den differenzierten neuronalen Stammzellen sowie in den Gliomazellen und den Neuroblastomazellen demnach nicht eindeutig. So konnten bei der Untersuchung des Methylierungsgrads des *GluR2*-Gens ein methylierter Lysinrest 9 nicht nur in Hepatomazellen und Keratinozyten, sondern auch in den Glioma- und in Neuroblastomazellen detektiert werden.

Diese bivalente Chromatinstruktur wurde ebenfalls in den durch Retinsäure differenzierten neuronalen Stammzellen und den Neuroblastomazellen detektiert. Es könnte sich hierbei um eine Mischung unterschiedlich differenzierter Zellen handeln, da eine Methylierung des Lysinrests 4 und eine Methylierung des Lysinrests 9 gegensätzliche biologische Wirkungen haben. Jedoch wurde eine bivalente Modifizierung des Chromatins auch in anderen Studien beobachtet und verschieden erklärt. Es wurde gezeigt, dass eine gleichzeitige Methylierung der Lysinreste 4 und 9 als Signal für die aktive Transkription von Genen dienen kann (Beisel et al., 2002; Byrd und Shearn, 2003; Vakoc et al., 2006). Diese doppelte Methylierung wird außerdem mit der Aktivierung von Genen in Verbindung gebracht, die normalerweise reprimiert sind (Ng et al., 2003). Des Weiteren haben Untersuchungen von Sims et al. (2003) gezeigt, dass der Grad der Methylierung des Lysinrests 4 am Histon H3 eine entscheidende Rolle spielt, diese Methylierung durch Methylierung des Lysinrests 9 der Bildung von Heterochromatin entgegen wirken kann (Nishioka et al., 2002). Um eine eindeutigere Aussage über die epigenetische Konfiguration des Chromatins treffen zu können, müssten weitere spezifische Marker für offenes beziehungsweise geschlossenes Chromatin analysiert werden.

5.4 Die Zelltyp spezifische Regulation der Genexpression durch Histondeacetylasen

Die Modulation der Chromatinstruktur durch Acetylierung oder Deacetylierung der Histone gilt als einer der bedeutendsten Mechanismen zur Regulation der Genexpression. Transkriptionell aktives Chromatin ist assoziiert mit hypermethylierten Histonen, wogegen transkriptionell inaktives Chromatin mit hypoacetyliertem Chromatin assoziiert ist.

REST kann sowohl über seine N-terminale als auch über seine C-terminale Repressordomäne Histondeacetylasen rekrutieren (Andres et al., 1999; Leichter et al., 1999; Huang et al., 1999; Grimes et al., 2000; Roopra et al., 2000; You et al., 2000), und auf diese Art das Chromatin enger verpacken. So wird Transkriptionsfaktoren der Zugang an die regulatorische Region der Gene erschwert.

Histondeacetylasen können pharmakologisch durch den Histondeacetylasenhemmer TSA inhibiert werden (Yoshida et al., 1990), wodurch es zu einer offenen für Transkriptionsfaktoren zugänglichen Chromatinstruktur kommt. Die Hemmung von Histondeacetylasen durch TSA bewirkte die Expression verschiedener neuronaler Gene, zu denen auch die REST Zielgene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *NeuroD*, *ANP* und *SCG10* (Schoenherr et al., 1995; Kuwahara et al., 2000; Roopra et al., 2001; Lunyak et al., 2002; Lietz et al., 2003) gehörten. Jedoch übt REST die

Reprimierung seiner Zielgene Zelltyp- und Gen-spezifisch aus, wobei die Repression nicht immer über die alleinige Rekrutierung von Histondeacetylasen vonstatten geht. So wurde in C6 Gliomazellen aber nicht in neuronalen Zellen eine Regulation des *Glur2*-Gens durch REST gezeigt (Huang et al., 1999), wobei REST hier nicht als Hauptregulator des Gens gesehen wird, sondern eher eine modulierende Funktion zugesprochen bekommt (Dingledine et al., 1999).

Hohl und Thiel (2005) aber haben weder in neuronalen, neuroendokrinen oder auch nicht neuronalen Zelle eine Histondeacetylasen abhängige Regulation des *Glur2*-Gens zeigen können. Im Gegensatz hierzu wurde in meiner Arbeit ein von Histondeacetylasen abhängiger Regulationsmechanismus des *Glur2*-Gens in Gliomazellen und in Neuroblastomazellen, aber nicht in Hepatomazellen und Keratinozyten beobachtet. Da aber auch in Hepatomazellen und Keratinozyten neben REST auch die Histondeacetylase 1 (HDAC1) an die regulatorische Region des Gens gebunden war, muss die Reprimierung des *Glur2*-Gens hier durch andere Repressorproteine erfolgen, die das Chromatin so eng verpackt haben, dass eine verstärkte Acetylierung der Histone nicht ausreicht, das Chromatin zu lockern und die Transkription des Gens zuzulassen. Auch die Untersuchungen bezüglich der Histondeacetylasen abhängigen Regulation der neuronalen Genen *Synapsin I* und *Synaptophysin* in retinalen Vorläuferzellen, neuronalen Stammzellen und Fibroblasten zeigen, dass die Regulation eines Gens durch REST nicht durch alle Zelltypen hindurch mittels desselben Repressionsmechanismus erfolgt, sondern von Zelltyp-spezifischen und Gen-spezifischen Faktoren bestimmt wird.

Studien von Lunyak et al. (2002) und von Ballas et al. (2001) können diese Beobachtung am Beispiel des für den *Natrium-Kanal Typ II (Nav.1.2)* kodierenden Gens erklären. In L6-Skelettmuskelzellen der Ratte konnte das Gen durch TSA dereprimiert werden, was in Rat-1 Zellen unmöglich war. Der Unterschied zwischen beiden Genen bestand einzig in der Rekrutierung des Repressorproteins HDAC: während in den Skelettmuskelzellen neben REST und CoREST auch HDAC an den Repressorkomplex gebunden war, hatten in den Fibroblastenzellen nur REST und CoREST an die Transkriptionseinheit gebunden, HDAC wurde von REST nicht rekrutiert. Eine Hemmung der HDACs konnte demnach durch Acetylierung der Histone die Chromatinstruktur nicht auflockern. Jedoch könnte es auch sein, dass eine verstärkte Acetylierung der Histone zur Transkriptionsinitiation nicht ausreichend war, da die entsprechenden Aktivatorproteine oder HATs fehlten, und so eine Expression der betroffenen Gene nicht erfolgen konnte.

Transkription

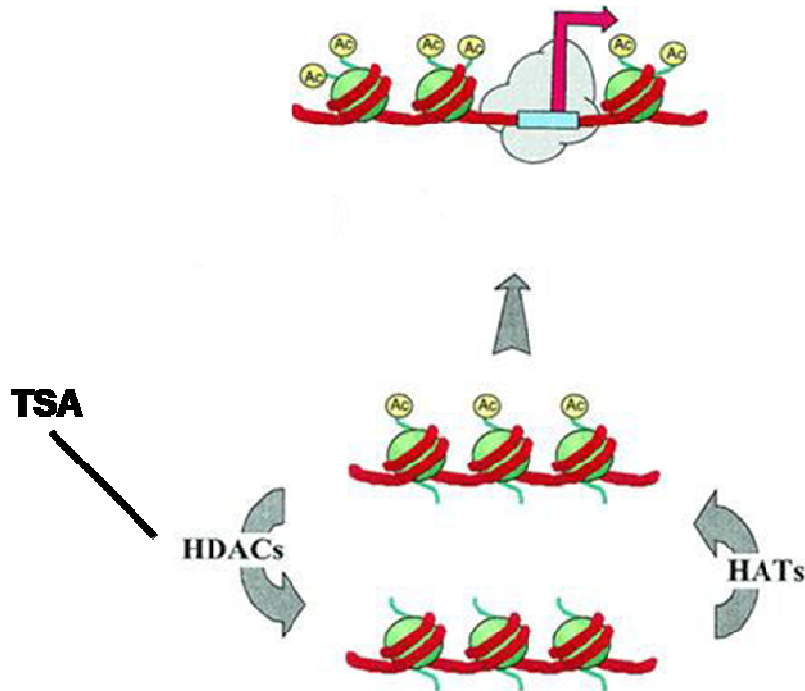


Abbildung 43: Schematische Darstellung von Histoneacetylierung und Histondeacetylierung

Dargestellt sind hier die Histone, um die die DNA gewunden ist. Der Acetylierungsgrad der Histone ist ausschlaggebend für die Struktur des Chromatins und somit für die Transkription der Gene. Histoneacetyltransferasen (HATs) übertragen Acetylgruppen auf die Lysinreste der Histone, Histondeacetylase (HDACs) arbeiten gegensätzlich und entfernen Acetylgruppen von den Lysinresten der Histone. TSA hemmt Histondeacetylase. Modifiziert nach Eberharter und Becker (2002).

5.5 Regulation neuronaler Gene durch REST

Um REST-Zielgene identifizieren zu können, wurde in dieser Arbeit eine dominant-positive Mutante von REST, DP-REST:ER verwendet. DP-REST:ER konkurriert nach seiner Aktivierung mit dem endogenen REST um die Bindung an das NRSE auf den Zielgenen von REST und sollte die Expression REST-regulierter Gene auslösen können. Dadurch stellt die Mutante von REST einen induzierbaren Mechanismus dar, mit dem REST-responsive Gene identifiziert werden können.

Analysen von Hohl und Thiel (2005), in denen die Zugänglichkeit von DP-REST:ER zum Chromatin der Zielgene abhängig vom jeweiligen Zelltyp war, bestätigen die Beobachtung, dass in verschiedenen Zelltypen die Repression von REST Zielgenen durch einen Mechanismus erfolgt, der den DNA-Bereich um das NRSE so moduliert, dass für das Protein DP-REST:ER kein Zugang mehr möglich ist. So war die Mutante DP-REST:ER in der Lage, die Expression der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* aber nicht die des Gens *GluR2* in den neuronalen und neuroendokrinen Zellen zu verstärken. Das Chromatin des *GluR2*-Gens war im Gegensatz zu dem der Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* eng und geschlossen, so dass die Mutante keinen Zugang mehr zur REST-Bindestelle NRSE auf der DNA hatte. In den Untersuchungen von Hohl und Thiel (2005) wurde die Expression des *GluR2*-Gens weder in neuronalen noch in neuroendokrinen Zellen durch REST reguliert. Untersuchungen von Myers et al. (1998) zeigen dagegen, dass in Gliomazellen die Genexpression von *GluR2* der Ratte durch REST reguliert wird. Auch in dieser Arbeit konnte die Bindung der Mutante von REST an das NRSE im *GluR2*-Gen in Glioblastomazellen eine Verstärkung der Genexpression induzieren. Die Identifikation von *GluR2* als REST-responsives Gen wird zudem durch eine Überexpression von REST mittels der Mutante Flag-REST bestätigt, die die Expression von *GluR2* in den Gliomazellen reduzieren konnte. Eine fehlende Transkriptionsaktivierung von *GluR2* in Hepatomazellen wird damit erklärt, dass DP-REST:ER hier nicht an das NRSE des *GluR2*-Gens binden konnte (Daten nicht gezeigt), da das Chromatin des Gens sich in einem unzugänglichen, inaktiven Zustand befand. Die Mutante von REST hatte also nur dann Zugang zur REST-Bindestelle, wenn diese in einem offenen chromosomalen Kontext lag. Diese Beobachtungen werden bestätigt durch eine Studie von Watanabe et al. (2004), die durch die Expression des Fusionsproteins REST-VP16 in C2C12-Myoblasten einen physiologisch aktiven neuronalen Phänotyp ausbilden konnten. Das Fusionsprotein REST-VP16 konnte eine Überexpression von REST kompensieren (Fuller et al., 2005), die Genexpression in differenzierten Muskelzellen aber nicht beeinflussen. Die Chromatinstruktur der REST-regulierten Gene war also übereinstimmend mit den in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen nicht mehr zugänglich für die REST-Mutante.

Im Gegensatz hierzu konnte endogenes REST an das *GluR2*-Gen unabhängig vom epigenetischen Kontext des Gens in allen hier untersuchten Zellen binden. So wurde die Bindung von REST sowohl in den Glioblastomazellen und in den Neuroblastomazellen, wo die Chromatinstruktur des *GluR2*-Gens offen war, als auch in Hepatomazellen und Keratinozyten, wo das *GluR2*-Gen sich in einem geschlossenen kompakten chromosomalen Kontext befand, gezeigt. Eine aktivierende Mutante reicht demnach nicht aus, die Expression neuronaler Gene in nicht neuronalen Zellen auszulösen, und somit durch eine Dereprimierung die Umwandlung einer nicht neuronalen Zelle in eine neuronale Zelle auszulösen. REST bindet demnach an das NRSE seiner Zielgene und moduliert das Chromatin der Gene mittels einer Zelltyp-abhängigen Rekrutierung verschiedener Korepressoren so, dass ein Zugang weiterer Transkriptionsfaktoren oder Proteine an die regulatorische Region der Gene nicht möglich ist.

Mittels der dominant-positiven Mutante von REST konnte ich erstmals zeigen, dass die neuronalen Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin*, in retinalen Vorläuferzellen und in neuronalen Stammzellen durch REST reguliert werden. Zusätzlich wurden in den neuronalen Stammzellen HNSC.100 auch die Gene, *Synaptotagmin II, IV* und *VII* als REST-responsiv identifiziert. In HNSC.100 Zellen konnte die aktivierte Mutante DP-REST:ER an die REST-Bindestellen der neuronalen Gene *Synapsin I*, *Synaptophysin*, *Synaptotagmin II, IV* und *VII* binden und deren Expression auslösen. Dies erfolgte, obwohl das Chromatin der Gene einen methylierten Lysinrest 9 trug und somit als unzugänglich und geschlossen galt. Jedoch korreliert die Methylierung des Lysinrests 9 nicht zwangsläufig mit stillgelegten Genen. Dies zeigen sowohl frühere Arbeiten (Byrd und Shearn, 2003; Beisel et al., 2002; Vakoc et al., 2006) als auch meine Untersuchungen, die zur Detektion einer bivalenten Chromatinmethylierung in den durch Retinsäure differenzierten neuronalen Stammzellen, in den Neuroblastomazellen und in den Gliomazellen führten.

Entgegen der Resultate von Su et al. (2004) konnte kein Anhaltspunkt für eine Regulation des *Synaptotagmin I*-Gens durch REST gefunden werden. Die Arbeitsgruppe erläuterte diese Behauptung nicht näher und zeigte keine Daten bezüglich der Regulation des *Synaptotagmin I*-Gens durch REST. Jedoch konnten in den von mir durchgeführten Untersuchungen weder eine TSA-induzierte Hemmung von Histondeacetylasen noch die aktivierende Mutante DP-REST:ER die Expression des *Synaptotagmin I*-Gens verstärken.

Im Gegensatz zu den Genen *Synaptoporin* und *Synaptobrevin 1* scheint das *Synaptobrevin 2*-Gen in den neuronalen Stammzellen durch REST reguliert zu werden. *Synaptobrevin 2* interagiert mit dem REST-regulierten *Synaptophysin* (Washbourne et al., 1995; Calakos et al., 1995) und hat seine Funktion in der Endozytose von synaptischen Vesikeln (Deak et al.,

2004). Da aber bisher das NRSE im *Synaptobrevin 2*-Gen noch nicht lokalisiert werden konnte, müssen zunächst mit Hilfe bioinformatischer Analysen die Sequenz des NRSEs auf dem *Synaptobrevin 2*-Gen lokalisiert und REST-Bindungsanalysen durchgeführt werden.

5.6 Sp1 und REST: Abhängig oder unabhängig voneinander?

Der Transkriptionsfaktor Sp1 (specificity protein 1) gehört zur Familie der Sp-like/Krüppel-like Transkriptionsfaktoren. Sp1 bindet sequenzspezifisch an GC-reiche Sequenzen auf der DNA und fungiert bei vielen Genen als transkriptioneller Aktivator (Kadonaga et al., 1987; 1988). Studien von Plaisance et al. (2005) und Park et al. (2007) zeigen, dass die Regulation von REST-Zielgenen durch eine Interaktion von REST und Sp1 erfolgt. Es wird behauptet, dass REST seine Funktion als negativer Regulator der Transkription nur ausüben kann, wenn Sp1 gehemmt ist. Umgekehrt könne Sp1 die Transkription von REST Zielgenen nur dann positiv beeinflussen, wenn REST gehemmt wäre. Eine Überexpression von REST hat in beiden Studien die Sp1 vermittelte Aktivierung der Genexpression gehemmt. Myers et al. (1998) haben im *GluR2*-Gen der Ratte im 5'-Bereich des Promotor eine Bindestelle für Sp1 identifiziert und gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Sp1 die *GluR2*-Genexpression in Neuronen und Gliazellen der Ratte positiv reguliert. Da in U87MG Gliomazellen das *GluR2*-Gen durch REST reguliert wird, wurde die These von Plaisance et al. (2005) und Park et al. (2007) am Beispiel der Gliomazellen genauer analysiert. Da der 5'-Bereich des *GluR2*-Gens, indem sich auch die Sp1-Bindestelle befindet, zwischen Mensch und Ratte hoch konserviert ist (Myers et al., 2004), konnte eine putative Bindestelle von Sp1 identifiziert und dessen Bindung an die DNA des *GluR2*-Gens detektiert werden. Die Verwendung einer negativen Mutante von Sp1 ließ erkennen, dass das *GluR2*-Gen in den Gliomazellen nicht nur durch REST sondern auch durch Sp1 reguliert wird. Jedoch konnte die Interaktion zwischen beiden Transkriptionsfaktoren nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu Beobachtungen von Plaisance et al. (2005) und Park et al. (2007) zeigte eine Überexpression von REST keine Auswirkungen auf die biologische Aktivität von Sp1. Plaisance et al. (2005) zeigten, dass die Hemmung von Sp1 durch REST mittels eines von Histondeacetylasen vermittelten Mechanismus erfolgt. Jedoch konnte in meinen Untersuchungen keine Aktivitätsänderung von Sp1 nach Hemmung der Histondeacetylasen in den Gliomazellen erkannt werden. So reguliert Sp1 die Expression des *GluR2*-Gens in einer von REST unabhängigen Art.

6 Ausblick

Der Transkriptionsfaktor REST reprimiert in nicht neuronalen Zellen die Expression vieler neuronaler Gene, die für die Ausbildung eines neuronalen Phänotyps essentiell sind. In Nervenzellen ist die Konzentration von REST so niedrig, dass neuronale Gene exprimiert werden können. Dagegen verhindert REST in neuronalen Stammzellen die Expression neuronaler Gene. Aus diesen Beobachtungen wird die immense Bedeutung, die REST bei der Ausbildung des neuronalen Phänotyps hat, deutlich. Da eine Inaktivierung des *REST*-Gens in Mäusen zwischen dem embryonalen Tag 9,5 bis 10 einen lethalen Phänotyp ergab (Chen et al., 1998), und zu diesem Zeitpunkt in der murinen Embryonalentwicklung noch keine oder nur marginal neuronale Gene exprimiert werden, konnten keine Aussagen zum neuronalen Genexpressionsmuster in Abwesenheit von REST gemacht werden.

Um den Einfluss von REST auf die neuronale Genexpression genauer analysieren zu können, würden transgene Mäuse, die induzierbar REST überexprimieren, als optimales Werkzeug dienen. Zusätzlich könnte eine Mutante von REST, DP-REST:ER genannt, durch eine Aktivierung statt einer Hemmung REST-responsiver Gene (Hohl und Thiel 2005; Ekici et al., 2008), die Abwesenheit von REST vorspielen. Interessant wäre hierbei, die Mutanten von REST spezifisch in verschiedenen Zelltypen, wie Neuronen, glialen und pankreatischen Zellen und außerdem in neuronalen Stammzellen zu exprimieren, und mittels dieser Zellspezifität die Rolle von REST in den unterschiedlichen Zelltypen herausarbeiten zu können. Die daraus resultierenden Erkenntnisse könnten den Ergebnissen aus den *in vitro* Studien dieser Arbeit gegenübergestellt werden.

Zu den von REST-regulierten neuronalen Genen gehören viele Gene, auf denen die Plastizität von Synapsen beruht. Hierzu gehören die neuronalen Gene, die für die Proteine SNAP-25, Synapsin I, Synaptophysin, Synaptotagmin IV und Rab3A kodieren (Südhof 2004; Ferguson et al., 2000, 2004; Hou et al., 2004; Castillo et al., 2007; Corradi et al., 2008; Liu et al., 2009). Unter der synaptischen Plastizität versteht man die aktivitätsabhängige Änderung der Stärke der Übertragung von Signalen an den Synapsen. Es wird angenommen, dass die synaptische Plastizität die Grundlage für die Bildung von Gedächtnis und vom Lernen darstellt, also von wichtigen biologischen Fähigkeiten, die zum Überleben notwendig sind. Bisher wurde noch nie die Rolle, die REST bei der Gedächtnisbildung und beim Lernen spielen könnte, analysiert. Eine Überexpression von REST oder die gezielte Expression von

DP-REST:ER, könnte die Bedeutung von REST bei der Bildung von Gedächtnis und beim Lernen klären.

Obwohl REST als einer der Hauptregulatoren der neuronalen Genexpression gilt, sind die Expression und die Regulation des *REST*-Gens selbst noch nicht vollständig analysiert. Kojima et al. (2001) haben 2 basale Promotoren identifiziert und gezeigt, dass diese in neuronalen und in nicht neuronalen Zellen eine vergleichbare Aktivität mit ähnlichem Level an REST-Transkripten zeigten. Daraus wird geschlossen, dass die Regulation der *REST*-Genexpression Zelltyp-abhängig auf posttranskriptioneller Ebene in Form von RNA Splicing, mRNA Abbau oder auch durch posttranslationelle Modifikationen erfolgt. Die Hypothese der posttranslationellen Regulation wurde durch Untersuchungen an neuronalen Zellen und Geweben bestätigt, in denen REST zwar präsent war, aber nicht an die Bindestelle auf der DNA seiner Zielgene binden konnte. In früheren Studien wurden 3 unterschiedliche Exons (A, B und C) im 5' untranslatierten Bereich vor dem eigentlichen Translationsstart (Exon D) identifiziert (Palm et al., 1998; Königsberger et al., 2000). Aus diesen entstehen mRNAs, die eine unterschiedliche Verteilung in neuronalen Vorläuferzellen, Neuronen und Astrozyten zeigen. Es wäre interessant zu klären, inwiefern diese mRNAs sich bezüglich Funktion und Lokalisation unterscheiden.

Ballas et al. (2005) haben zwei Möglichkeiten der REST-Regulation während der neuronalen Differenzierung gezeigt: So wird zunächst von embryonalen Stammzellen ausgegangen, in denen REST stark exprimiert wird, diese REST-Proteinkonzentration wird aber beim Übergang zu neuralen Vorläuferzellen durch posttranslationelle Modifikationen enorm vermindert. Differenzieren die Vorläuferzellen nun zu Neuronen, wird das *REST*-Gen selbst reprimiert. Neben der Detektion einer doppelsträngige mRNA (Kuwabara et al.; 2004), die an das Protein REST bindet und somit dessen Interaktion mit anderen Repressorproteinen verhindert, wurde der Isoform REST4 (Lee et al., 2000) ebenso eine die Aktivität von REST beeinträchtigende Funktion zugesprochen.

Neben der Frage, wie das *REST*-Gen reguliert wird, stellt sich natürlich auch die Frage, ob das Gen in allen verschiedenen Zelltypen auf die gleiche Art und Weise reguliert wird. Sind hierbei dieselben Transkriptionsfaktoren verantwortlich oder gibt es Zelltyp spezifische Unterschiede?

Eine gewebsspezifische Überexpression von REST oder der aktivierenden Mutante DP-REST:ER in β -Zellen des Pankreas wären ebenfalls im Mausmodell möglich und würden Einblicke in die Aktivität von REST im endokrinen nicht neuronalen System geben.

REST wird im normalen endokrinen Pankreas nicht exprimiert (Atouf et al., 1997; Hohl und Thiel 2005), was eine Expression neuronaler Gene, die für synaptische Vesikelproteine, so

z.B. Synapsin I (Matsumoto et al., 1999), Neurotransmitter und Neurotransmitter synthetisierende Enzyme kodieren, erlaubt. In adulten differenzierten β -Zellen des Pankreas liegt REST in einer sehr niedrigen Konzentration vor, da REST hier die Expression exzitatorischer Proteine reguliert, was bei einer verstärkten Expression von REST zu einer verminderten Insulinausschüttung führt (Martin et al., 2008). In transgenen Mäusen, die das Transgen REST unter der Kontrolle des Insulin2-Promotors spezifisch in den β -Zellen des Pankreas exprimierten, wurde eine Glukoseintoleranz entdeckt, die auf einer geringeren Insulinausschüttung beruht (Martin et al., 2008). Hierbei könnte das *Connexin36*-Gen beteiligt sein, dass als REST- responsives Gen in β -Zellen an der Insulinsekretion beteiligt ist (LeGurun et al., 2003; Martin et al., 2003; Hohl und Thiel, 2005).

Folglich könnte eine erhöhte Konzentration von REST in den β -Zellen die Anfälligkeit, an Diabetes zu erkranken, erhöhen. Demnach wäre es aus therapeutischer Sichtweise interessant, diese Hypothese von Martin et al. (2008) genauer zu beleuchten und auch die Rolle, die die Regulation des *Connexin36*-Gens hier spielt, zu erkunden.

Da diese Arbeit deutlich macht, in welchem enormen Umfang Zelltyp-spezifische Merkmale die Aktivität von REST beeinflussen, ist es essentiell, die Interaktion von REST mit seinen Korepressorproteinen genauer zu analysieren. Nur so kann der Repressionsmechanismus von REST vollständig verstanden werden. Es sollte geklärt werden, welche molekularen Gen-oder Zelltyp-spezifischen Faktoren bestimmen, welche Repressorproteine von REST rekrutiert werden.

7 Zusammenfassung

Hohl und Thiel (2005) haben gezeigt, dass REST die Expression seiner Zielgene nicht Zelltyp unabhängig steuert, sondern dass die Genregulation durch REST abhängig von für den Zelltyp charakteristischen Merkmalen ist.

Ich konnte zeigen, dass REST zwar in den von mir untersuchten Zellen an die DNA der analysierten Gene gebunden war, seine Funktion aber mittels verschiedener Mechanismen ausgeübt hatte. Während in Zellen neuronalen oder glialen Ursprungs ein Histondeacetylase abhängiger Repressionsmechanismus nachgewiesen werden konnte, erfolgte in nicht neuronalen Zellen die Repression der Gene über einen Mechanismus, der das Chromatin der Zellen so modifizierte, dass weder eine verstärkte Acetylierung der Histone noch eine aktivierende REST-Mutante die Genexpression induzieren konnte. Hierbei konnte eine Korrelation zwischen dem Methylierungsstatus der Histone und der Fähigkeit von REST, die Genexpression zu beeinflussen, erkannt werden.

Des Weiteren konnte ich zeigen, dass REST an der Differenzierung neuraler Stammzellen und an der Regulation der Expression neuronaler Gene in neuronalen Stammzellen beteiligt ist. Hierbei stehen die Biosynthese von REST und die neuronaler Proteine in einem inversen Verhältnis zueinander.

Außerdem wurde am Beispiel der neuronalen Gene *Synapsin I* und *Synaptophysin* von mir erstmals gezeigt, dass REST auch in retinalen Vorläuferzellen an der Regulation neuronaler Gene beteiligt ist.

8 Summary

Hohl and Thiel (2005) have shown, that REST does not direct the expression of its target genes independently of the cell type, but that the gene regulation by REST relies on cell type characteristic features.

I have shown the binding of REST on the DNA of the analyzed genes in all cell types, however, REST used varied mechanisms to exercise its function. In cells of neuronal or glial origin, a repression mechanism dependent on histone deacetylation has been detected, whereas in non-neuronal cells the repression was achieved by a mechanism, that modified the chromatin in that way, that neither an enhanced acetylation of the histones nor an activating mutant of REST could induce the gene expression. In that case neither an enhanced histone acetylation nor an activating instead of a repressing mutant of REST could induce the gene expression. So, a correlation between the methylation pattern of the histones and the ability of REST to influence gene expression, had to be recognized. Furthermore, I showed the involvement of REST in the differentiation of neural stem cells and in the regulation of neuronal gene expression in neural stem cells. Thereby, the biosynthesis of REST and of neuronal proteins was in an inverse proportion to each other. Moreover, using the example of the neuronal genes *Synapsin I* and *Synaptophysin*, first I showed the involvement of REST in the regulation of neuronal genes in retinal precursor cells.

9 Literatur

Abderrahmani A, Steinmann M, Plaisance V, Niederhauser G, Haefliger JA, Mooser V, Bonny C, Nicod P, Waeber G. „The transcriptional repressor REST determines the cell-specific expression of the human MAPK8IP1 gene encoding IB1 (JIP-1).“

Molecular Cell Biology 2001; 21: 7256-67.

Abderrahmani A, Niederhauser G, Plaisance V, Haefliger JA, Regazzi R, Waeber G. “Neuronal traits are required for glucose-induced insulin secretion.”

Federation of European Biochemical Societies Letters 2004; 565: 133-138.

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles B. “Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma derived cell line.”

Nature 1979; 282: 615-616.

Alam J und Cock JL. “Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription.”

Analytical Biochemistry 1990; 188: 245-254.

Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. “Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis.”

Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 1964; 51 (5): 786–794.

Andrés ME, Burger C, Peral-Rubio MJ, Battaglioli E, Anderson ME, Grimes J, Dallman J, Ballas N, Mandel G. “CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression.”

Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 1999; 96: 9873-9878.

Arents G, Burlingame RW, Wang B-C, Love WE, Moudrianakis EN. “The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: A tripartite protein assembly and a left-handed superhelix.”

Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 1991; 88: 10148-10152.

Atouf F, Czernichow P, Scharfmann R. "Expression of neuronal traits in pancreatic beta cells. Implication of neuron-restrictive silencing factor/ repressor element silencing transcription factor, a neuron restricted silencer."

The Journal of Biological Chemistry 1997; 272: 1929-1934.

Bai G, Zhuang Z, Liu A, Chai Y, Hoffman PW. "The role of the RE1 element in activation of the NR1 promoter during neuronal differentiation."

The Journal of Neurochemistry 2003; 85: 992-1005.

Ballas N, Battaglioli E, Atouf F, Andres ME, Chenoweth J, Anderson ME, Burger C, Moniwa M, Davie JR, Bowers WJ, Federoff HJ, Rose DW, Rosenfeld MG, Brehm P, Mandel G. "Regulation of Neuronal Traits by a Novel Transcriptional Complex."

Neuron 2001; 31: 353-365.

Ballas N, Grunseich C, Lu DD, Speh JC, Mandel G. "REST and Its Corepressors Mediate Plasticity of Neuronal Gene Chromatin throughout Neurogenesis."

Cell 2005; 121: 645-657.

Ballas N und Mandel G. "The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes."

Current Opinion in Neurobiology 2005; 15: 500–506.

Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. "Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain."

Nature. 2001; 410: 120-124.

Bannister AJ, Schneider R, Kouzarides T. „Histone modification: dynamic or static?"

Cell 2002; 109: 801-806.

Barber AJ, Nakamura M, Wolpert EB, Reiter CEN, Seigel GM, Antonetti DA, Gardner TW. "Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidylinosito-3/Akt-mediated mechanism that rescues the activation of caspase-3."

Journal of Biological Chemistry 2001; 276: 32814-32821.

Barrachina M, Moreno J, Juves S, Moreno D, Olive´ M, Ferrer I. "Target Genes of Neuron-Restrictive Silencer Factor Are Abnormally Up-Regulated in Human Myotilinopathy."

The American Journal of Pathology 2007; 171 (4): 1312-1323.

Battaglioli E, Andres ME, Rose DW, Chenoweth JG, Rosenfeld MG, Anderson ME, Mandel G. "REST repression of neuronal genes requires components of the hSWI.SNF complex." *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:41038-41045.

Beisel C, Imhof A, Greene J, Kremmer E, Sauer F. „Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1." *Nature* 2002; 419 (6909): 857-862.

Belyaev ND, Wood IC, Bruce AW, Street M, Trinh JB, Buckley NJ." Distinct RE-1 Silencing Transcription Factor-containing Complexes Interact with Different Target Genes." *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279: 556-561.

Bibel M, Richter J, Schrenk K, Tucker KL, Staiger V, Korte M, Goetz M, Barde YA. "Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage." *Nature Neuroscience* 2004; 7 (9): 1003-1009.

Biedler JL, Helson L, Spengler BA. "Morphology an growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture." *Cancer research* 1973; 33: 2643-2652.

Blau HM. "Differentiation requires continous active control." *Annual Review of Biochemistry* 1992; 61: 1213-1230.

Brandstätter JH, Fletcher EL, Garner CC, Gundelfinger ED, Wässle H. "Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein Bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina." *European Journal of Neuroscience* 1999; 11:3683–3693.

Brockmann D und Esche H. "Regulation of viral and cellular gene expression by E1A proteins encoded by the oncogenic adenovirus type 12." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 1995; 199 (3): 81-112.

Bruce AW, Donaldson IJ, Wood IC, Yerbury SA, Sadowski MI, Chapman M, Göttgens B, Buckley N. "Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* 2004; 101: 10458-10463.

Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascanos M, Yee J-K. "Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells."

Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 1993; 90: 8033-8037.

Byrd KN, Shearn A. "ASH1, a Drosophila trithorax group protein, is required for methylation of lysine 4 residues on histone H3."

Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 2003; 100 (20): 11535-11540.

Calakos N, Scheller RH. "Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle."

Journal of Biological Chemistry 1995; 269 (40): 24534-24537.

Calderone A, Jover T, Noh K, Tanaka H, Yokota H, Lin Y, Grooms SY, Regis R, Bennett MVL, Zukin RS. "Ischemic Insults Derepress the Gene Silencer REST in Neurons Destined to Die."

The Journal of Neuroscience 2003; 23 (6): 2112-2121.

Castillo PE, Janz R, Südhof TC, Tzounopoulos T, Malenka RC, Nicoll RA. "Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus."

Nature 1997; 388: 590-593.

Chomczynski P und Sacchi N. "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction."

Analytical Biochemistry 1987; 162: 156-159.

Chong JA, Tapia-Ramirez J, Kim S, Toldeo-Aral JJ, Zheng Y, Boutros MC, Altshuler YM, Frohmann MA, Kraner SD, Mandel G. "REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression in neurons."

Cell 1995; 80: 949-957.

Chen Z-F, Paquette AJ, Anderson DJ. "NRSF/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis."

Nature Genetics 1998; 20: 136-142.

Corradi A, Zanardi A, Giacomini C, Onofri F, Valtorta F, Zoli M, Benefati F. "Synapsin-I-and synapsin-II-null mice display an increase age-dependant cognitive impairment."

Journal of Cell Science 2008; 121: 3042-3051.

Coulson JM. "Transcriptional regulation: Cancer, neurons and the REST."

Current Biology 2005; 15 (17): R665–R668.

Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U. "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 1995; 84: 109-129.

Deak F, Schoch S, Liu X, Sudhof TC, Kavalali ET. "Synaptobrevin is essential for fast synaptic-vesicle endocytosis."

Nature Cell Biology 2004; 6 (11): 1102-1108.

De Wet J, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S. "Firefly Luciferase Gene: Structure and Expression in Mammalian Cells."

Molecular and Cellular Biology 1987; 7 (2): 725-737.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. "The glutamate receptor ion channels."

Pharmacological Review 1999; 51: 7–62.

Eberharter A und Becker PB. "Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin."

EMBO reports 2002; 3 (3): 224-229.

Ekici M, Hohl M, Schuit F, Martínez-Serrano A, Thiel G. "Transcription of genes encoding synaptic vesicle proteins in human neural stem cells: Chromatin accessibility, histone methylation pattern and essential role of REST."

Journal of Biological Chemistry 2008; 283 (14): 9257-9268.

Ekici M, Schmitz F, Hohl M, Seigel GM, Thiel G. "Chromatin structure and expression of synapsin I and synaptophysin in retinal precursor cells."

Neurochemistry International 2008; 53 (5): 165-172.

Ferguson GD, Anagnostaras SG, Silva AJ, Herschman HR. „Deficits in memory and motor performance in synaptotagmin IV mutant mice.”

Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 2000; 97: 5598-5603.

Ferguson GD, Wang H, Herschman HR, Strom DR. „Altered hippocampal short-term plasticity and associative memory in synaptotagmin IV (-/-) mice.”

Hippocampus 2004; 14: 964-974.

Fischle W, Wang Y, Allis CD. „Histone and chromatin crosstalk.”

Current Opinion in Cell Biology 2003; 15 (2): 172-183.

Fuller GN, Su X et al. “Many human medulloblastoma tumours overexpress repressor element-1 silencing transcription (REST)/neuron-restrictive silencer factor, which can be functionally countered by REST-VP16.”

Molecular cancer therapy 2005; 4: 343-349.

Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. “The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation.”

Journal of Biological Chemistry 2003; 278 (6): 4035-4040.

Gage FH, Ray J, Fisher LJ. “Isolation, characterisation, and use of stem cells from the CNS.”

Annual Review of Neuroscience 1995; 159-192.

Gage FH. “Mammalian neural stem cells.”

Science 2000; 287: 1433–1438.

García-Sánchez R, Ayala-Luján J, Hernández-Peréz A, Mendoza-Figueroa T, Tapia-Ramírez J. “Identification of repressor element 1 in cytochrome P450 genes and their negative regulation by RE1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor.”

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 2003; 1620 (1-3): 39-46.

Graham F, Smiley J, Russell W, Nairn R. “Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5.”

Journal of general Virology 1977; 36: 59-72.

Gratzner, H. G. "Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication."

Science 1982; 218 (4571): 474-475.

Greenway D, Street M, Jeffries A, Buckley NJ. "RE1 Silencing Transcription Factor Maintains a Repressive Chromatin Environment in Embryonic Hippocampal Neural Stem Cells."

Stem Cells 2007; 25: 354-363.

Grimes JA, Nielsen SJ, Battaglioli E, Miska EA, Speh JC, Berry DL, Atouf F, Holdener BC, Mandel G, Kouzarides T. "The co-repressor mSin3A is a functional component of the REST-CoREST repressor complex."

Journal of Biological Chemistry 2000; 275: 9461-9467.

Grunstein M. "Histone acetylation in chromatin structure and transcription."

Nature 1997; 389 (6649): 349-352.

Gurrola-Diaz C, Lacroix J, Dihlmann S, Becker CM, von Knebel Doeberitz M. "Reduced expression of neuron restrictive silencer factor permits transcription of glycine receptor alpha1 subunit in small-cell lung cancer cells."

Oncogene 2003; 22: 5636-5645.

Hawley RG, Lieu FH, Fong AZ, Hawley TS. "Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy."

Gene Therapy 1994; 1 (2): 136-138.

Hohl M und Thiel G. "Cell type-specific regulation of RE-1 silencing transcription factor (REST) target genes."

European Journal of Neuroscience 2005; 22: 2216-2230.

Hou Q, Gao X, Zhang X, Kong L, Wang X, Bian W, Tu Y, Jin M, Zhao G, Li B, Jing N, Yu L. "SNAP-25 in hippocampal CA1 region is involved in memory consolidation."

European Journal of Neuroscience 2004; 20: 1593-1603.

Hsieh J, Aimone JB, Kaspar BK, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FG. "IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes."

The Journal of Cell Biology 2004; 164: 111-122.

Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH. "Histone deacetylase inhibition mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells."

Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 2004; 101(47): 16659-16664.

Huang Y, Myers SJ, Dingledine R. "Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes."

Nature Neurosciences 1999; 2: 867–872.

Humphrey GW, Wang Y, Russanowa VR, Hirai T, Qin J, Nakatani Y, Howard BH. "Stable Histone deacetylase complexes distinguished by the presence of SANT domain proteins CoREST/kiaa0071 and Mta-L1."

Journal of Biological Chemistry 2001; 276: 6817-6824.

Ishiguro H, Kim KT, Joh TH, Kim KS. "Neuron-specific expression of the human dopamine beta-hydroxylase gene requires both the cAMP-response element and a silencer region."

Journal of Biological Chemistry 1993; 268: 17987–17994.

Ishiguro H, Kim KS, Joh TH. "Identification of a negative finger transcription factor REST/NRSF/XBR is frequent in neuroregulatory element in the 5'-flanking region of the human dopamine beta-hydroxylase gene."

Brain Research Molecular Brain Research 1995; 34: 251–261.

Johnson R, Teh C, Kunarso G, Yew Wong K, Srinivasan G, Cooper ML, Volkta M, Chan SS, Lipovich L, Pollard SM, Karuturi KM, Wei C, Buckley NJ, Stanton LW. "REST regulates distinct transcriptional networks in embryonic and neural stem cells."

PLoS Biol 2008, 6 (10): e256. doi:10.1371/journal.pbio.0060256

Jenuwein T und Allis CD. „Translating the histone code.“

Science 2001, 293 (5532): 1074-1080.

Jones PJ, Veenstra GJC, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. "Methylated DNA and MeCP2 recruits histone deacetylases to repress transcription."

Nature Genetics 1998; 19: 187-191.

Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. "Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding." domain.
Cell 1987; 51: 1079-90.

Kadonaga, J.T., Courey, A.J., Ladika, J. and Tjian, R. "Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation."
Science 1988; 242: 1566-70.

Kallunki P, Jenkinson S, Edelman GM, Jones FS. "Silencer elements modulate the expression of the gene for the neuron-glia cell adhesion molecule, Ng-CAM."
Journal of Biological Chemistry 1995; 270: 21291–21298.

Kallunki P, Edelman GM, Jones FS. "Tissue-specific Expression of the L1 Cell Adhesion Molecule Is Modulated by the Neural Restrictive Silencer Element."
The Journal of Cell Biology 1997, 138 (6); 1343–1354.

Kallunki P, Edelman GM, Jones FS. "The neural restrictive silencer element can act as both a repressor and enhancer of L1 cell adhesion molecule gene expression during postnatal development."
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 1998; 95: 3233–3238.

Kim CS, Hwang CK, Choi HS, Song KY, Law PY, Wei LN, Loh HH. "Neuron-restrictive silencer factor (NRSF) functions as a repressor in neuronal cells to regulate the mu opioid receptor gene."
The Journal of Biological Chemistry 2004; 279 (45): 46464-4647.

Kojima T, Murai K, Naruse Y, Takahashi N, Mori N. "Cell-type non-selective transcription of mouse and human genes encoding neural-restrictive silencer factor."
Molecular Brain Research 2001; 90 (2): 174-186.

Königsberger C, Chicca JJ, Amoureux MC, Edelman GM, Jones FS. " Differential regulation by multiple promoters of the gene encoding the neuron-restrictive silencer factor."
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 2000; 97: 2291-2296.

Kornberg RD und Lorch Y. "Twenty-Five Years of the Nucleosome, Fundamental Particle of the Eukaryote Chromosome."
Cell 1999, 98: 285–294.

Kouzarides T. "Histone methylation in transcriptional control."

Current Opinion in Genetics and Development 2002, 12 (2). 198-209.

Kramer-Hämmerle S, Rotheaigner I, Brack-Werner R. "Differenzierung einer humanen neuronalen Stammzelllinie unter verschiedenen Wachstumsbedingungen."

BIOspektrum 2004; 6: 796-798.

Kraner SD, Chong JA, Tsay HJ, Mandel G. „Silencing the type II sodium channel gene: a model for neural-specific gene regulation."

Neuron 1992; 9: 37-44.

Kuo WL, Abe M, Rhee J, Eves EM, McCarthy SA, Yan M, Templeton DJ, McMahon M, Rosner MR. "Raf, but not MEK or ERK, is sufficient for differentiation of hippocampal neuronal cells."

Molecular Cell Biology 1996; 16: 1458-1470.

Kuwabara T, Hsieh J, Nakashima K, Taira K, Gage FH. "A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells."

Cell 2004; 116 (6): 779-793.

Kuwahara K, Saito Y, Ogawa E, Takahashi N, Nakagawa Y, Naruse Y, Harada M, Hamanaka I, Izumi T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Kawakami R, Nakanishi M, Mori N, Nakao K. "The Neuron-Restrictive Silencer Element–Neuron-Restrictive Silencer Factor System Regulates Basal and Endothelin 1-Inducible Atrial Natriuretic Peptide Gene Expression in Ventricular Myocytes."

Molecular and Cellular Biology 2001; 21 (6): 2085-2097.

Lachner M, O`Sullivan RJ, Jennuwein T. "An epigenetic road map for histone lysine methylation."

Journal of Cell Science 2003; 116 (11): 2117-2124.

Learish RD, Bruss MD, Haak-Frendscho M. "Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks proliferation of neural progenitor cells."

Developmental Brain Research 2000; 120 (1): 97-109.

Lee JH, Shimojo M, Chai YG, Hersh LB. "Studies on the Interaction of REST4 with the cholinergic repressor element-1/neuron restrictive silencer element."

Brain Research Molecular Brain Research 2000; 80: 88-98.

Leichter M und Thiel G. "Transcriptional repression by the zinc finger protein REST is mediated by titratable nuclear factors."

European Journal of Neuroscience 1999; 11: 1937-1946.

Le Gurun S, Martin D, Formenton A et al . "Connexin-36 contributes to control function of insulin-producing cells."

Journal of Biological Chemistry 2003; 278: 37690–37697.

Leyboldt F, Lewerenz J, Methner A. "Identification of genes up-regulated by retinoic acid induced differentiation of the human neuronal precursor cell line NTERA-2 cl.D1."

Journal of Neurochemistry 2001; 76 (3): 806-814.

Leyboldt F, Flajolet M, Methner A. "Neuronal differentiation of cultures human NTERA-2cl.D1 cells leads to increased expression of synapsins."

Neuroscience Letters 2002; 324: 37–40.

Li L, Suzuki T, Mori N, Greengard P. "Identification of a functional silencer element involved in neuron-specific expression of the synapsin I gene."

Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 1993; 90: 1460–1464.

Lietz M, Cichetti P, Thiel G. "Inverse expression pattern of REST and synapsin I in human neuroblastoma cells."

Biological Chemistry 1998; 379: 1301-1304.

Lietz M, Bach K, Thiel G. „Biological activity of RE-1 silencing transcription factor (REST) towards distinct transcriptional activators."

European Journal of Neuroscience 2001; 14: 1303-1312.

Lietz M, Hohl M, Thiel G. " RE-1 silencing transcription factor (REST) regulates human synaptophysin gene transcription through an intronic sequence-specific DNA-binding site."

European Journal of Biochemistry 2003; 270: 2-9.

Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG, Evan GI. "A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins."

Nucleic Acids Research 1995; 23 (10): 1686-1690.

Liu R, Hannehalli S, Bucan M. "Motifs and *cis*-regulatory modules mediating the expression of genes co-expressed in presynaptic neurons."

Genome Biology 2009; 10 (7): R72.1-R72.18.

Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. "Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors."

Science 2002; 292 (1): 268-271.

Lopez-Carballo G, Moreno L., Masia S, Perez P, Baretino D. "Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway by Retinoic Acid Is Required for Neural Differentiation of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells."

Journal of Biological Chemistry 2002; 277 (28): 25297- 25304.

Lorincz MT, Detleff PJ, Albin RL, O`Shea KS. "Embryonic stem cells expressing expanded CAG repeats undergo aberrant neuronal differentiation and have persistent Oct-4 and REST/NRSF expression."

Molecular and Cell Neuroscience 2004; 26: 135–143.

Lunyak VV, Burgess R, Prefontaine GG, Nelson C, Sze SH, Chenoweth J, Schwartz P, Pevzner PA, Glass C, Mandel G, Rosenfeld MG. "Corepressor-Dependent Silencing of Chromosomal Regions Encoding Neuronal Genes."

Science 2002; 298: 1747-1752.

Martin D, Tawadros T, Meylan L, Abderrahmani A, Condorelli DF, Wäber G, Häfliger J-A. "Critical role of the transcriptional repressor neuron-restrictive silencer factor in the specific control of connexin36 in insulin-producing cell lines."

Journal of Biological Chemistry 2003; 278: 53082–5308.

Martin C, Zhang Y. "The diverse functions of histone lysine methylation."

Nature Reviews Molecular Cell Biology 2005; 6 (11): 838-849.

Martin D, Allagnat F, Chaffard G, Caille D, Fukuda M, Regazzi R, Abderrahmani A, Waeber G, Meda P, Mächler P, Häfliger J-A. "Functional significance of REST target genes in pancreatic beta cells."

Diabetologia 2008; 51: 1429–1439.

Matsumoto K, Ebihara K, Yamamoto H, Tabuchi H, Fukunaga K, Yasunami M, Ohkubo H, Shichiri M, Miyamoto E. "Cloning from insulinoma cells of synapsin I associated with insulin secretory granules."

Journal of Biological Chemistry 1999; 274 (4): 2053-9.

McBurney M, Reuhl KR, AllyAI, Nasipuri S, Bell JC, Craig J."Differentiation and Maturation of Embryonal Carcinoma-derived Neurons in Cell Culture."

The Journal of Neuroscience 1988; 8 (3): 1063-1073.

McKay R ."Stem cells in the central nervous system."

Science 1997; 276: 66–71.

Majumder, S. „REST in good times and bad: Roles in tumor suppressor and oncogenic activities."

Cell Cycle 2006; 5: 1929–1935.

Messam CA, Hou J, Major EO. "Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CNS defined by a human-specific anti-nestin antibody."

Experimental Neurology 2000; 161: 585-96.

Messam CA, Hou J, Berman JW, Major EO. "Analysis of the temporal expression of nestin in human fetal brain derived neuronal and glial progenitor cells."

Brain Research Developmental Brain Research 2002; 134: 87-92.

Mori N, Stein R, Sigmund O, Anderson DJ. "A cell type-preferred silencer element that controls the neural-specific expression of the SCG10 gene."

Neuron 1990; 4: 583–594.

Mori N, Schoenherr C, Vandenberg DJ, Anderson DJ. "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 1992; 9: 45-54.

Myers SJ, Peters J, Huang Y, Comer MB, Barthel F, Dingle R. "Transcriptional Regulation of the GluR2 Gene: Neural-Specific Expression, Multiple Promoters, and Regulatory Elements."

The Journal of Neuroscience 1998; 18 (17): 6723-6739.

Myers SJ, Huang Y, Genetta T, Dingledine R. "Inhibition of Glutamate Receptor 2 Translation by a Polymorphic Repeat Sequence in the 5'-Untranslated Leaders."

The Journal of Neuroscience 2004; 24 (14): 3489–3499.

Nakanishi Y, Nakamura M, Mukuno H, Kanamori A, Seigel GM, Negi A. "Latanoprost rescues retinal neuro-glial cells from apoptosis by inhibiting caspase-3, which is mediated by p44/p42 mitogen-activated protein kinase."

Experimental Eye Research 2006; 83: 1108–1117.

Nan X, Ng H-H, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. "Transcriptional repression by methylated-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex."

Nature 1998; 393: 386-389.

Naruse Y, Aoki T, Kojima T, Mori N. "Neural restrictive silencer factor recruits mSin3 and histone deacetylase complex to repress neuron-specific target genes. "

Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 1999; 96: 13691-13696.

Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector."

Science 1996; 272 (5259): 263-267.

Nan X, Ng H-H, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. "Transcriptional repression by methylated-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex."

Nature 1998; 393: 386-389.

Navone F, Jahn R, Di Gioia G, Stukenbrok H, Greengard P, De Camilli P. "Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells."

The Journal of Cellular Biology 1986; 103: 2511-2527.

Neumann S, Seitz R, Gorzella A, Heister A, von Knebel Döberitz M, Becker C-M. "Relaxation of glycine receptor and onconeural gene transcription control in NRSF deficient small cell lung cancer cell lines."

Brain Research.Molecular Brain research 2004; 120: 173-181.

Ng HH, Rober F, Young RA, Struhl K. "Targeted Recruitment of Set1 Histone Methylase by Elongating Pol II Provides a Localized Mark and Memory of Recent Transcriptional Activity." *Molecular Cell* 2003; 11: 709–719.

Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Reinberg D. "Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation." *Genes and Development* 2001; 16: 479-489.

Otto SJ, McCorckle SR, Hover J, Conaco C, Han J, Impey S, Yochum GS, Dunn JJ, Goodman RH, Mandel G. "A New Binding Motif for the Transcriptional Repressor REST Uncovers Large Gene Networks Devoted to Neuronal Functions." *The Journal of Neuroscience* 2007; 27 (25): 6729-6739.

Ooi L, Belyaev ND, Miyake K, Wood IC, Buckley NJ. "BRG1 chromatin remodeling activity is required for efficient chromatin binding by repressor element 1-silencing transcription factor (REST) and facilitates REST-mediated repression." *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 38974-38980.

Ooi L und Wood C. "Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST." *Nature Reviews Genetics* 2007; 8: 544-554.

Palm K, Belluardo N, Metsis M, Timmusk T. "Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene." *The Journal of Neuroscience* 1998; 18: 1280-1296.

Palm K, Metsis M, Timmusk T. "Neuron-specific splicing of zinc finger transcriptio factor REST/NRSF/XBR is frequent in neuroblastomas and conserved in human, mouse an rat." *Brain Research.Molecular Brain research* 1999, 72: 30-39.

Park SY, Kim JB, Han Y-M. "REST is a key regulator in brain-specific homeobox gene expression during neuronal differentiation." *Journal of Neurochemistry* 2007; 103: 2565–2574.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. "Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions."

Endocrine Reviews 2001, 22: 153-183.

Plaisance V, Niederhauser G, al Azzouz F, Lenain V, Haefliger J-A, Waeber G, Abderrahmani A. "The Repressor Element Silencing Transcription Factor (REST)-mediated Transcriptional Repression Requires the Inhibition of Sp1."

The Journal of Biological Chemistry 2005; 280 (1): 401-407.

Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll, Strahl BD, Sun Z-W, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jennuwein T. "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases."

Nature 2000, 406: 593-599.

Reynolds BA, Weiss S. "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system."

Science 1992; 255: 1707-1710.

Rice JD and Allis CD. "Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation."

Current Opinion in Cell Biology 2001; 13 (3): 263-273.

Rosahl TW, Geppert M, Spillane D, Herz J, Hammer RE, Malenka RC und Südhof TC. "Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I."

Cell 1993, 75(4): 661-670.

Roopra A, Sharling L, Wood IC, Briggs T, Bachfischer U, Paquette AJ, Buckley NJ. "Transcriptional repression by neuron-restrictive silencer factor is mediated via the Sin3-histone deacetylase complex."

Molecular Cell Biology 2000; 6: 2147-2157.

Roopra A, Huang Y, Dingledine R. "Neurological disease: listening to gene silencers."

Molecular Interventions 2001; 4: 219-228.

Rueda D, Navarro B, Martinez-Serrano A, Guzman M, Galve-Roperh I. "The Endocannabinoid Anandamide Inhibits Neuronal Progenitor Cell Differentiation through Attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK Pathway."

The Journal of Biological Chemistry 2002; 277 (48): 46645-46650.

Salasznyk RM, Klees RF, Hughlock MK, Plopper GE. "ERK signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on collagen I and vitronectin."

Cell Communication and Adhesion 2004; 11 (5-6): 137-153.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase."

Science 1988; 239 (4839): 487-491.

San DWY, Ray J, Gage FH. "Bipotent progenitor cell lines from the human CNS."

Nature Biotechnology 1997; 15: 574–580.

Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NCT, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. "Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3."

Nature 2002; 419: 407-411.

Schmitz F, Königstorfer A, Südhof TC. "RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function."

Nature 2000; 28: 857-872.

Schoch S, Cibelli G und Thiel G. "Neuron-specific Gene Expression of Synapsin I. Major role of a negative regulatory mechanism."

The Journal of Biological Chemistry 1996; 271: 3317-3323.

Schoenherr CJ und Anderson DJ. "The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes."

Science 1995; 267: 1360-1363.

Schoenherr CJ, Paquette AJ, Anderson DJ. "Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor."

Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S. 1996; 93: 9881–9886.

Seigel GM. "Establishment of an E1A-immortalized retinal cell line."

In vitro Cellular and Developmental Biology 1996; 32: 66-68.

Seigel, GM, Mutchler AL and Imperato EL. "Expression of Glial Markers in a Retinal Precursor Cell Line."

Molecular Vision 1996; 2,2.

Seigel GM, Sun W, Wang J, Hershbergre DH, Campbell LM, Salvi RJ. "Neuronal gene expression and function in the growth-stimulated R28 retinal precursor cell line."

Current Eye Research 2004; 28 (4): 257-269.

Shi Y-S, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y.

"Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1."

Cell 2004; 119: 941-953.

Shi Y-S, Matson C, Lan F, Iwase S, Baba T, Shi Y. "Regulation of LSD1 Histone Demethylase Activity by Its Associated Factors."

Molecular Cell 2005; 19 (6): 857-864.

Singh SK, Kagalwala MN, Parker-Thornburg J, Adams H, Majumder S. "REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells."

Nature 2008; 453: 223-227.

Simpson PB, Bacha J-I, Palfreyman E-L, Woollacott A-L, McKernan RM, Kerby J. "Retinoic Acid-Evoked Differentiation of Neuroblastoma Cells Predominates over Growth Factor Stimulation: An Automated Image Capture and Quantitation Approach to Neuritogenesis."

Analytical Biochemistry 2001; 298 (2): 163-169.

Sims RJ, III, Nishioka K, Reinberg D. "Histone lysine methylation: a signature for chromatin function."

Trends in Genetics 2003; 19 (11): 629-639.

Sirven A, Pflumio F, Zennou V, Titeux M, Vainchenker W, Coulombel L, Dubart-Kupperschmitt A, Charneau P. "The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells."

Blood 2000; 96 (13): 4103-4110.

Snowden AW, Gregory PD, Case CC, Pabo CO. "Gene-Specific Targeting of H3K9 Methylation Is Sufficient for Initiating Repression In Vivo."

Current Biology 2002; 12: 2159-2166.

Stein JL, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS. „Control of cell cycle regulated histone genes during proliferation and differentiation.”

International Journal of obesity and related metabolic disorders 1996; 20: 84-90.

Stepulak A, Luksch H, Gebhardt C, Uckermann O, Marzahn J, Sifringer M, Rzeski W, Staufner C, Brocke KS, Turski L, Ikonomidou C. " Expression of glutamat receptor subunits in human cancers."

Histochemistry and Cell Biology, 2009 (noch nicht gedruckt).

Sterner D und Berger SL. "Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors."

Microbiology and Molecular Biology Reviews 2000; 64 (2): 435–459.

Stewart MD, Li J, Wong J. " Relationship between Histone H3 Lysine 9 Methylation, Transcription Repression, and Heterochromatin Protein 1 Recruitment."

Molecular and Cellular Biology 2005; 25 (7): 2525-2538.

Strahl BD und Allis CD. "The language of covalent histone modifications."

Nature 2000; 403: 41-45.

Strakova N, Ehrmann J, Dzubak P, Bouchal J, Kolar Z. "The synthetic ligand of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ciglitazone affects human glioblastoma cell lines."

The Journal of Pharmacologic and Experimental Therapeutics 2004; 309 (3): 1239-1247.

Su X, Kameoka S, Lentz S, Majumder S. "Activation of REST/NRSF Target Genes in Neural Stem Cells Is Sufficient To Cause Neuronal Differentiation."

Molecular Cell Biology 2004; 24: 8018-8025.

Südhof TC. "The synaptic vesicle cycle."

Annual Review of Neuroscience 2004; 27: 509-547.

Tabuchi A, Nakatani C, Nakaoka R, Naruse Y, Kojima T, Mori N, Tsuda M. "Silencer mediated repression and non-mediated activation of BDNF and c-fos gene promoters in primary glial or neuronal cells."

Biochemical and Biophysical Research Communications 1999; 261: 233–237.

Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, Shinkai Y. "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."

The Journal of Biological Chemistry 2001; 276: 25309-25317.

Tahiliani M, Mei P, Fang R, Leonor T, Rutenberg M, Shimizu F, Li J, Rao A, Shi Y. "The histone H3K4 demethylase SMCX links REST target genes to X-linked mental retardation."

Nature 2007, 447: 601-605.

Takahashi J, Palmer TD and Gage FH. " Retinoic acid and Neurotrophins collaborate to regulate Neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures."

Journal of Neurobiology 1999; 38: 65-81.

Taupin P, Gage FH. "Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals."

The Journal of Neuroscience 2002; 69 (6): 745-749.

Thiel G, Schoch S, Petersohn D. "Regulation of Synapsin I Gene Expression by the Zinc Finger Transcription Factor zif268/egr-1."

The Journal of Biological Chemistry 1994; 269 (21): 15294-15301.

Thiel G., Lietz M, Cramer M."Biological Activity and Modular Structure of RE-1-silencing Transcription factor (REST), a repressor of Neuronal Genes."

The Journal of Biological Chemistry 1998; 273 (41): 26891-26899.

Thiel G und Lietz M. "Zinkfingerprotein REST. Regulator neuronaler Gene."

Biologie in unserer Zeit 2004; 34 (2): 96-101.

Thiel G, Lietz M, Hohl M. "How mammalian transcriptional repressors work."

European Journal of Biochemistry 2004; 271: 2855–2862.

Thiel G und Hohl M. "Transcription factors in the nervous system – Development, Brain Function and Disease." 2006

G. Thiel, Editor, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, S.:113-128.

Thiel G, Ekici M, Rössler OG. "Regulation of cellular proliferation, differentiation and cell death by activated Raf."

Cell Communication and Signaling 2009; 7:8 doi:10.1186/1478-811X-7-8.

Thomas-Reetz A C und De Camilli P. "A role for synaptic vesicles in non-neuronal cells: clues from pancreatic beta cells and from chromaffin cells."

The Federation of American Societies for Experimental Biology 1994; 8 (2): 209-216.

Timmusk T, Palm K, Lendahl U, Metsis M. "Brain-derived neurotrophic factor expression *in vivo* is under the control of neuron-restrictive silencer element."

The Journal of Biological Chemistry 1999; 274: 1078-1084.

Vakoc CR, Sachdeva MM, Wang H, Blobel GA. „Profile of Histone Lysine Methylation across Transcribed Mammalian Chromatin."

Molecular and Cellular Biology 2006; 26 (24): 9185-9195.

Van Holde KE. "Histone Modifications. In Chromatin, Springer series in molecular biologie" Springer, New York 1988; pp: 111-141.

Van Vurden DG, Yazdani M, Bosma I, Broekhuizen AJF, Postma TJ, Heimans JJ, van der Valk P, Aronics E, Tannous BT, Würdinger T, Kaspers GJL, Cloos J. "Attenuated AMPA Receptor Expression Allows Glioblastoma Cell Survival in Glutamate-Rich Environment."

Public Library of Science 2009; 4 (6): e5953.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural, RJ, Sutton G et al. "The Sequence of the Human Genome. "

Science 2001; 291: 1304-1351.

Villa A, Snyder EY, Vescovi A., Martinez-Serrano A. "Establishment and properties of a growth factor dependent, perpetual neural stem cell line from the human CNS."

Experimental Neurology 2000; 161: 67-84.

von Kriegstein K, Schmitz F, Link E, Südhof TC. "Distribution of synaptic vesicle proteins in the mammalian retina identifies obligatory and facultative components of ribbon synapses." *European Journal of Neuroscience* 1999; 11 (4): 1335-1348.

Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, Orkin SH. "A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells." *Nature* 2006; 444: 364-368.

Washbourne P, Schiavo G, Montecucco C. "Vesicle-associated membrane protein-2 (synaptobrevin-2) forms a complex with synaptophysin." *Biochemical Journal* 1995; 305 (3): 721-724.

Watanabe Y, Kameoka S, Gopalakrishnan V, Aldape KD, Pan ZZ, Lang FF, Majumder S. "Conversion of myoblasts to physiologically active neuronal phenotype." *Genes and Development* 2004; 18: 889-900.

Whyte P, Ruley H und E. Harlow. "Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation." *Journal of Virology* 1988, 62: 257-265.

Wolffe AP. "Chromatin: Structure and Function." Academic Press 1995, Third Edition, Paperback, 356 Seiten.

Wood IC, Roopra A, Buckley NJ. "Neural specific expression of the M4 muscarinic acetylcholine receptor gene is mediated by a RE1/NRSE-type silencing element." *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 14221–14225.

Xu J, Liu X, Jiang Y, Chu L, Hao H, Liua Z, Verfaillie C, Zweier J, Gupta K, Liu Z. "MAPK/ERK signalling mediates VEGF-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2008, 12 (6a): 2395-2406.

Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. "Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A." *Journal of Biological Chemistry* 1990; 265: 17174-17179.

Yoshida Y, Tsuzuki K, Ishiuchi S, Ozawa A. "Serum-dependence of AMPA receptormediated proliferation in glioma cells."

Pathology international 2006; 56 (5): 262-271.

You A, Tong JK, Grozinger CM, Schreiber SL. "CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex."

Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 2000; 98 (4): 1454-1458.

Zhang X-M, Li Q-M, Su D-J, Wang N, Shan Z-Y, Jin L-H, Lei L. "RA induces the neural-like cells generated from epigenetic modified NIH/3T3 cells."

Molecular Biological reports, Springer Verlag Niederlande 2009. Elektronische Publikation

Zhang Y und Reinberg D. "Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails."

Genes and Development 2001; 15: 2343-2360.

Zheng D, Zhao K, Mehler MF. "Profiling RE1/REST-mediated histone modifications in the human genome."

Genome Biology 2009, 10 (1), Article R9.1-R9.20.

Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TD. "Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors."

Journal of Virology 1999; 73 (4): 2886–2892.

10 Publikationen und Poster

10.1 Publikationen

Ekici M, Hohl M, Schuit F, Martínez-Serrano A, Thiel G. "Transcription of genes encoding synaptic vesicle proteins in human neural stem cells: Chromatin accessibility, histone methylation pattern and essential role of REST."

Journal of Biological Chemistry 2008; 283 (14): 9257-9268.

Ekici M, Schmitz F, Hohl M, Seigel GM, Thiel G. "Chromatin structure and expression of synapsin I and synaptophysin in retinal precursor cells."

Neurochemistry International 2008; 53 (5): 165-172.

Genexpression in humanen neuronal Stammzellen

„Regulation der Genexpression in neuronalen Stammzellen durch Retinsäure und den Transkriptionsfaktor REST“

Myriam Ekici 2008

VDM Verlag Dr. Müller

Thiel G, Ekici M, Rössler OG. "Regulation of cellular proliferation, differentiation and cell death by activated Raf."

Cell Communication and Signaling 2009; 7:8 doi:10.1186/1478-811X-7-8.

Ekici M, Hohl M, Thiel G. „Chromatin structure and expression of the AMPA receptor subunit GluR2 in human glioma cells: major regulatory role of REST und Sp1.“

In Arbeit.

10.2 Poster

Myriam Ekici, Mathias Hohl and Gerald Thiel

Regulation of synapsin I, synaptophysin and synaptotagmins II, IV and VII gene expression in human neural stem cells by histone methylation, acetylation and the transcription factor REST.

Molecular pathways in health and disease of the nervous system, GBM, Study group
Neurochemistry, Hamburg, Germany, September 14-15, 2007

Myriam Ekici, Mathias Hohl and Gerald Thiel

Regulation of synapsin I, synaptophysin and synaptotagmins II, IV and VII gene expression in human neural stem cells by histone methylation, acetylation and the transcription factor REST.

Molecular Life Science GBM Fall meeting, Hamburg, Germany, September 16-19, 2007

Myriam Ekici, Mathias Hohl and Gerald Thiel

Regulation of synapsin I, synaptophysin and synaptotagmins II, IV and VII gene expression in human neural stem cells by histone methylation, acetylation and the transcription factor REST.

9th DGZ Young Scientist Meeting, Münster, September 20-21, 2007

Myriam Ekici, Mathias Hohl and Gerald Thiel

Regulation of synapsin I, synaptophysin and synaptotagmins II, IV and VII gene expression in human neural stem cells by histone methylation, acetylation and the transcription factor REST.

11th Joint meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar, Germany, November 01-03, 2007

Myriam Ekici, Mathias Hohl and Gerald Thiel

Transcription of genes encoding synaptic vesicle proteins in human neural stem cells: chromatin accessibility, histone methylation pattern and essential role of REST.

59. Mosbacher Kolloquium der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie E.V.,
Mosbach/Baden, März 27-29, 2008

Myriam Ekici, Mathias Hohl and Gerald Thiel

Transcription of genes encoding synaptic vesicle proteins in human neural stem cells: chromatin accessibility, histone methylation pattern and essential role of REST.

19th Neuro-DoWo 2008, Saarbrücken, April 10-11. 2008

Myriam Ekici, Mathias Hohl and Gerald Thiel

Chromatin structure and expression of the AMPA receptor subunit GluR2 in human glioma cells: role of REST and Sp1.

Molecular pathways in health and disease of the nervous system, GBM, Study group Neurochemistry, Homburg/Saar, Germany, September 11-13, 2008

Myriam Ekici, Mathias Hohl and Gerald Thiel

Transcription of genes encoding synaptic vesicle proteins in human neural stem cells: chromatin accessibility, histone methylation pattern and essential role of REST.

5th International Stem Cell School in Regenerative Medicine, Berlin, Germany, October 20-22, 2008

Myriam Ekici, Mathias Hohl and Gerald Thiel

Chromatin structure and expression of the AMPA receptor subunit GluR2 in human glioma cells: role of REST and Sp1.

12th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar, Germany, October 29-31, 2008

Myriam Ekici, Mathias Hohl and Gerald Thiel

Chromatin structure and expression of the AMPA receptor subunit GluR2 in human glioma cells: role of REST and Sp1.

60. Mosbacher Kolloquium der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie E.V., Mosbach/Baden, März 27-29, 2009