

2 Literaturübersicht

2.1 Die Labormaus in der biomedizinischen Forschung

Während der letzten zehn Jahre ist die gentechnisch veränderte Labormaus ein immer wichtigeres Werkzeug zur experimentellen Aufklärung biomedizinischer Fragestellungen in der Medizin geworden. Schon 1982 gelang es Palmiter und Kollegen (Palmiter et al., 1982), durch Pronukleusinjektion die ersten transgenen Mäuse herzustellen. Mit der erfolgreichen Isolierung von pluripotenten Embryonalen Stammzellen (ES), welche aus Blastozysten gewonnen werden konnten (Evans, M. J. und Kaufman 1981; Martin 1981), und dem Wissen, dass Zellen durch homologe Rekombination *in vitro* zielgerichtet genetisch manipuliert werden können (Smithies et al., 1985), war der Grundstein zur Herstellung der ersten knock-out-Maus gelegt (Doetschman et al., 1987; Thomas und Capecchi 1987). Trotz der Entwicklung dieser bahnbrechenden Technologie erwies sich die Methode der konstitutiven Genmanipulation *ab initio* jedoch in vielen Fällen als zu unflexibel und zu drastisch, um bestimmte Fragestellungen beantworten zu können. In knock-out-Experimenten, in denen der induzierte knock-out eines Gens letal war, konnten in den meisten Fällen deshalb keine oder nur sehr limitierte Angaben über die ablatierte Genfunktion ab einem bestimmten Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung gemacht werden (embryonal letaler Phänotyp). In den letzten zehn Jahren wurden aus diesem Grund neue Technologien entwickelt, die es ermöglichen, Gene nicht nur irreversibel *ab initio* zu verändern, sondern ihre Expression bzw. das Unterbinden ihrer Expression *spatiotemporal* zu induzieren.

Ein bedeutender erster Schritt für die Etablierung konditionaler Mausmodelle gelang durch die Verwendung des Cre-lox-Systems (Lakso et al., 1992; Orban et al., 1992). Dieses beruht auf der enzymatischen Aktivität einer aus Bakteriophagen isolierten und klonierten sequenzspezifischen Rekombinase (Cre-Rekombinase). Diese Cre-Rekombinase ist in der Lage, DNA-Sequenzen, die von sogenannten loxP-Seiten flankiert sind, spezifisch zu rekombinieren und in der lebenden Maus zu entfernen (Gu et al., 1993). Da es nur bei der gleichzeitigen Expression der Cre-Rekombinase und der geflochten DNA-Sequenz in einer Zelle gemeinsam zu einer Rekombination kommen kann, ist es möglich, diesen Zeitpunkt durch das Verwenden von gewebs-oder zelltypspezifischen Promotoren, welche die Expression der Cre-Rekombinase kontrollieren, zu bestimmen.

Ein weiterer Meilenstein in der Maustechnologie war die Entwicklung konditioneller transgener Mausmodellssysteme. Diese „schaltbaren Mäuse“ erlaubten die *spatiotemporale* Expression rekombinanter Proteine exogen und reversibel zu kontrollieren. Fast alle dieser

regulatorischen Systeme haben drei grundsätzliche Gemeinsamkeiten: 1. Die Aktivierung des molekularen Schaltmechanismus erfolgt durch einen Liganden, der einen transkriptionellen Transaktivator aktiviert, 2. die spezifische Bindung des aktivierten Transaktivators an einen hochspezifischen DNA-Sequenzanker und 3. die transkriptionelle Aktivierung des zu regulierenden Gens, welches in unmittelbarer Nähe der Ankersequenz liegt und durch den Transaktivator angeschaltet wird. Übertragen auf ein konditionelles Mausmodell bedeutet dies, dass eine transgene Effektormaus, die einen über einen Liganden induzierbaren transkriptionellen Aktivator exprimiert, mit einer Respondermaus verpaart werden muss. Diese Respondermaus trägt ein Transgen, das durch den Aktivator der Effektormaus transkriptionell regulierbar (*on/off*) ist. Die aus dieser Kreuzung entstehenden bitransgenen Nachkommen sind dann in der Lage, das gewünschte Transgen konditional zu exprimieren (Bockamp et al., 2002).

In den letzten Jahren wurden mehrere solcher binären Systeme in transgenen Mäusen erfolgreich angewendet (Furth et al., 1994; Gardner et al., 1996; Saez et al., 2000; Cronin et al., 2001). Einige dieser Modelle basieren auf nukleären Hormonrezeptorfusionen der Steroidhormone Progesteron (Gardner et al., 1996), Östrogen (nur *in vitro* Braselmann et al., 1993) oder Ecdyson (Saez et al., 2000). Nach Stimulation durch einen adäquaten Liganden wandeln sich diese Fusionspolypeptide in aktive Dimere um, welche dann an spezifische DNA-Ankersequenzen binden können und die Transkription des Transgens aktivieren (Evans, R. M. 1988; Carson-Jurica et al., 1990; Pratt und Toft 1997).

Ein weiteres System, das Isopropyl- β -D-thiogalaktosidase (IPTG)-induzierbare-System, beruht auf dem regulatorischen Mechanismus des Lactoseoperons von *Escherichia coli*, welcher 1961 von Jacob und Monod entdeckt wurde (Jacob und Monod 1961). In Abwesenheit von Lactose (hier der Ligand) bindet der *lacI*-Repressor des Operons an seine Bindungssequenz auf der DNA (*lacO*) und verhindert somit die Transkription von Genen, die für die Umsetzung von Lactose relevant sind, und umgekehrt. Neuere Arbeiten, in denen ein modifizierter synthetischer *lacI*-Repressor (*synlacI*-Repressor) zur Herstellung transgener Mäuse verwendet wurde, waren bereits erfolgreich und zeigten, dass ein ausgewähltes Transgen durch IPTG-vermittelte Induktion in diesen Mäusen exprimiert werden konnte (Cronin et al., 2001).

2.2 Das Tet-System

Das bisher erfolgreichste binäre System zur induzierbaren Genexpression in genetisch veränderten Mäusen ist das Tet *on/off*-System. Gossen und Bujard konnten 1992 zeigen, dass das tet-Resistenzoperon des *Escherichia coli* Tn 10-Genlokus genutzt werden konnte, um transgene Expression in Säugerzellen konditional zu regulieren (Gossen und Bujard 1992). Durch die Fusion des Tet-Repressors (TetR) mit der VP 16 Aktivationsdomäne des *Herpes simplex*-Virus entstand der tTA-Transaktivator, welcher direkt über Zugabe von Tetracyclin in der Zellkultur reguliert werden konnte: In Abwesenheit von Tetracyclin (bzw. seines Analogons Doxycyclin (DOX)) ist tTA in der Lage, spezifisch an seine Tetracyclinoperon-Konsensussequenz (Tetracyclin Responsives Element, TRE) zu binden und so die Transkription eines gewählten Transgens zu aktivieren. Hierbei ist wichtig, zu verstehen, dass die TRE direkt an einen synthetischen Minimalpromoter gekoppelt ist, welcher in Abwesenheit von tTA normalerweise transkriptionell inaktiv ist. Durch die Zugabe von DOX kommt es zu einer Konformationsänderung des tTA-Effektors, die das Anbinden von tTA an das TRE verhindert und dazu führt, dass die Genexpression des Transgens zum Erliegen kommt (Tet-*off*-System).

Das Tet-System besteht also aus zwei Hauptkomponenten: Dem vom Liganden DOX abhängigen und somit exogen und reversibel induzierbaren Effektor tTA, sowie dem über die TRE-CMV-Minimalpromoterkassette gesteuerten Transgen als Responder.

Schon bald nach dem Erscheinen dieser Pionierarbeiten gelang es, die Erkenntnisse, die *in vitro* gemacht wurden, auch in transgenen Mäusen erfolgreich anzuwenden. Durch die Verpaarung einer Maus, die als Transgen den oben beschriebenen Effektor tTA unter der Kontrolle eines humanen Cytomegaloviruspromoters (hCMV) trug, mit einer Respondermaus, welche das an die TRE-CMV-Minimalpromoterkassette klonierte Reporter-gen Luciferase besaß, konnten erstmals bitransgene Tiere generiert werden, welche das luciferasekodierende Reporter-gen exogen reversibel exprimierten (Furth et al., 1994). Diese Mäuse zeigten eine im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Tiere, die allein das Responderkonstrukt trugen) stark erhöhte Luciferaseexpression in vielen untersuchten Geweben. In der Zunge, im Muskel und der Haut kam es teilweise zu bis zu 100-fach gesteigerter Expression des Reporter-gens. Setzte man den bitransgenen Tieren subkutan Tetracyclinpellets ein, die die Induktorsubstanz Tetracyclin (Tet) langsam freigaben, und untersuchte die Tiere nach einer Woche, so waren die Luciferasewerte wieder auf das Basallevel zurückgegangen. Diese Arbeit zeigte erstmals, dass es möglich war, ein rekombinantes Genprodukt in Mäusen exogen und zugleich reversibel zu induzieren.

Durch die Entwicklung des reversen Transaktivators (rtTA), der sich ebenfalls über Tet regulieren ließ, konnte das System in seiner Anwendung weiter verbessert werden. Diese Mutante (rtTA) des tTA ist in der Lage, bei Zugabe von DOX (Tet-*on*) an TRE anzubinden und somit den CMV-Minimalpromoter zu aktivieren. Hierdurch ergaben sich zwei entscheidende Vorteile: Auch wenn sich die pharmakologischen Eigenschaften von Tetracyclin und seiner Derivate für die Anwendung *in vivo* als sehr geeignet erwiesen (bekannte Pharmakokinetik, keine Toxizität, Gewebs- und Plazentagängigkeit), so wäre doch in einigen Fällen, wie etwa während der Embryonalentwicklung und –aufzucht, oder z.B. für gentherapeutische Fragestellungen eine dauerhafte Anwesenheit des Antibiotikums nicht erwünscht. Dies kann durch den Einsatz eines reversen Transaktivators (rtTA) umgangen werden. Da die Induktion einer Genexpression langsamer verläuft, wenn der Effektor zunächst inaktiviert werden muss (*tet clearance*), konnte die Aktivationskinetik durch die Entwicklung des rtTA wesentlich beschleunigt werden, was für viele experimentelle Fragestellungen von Vorteil ist (Gossen et al., 1995). Kistner und Kollegen generierten bald darauf transgene Mäuse, die als Effektor das rtTA trugen. In diesen Experimenten zeigte sich, dass die Expression des Transgens in manchen Fällen bereits nach einer Stunde volle Aktivität erreichte und so ein schnelles „Anschalten“ des Transgens möglich wurde (Kistner et al., 1996).

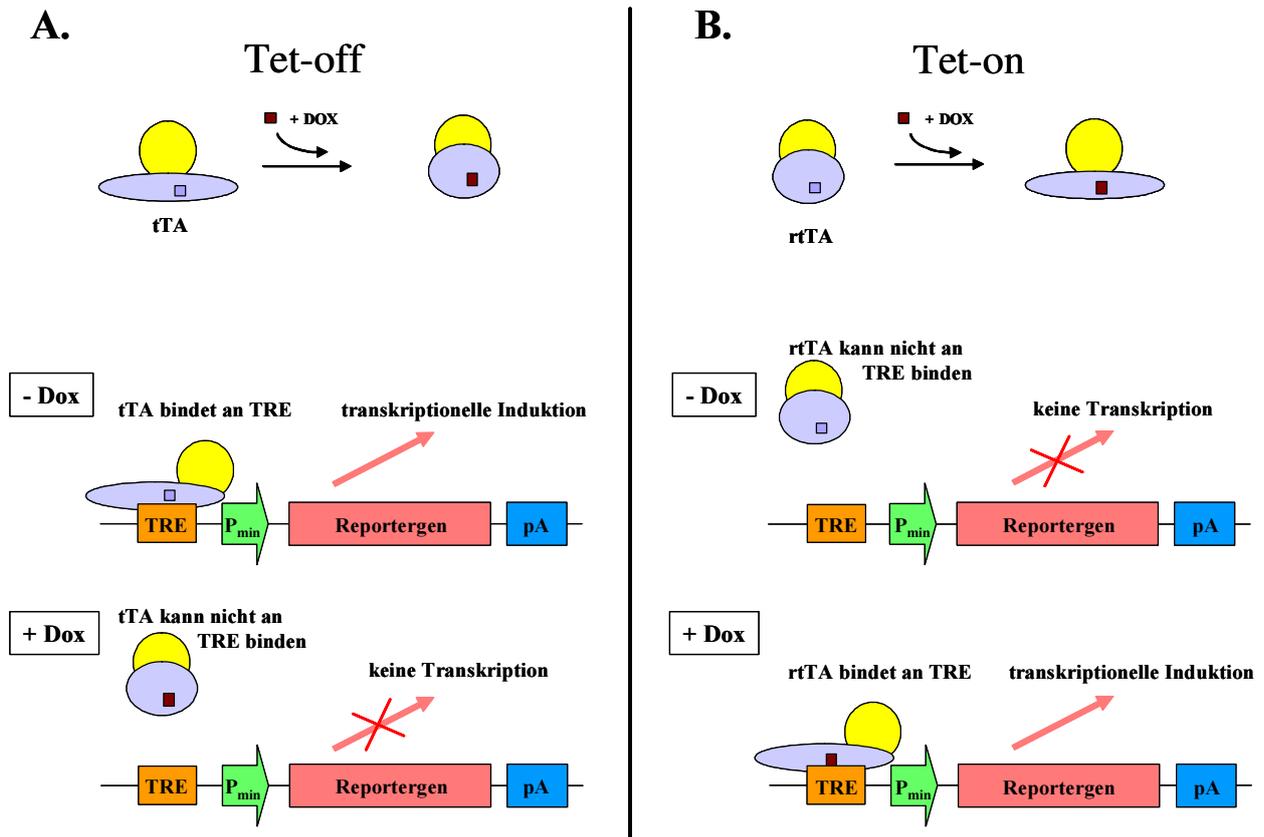


Abb.1 Das Tet-System

A: Das Tet-off-System (tTA) aktiviert die Expression in Abwesenheit seines Liganden Doxycyclin (DOX, dargestellt als braunes Kästchen). Bei Zugabe von DOX erlischt die Transkription des Reportergens. B: Im Gegensatz hierzu führt die Zugabe von DOX im Tet-on-System (rtTA) zu einer transkriptionellen Induktion des Reportergens.

tTA, Tetrazyclin-abhängiger Transaktivator; rtTA, reverser Tetrazyclin-abhängiger Transaktivator; DOX, Doxycyclin (Ligand); TRE, Tetracyclin Responsives Element.

Aus Bockamp et al., 2002.

2.3 Das modifizierte Tet-Repressorsystem

Ein weiteres Problem des Tet-Systems lag in der für manche transgene Linien berichteten unerwünschten Restaktivität des CMV-Minimalpromoter-Responders (*promoter leakyness*). Es wurde festgestellt, dass in manchen transgenen Mauslinien auch ohne Aktivierung durch den Effektor eine unerwünschte Basalexpression des Reportergens detektiert werden konnte (Furth et al., 1994; Gossen et al., 1995; Kistner et al., 1996; Imhof et al., 2000). Als gezeigt werden konnte, dass es mit Hilfe eines modifizierten Tet-Repressorsystems möglich war, die Expression eines aktiven Zielpromoters zu reprimieren (Deuschle et al., 1995), kam man dem Ziel, die oben beschriebene unerwünschte Basalaktivität eines Respondergens herunterzuregulieren, einen entscheidenden Schritt näher. Erste Versuche ergaben, dass durch die Fusion der KRAB-Domäne des humanen Kox 1-Zinkfingerproteins an den Tet-Repressor des Tn10-Genlokus von *Escherichia coli* ein über Tet kontrollierbares Hybridprotein geschaffen werden konnte, welches in der Lage war, *in vitro* die Aktivität eines konstitutiv aktiven hCMV-*immediate early*-Promoter/Enhancerelementes in HeLa-Zellen herunterzuregulieren. Wurde das Medium mit DOX versehen, so kam es zu einem mehr als 50-fachen Anstieg der Luciferaseexpression (Reportergen: Luciferase) im Vergleich zur Basalaktivität. Diese Arbeit zeigte, dass das Tet-System nicht nur dazu genutzt werden konnte, die Transkription von Genen zu aktivieren, sondern diese auch abzuschalten.

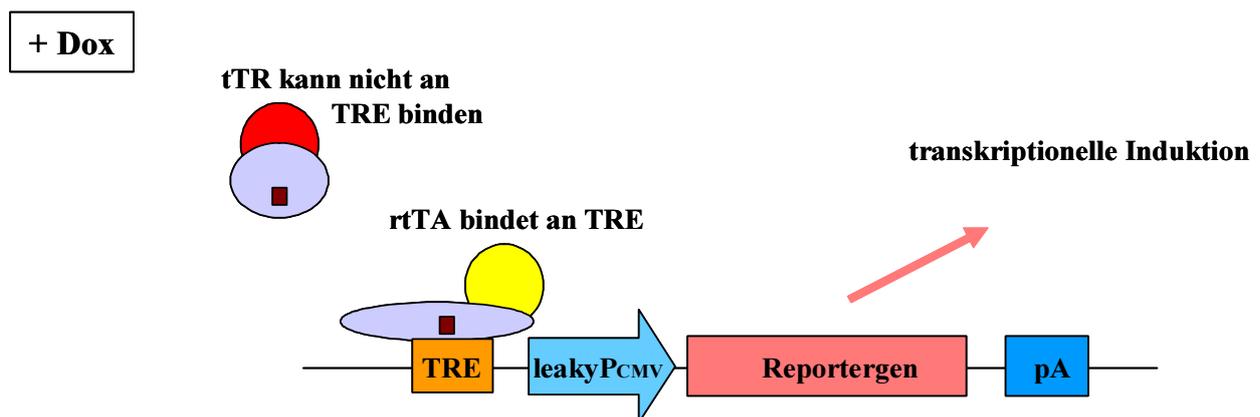
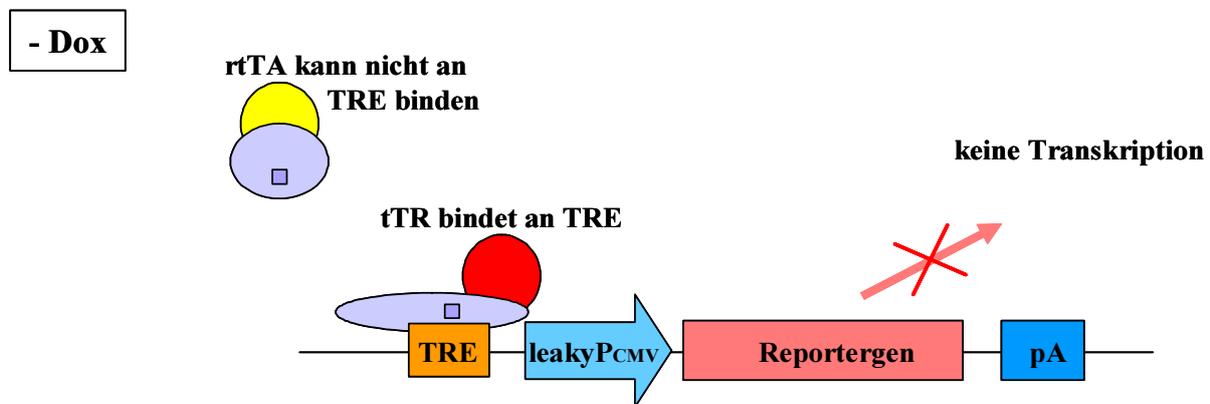
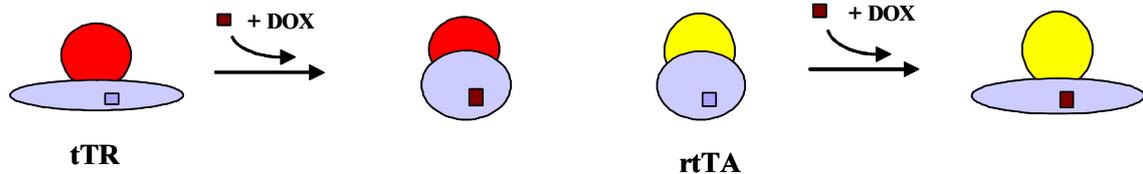


Abb.2 Das kombinierte Repressor/Aktivator Tet-System

Bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Tetrazyclin-abhängigen Repressors (tTR) sowie eines reversen Tetrazyclin-abhängigen Transaktivators (rtTA) kann die Transkription eines Reportergens allein über die Doxycyclinkonzentration exogen und reversibel induziert werden. tTR bindet allein in Abwesenheit seines Liganden Doxycyclin (DOX, dargestellt als braunes Kästchen) an das TRE (Tetracyclin Responsives Element) des Responders und unterbindet somit die Transkription des Reportergens, welches über einen konstitutiv aktiven CMV-Minimalpromoter (leaky PCMV) exprimiert wird. Im Gegensatz hierzu führt die Zugabe von DOX zu einer transkriptionellen Induktion des Reportergens, da nun allein der Tetrazyclin-abhängige Transaktivator rtTA an das TRE anzubinden vermag.

Angelehnt an Bockamp et al., 2002.

Die Effektivität von Tet-Repressorsystemen im Hinblick auf das Herunterregulieren der oben beschriebenen ungewollten Basalaktivität des TRE-CMV-Minimalpromoter-Responders konnte sowohl *in vitro* (Forster et al., 1999; Freundlieb et al., 1999; Imhof et al., 2000) als auch im transgenen Mausmodell (Zhu et al., 2001) gezeigt werden. In diesen transgenen Modellen wurden Aktivator und Repressor co-exprimiert und so die stringente und DOX-

abhängige Regulation des Transgens erreicht. Der Funktionsmechanismus eines kombinierten Repressor/Aktivator Tet-Systems ist in Abb.2 dargestellt.

Ein weiterer und viel entscheidenderer Aspekt der Veröffentlichung von Deuschle und Kollegen war jedoch die grundsätzliche Idee, durch Verknüpfung des Tet-Systems mit einem Repressorelement die Expression von endogenen Genen exogen und reversibel zu reprimieren (Deuschle et al., 1995).

Dieser Gedanke ist die Basis der hier vorliegenden Arbeit, deren Ziel es war, ein spezifisches Mausgen mit Hilfe eines modifizierten Repressor-Tet-Systems herunterzuregulieren und somit, im Gegensatz zu einer „klassischen“ knock-out-Strategie, nicht das Gen an sich *ab initio* irreversibel zu zerstören, sondern allein dessen Transkription exogen, induzierbar und reversibel zu beeinflussen (*transcriptional targeting*).

2.4 Transkriptionsrepression

Eine besondere Bedeutung hatte in diesem Zusammenhang natürlich die Auswahl potentieller Repressoren, die über ihre spezifischen Wirkmechanismen die Transkriptionsrepression bewirken können. Interessanterweise wurden, fast zeitgleich mit der Entwicklung des Tet-Systems, fundamentale und revolutionäre Erkenntnisse auf dem Gebiet der Transkriptionsregulation gewonnen. Es wurde deutlich, dass für die ungeheure Anzahl von Informationen, die für das Funktionieren eines komplexen eukaryotischen Organismus nötig sind, nicht allein die primäre DNA-Sequenz verantwortlich sein konnte, sondern auch epigenetische Mechanismen bei der Kontrolle der Genexpression eine entscheidende Rolle spielen müssen. Dies führte zur Entdeckung des epigenetischen Codes (Jenuwein und Allis 2001; Rice und Allis 2001). Ganz allgemein gesprochen handelt es sich bei diesem epigenetischen Code um von bestimmten Enzymen vermittelte, kovalente Veränderungen an den Histonen oder auch an der DNA selbst, die zu einer unterschiedlich dichten Verpackung der Chromatinstruktur führen. Bedingt durch eine veränderte Zugänglichkeit der Transskriptionsmaschinerie an die DNA, kann es entweder zu einer Genaktivierung oder zu einer Genrepression kommen. Wie ist dies nun genauer zu verstehen?

In jeder eukaryotischen Zelle liegt die DNA nicht als nackter Strang vor, sondern als ein dynamisches Polymer, das Chromatin. Die Bausteine des Chromatins sind die Nukleosome. Jedes Nukleosom besteht aus einem Oktamer von Core-Histonproteinen, gebildet von vier Histonpartnern (einem H3-H4-Tetramer und zwei H2A-H2B-Dimeren), um die jeweils fast zwei superhelikale Windungen von DNA geschlungen sind (Luger et al., 1997). Die Histone sind kleine Proteine, welche aus einer globulären Domäne und einem flexiblen und geladenen

NH₂-Terminus, auch Histonschwanz genannt, bestehen, der aus dem Nukleosom herausragt. Erst in den letzten Jahren wurde klar, dass die Kontrolle der Gentranskription unter anderem durch kovalente Veränderungen an eben diesen Histonschwänzen bewirkt wird. Die am besten charakterisierte Modifikation ist die Acetylierung von ε-Aminogruppen an Lysinresten der N-terminalen Schwänze von Core-Histonproteinen, welche von Histonacetylasen (HATs) katalysiert werden (Wolffe 1997). Hierbei kommt es zu einer Neutralisation der positiv geladenen Histonschwänze, was deren Affinität zur negativ geladenen DNA herabsetzt (Hong et al., 1993). Somit wird die Chromatinstruktur aufgelockert und zugänglich für transkriptionelle Regulatorproteine (Li et al., 1993; Vettese-Dadey et al., 1996). Einige bekannte transkriptionale Co-Aktivatoren besitzen Histonacetyltransferaseaktivität (Grunstein 1997; Kuo und Allis 1998; Workman und Kingston 1998). Im Gegensatz dazu induziert die Deacetylierung dieser Lysinreste durch die enzymatische Aktivität von Histondeacetylasen (HDACs) eine epigenetische Repression und kehrt somit den oben beschriebenen Effekt um. Die gegenwärtig bevorzugte Interpretation der molekularen Wirkweise von HDACs besagt, dass durch die herabgesetzte Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsaktivatoren, hervorgerufen durch eine engere Chromatinverpackung, Transkriptionsrepression implementiert wird (Roth und Allis 1996; Wolffe und Pruss 1996). Darüber hinaus ist es transkriptionellen Repressorkomplexen möglich, an die DNA anzubinden und so HDACs, welche keine eigene DNA-Bindungskapazität haben, an ihren Wirkort zu bringen (Braunstein et al., 1993; Heinzel et al., 1997).

2.5 Repressormoleküle

Das Wissen, mit Hilfe von HDACs Genexpression zu reprimieren, machte diese Enzymfamilie deshalb als Repressorkandidaten attraktiv. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass durch Forschungen in den letzten zwei Jahren noch weitere Enzyme entdeckt werden konnten, die über Modifikationen an den Histonschwänzen wirken und so die Genregulation beeinflussen. Bei diesen kovalenten Veränderungen handelt es sich um Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinisierung bestimmter Aminosäuren (Lysin, Arginin, Serin). Die Vielfältigkeit dieser kovalenten Modifikationen sowie ihr Auftreten nach bestimmten Mustern in bestimmten Sequenzen spricht in überzeugender Weise für die Existenz des Histoncodes (Berger 2002; Kouzarides 2002).

Bis heute sind in Säugern 11 verschiedene HDACs identifiziert worden, welche in 3 verschiedene Klassen eingeteilt werden. HDACs der Klasse 1 (HDAC 1, 2, 3, 8 und wahrscheinlich 11) werden in den meisten Zelltypen exprimiert und weisen hohe Homologie

zum transkriptionellen Co-Regulator RPD3 der Hefe auf (Vidal und Gaber 1991). Mitglieder der Klasse 2 (HDAC 4, 5, 7, 9 und 10) kommen nur in bestimmten Geweben vor und besitzen katalytische Domänen mit hoher Sequenzhomologie zur Hefedeacetylase Hda1 (Rundlett et al., 1996). HDACs der Klasse 3 sind Deacetylasen, die in Verbindung mit dem Hefe Repressorfaktor Sir2p gebracht werden (Guarente 2000).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden HDAC 1, 3 und 4 als Repressoren verwendet.

Die Histondeacetylasen 1 und 3 sind ubiquitär exprimierte Proteine, welche lediglich aus einer Repressordomäne, nämlich der Deacetylase Domäne bestehen (Yang, W.-M. et al., 1997; Emiliani et al., 1998; Hassig et al., 1998). HDAC 1 und 3 sind im Zellkern anzutreffen, auch wenn HDAC 3 neben dem nukleären Lokalisierungssignal zusätzlich ein nukleäres Exportsignal besitzt (Emiliani et al., 1998; Yang, W.M. et al., 2002). HDAC 1 ist in der Lage, alle vier Histonproteine *in vitro* zu deacetylieren und benötigt hierbei keine Co-Faktoren. *In vivo* bildet HDAC 1 zusammen mit HDAC 2 und den histonbindenden Proteinen RbAp46/48 den HDAC-Corekomplex, welcher mit den Co-Repressoren Sin3 und NuRD (*nucleosome remodeling histone deacetylase complex*) assoziieren kann (Knoepfler und Eisenman 1999).

Auch wenn endogenes HDAC 3 vor allem mit sich selbst assoziiert ist, kann es doch *in vitro* und *in vivo* Oligomere mit anderen HDACs (HDAC 4,5 und 7) bilden (Fischle et al., 2001; Yang, W.M. et al., 2002). Im Gegensatz zu HDAC 1 und 2 bildet HDAC 3 keine Co-Repressorkomplexe mit Sin3 oder NuRD, dafür jedoch mit den Co-Repressoren SMRT und N-Cor, welche eine konservierte Deacetylase-Aktivierungsdomäne besitzen, über die HDAC 3 aktiviert wird (Guenther et al., 2001; de Ruijter et al., 2002).

HDAC 4 wird im Gegensatz zu HDAC 1 und 3 nicht in allen Geweben exprimiert. Am häufigsten ist es in Gehirn und Skelettmuskulatur anzutreffen (Grozinger et al., 1999; Wang et al., 1999). Es besteht aus wenigstens zwei Repressordomänen, nämlich einer N-terminalen Repressordomäne sowie einer Deacetylase-Domäne (Miska et al., 1999; Wang et al., 1999). HDAC 4 kann nicht direkt an die DNA anbinden. Fusioniert an GAL4 ist HDAC 4 jedoch in der Lage, die Aktivität eines mit GAL4 Bindungsstellen versehenen viralen Thymidinkinasepromoters zu reprimieren (Miska et al., 1999). HDAC 4 liegt primär im Cytoplasma vor, wohin es aktiv aus dem Nucleus exportiert wird (Miska et al., 1999). Außerdem ist bekannt, dass HDAC 4 direkt an den Transkriptionsaktivator MEF 2 (*myocyte enhancer factor 2*) anbindet und so die MEF 2-vermittelte Transkription herunterreguliert (Miska et al., 1999; Wang et al., 1999).

Generell ist zu sagen, dass histonmodifizierende Enzyme keinen Zugang zu ihren Substraten haben, solange sie nicht gezielt von an die DNA gebundenen Aktivatoren bzw. Repressoren

an diese herangebracht werden. Dies zeigt klar, dass nicht alle Histone generell von dem gleichen Enzym zur gleichen Zeit global modifiziert werden können und steht für die Selektivität der Regulation (Kouzarides 2002).

Ein weiterer epigenetischer Mechanismus, der für das Abschalten von Genen in der Zelle von entscheidender Bedeutung ist, ist die DNA-Methylierung. Säugerzellen besitzen das Potential, ihr Genom über die kovalente Methylierung des Cytosinrings an seiner 5'-Position zu modifizieren, vorausgesetzt dem Cytosin folgt eine Guaninbase (Bird 1992). Bestimmte Regionen des Genoms, speziell die 5'-Enden von Genen, besitzen eine erhöhte Frequenz an CpG-Dinukleotiden, dann auch CpG-Inseln genannt (Bird 1992). Im Säuger genom sind etwa 70% dieser CpG-Inseln methyliert (Cooper und Krawczak 1989). Dieser Methylierungsstatus ist essentiell für eine normale Entwicklung, da er eine wichtige Rolle spielt bei der Inaktivierung des X-Chromosoms, der Inaktivierung parasitärer, invasiver, retroviraler Elemente, der gewebsspezifischen Genexpression, sowie dem Imprinting (Jaenisch 1997; Surani 1998; Bestor, T. H. 2000). Zurückzuführen ist dies auf die Funktion, welche die CpG-Methylierung bei der transkriptionellen Genrepression spielt (Razin 1998; Ng und Bird 1999). Verantwortlich für die Methylierung der Cytosinbasen sind die DNA-Methyltransferasen (Dnmts). Als erste wurde die DNA-Methyltransferase Dnmt1 entdeckt (Bestor, T. et al., 1988), welche verantwortlich für das Beibehalten eines bereits in der Zelle existierenden Methylierungsstatus während der DNA-Replikation ist (Leonhardt et al., 1992; Liu et al., 1998), Aus diesem Grund wurde dieses Enzym als „*maintenance*“-Dnmt bezeichnet. Aus Versuchen mit Dnmt-knock-out-ES-Zellen ist bekannt, dass diese Zellen trotzdem *de novo*-Methylierung aufweisen (Lei et al., 1996). Deshalb wurde davon ausgegangen, dass neben der Dnmt1 auch von dieser unabhängige *de novo*-Methyltransferasen existieren (Lei et al., 1996). Okano und Kollegen entdeckten daraufhin 1998 Dnmt3a und Dnmt3b, von denen Dnmt3a in dieser Arbeit als potentiell es Repressormolekül getestet werden sollte (Okano et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass diese Enzyme in erhöhtem Maße in undifferenzierten ES-Zellen exprimiert wurden, in differenzierten ES-Zellen und Mausgewebe adulter Mäuse jedoch herunterreguliert waren. Weiterhin methylieren Dnmt3a und 3b halbmethylierte und unmethylierte DNA *de novo* (Okano et al., 1998). Weitere Forschungen ergaben, dass dieses Methylierungsmuster nicht zufällig ist (Hsieh 1999). Aus einer anderen Studie ging hervor, dass Dnmt3a möglicherweise wichtige Funktionen neben der *de novo* Methylierung besitzt. Über den sequenzspezifischen Transkriptionsfaktor RP58 kann Dnmt3a gezielt an Promotoren herangebracht werden und zeigt dort eine Co-Repressor-Aktivität unabhängig von seiner *de novo*-Methyltransferase-Aktivität. Außerdem ist Dnmt3a über die Rekrutierung von HDAC 1 in der Lage, Transkription zu reprimieren (Fuks et al., 2001), ein Phänomen,

welches zuvor auch schon für Dnmt1 gezeigt werden konnte (Fuks et al., 2000; Robertson et al., 2000; Rountree et al., 2000).

Durch diese Forschungsarbeiten wurde deutlich, dass epigenetische Mechanismen (Histondeacetylierung und DNA-Methylierung), welche über Modifikationen, die an der DNA selbst bzw. an Histonproteinen einen für jede Zelle individuellen epigenetischen Code anlegen können, funktional nicht voneinander getrennt werden können. Es ist an dieser Stelle jedoch auch anzumerken, dass durch die Methylierung von CpGs die Wirkung von Transkriptionsfaktoren aufgehoben werden kann. Da Transkriptionsfaktoren auf den Methylierungsstatus unterschiedlich reagieren, ist es wahrscheinlich, dass diese direkte Störung der Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA wohl eher eine untergeordnete Rolle bei der Repression von Genen spielt (Bird und Wolffe 1999). Von viel entscheidenderer Bedeutung sind Erkenntnisse, die darauf hinwiesen, dass das Abschalten eines Gens durch Methylierung eng mit der Remodellierung einer Chromatinstruktur verbunden ist, welche die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren an den Promoter dieses Gens herabsetzt (Razin 1998). Die Tatsache, dass heterochromatische Regionen des Säuger-genoms auch ein hohes Maß an CpG-Methylierung aufwiesen (Razin und Cedar 1977; Jeppesen und Turner 1993), sprach hierfür ebenso, wie die Beobachtung, dass *in vitro* methylierte Gensequenzen in der Zelle zu inaktivem Chromatin formatiert wurden (Keshet et al., 1986), und die reprimierenden Effekte, welche durch die CpG-Methylierung ausgelöst wurden, nur dann zu beobachten waren, wenn die methylierte DNA ihre entsprechende Chromatinstruktur erlangt hatte (Buschhausen et al., 1987). Darüber hinaus war in komplementären Versuchen ein starker Aktivator wie z.B. GAL4-VP16 in der Lage, eine allein durch DNA-Methylierung hervorgerufene Genrepression aufzuheben, konnte dies aber nicht mehr, sobald die methylierte DNA-Zielsequenz in Chromatin verpackt worden war (Kass et al., 1997).

Für das Verstehen des Zusammenspiels von DNA-Methylierung, Hypoacetylierung und Genrepression waren die Forschungsergebnisse zweier Arbeitsgruppen von entscheidender Bedeutung. Das methylbindende Protein MeCP2 (*methyl-CpG-binding protein*), welches an der Transkriptionsrepression methylierter DNA beteiligt ist (Nan et al., 1997), rekrutiert über das Multidomänenprotein Sin3A Histondeacetylasen (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998) und bildet somit ein Bindeglied zwischen den beiden zuvor beschriebenen epigenetischen Mechanismen, nämlich der Histon- und DNA-Modifikation. Deshalb war es wichtig, im Rahmen dieser Arbeit sowohl MeCP2 als auch Sin3A auf ihr Repressorpotential zu testen.

Das Polypeptid MeCP2 ist ein abundantes Säugerprotein, welches im Zellkern lokalisiert ist und eine hohe Affinität zu methylierten CpG-Paaren besitzt, an die es *in vitro* und *in vivo* bindet. Ein einzelnes symmetrisch methyliertes CpG-Paar ist bereits ausreichend, um eine

Bindung des MeCP2 hervorzurufen. Dabei spielt es keine Rolle, ob die methylierte DNA als nackter Strang vorliegt oder in Chromatin verpackt ist (Nan et al., 1996; Nan et al., 1997; Bird 1999). MeCP2 ist essentiell für die embryonale Entwicklung der Maus (Tate et al., 1996), und MeCP2-knock-out Mäuse sind embryonal letal. Das MeCP2-Protein besteht aus der Methyl-CpG-bindenden Domäne (MBD), sowie einer Transkriptionellen Repressordomäne (TRD), über die es in der Lage ist, Transkription zu reprimieren (Nan et al., 1997). Wie bereits erwähnt, wird diese Repression durch das Anbinden des Sin3-HDAC-Co-Repressor-Komplexes an die TRD vermittelt und ist somit vor allem auf eine über Histondeacetylierung hervorgerufene engere Packung der Chromatinstruktur zurückzuführen (Nan et al., 1998).

Der Sin3-Co-Repressor-Komplex besteht aus mindestens acht Untereinheiten (sin3, HDAC1 und 2, RbAp46/48, SAP 18 und 30) und ist hoch konserviert von der Hefe bis zum Säuger (Ng und Bird 2000). Das Multidomänenprotein Sin3 bildet in diesem Komplex eine Art Gerüst, um das sich die anderen Proteine organisieren, und vermittelt über verschiedene Interaktionsdomänen die Bindung an Transkriptionsfaktoren und weitere DNA-bindende Proteine, welche dann den Komplex gezielt an seinen Wirkort bringen. Über eine weitere hoch konservierte Region bindet Sin3 HDAC1 und 2. Es wird vermutet, dass diese HDACs dann die eigentliche, wichtige Repressorfunktion des Komplexes ausführen (Laherty et al., 1997; Nan et al., 1998; Knoepfler und Eisenman 1999; Ahringer 2000). Auch wenn über das Blockieren der HDAC-Aktivität, etwa über die Behandlung mit Histondeacetylasehemmern, eine beobachtete Repression durch den Sin3-Komplexe signifikant aufgehoben werden kann, so ist diese nicht völlig eingestellt, was impliziert, dass weitere Arten von Sin3-vermittelter Repression existieren (Nan et al., 1998; Knoepfler und Eisenman, 1999). Fusioniert an eine DNA-bindende Domäne ist zum Beispiel mSin3A in der Lage, die Transkription eines Zielpromoters zu reprimieren (Rao et al., 1996).

Ein noch nicht erwähntes, aber ebenfalls in dieser Arbeit als Repressor benutztes Protein ist das humane Polycomb-group-(PcG)-Protein EED (*embryonic ectoderm development*). PcG-Proteine bilden multimerische Proteinkomplexe, die an der Beibehaltung eines reprimierten Transkriptionsstatus über Zellgenerationen hinweg beteiligt sind (*permanent heritable gene silencing*) (Kingston et al., 1996; Pirrotta 1997; Schumacher und Magnuson 1997). EED ist ein Bestandteil eines humanen PcG-Proteinkomplexes (Sewart et al., 1998). Van der Vlag und Otte konnten zeigen, dass EED sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit HDAC 1 und 2 interagiert, und dass diese Interaktion hochspezifisch ist, da keine anderen getesteten PcG Proteine von Vertebraten hierzu in der Lage waren. Eine durch EED vermittelte Transkriptionsrepression konnte in dieser Studie durch die Zugabe eines Histondeacetylasehemmers aufgehoben werden, was implizierte, dass die Repression über die HDAC-Aktivität des

Multiproteinkomplexes bewirkt wurde (van der Vlag und Otte 1999).

Auch diese Ergebnisse machen deutlich, dass sich verschiedene Genrepressorsysteme des Organismus gegenseitig ergänzen, um einen individuellen epigenetischen Code anzulegen.

Da alle hier beschriebenen Repressoren nicht autonom an einen zu reprimierenden Zielpromoter binden können, war es die Absicht dieser Arbeit, „Designerrepressoren“ zu generieren, welche das über Tetracyclin kontrollierbare TetR-Induktionssystem mit den Repressormolekülen verbinden. Zu diesem Zweck sollte das von Hillen beschriebene TetR(B/E) (Forster et al., 1999) TRE-DNA-bindende und durch DOX induzierbare Polypeptid carboxyterminal mit der für den jeweiligen Repressor kodierenden DNA-Sequenz fusioniert werden. Auf diese Weise sollten Hybridrepressoren generiert werden, die ligandenvermittelt an einen spezifischen Promoter gebracht werden konnten (*Tet on/off*).

Die Frage war nun, welche ausgewählten Repressormoleküle unter den Bedingungen des Tet-Systems (fusioniert mit dem Tet-Repressor) ihr Repressorpotential entfalten könnten.

Natürlich war es notwendig, die einzelnen Designerrepressoren zunächst in der Zellkultur auf ihre Wirksamkeit zu testen und somit die Grundlage für ein *transcriptional targeting* in der Maus zu schaffen. Falls es gelingen sollte, Tet-induzierbare synthetische Repressoren, die in der Zellkultur funktionierten, zu entwickeln, war es als nächster Schritt denkbar, diese dann *in vivo*, also im experimentellen Mausmodell, auf ihre Wirksamkeit zu testen.