

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Transkription spezifischer Zielgene mit Hilfe eines im Rahmen dieser Doktorarbeit neu zu entwickelnden Repressorsystems exogen induzierbar kontrollieren zu können (*transcriptional targeting*). In diesem Zusammenhang sollten neue und zuvor noch nicht funktionell im Tet-System getestete Repressorfusionen bezüglich ihrer Repressionseffizienz charakterisiert werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden deshalb sieben verschiedene Tet-Silencermoleküle (TetR (B/E)-HDAC 1,3 und 4; TetR (B/E)-MeCP2; TetR (B/E)-Dnmt3a; TetR (B/E)-Sin3A; TetR (B/E)-EED) generiert und zusätzlich ein Tet-abhängiges konstitutiv aktives HPRT-Responderkonstrukt hergestellt, welches als Reporter gen Luciferase exprimierte. In einer ersten Versuchsreihe wurde das Potential der verschiedenen Tet-Repressoren zunächst in transienten Cotransfektionssays evaluiert. Diese Experimente zeigten, dass der TetR (B/E)-HDAC 4-Repressor in der Lage war, die Luciferaseaktivität des HPRT-Responders um 50% herunterzuregulieren. Um die Effizienz des TetR (B/E)-HDAC 4-Repressors auf einem Zielpromoter zu testen, welcher im chromosomalen Kontext vorlag, wurde in weiteren Versuchen die HRL9-Zelllinie verwendet, welche einen konstitutiv aktiven humanen CMV-Minimalpromoter-Responder mit dem Reporter gen Luciferase sowie einen reversen Transaktivator (rtTA) stabil in ihr Genom integriert hat. Mittels transients Transfektion des TetR (B/E)-HDAC 4 in die HRL9-Zelllinie war es möglich, die Transkription des hCMV-Zielpromoters um über 60% zu reprimieren. Nach stabiler Transfektion der HRL9-Zelllinie mit dem TetR (B/E)-HDAC 4-Repressorkonstrukt wurden zwei Einzelklone isoliert, deren Luciferaseaktivität sich exogen über den Induktor Doxycyclin (DOX) im Medium sowohl negativ (durch HDAC 4-Repressorbindung) als auch positiv (durch rtTA-Transaktivatorbindung) regulieren ließ. Die mit Klon 102 durchgeführten Tet-*on/off* Induktionsversuche demonstrierten, dass die transkriptionelle Zielpromoteraktivität dieses Klons bei einem Konzentrationswechsel von 1µg/ml Medium zu DOX-freiem Medium um den Faktor 45 herunterreguliert werden konnte (*shift* rtTA-Transaktivatorbindung zu TetR (B/E)-HDAC 4-Repressorbindung am Zielpromoter).

Weiterhin konnte innerhalb eines Langzeitversuches gezeigt werden, dass das reprimierende Potential der HDAC 4 Histondeacetylase auch nach sechswöchiger, ununterbrochener Anlagerung des Repressors an den hCMV-Promoter nicht zu einer permanenten Repression des Promoters führte. Dieses Resultat demonstrierte, dass die epigenetische Wirkung der Histondeacetylase 4 vollständig modulierbar bleibt und somit als dynamisch-reversibler molekularer „*switch*“ funktioniert.

Mit Hilfe des spezifischen Histondeacetylasehemmers Trichostatin A (TSA) konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Repression auf die TetR (B/E)-HDAC 4-vermittelte Histondeacetylaseaktivität zurückzuführen war.

Des weiteren gelang es im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des tritransgenen stabilen HRL9-HDAC 4-Klons 102, grundlegende Einsichten über den funktionalen Zusammenhang zwischen Zellzyklusprogression und *de novo* Institution der Transkriptionsrepression bzw.-aktivierung zu gewinnen. Durch die Blockade des Zellzyklus mit Hilfe von Mimosin konnte eindeutig bewiesen werden, dass die transkriptionelle Aktivierung eines Zielpromoters (hCMV-Minimalpromoter) durch den reversen Transaktivator rtTA in der G1-Phase stattfinden kann. In Parallelversuchen gelang es erstmalig nachzuweisen, dass Histondeacetylase 4-vermittelte Genrepression nicht während der G1-Phase möglich war, sondern bei Progression durch den Zellzyklus (G1-S-G2-M-Transition) stattfinden muss. Die hier vorgelegten Daten demonstrierten daher erstmals eindeutig einen fundamentalen Funktionsmechanismus, nämlich wie und wann Transkriptionsrepression durch den Zellzyklus propagiert wird.

7 Summary: „Development of an innovative strategy for generation of knock-out mouse models“

The aim of this thesis was the exogenically inducible controlling of the transcription of specific target genes by means of a repressor system that had to be developed (transcriptional targeting). For this, new repressor fusions, which had not been tested functionally in the Tet system before, had to be characterized with respect to their efficiency as repressors.

In the course of this work seven different Tet-silencer molecules were generated: TetR (B/E)-HDAC 1,3 and 4; TetR (B/E)-MeCP2; TetR (B/E)-Dnmt3a; TetR (B/E)-Sin3A; TetR (B/E)-EED. In addition, a Tet-dependent constitutively active HPRT responder construct was produced that – being a reporter gene - expressed luciferase. In a first series of experiments, the potential of the different Tet repressors was evaluated in transient cotransfection essays.

These experiments showed that the TetR (B/E)-HDAC 4 repressor was able to reduce the luciferase activity of the HPRT responder by 50%. To test the efficiency of the TetR (B/E)-HDAC 4 repressor on a target promoter, which was provided in a chromosomal context, the HRL9 cell line was employed in further experiments. This cell line has a constitutively active humane CMV-minimal promoter-responder with the reporter gene luciferase as well as a reverse transactivator (rtTA) integrated in its genome in a stable way.

By transient transfection of TetR (B/E)-HDAC 4 in the HRL9 cell line it was possible to repress transcription of the hCMV target promoter by over 60 %. After stable transfection of the HRL9 cell line with the TetR (B/E)-HDAC 4 repressor construct, two single clones were isolated. The luciferase activity of these clones could be regulated exogenically by the inductor doxycycline (DOX) in the medium; regulation was achieved negatively (by HDAC 4-repressor binding) as well as positively (by rtTA transactivator binding).

The Tet on/off induction experiments performed with clone 102 demonstrated that the transcriptional target promoter activity of this clone could be suppressed by a factor of 45 (shift of rtTA transactivator binding to TetR (B/E)-HDAC 4 repressor binding at target promoter) by changing the concentration from 1 µg/ml to DOX-free medium.

Furthermore, a long-time experiment proved that the repressor potential of HDAC 4 histone deacetylase did not lead to a permanent repression of the promoter even after six weeks of uninterrupted binding of the repressor to the hCMV promoter. This result showed that the epigenetic effect of histone deacetylase 4 remains fully tunable, and thus works as a dynamical, reversible molecular switch.

By means of the specific histone deacetylase supressor trichostatine A (TSA) it could be

shown that the observed repression was due to the TetR (B/E)-HDAC 4-induced histone deacetylase activity.

In the course of this work, fundamental insight into the functional dependence between cell cycle progression and *de novo* institution of transcription repression and activation was achieved with the tritransgenic stable HRL9-HDAC 4 clone 102. Blocking the cell cycle with mimosine was able to prove that transcriptional activation of a target promoter (hCMV minimal promoter) can take place in the G1 phase through the reverse transactivator rtTA.

Parallel experiments showed for the first time that histone deacetylase 4-induced gene repression was impossible during the G1 phase, but has to take place during the progression through the cell cycle (G1-S-G2-M transition). The data presented here show for the first time clearly a fundamental functional mechanism, i.e. how and when transcription repression is propagated through the cell cycle.