

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Transkription eines spezifischen Mausgens mit Hilfe eines Tet-Repressorsystems kontrollieren zu können und in diesem Zusammenhang neue, zuvor noch nicht im Tet-System getestete, eukaryotische Repressoren bezüglich ihrer Effizienz zu untersuchen.

### 5.1 Klonierung der Tet-Repressormoleküle und des TRE-Responders

Es sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst neue Repressorfusionsmoleküle entwickelt werden, mit deren Hilfe die Transkription des Zielgens exogen, induzierbar und reversibel herunterreguliert werden sollte. Zu diesem Zweck wurde als erstes eine Art „Effektor-Rückgrat“ synthetisiert. Dessen wichtigste Komponenten waren zum einen der pCAG-Promoter, welcher die Expression der TetR (B/E)-Silencer-cDNA kontrollieren sollte, und der in der Literatur als ein Promoter beschrieben wurde, der für die Expression in allen getesteten Zelltypen, sowohl in der Zellkultur als auch in der transgenen Maus geeignet ist (Niwa et al., 1991), zum anderen der tetracyclinabhängige Tet-Repressor TetR (B/E) (Forster et al, 1999) mit nachfolgendem Polylinker (für das spätere Einklonieren der ausgewählten Repressormoleküle), ein darauf folgendes Polyadenylationssignal sowie eine entkoppelte Hygromycinresistenzkassette zur Selektion stabiler Zellklone. In das auf diese Weise hergestellte Plasmid konnte nun jeweils eines der gewählten Silencermoleküle hinter den Tet-Repressor kloniert werden. Die Auswahl der Repressoren erfolgte nach intensiver Literaturrecherche. Hierbei wurde darauf geachtet, Silencer zu testen, die erstens noch nicht in Verbindung mit dem Tet-System erforscht worden waren und die sich zweitens in ihren spezifischen Wirkmechanismen unterschieden. Freundlicherweise wurden dem Labor eine Vielzahl verschiedener Repressoren von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Hierzu gehörten die Klasse I-Histondeacetylasen HDAC 1 und 3, die Klasse II-Histondeacetylase HDAC 4, die *de novo*-DNA-Methyltransferase Dnmt3a, das CpG-methylbindende Protein MeCP2 sowie das Multidomänenprotein Sin3A und das Polycomb-Gruppen-Protein EED. Bei der Klonierung der diversen Repressormolekül-cDNAs in das oben beschriebene Effektor-Rückgrat musste vor allem darauf geachtet werden, dass diese Klonierung *in frame*, also im Leserahmen an die TetR (B/E)-cDNA, erfolgte. Nur hierdurch war eine vollständige und korrekte Transkription der TetR (B/E)-Repressorfusions-cDNA gewährleistet. Aus diesem Grund wurden alle generierten Effektorplasmide in diesem Bereich ansequenziert, und so die richtige Basenabfolge überprüft. Die Sequenzierung bestätigte die

Richtigkeit der erwarteten Nukleotidsequenz in allen generierten Repressorexpressionskonstrukten.

Um Repressoren auf ihre Funktionalität und Effizienz testen zu können, war es nötig einen Tet-Responder herzustellen, über welchen die Analyse der Repressoren in der Zellkultur möglich war. Dieser Responder sollte folgende Eigenschaften haben: Erstens war es wichtig, für die verschiedenen Designerrepressoren spezifische Ankersequenzen zu schaffen. Aus diesem Grund wurde der Responder mit sechs in Tandem angeordneten tet-O Bindungsstellen (TRE) versehen. Diese tet-O Sequenzen binden die verschiedenen Repressorproteine nur in Abwesenheit von DOX, können aber keine Interaktion mit TetR (B/E)-Repressorproteinen im Beisein von DOX eingehen. Diese wichtige Eigenschaft (Tet *on/off*) ermöglicht das exogen reversible, durch DOX regulierbare Andocken der Repressoren an die Responder-DNA-Kassette. Als zweite essentielle Komponente war es wichtig, einen eukaryotischen Promoter in den Responder zu integrieren, dessen konstitutive, transkriptionelle Aktivität durch den Repressor herunterreguliert werden konnte.

Da bisherige Versuche, bei denen die Transkription von Genen gezielt durch den Einsatz von negativen und positiven Transkriptionsfaktoren reguliert wurde, lediglich mit synthetischen, viralen Promotoren durchgeführt wurden (CMV- und Thymidin-Kinase-(TK)-Promotoren) (Deuschle et al., 1995; Forster et al., 1999; Freundlieb et al., 1999; Imhof et al., 2000; Jiang et al., 2001; Ryu et al., 2001) wurde hier gezielt ein nicht-viraler, eukaryotischer Promoter für den Responder ausgewählt. Der ausgesuchte murine Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-(HPRT)-Promoter wurde gewählt, da er in allen Geweben konstitutiv exprimiert und seine Transkriptionsregulation in der Literatur im Detail beschrieben war (Melton et al., 1986). Der HPRT-Promoter sollte die Expression der über eine *intra-ribosomal entry site* (IRES) gekoppelten Reportergene (d2EGFP und Luciferase) ermöglichen. In unmittelbarer Nachbarschaft wurde 5' vom HPRT-Promoter die spezifische Ankersequenz (TRE) der Transkriptionsrepressoren und -aktivatoren kloniert. Desweiteren trägt der Responder eine entkoppelte Neomycinkassette, um eine Selektion von Zellklonen mittels G-418 nach einer stabilen Transfektion zu ermöglichen.

## **5.2 Analyse der Repressoren im transienten Transfektionsessay**

Um nun die verschiedenen klonierten Silencerkonstrukte in einem schnellen Essay auf ihr Repressionspotential zu untersuchen und gleichzeitig die Funktionalität des HPRT-Responderkonstrukts zu testen, wurden zunächst transiente Cotransfektionen des HPRT-Responders zusammen mit je einem der verschiedenen Repressoren in NIH 3T3

Mausfibroblasten durchgeführt. Die Auswertung der Versuchsergebnisse ergab, dass von allen getesteten Repressorexpressionskonstrukten allein pCMB 1 hygro TetR(B/E)-HDAC 4 in der Lage war, die Aktivität des HPRT-Promoters im HPRT-Responder in Abwesenheit von DOX herunterzuregulieren, wodurch die Expression des Reportergens Luciferase signifikant verringert werden konnte. Die Tatsache, dass alle anderen sechs getesteten Silencer nicht in der Lage waren, die Transkription zu reprimieren, könnte wie folgt begründet werden: Durch die Klonierung der Silencer-cDNA an die TetR (B/E)-cDNA entsteht nach Transkription und Translation sehr wahrscheinlich ein Fusionsprotein, dessen spezifisch gefaltete dreidimensionale Struktur der Fähigkeit zur Repression entgegensteht. So könnte zum Beispiel das fertige TetR (B/E)-Repressorfusionprotein daran gehindert werden, überhaupt an das TRE des HPRT-Responders anzubinden oder auch die hierbei so wichtige Homodimerisierung zweier Fusionsproteine an das TRE unterbunden sein. Es ist auch denkbar, dass durch die Faltung der Proteine gerade die Domänen maskiert werden, welche für das Reprimieren der Genexpression verantwortlich sind, oder Bindungsseiten maskiert werden, ohne die die Repressoren nicht mehr in der Lage sind, andere, eventuell für die Repression wichtige Co-Repressoren an sich zu binden. Eine solche Fehlfaltung könnte auch dafür verantwortlich sein, dass das Repressorfusionprotein nach seiner Fertigstellung im Cytoplasma der Zelle nicht mehr in der Lage ist, zurück in den Nukleus transportiert zu werden, um dort sein reprimierendes Potential am Zielpromoter ausüben zu können. Ausgeschlossen werden kann hingegen eine Rasterverschiebung des offenen Leserahmens innerhalb der TetR (B/E)-Repressorfusion, da die Richtigkeit der Nukleotidsequenz in diesem Bereich für alle Effektorstrukturen durch Sequenzierung bestätigt werden konnte. Allerdings ist in diesem Zusammenhang anzumerken, dass eventuelle Mutationen innerhalb der DNA-Sequenz der Repressorplasmide, welche außerhalb des Sequenzierungsbereiches stattgefunden haben und daher nicht bemerkt werden konnten, ebenfalls die Funktionalität unterbinden könnten (z.B. Stopcodone oder falscher Aminosäureeinbau durch Fehlcodierung). Diese Möglichkeit ist allerdings sehr unwahrscheinlich, da alle Konstrukte durch direktes Umklonieren generiert wurden und im Falle des pCMB 1 hygro TetR (B/E)-Sin3A-Plasmids eine *proofreading* Polymerase für die PCR-Amplifikation verwendet wurde. Wie bereits erwähnt, war lediglich das Repressorfusionprotein TetR (B/E)-HDAC 4 dazu in der Lage, die Expression des HPRT-Responders signifikant herunterzuregulieren. Eine Repression um etwas über 50% im Vergleich zu den Kontrollen bewies dies zweifelsfrei. Da die Transfektion mit dem Kontrollplasmid pCMB1 hygro TetR (B/E) keine Repression des HPRT-Responders verursachte, konnte ausgeschlossen werden, dass schon das Anbinden des Tet-Repressors am TRE des Responders für die Herunterregulation der Promoteraktivität,

etwa durch sterische Behinderung von Transkriptionsfaktoren, verantwortlich war. Diese Argumentation wird auch dadurch unterstützt, dass die anderen getesteten Silencerfusionen ebenfalls keine reprimierende Wirkung auf die Transkriptionsaktivierung des HPRT-Responders zeigten. Die beobachtete exogen induzierbare Repression konnte also völlig der Aktivität der HDAC 4 zugeschrieben werden (eventuell unterstützt durch von ihr rekrutierte Co-Repressoren), was zeigte, dass eine von HDAC 4 vermittelte Repression erfolgreich mit den exogen induzierbaren und reversiblen Eigenschaften des Tet-Systems kombiniert werden konnte.

Bei dem Vergleich dieses Ergebnisses mit anderen aus der Literatur bekannten Versuchen, die Promoteraktivität eines Responders mit Hilfe des TetR-Repressorsystems in transienten Versuchen herunterzuregulieren, wird jedoch deutlich, dass eine Repression um den Faktor 2, wie sie in dieser Arbeit mit TetR (B/E)-HDAC 4 möglich war, als eher niedrig einzustufen ist. Da in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen Ergebnisse publiziert wurden, welche die Effektivität von anderen spezifischen TetR-Silencerkonstrukten in transienten Essays widerspiegeln, war es möglich, das Potential des TetR (B/E)-HDAC 4-Repressors an diesen zu messen bzw. mit diesen zu vergleichen. Mehrere Arbeitsgruppen verwendeten in ihren Studien Varianten der KRAB-Repressordomäne des humanen KOX1 Zinkfingerproteins als Repressor, welcher an die TetR-cDNA fusioniert wurde (Deuschle et al., 1995; Foster et al., 1999; Freundlieb et al., 1999; Imhof et al., 2000; Ryu et al., 2001). Die Ergebnisse zeigten, dass es sich hierbei um einen sehr potenten Repressor handelte, der in der Lage war, die Promoteraktivität der Responderkonstrukte in verschiedenen getesteten Zelllinien nach transients Transfektion meist um den Faktor 10-30 herunterzuregulieren (Deuschle et al., 1995 ; Freundlieb et al., 1999; Imhof et al., 2000; Ryu et al., 2001). Sowohl Freundlieb und Kollegen als auch Ryu und Kollegen verwendeten in ihren Arbeiten auch diverse aus *Drosophila* stammende Repressoren und untersuchten diese in verschiedenen Zelllinien hinsichtlich ihrer Effektivität im Tet-System (Freundlieb et al., 1999; Ryu et al., 2001). Die Veröffentlichungen dieser beiden Arbeitsgruppen sind von besonderem Interesse, da sie zum einen zeigen, wie unterschiedlich aktiv einzelne Repressoren in den verschiedenen verwendeten Zelllinien waren und zum anderen klarmachen, dass unterschiedliche Silencer in ihrer Effektivität (immer bezüglich des Tet-Systems) extrem voneinander abweichen. So waren zum Beispiel aus *Drosophila* stammende Repressoren, welche in HeLa-Zellen getestet wurden, in der Lage die, Aktivität des Zielpromoters um den Faktor < 2 bis 5-10 herunterzuregulieren, schafften dies jedoch in INS-1-Zellen ( $\beta$ -Zellen des Rattenpankreas) nur noch um den Faktor <2-3 (Ryu et al., 2001). Das gleiche Phänomen beschrieben auch Jiang und Kollegen, welche mit einem TetR-Repressor bestehend aus TetR und der mSin3

Interaktionsdomäne des humanen Mad1 Proteins und Responder in drei verschiedenen Zelllinien eine Herunterregulation von ca. 60-fach, 11-fach und 3,5-fach erreichten (Jiang et al., 2001).

Diese Resultate machen einerseits deutlich, dass die Effektivität des hier untersuchten TetR (B/E)-HDAC 4-Repressors im Vergleich zu anderen Repressorfusionen also relativ niedrig einzustufen ist. Andererseits bieten sie jedoch gleichzeitig alternative Erklärungsmöglichkeiten an. So könnte ein Grund für die vergleichsweise niedrige Effektivität des TetR (B/E)-HDAC 4-Repressors darin zu suchen sein, dass dieser in NIH 3T3-Zellen getestet wurde und es ihm eventuell in dieser Zelllinie nicht möglich war eine höhere Repression zu bewirken (z.B. durch das Fehlen von weiteren Corepressoren). Hier muss allerdings erwähnt werden, dass bei transienten Versuchen in NIH 3T3-Zellen, bei denen HDAC 4 an eine GAL4-Bindungsseite gekoppelt war, gute repressorische Ergebnisse erzielt werden konnten (Wang et al., 1999). Ein anderer Grund könnte sein, dass das reprimierende Potential der HDAC 4 an sich einfach zu schwach ist. In diesem Zusammenhang muss nochmals darauf hingewiesen werden, dass bei der Klonierung des TetR (B/E)-HDAC 4-Repressorkonstrukts lediglich die Deacetylasedomäne der HDAC 4 an die TetR (B/E)-cDNA fusioniert wurde und nicht auch ihre Repressordomäne. Auch dies könnte eine Erklärung sein, warum eine Repression lediglich um den Faktor 2 möglich war. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Deacetylasedomäne einen hohen Anteil an der reprimierenden Wirkung der HDAC 4 innehat, so ist auch nach deren Blockierung noch eine Restaktivität des HDAC 4 Moleküls erkennbar, welche der Repressordomäne zugeschrieben werden könnte (Miska et al., 1999; Wang et al., 1999). Das Fehlen dieser Repressordomäne könnte die Effektivität des TetR (B/E)-HDAC 4-Repressors senken und zusätzlich Einfluss haben auf die dreidimensionale Proteinstruktur des Proteins, welches eventuell hierdurch eine nicht ganz optimale Faltstruktur annehmen könnte und somit, wie bereits für die anderen in dieser Arbeit beschriebenen Repressoren, in seiner Wirkung eingeschränkt werden könnte. In diesem Zusammenhang könnte vor allem ein verminderter Rücktransport des fertigen Proteins in den Zellkern von Bedeutung sein. Dies geht aus einem Vergleich zweier Veröffentlichungen hervor, bei denen jeweils der gleiche Repressor (KRAB) sowie Responder benutzt worden waren (Deuschle et al., 1995; Forster et al., 1999). Ein Unterschied lag jedoch darin, dass Deuschle und Kollegen zwischen den Tet-Repressor und die KRAB-cDNA ein zusätzliches nukleäres Lokalisationssignal (NLS) klonierten, welches bei Forster und Kollegen fehlte. Diesen gelang dann auch nur eine Repression um den Faktor 4-6, während mit einem zusätzlichen NLS eine Herunterregulation um das 10-fache erreicht werden konnte (Deuschle et al., 1995; Forster et al., 1999). Weiterhin ist nicht

auszuschließen, dass eine geringere Repressoreffektivität verschiedener Repressorkonstrukte aus einer unterschiedlichen Halbwertszeit der verschiedenen getesteten rekombinanten Proteine bzw. ihrer mRNA resultiert.

Da in keiner Veröffentlichung mit Responderkonstrukten gearbeitet wurde, welche einen eukaryotischen Promoter trugen, sondern nur CMV-Promotoren (Deuschle et al., 1995; Foster et al., 1999; Freundlieb et al., 1999; Ryu et al., 2001; Jiang et al., 2001), Adenoviruspromotoren (Imhof et al., 2000) oder Thymidinkinasepromotoren (Deuschle et al., 1995) in ihrer Aktivität herunterreguliert wurden, konnte auch nicht ausgeschlossen werden, dass der HPRT-Promoter selbst sich einfach generell schlechter über das Tet-Repressorsystem regulieren ließ als die in anderen Arbeiten getesteten viralen Promotoren. Um diese Möglichkeit genauer zu untersuchen, wurden Co-Transfektionsassays mit dem HPRT-Responder und dem von Hillen zur Verfügung gestellten pCMV-TetR (B/E)-KRAB-Repressor durchgeführt (Foster et al., 1999). Dieser war in der Lage, die Aktivität des HPRT-Promoters um den Faktor 5 zu reprimieren. Dies machte zum einen erneut deutlich, dass die Effektivität des TetR (B/E)-HDAC 4-Repressors geringer war, zeigte aber gleichzeitig auch auf, dass der HPRT-Promoter wohl generell nicht weniger gut zu reprimieren war. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse einer oben bereits erwähnten Veröffentlichung bestätigt, in welcher exakt das gleiche TetR (B/E)-KRAB-Repressorexpressionskonstrukt einen CMV-Promoter-Responder um den Faktor 4-6 zu reprimieren vermochte (Forster et al., 1999). Der Vollständigkeit wegen muss hier erwähnt werden, dass Foster und Kollegen ihre Versuche in HeLa-Zellen durchgeführt hatten und nicht in NIH 3T3-Zellen.

Interessant war nun natürlich, inwieweit eine stabile Integration des HPRT-Responders in das Genom der NIH 3T3-Zelllinie seine Regulierbarkeit beeinflussen würde.

### **5.3 Stabile Integration des HPRT-Responders**

Um zu ermitteln, in welcher Weise sich das Silencerpotential der Repressorexpressionskonstrukte auf den in das Genom der NIH 3T3 Zellen integrierten HPRT-Responder auswirken würde, wurden Einzelklone generiert, die stabil mit dem HPRT-Responderkonstrukt transfiziert worden waren. Diese Versuche sollten zeigen, ob mit der Integration des Responders in den chromosomalen Kontext der Zelle eine Repression des HPRT-Promoters durch Transkriptionssilencer wie bei der transienten Cotransfektion induziert werden konnte. Stabile Responderklone sollten transient mit den bereits in den durchgeführten Cotransfektionen getesteten Silencermolekülen transfiziert werden und eventuelle Veränderungen in der Luciferaseexpression ermittelt werden. Zunächst war es

jedoch in einem Vorversuch nötig, diejenigen unter den generierten Responderklonen herauszusuchen, welche sich überhaupt regulieren ließen. Dies war sinnvoll, da die Tatsache einer überstandenen Selektion durch das Selektionsantibiotikum Neomycin (der HPRT-Responder besitzt eine entkoppelte Neomycinresistenzkassette) allein noch nicht zwangsläufig bedeuteten musste, dass das HPRT-Responderkonstrukt vollständig, funktionierend und regulierbar in das Genom des Einzelklons eingebaut worden war. Als Repressor wurde hierbei der bei den transienten Cotransfektionen etwas effektivere pCMV-TetR (B/E)-KRAB-Repressor verwendet. Einzelklone, welche sich als regulierbar erweisen würden, sollten dann zunächst transient, und, wenn eine Repression beobachtet werden konnte, später auch stabil mit den im Rahmen dieser Dissertation generierten TetR (B/E)-Repressoren getestet werden.

Trotz der hohen Anzahl von 129 generierten und analysierten Klonen, wurde letztlich kein Kandidat ermittelt, der sich durch das Repressorexpressionskonstrukt pCMV-TetR (B/E)-KRAB in der Expression der Luciferase signifikant negativ beeinflussen ließ und für die geplanten Versuche hätte eingesetzt werden können.

Da außer der Tatsache, dass der HPRT-Responder nun stabil in das Wirtszellgenom integriert war, keine anderen Parameter im Vergleich zu den zuvor durchgeführten transienten Cotransfektionen verändert worden waren, ist eine Erklärung für die nicht vorhandene Regulierbarkeit des HPRT-Responders wohl vor allem in dieser stabilen Integration zu suchen. Vorstellbar ist, dass dem HPRT-Promoter innerhalb des Responderkonstrukts eventuell für ihn wichtige regulatorische Elemente fehlen, welche notwendig sind, um auch nach stabiler Integration in das Genom regulierbar zu sein. Es ist zum Beispiel bekannt, dass die gewebsspezifische Expression des HPRT-Gens noch von Sequenzen mitreguliert wird, welche bis zu ca. 1000 Basenpaaren *upstream* von dem Beginn der HPRT-Promotersequenz liegen und das Intron 1 des Gens Kontrollelemente enthält, welche vom HPRT-Promoter möglicherweise nach stabiler Integration benötigt werden (Jiralerspong und Patel 1996; Melton et al., 1997). Möglich ist auch, dass im Rahmen der stabilen Transfektion eine enorm hohe Anzahl von Integrationen des HPRT-Responders stattgefunden hat, und eine vergleichsweise geringere Anzahl von Repressormolekülen somit nicht in der Lage war, das Übermaß an Respondermolekülen in signifikanter Weise herunterzuregulieren. Dieser Effekt würde zusätzlich verstärkt werden durch einen bei der Transfektion eventuell verursachten Verlust des TRE bei einigen Responderkonstrukten. Dieser Verlust des TRE würde dazu führen, dass der Silencer nicht mehr physisch benachbart an den HPRT-Promoter binden würde und auf diese Weise die Repressoraktivität nicht mehr an die HPRT-Promoterregion herangebracht werden könnte.

## 5.4 Transkriptionsregulierung in HRL9-Zellen und deren modifizierten

### Derivaten

Aufgrund der Ergebnisse aus den Versuchen mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPRT-Responderkonstrukt erschien es daher ratsam, auf eine bereits veröffentlichte Zelllinie, in welcher ein Responder bereits stabil in das Genom der Zelle integriert war zurückzugreifen. Von dieser Zelllinie war bekannt, dass die Aktivität des in der Zelllinie integrierten Zielgens (Luciferase) konstitutiv transkriptionell aktiv war und darüber hinaus sowohl negativ als auch positiv durch Aktivatoren/Repressoren regulierbar war (Freundlieb et al., 1999). Diese Zelllinie HRL9 trägt folgende stabil integrierten Konstrukte: Den rtTA reversen Transkriptionsaktivator (TetR-VP16 Fusion) als durch DOX induzierbaren Effektor und als Responder das Luciferase Reportergen unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven hCMV-Minimalpromoters mit einer 5' integrierten TRE, an welcher sowohl der rtTA-Effektor (+DOX) als auch der TetR (B/E) Silencer (-DOX) binden können. Entscheidend an diesem System war vor allem die konstitutive Expression von Luciferase durch den hCMV-Minimalpromoter und die Tatsache, dass sich dieser Promoter exogen über unterschiedliche Doxycyclinkonzentrationen im Medium regulieren ließ. Natürlich war die Verwendung dieses hCMV-Minimalpromoter-Responders mit dem Nachteil verbunden, dass dieser einen viralen Promoter besaß. Da es aber auch ein Ziel dieser Arbeit sein sollte, das Repressionspotential der neu generierten Repressoren auf einen im chromosomalen Kontext stehenden Zielpromoter zu testen, war es ratsam, die Versuche mit diesem viralen Responder weiterzuführen, zumal die Herstellung eines neuen Responders mit einem anderen eukaryotischen Promoter und dessen erneute Prüfung den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte.

Mit Hilfe transienter Transfektionen wurde nun zuerst ermittelt, ob das Silencerkonstrukt pCMB 1 hygro TetR (B/E)-HDAC 4 in der Lage war, auch den stabil in das Genom der Zelle integrierten hCMV-Minimalpromoter herunterzuregulieren. Im Vergleich zur Kontrolle war es möglich, die basale Aktivität des hCMV-Minimalpromoters in Abwesenheit von DOX um etwas mehr als 60% herunterzuregulieren. Dies bewies die Potenz des eingesetzten TetR (B/E)-HDAC 4-Repressors, auch einen Promoter reprimieren zu können, welcher in einem chromosomalen Kontext (also in Chromatin verpackt) vorlag. Die Fähigkeit des TetR (B/E)-HDAC 4-Repressors, den stabil integrierten hCMV-Minimalpromoter schon transient um mehr als 60% herunterregulieren zu können, ließ es ratsam erscheinen, nun auch HRL9-Einzelklone zu generieren, welche zusätzlich das TetR (B/E)-HDAC 4 Repressorexpressionskonstrukt stabil in ihr Genom integriert hatten. Dadurch sollte es



möglich werden, Ergebnisse aus *in vitro*-Versuchen zu erhalten, bei denen sowohl Repressor als auch Responder stabil im gleichen Genom eingebaut waren. Außerdem konnten Erkenntnisse, welche mit diesen Klonen gewonnen würden, dann direkt mit der Literatur verglichen werden, da die HRL9-Zelllinie bereits mit einem anderen TetR(B/E)-Repressor stabil transfiziert worden war (Freundlieb et al., 1999). Eine Zahl von 116 HRL9-HDAC 4-Einzelklonen konnten nach stabiler Transfektion isoliert werden. Diese wurden hiernach als Einzelklone auf ihr Verhalten gegenüber verschiedenen DOX-Konzentrationen getestet. Das allgemein experimentelle Vorgehen orientierte sich analog der in der Veröffentlichung von Freundlieb und Kollegen beschriebenen Strategie (Freundlieb et al., 1999). Aus diesem Labor stammte nämlich nicht nur die HRL9-Zelllinie, sondern es lagen, wie bereits erwähnt, auch Ergebnisse über das Verhalten von stabil mit einem TetR (B/E)-KRAB-Repressor transfizierten HRL9-Einzelklonen vor. Ebenso wie in dieser Veröffentlichung wurden die stabilen HRL9-HDAC 4-Einzelklone nun jeweils auf ihr Verhalten bezüglich ihrer Luciferaseexpression in DOX-freiem, sowie mit 10ng DOX/ml und 1µg DOX/ml versehenem Medium getestet. Von besonderem Interesse war hierbei die Größe des Unterschieds in der Luciferaseaktivität der Klone bei einer DOX-Konzentration von 10ng/ml verglichen mit derjenigen, welche in DOX-freiem Medium ermittelt wurde. Zum besseren Verständnis ist hier zu ergänzen, dass bei einer Konzentration von 10ng DOX/ml Medium davon ausgegangen wird, dass weder der in der HRL9-Zelllinie integrierte reverse Transaktivator (rtTA), noch der TetR (B/E)-HDAC 4-Repressor in der Lage sind, sich an das TRE des hCMV-Minimalpromoters anzulagern, und die bei dieser DOX-Konzentration gemessene Luciferaseaktivität somit das Level der basalen Expression der Zelllinie widerspiegeln sollte (Gossen und Bujard 1992; Gossen et al., 1995; Freundlieb et al., 1999). In DOX-freiem Medium dagegen ist es allein dem Repressor möglich, an das TRE zu binden und sein Potenzial zu entfalten. Je größer also der Unterschied in der Luciferaseexpression zwischen diesen beiden Konzentrationen, desto effektiver sollte der Repressor wirken. Von der HRL9-Zelllinie war allerdings bekannt, dass sich die Luciferaseexpression bereits ohne das Vorhandensein eines Repressors um etwa 55% bei dem Vergleich 10ng DOX/ml Medium zu DOX-freiem Medium reduzierte, was sehr wahrscheinlich mit der Tatsache zu erklären ist, dass es dem rtTA anscheinend doch noch möglich war bei einer Konzentration 10ng/ml in sehr beschränktem Ausmaß an das TRE des Zielpromoters anzubinden. Aus diesem Grund konnten also nur HRL9-HDAC 4 Einzelklone von Bedeutung sein, bei welchen im Vergleich 10ng DOX/ml Medium (residuale Transkription) zu 0ng DOX/ml Medium (ausschließliche Bindung des Repressors an das TRE) eine noch deutlich höhere Reduktion der Luciferaseexpression zu messen war, die somit nicht auf das schlichte Wegfallen einer

Aktivierung durch den rtTA zurückzuführen war (passive Abnahme der Luciferaseexpression), sondern über die Repression durch den TetR (B/E)-HDAC 4-Silencer erklärt werden konnte (aktive Abnahme der Luciferaseexpression). Bei ersten Vorversuchen wiesen 5 der 116 getesteten HRL9-HDAC 4 Einzelklone im Vergleich untereinander eine deutlich höhere Reduktion der Luciferaseaktivität von 10ng DOX/ml Medium zu Medium ohne DOX auf, als dies für die parentale und nicht pCMB 1 hygro TetR (B/E)-HDAC 4 transfizierte HRL9-Zelllinie bekannt war. Diese wurden dann nochmals in größeren Versuchsansätzen genauer auf ihr Verhalten gegenüber den verschiedenen DOX-Konzentrationen untersucht. Dabei konnten zwei HRL9-HDAC 4-Klone isoliert werden, welche eine signifikant höhere Reduktion der Luciferaseexpression in DOX-freiem Medium (ca. um den Faktor 5) aufwiesen, als die in Parallelansätzen getesteten Vergleichsklone. Somit konnte die beobachtete Repression eindeutig der Wirkung des TetR (B/E)-HDAC 4-Repressors zugeschrieben werden. Der Versuch einen stabil in das Genom der Zelle integrierten Responder mit Hilfe des ebenfalls stabil eingebauten TetR (B/E)-HDAC 4-Repressors herunterzuregulieren, war also gelungen.

Bei dem Vergleich der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen, welche die Effektivität von Repressoren in stabil transfizierten Zellen getestet hatten, wurde jedoch deutlich, dass die Effizienz des TetR (B/E)-HDAC 4-Silencers als relativ gering einzustufen ist. Besonders deutlich wurde dies beim Betrachten der von Freundlieb und Kollegen erzielten Ergebnisse, bei denen die HRL9-Zelllinie stabil mit einem TetR (B/E)-KRAB-Repressor transfiziert worden war und derart generierte Einzelklone auf ihr Verhalten bezüglich ihrer Luciferaseaktivität in verschiedenen DOX-Konzentrationen im Medium getestet wurden. Hierbei gelang es, die Luciferaseexpression mehrerer Einzelklone in Abwesenheit von DOX mit Hilfe des KRAB-Repressors bis in den Bereich des Hintergrundlevels des Messinstruments herunterzuregulieren, was einer Repression der Promoteraktivität um einen Faktor von mehreren Hundert bis über Tausend gleichkam (Freundlieb et al., 1999). Imhof und Kollegen war es möglich, in ihrer Arbeit die Aktivität eines stabil integrierten Adenoviruspromoters mit Hilfe eines KRAB-Repressors (ebenfalls stabil integriert) in C2C12 Zellen so weit zu reprimieren, dass die Expression der Reportergerenprodukte nicht mehr zu detektieren war (Imhof et al., 2000) und auch Deuschle erzielte mit dem KRAB-Repressor in stabil transfizierten HeLa-Zellen eine gute Repressionsaktivität (Repression der Aktivität eines humanen CMV/IE-Promoter/Enhancers um den Faktor 10, Deuschle et al., 1995). Aber nicht nur mit dem KRAB-Repressor konnten in stabilen transfizierten Zelllinien Erfolge erzielt werden. Einer weiteren Arbeitsgruppe gelang es mit Hilfe eines TetR-Silencers, welcher die mSin3 interagierende Domäne des

humanen Mad1 Transkriptionsaktivators als Repressor nutzte, die Aktivität eines CMV-Promoters in stabil transfizierten HEK 293-Zellen gänzlich zu inhibieren (Jiang et al., 2001). Diese Ergebnisse sprechen deutlich für die geringere Effizienz des HDAC 4-Repressors, welche sich schon im Verlauf der transienten Versuchsreihen angedeutet hatte und auch durch die stabile Integration des TetR (B/E)-HDAC 4-Repressorexpressionskonstruktes in das Zellgenom nicht wesentlich gesteigert werden konnte (etwa um das Doppelte im Vergleich zu den transienten Transfektionen der HRL9-Zelllinie). Die einfachste Erklärung hierfür wäre sicherlich, dass das Potential der Histondeacetylasedomäne der HDAC 4 im Vergleich zu anderen bis *dato* im Tet-System getesteten Repressoren *per se* zu gering ist, um eine stärkere Repression bewirken zu können. Eine weitere Erklärung ist selbstverständlich auch hier analog zu den bei den transienten Transfektionsversuchen diskutierten Erklärungsversuchen, dass hervorgerufen durch die Klonierung der HDAC 4 Histondeacetylasedomäne an den Tet-Repressor oder auch durch das Weglassen der Repressordomäne das von der Zelle generierte TetR (B/E)-HDAC 4-Fusionsprotein eine suboptimale dreidimensionale Struktur annehmen muss, welches es ihm verbietet, seine vollständige Funktionalität auszuüben. So könnte das fertige TetR (B/E)-HDAC 4-Repressorfusionprotein gehindert werden, an das TRE des CMV-Minimalpromoters anzubinden oder auch die hierbei so wichtige Homodimerisierung zweier TetR (B/E)-HDAC 4-Fusionsproteine an das TRE gestört sein. Es ist auch denkbar, dass durch die Faltung der Proteine gerade die Domänen maskiert werden, welche für das Reprimieren der Genexpression verantwortlich sind, oder Bindungsseiten maskiert werden, ohne welche die Histondeacetylasedomäne nicht mehr in der Lage ist, andere, eventuell für die Repression wichtige Co-Repressoren, an sich zu binden. Eine solche Fehlfaltung könnte auch dafür verantwortlich sein, dass das Repressorfusionprotein nach seiner Fertigstellung im Cytoplasma der Zelle nicht mehr in der Lage ist, in ausreichendem Maße zurück in den Nukleus transportiert zu werden, um dort sein reprimierendes Potential am Zielpromoter ausüben zu können. Ausgeschlossen werden kann hingegen auch hier wieder eine Rasterverschiebung des offenen Leserahmens innerhalb der TetR (B/E)-Repressorfusion, da die Richtigkeit der Nukleotidsequenz in diesem Bereich für alle Effektorstrukturen durch Sequenzierung bestätigt werden konnte. Allerdings ist in diesem Zusammenhang erneut anzumerken, dass eventuelle Mutationen innerhalb der codierenden DNA-Sequenz des Repressorplasmids, welche außerhalb des Sequenzierungsbereiches stattgefunden haben und daher nicht bemerkt werden konnten, ebenfalls die Funktionalität einschränken könnten. Diese Möglichkeit ist jedoch, wie bereits gesagt, sehr unwahrscheinlich. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass eine geringere Repressoreffektivität des TetR (B/E)-HDAC 4-Repressorkonstrukts auf eine zu kurze Halbwertszeit des rekombinanten Proteins

bzw. seiner mRNA zurückzuführen ist. Eine weitere Möglichkeit, die vergleichsweise niedrige Effizienz des TetR (B/E)-HDAC 4-Repressors zu erklären, könnte gerade im Falle der stabilen Integration sein, dass sich eine zu hohe Anzahl von HDAC 4-Molekülen toxisch auf die Wirtszelle auswirkt. Die Zielzelle würde in diesem Fall sterben, es käme also zu einer unerwünschten Form von Selektion, so dass letztlich nur Zellen überleben würden, welche von Beginn an relativ wenige Kopien des TetR (B/E)-HDAC 4-Repressorexpressionskonstruks in ihr Genom integriert hätten. Hieraus würde automatisch auch eine geringe Anzahl an wirksamem Protein resultieren, welches dann nicht in der Lage ist, alle vorhandenen TREs des Responders in der Zelle zu saturieren. Betrachtet man die geringe Ausbeute (nur 2 von 116 analysierten Einzelklonen waren in der Lage, die Expression des Reportergens zu reprimieren), scheint dies eine einleuchtende Interpretation der Daten zu sein, zumal Freundlieb und Kollegen in ihrer Arbeit eine wesentlich höhere Ausbeute an sehr gut zu regulierenden stabilen Einzelklonen beschrieben hatten (Freundlieb et al., 1999).

## **5.5 Analyse der Repression mit Hilfe des HDAC-spezifischen Inhibitors**

### **TSA**

Auch wenn die durch den TetR (B/E)-HDAC 4-Repressor hervorgerufene Herunterregulation des hCMV-Minimalpromoters in den HRL9-HDAC 4-Einzelklonen 46 und 102 relativ niedrig war, so war sie doch signifikant und erlaubte es somit, weitere Fragestellungen zu untersuchen. Wie bereits erwähnt wurde bei der Generierung des TetR (B/E)-HDAC 4-Silencerkonstruktes lediglich die Histondeacetylasedomäne der HDAC 4 hinter den Tet-Repressor kloniert. Es war also davon auszugehen, dass die beobachtete Repression ebenfalls durch diese Domäne induziert wurde. Um sicher zu klären, dass die beobachtete Repression, durch die enzymatische HDAC 4-Histondeacetylaseaktivität vermittelt wurde, wurde der HRL9-HDAC 4-Klon 102 in Abwesenheit von DOX mit dem spezifischen Deacetylasehemmer Trichostatin A (TSA) behandelt. TSA wurde bereits früher erfolgreich zur Hemmung der HDAC 4-Deacetylasedomäne eingesetzt, allerdings lediglich in transienten Versuchsansätzen und unter Benutzung des GAL4-Systems (Miska et al., 1999; Wang et al., 1999). Die Kultivierung der Zellen in DOX-freiem Medium sollte sicherstellen, dass der TetR (B/E)-HDAC 4-Repressor kontinuierlich an das TRE des hCMV-Minimalpromoters anbinden konnte, um dort die Repression zu bewirken. Würde diese Repression nun durch die Zugabe von TSA aufgehoben werden, so könnte eindeutig bewiesen werden, dass die beobachtete Herunterregulation von den katalytischen Eigenschaften der Histondeacetylasedomäne bewirkt wurde. Die Ergebnisse dieser Versuche bestätigten genau diese

Annahme, da die mit TSA behandelten Zellen im Vergleich zu denjenigen, welche allein in DOX-freiem Medium ohne TSA gehalten wurden, einen enormen Anstieg in ihrer Luciferaseaktivität zeigten.

## **5.6 Langzeitstudie zur epigenetischen Modifikation durch HDAC 4**

Auch wenn es derzeit als allgemein akzeptiert gilt, dass sowohl reversible als auch später weitervererbte Veränderungen in der Genexpression durch spezifische Histonmodifikationen bewirkt werden können (Richards und Elgin 2002), konnte die Frage, wie genau transiente im Gegensatz zu vererbten Veränderungen auf epigenetischer Ebene gesetzt werden, noch nicht beantwortet werden. Allerdings ist zu erwarten, dass das Zusammenspiel von ganz bestimmten, exakt definierten Histonmodifikationen entscheidend dazu beiträgt um festzulegen, ob ein Gen transient oder stabil reprimiert wird (Rice und Allis 2001).

Um die Frage zu klären, ob eine von HDAC 4 induzierte Repression auch zu einer stabilen, weitervererbaren Genrepression führen konnte oder die Transkription lediglich transient reprimiert werden kann, wurde die HRL9-HDAC 4-Zelllinie 102 über einen Zeitraum von 6 Wochen ohne DOX im Medium gehalten. Der Silencer war also während dieser Zeit ständig an das TRE des hCMV-Minimalpromoters angelagert und konnte dort seine Repressorfunktion ausüben. Um nun festzustellen, ob der hierdurch bewirkte repressive Status des Responders auch trotz der Zugabe von DOX (Aktivierung durch den reversen Transaktivator rtTA) beibehalten werden konnte oder es zu einer Reaktivierung des Promoters kommen würde, wurden Zellen nach Ablauf der sechs Wochen sowohl mit 10ng DOX/ml Medium als auch mit 1µg DOX/ml behandelt und die Luciferaseaktivität der einzelnen Populationen bestimmt. Die Kultivierung der Zelllinie bei einer Konzentration von 1µg DOX/ml Medium sollte der starken VP16 Transaktivator-domäne die Möglichkeit geben, an den Promoter zu binden, um dort ihr hohes Aktivationspotential wirken zu lassen. Mit der Zugabe von 10ng DOX/ml Medium sollte überprüft werden, ob wieder ein Ansteigen der Luciferaseaktivität auf die für diese DOX-Konzentration bekannten Werte erfolgen würde, die, wie bereits erwähnt, sehr wahrscheinlich auf eine nur sehr rudimentäre Wirkung des Aktivators rtTA bei diesen niedrigen DOX-Konzentrationen zurückzuführen war. In beiden Fällen kam es zu einer völligen Wiederherstellung der transkriptionalen Kompetenz des Promoters. Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass die über HDAC 4 vermittelte Repression schnell, spezifisch und reversibel ist und durch diesen dynamischen Mechanismus eine rasche Veränderung der Genexpression bewirkt werden kann, die aber nicht an die Tochtergeneration weitergegeben wird.

Die Auswertung der Messwerte dieses Langzeitversuchs zeigen ferner, dass nach Ablauf der sechs Wochen eine Zunahme der Luciferaseaktivität innerhalb der Zellpopulation beobachtet werden konnte. Diese Erhöhung zeigt sich allerdings nur bei Zellen, welche in DOX-freiem Medium gehalten wurden und bei solchen, die nach Ablauf der sechs Wochen für 24h in 10ng DOX/ml Medium inkubiert wurden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass ein gewisser Prozentsatz von Zellen der Zelllinie 102 im Verlauf der Langzeitkultur, Kopien des stabil in ihr Genom integrierten pCMB1 hygro TetR (B/E)-HDAC 4-Repressorexpressionskonstruktes verloren hatten und somit die Effizienz der Repression insgesamt heruntergesetzt wurde. Dieses Verhalten wäre ein zusätzliches Indiz für die bereits diskutierte eventuelle Toxizität des TetR (B/E)-HDAC 4 Fusionsproteins für die Zelle. Dass es diesen Zellen dabei möglich ist, die konstante Behandlung mit dem Selektionsantibiotikum Puromycin auch weiterhin zu überleben, ist hierbei kein Widerspruch, da die Resistenzvermittlung über ein vom Repressorkonstrukt unabhängiges Plasmid (pPUR) gesteuert wird. Die Beobachtung, dass auch bei einer DOX-Konzentration von 10ng/ml die Luciferaseaktivität ansteigt und somit der Faktor der Repression (Luciferaseexpression bei 10ng DOX/ml Medium im Vergleich zu DOX-freiem Medium) gleich bleibt, lässt darüber hinaus darauf schließen, dass es bei einer Konzentration von 10ng DOX/ml nicht nur dem reversen Transaktivator, sondern auch dem TetR (B/E)-HDAC 4 Repressor möglich ist, an das TRE des hCMV-Minimalpromoters anzubinden. Da aber im Verhältnis nun weniger Repressormoleküle zur Verfügung stehen, steigen auch diese Luciferasewerte proportional an. Keine Veränderung war hingegen bezüglich der Luciferaseaktivität bei einer Konzentration von 1µg DOX/ml Medium nach Ablauf von 6 Wochen zu beobachten. Das erscheint logisch, da es dem Repressor generell bei einer solch hohen DOX-Konzentration im Medium unmöglich ist, an das TRE des Promoters zu binden und somit eine Abnahme von Repressormolekülen ohne Konsequenzen bliebe.

## **5.7 Expressionsalterierung im Zusammenhang mit dem Zellzyklus**

Dank des gut funktionierenden TetR-Aktivator/Repressorsystems, welches im stabil transfizierten HRL9-HDAC 4-Einzelklon 102 vorlag, und der Möglichkeit, die über die HDAC 4-Histondeacetylasedomäne vermittelte Repression des hCMV-Minimalpromoter-Responders mit Hilfe von TSA zu deblockieren, konnte es nun vielleicht erstmals möglich sein, herauszufinden, in welcher Weise die Histondeacetylase benötigt wurde, um den Repressionsstatus des Promoters während des Zellzyklus aufrechtzuerhalten. Sobald eine Promoterregion gezielt durch das Setzen einer oder mehrerer epigenetischer Markierungen kovalent programmiert ist, muss dieser repressive Status des Promoters auch durch den

Zellzyklus hindurch beibehalten werden können. Wenn man nun die Histondeacetylaseaktivität in bestimmten Phasen des Zellzykluses inhibieren würde, wäre es vielleicht möglich, erstmals ein genaues Zeitfenster zu ermitteln, in dem die Deacetylaseaktivität für das Beibehalten des Promotersilencings benötigt wurde. Sowohl bereits existierende als auch neu synthetisierte Histone werden vor allem während der S-Phase, in der auch der DNA-Strang dupliziert wird, an die neu entstandenen nackten Chromatide verbracht (Verreault 2000). Dies könnte darauf hinweisen, dass während dieser Zeit, also während der S-Phase, posttranslationale Modifikationen über eine später aktive oder reprimierte Gentranskription bestimmen. Um herauszufinden, wann die Histondeacetylaseaktivität benötigt wurde, um die transkriptionale Repression in Zellen beizubehalten, wurden Zellen in G1 blockiert. Diese in G1 blockierten Zellen konnten also nicht mehr in die S-Phase eintreten. Um dies experimentell umzusetzen, wurden Zellen des Klons 102 durch Zugabe von Mimosin in einem späten G1-Block gehalten (Krude 1999). Während dieses G1-Block wurden die Zellen mit dem spezifischen Deacetylasehemmer TSA inkubiert. Bei dem Vergleich der in G1 blockierten Zellpopulation mit Zellen, die während der TSA-Behandlung den Zellzyklus frei durchlaufen konnten, wurde ein enormer Unterschied bezüglich der Luciferaseexpression beobachtet. Die asynchron im Zellzyklus befindliche Population reagierte auf die Zugabe von TSA mit einer um den Faktor 16 höheren Steigerung ihrer Luciferaseaktivität, als dies bei den im späten G1-Block festgehaltenen Zellen zu beobachten war. Diese Ergebnisse beweisen zum ersten Mal eindeutig, dass Zellen, welche sich in der G1-Phase befinden, nicht sensitiv auf TSA reagierten, was nahelegt, dass in G1 keine Histondeacetylaseaktivität-vermittelten spezifischen „epigenetischen Makierungen“ an der hCMV-Minimalpromoterregion gesetzt wurden. Es kann also ausgeschlossen werden, dass ein *reprogramming* der Histone, welches den repressiven Status des Promoters vorgibt während der G1-Phase stattfand. Die Tatsache, dass in Zellen, welche ungestört den Zellzyklus durchlaufen konnten, die transkriptionelle Repression des Promoters hoch sensitiv auf die Zugabe von TSA reagierte, lässt den Schluss zu, dass die Aktivität der Histondeacetylase benötigt wird, um den repressiven Status des Promoters beim Durchlaufen des Zellzyklus aufrechtzuerhalten (vermutlich während der S-und/oder G2/M-Phase). Der dennoch zu beobachtende, wenn auch geringe Anstieg der Luciferaseexpression innerhalb der G1-blockierten Zellpopulation ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass es trotz der Behandlung mit Mimosin nicht möglich war, die gesamte Zellpopulation in der G1-Phase festzuhalten und die gemessenen Werte von den in der S-und/oder G2/M-Phase befindlichen Zellen verursacht wurden.

Wenn eine Abhängigkeit zwischen Zellzyklus und der Fähigkeit, überhaupt die Transkription

des Zielpromoters in G1 zu aktivieren, bestand, so sollte diese Möglichkeit mit Hilfe des rtTA-Transaktivators durch DOX-Gabe zu testen sein. Da der HRL9-HDAC 4-Einzelklon nicht nur den HDAC 4-Repressor, sondern auch einen funktionierenden reversen Transaktivator im Genom integriert hatte, war es möglich, diese Frage näher zu beleuchten. Zu diesem Zweck wurden auch hier Zellen des HRL9-HDAC 4 Einzelklons 102 durch die Zugabe von Mimosin in G1 synchronisiert und 24h in DOX-freiem Medium gehalten, so dass der TetR (B/E)-HDAC 4-Repressor an das TRE des hCMV-Minimalpromoters Andocken konnte, und somit den hCMV-Zielpromoter herunterregulieren konnte. Die Frage war nun, ob es durch Zugabe von 1µg DOX/ml Medium über 24h (rtTA kann sich an das TRE des Promoters anlagern, der Repressor nicht mehr) möglich sein würde, den *gesilenceten* Promoter wieder ebenso zu aktivieren, wie es vorausgegangene Versuche gezeigt hatten, obwohl die Zellpopulation in einem späten G1-Block gehalten wurde. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen zeigten, dass es dem reversen Transaktivator trotz der G1-Synchronisation der Zellen weiterhin möglich war, die Expression der Luciferase hochzuregulieren. Dies ließ den eindeutigen Schluss zu, dass die Aktivierung des hCMV-Minimalpromoters durch rtTA sehr wohl in der G1-Phase stattfinden kann, da sonst eine geringere Aktivierung im Vergleich zu asynchron den Zyklus durchlaufenden Zellen zu beobachten gewesen wäre. Die Beobachtung, dass eine noch stärkere Aktivierung als im Vergleich zu der nicht mit Mimosin behandelten Kontrollpopulation erzielt wurde, untermauert diese Feststellung zusätzlich. Geht man nämlich davon aus, dass der rtTA nur während der G1-Phase eine Aktivierung des Promoters bewirken kann, so wird selbstverständlich die gemessene Luciferaseaktivität höher sein, je mehr Zellen sich in dieser Zellzyklusphase befinden und durch den Aktivator stimuliert werden können.

Es kann also gesagt werden, dass der hCMV-Zielpromoter nicht refraktär für transkriptionelle Aktivierung durch den rtTA-Transaktivator in G1 war. Andererseits wurden in G1 bereits epigenetisch kovalent makierte Histone nicht mit Hilfe von HDAC 4 neu reprogrammiert, was den eindeutigen Schluß zuläßt, dass HDAC 4-vermittelte Genrepression der Progression durch den Zellzyklus bedarf. Es kann deshalb angenommen werden, dass das HDAC 4-vermittelte *reprogramming* wahrscheinlich während der S und/oder G2/M-Phase des Zellzyklus erfolgt.

Diese während der hier vorliegenden Arbeit gewonnenen Einsichten zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen Zellzyklus und dem aktiven Setzen einer epigenetischen Markierung. Die hier vorgelegten Daten demonstrieren daher erstmals eindeutig einen fundamentalen Funktionsmechanismus, nämlich wie und wann Transkriptionsrepression durch den Zellzyklus propagiert wird.



Abschließend ist zu sagen, dass aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen bezüglich des Potentials des TetR (B/E)-HDAC 4-Repressors deutlich wird, dass von seinem Einsatz als Effektor in einer transgenen Maus eher abgeraten werden muss. Auch wenn zu vermuten ist, dass durch seine Verwendung ein sogenannter *dosage effect* erzielt werden könnte, so scheint es doch sehr unwahrscheinlich zu sein, dass mit seiner Hilfe die Expression eines Zielgens stringent unterbunden werden kann. Gerade die in der Diskussion vorgelegten Vergleiche mit dem bereits erfolgreich im Mausmodell eingesetzten KRAB-Repressor (Jiang et al., 2001) machen dies deutlich.

Im Gegensatz hierzu ist es von großem wissenschaftlichen Interesse, dass die während dieser Arbeit gewonnenen fundamentalen Erkenntnisse hinsichtlich des direkten Zusammenhangs zwischen Zellzyklus und dem aktiven Setzen einer epigenetischen Markierung durch die Histondeacetylase 4 in Zukunft noch einer weiterführenden detaillierten Charakterisierung bedürfen. Dabei ist es vor allem angedacht, durch noch spezifischere Methoden engere Zeitfenster während der Progression durch den Zellzyklus zu setzen, mit Hilfe derer dann noch genauer bestimmt werden kann zu welchem Zeitpunkt des Zellzyklus (S-G2- oder M-Phase) die Histondeacetylase tatsächlich kovalente Modifikationen an den Histonen vornimmt.