

**Die Rolle des CSB-Proteins
bei der neuronalen Entwicklung und
Hypoxie-induzierten Transkription**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christine Mariele Schumacher
aus München

Düsseldorf, Juni 2012

aus dem Leibniz-Institut für Umweltmedizinische Forschung (IUF) gGmbH
(Wissenschaftlicher Direktor: Prof. Dr. med. Jean Krutmann)

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. med. Jean Krutmann
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juni 2012

*Whenever you see darkness,
there is extraordinary opportunity for the light to burn brighter.*

- Bono -

Für Stefan

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
8-oxoG	8-Oxoguanin
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AF	Alexa Fluor
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNS	Komplementäre DNS
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPD	Cyclobutanpyrimidin-Dimer
CS	Cockayne Syndrom
CSB	Cockayne Syndrom Protein B
Ct	<i>cycle threshold</i>
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's PBS
dsDNS	Doppelsträngige DNS
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ERCC6	<i>Excision repair cross-complementation group 6</i>
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GFAP	Saures Gliafaserprotein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GLUT-1	Glucose Transporter 1
h	Stunde
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
HAT	Histonacetyltransferase
HCl	Chlorwasserstoff
HDAC	Histondeacetylase

HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HMOX	Hämoxygenase
HRE	Hypoxie-responsives Element
ICC	Immunzytochemie
IHC	Immunhistochemie
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
mA	Milliampere
MBP	Myelin-Basisches Protein
MEFs	Embryonale Mausfibroblasten
MEM	Essentielles Minimalmedium
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
M-MLV	Moloney-Mausleukämievirus
mm	Millimeter
mM	millimolar
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mRNS	Boten-RNS
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NeuN	Neuronale Nuclei
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PFA	Paraformaldehyd
RNS	Ribonukleinsäure
RNS Pol II	RNS Polymerase II
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPS6	Ribosomales Protein S6
RT	Raumtemperatur
rw	rückwärts
SAHA	Suberoylanilid-Hydroxaminsäure
sec	Sekunde

SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
TTD	Trichothiodystrophie
U/min	Umdrehungen pro Minute
Ub	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vw	vorwärts
WB	Western Blot
XP	Xeroderma pigmentosum

Zusammenfassung

Das Cockayne Syndrom (CS) ist eine autosomal rezessive Erkrankung, die von einer Vielzahl an klinischen Symptomen charakterisiert ist. Hierzu zählen Störungen der neuronalen Entwicklung, Wachstumsdefizite, eine erhöhte Photosensitivität und Anzeichen von frühzeitigem Altern. Während die fötale Entwicklung der Patienten normal abläuft, treten die meisten Symptome des klassischen Syndroms (CS Typ I) in den ersten beiden Lebensjahren auf. Die beiden Hauptmerkmale der neurologischen Defekte sind Demyelinisierung der weißen Substanz und neuronale Atrophie, die besonders stark im Kleinhirn vertreten ist und in Störungen der Motorkoordination resultiert.

Etwa 80% aller CS-Erkrankungen sind auf Mutationen im CSB-Gen zurückzuführen. Von CSB ist bekannt, dass es eine wichtige Funktion bei der transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR), einer Unterform der Nukleotidexzisionsreparatur, hat. Diese ist essentiell für die Reparatur von bestimmten DNS-Schäden wie z.B. UV-induzierten Läsionen in der Haut. Man geht jedoch davon aus, dass CSB noch weitere Funktionen besitzt. Die Mehrheit der neurologischen Schäden bei CS-Patienten kann nämlich nicht durch einen ausschließlichen Defekt der TCR erklärt werden. Eine Funktion von CSB bei der neuronalen Entwicklung und Transkription wird daher stark vermutet. Aufbauend auf Befunden, in denen humane CSB-defiziente Fibroblasten nicht adäquat auf geringe Sauerstoffkonzentrationen reagierten und dabei Hypoxie-induzierte Signalwege nur unzureichend aktivieren konnten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieser, für die Gehirnentwicklung essentielle Mechanismus, in CSB-defizienten Organismen gestört ist. In dieser Arbeit sollte die Auswirkung von hypoxischen Bedingungen auf die CSB-vermittelte Hirnentwicklung und Transkription im Mausmodell untersucht werden.

Zuerst wurden CSB-defiziente Mäuse nach ihren äußeren CS-Symptomen charakterisiert. Die Tiere, die in früheren Studien bereits durch Koordinations- und Verhaltensstörungen auffielen, wiesen im Alter von acht Wochen eine signifikant reduzierte Körper- und Gehirnmasse auf. Da apoptotische Prozesse zu diesem Zeitpunkt ausgeschlossen werden konnten, wurde die neurale Entwicklung des Kleinhirns analysiert. Histologische Untersuchungen des Kleinhirns am postnatalen Tag 12 zeigten aber keine offensichtlichen Entwicklungsdefekte der Purkinje-, Bergmann Gliazellen und Körnerzellschicht. Die Myelinisierung der weißen Substanz war ebenfalls weitestgehend gleichmäßig ausgeprägt. Dies lässt auf eine milde Ausprägung des neurologischen CS-Phänotyps in den CSB-defizienten Mäusen schließen.

Da bereits gezeigt wurde, dass humane CSB-defiziente Fibroblasten eine gestörte Hypoxie-Antwort aufweisen, wurde die Expression von Hypoxie-induzierten Genen im Kleinhirn analysiert. Dabei wurde beobachtet, dass der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF im Kleinhirn CSB-defizienter Mäuse signifikant schwächer exprimiert war, was in einer signifikant reduzierten Anzahl und einer Rarefizierung von Blutgefäßen im Kleinhirn resultierte. Darüber hinaus wurde eine signifikant verminderte Expression der Histonacetyltransferase p300 auf mRNA- und Proteinlevel gefunden. P300 gilt als Cofaktor

des Hypoxie-induzierbarer Faktors-1 (HIF-1) und ist für die Transaktivierung der HIF-1-abhängigen Genexpression essentiell. Ein reduzierter Level an p300 war besonders in den Purkinjezellen des Kleinhirns zu beobachten, welche extrem sensitiv für Sauerstoff-Konzentrationsänderungen sind. Um zu untersuchen, welche Auswirkungen geringe Sauerstoffkonzentrationen, wie sie auch physiologisch im Gehirn vorkommen, auf die Gehirnentwicklung bei CSB-Defizienz haben, wurden Neurosphären aus cerebellaren neuronalen Vorläuferzellen generiert und bezüglich klassischer Entwicklungsparameter untersucht. Dabei waren keine Unterschiede in der Migration und Differenzierung der Vorläuferzellen in Neuronen und Oligodendrozyten unter 1% O₂ zu beobachten. Allerdings bewirkten hypoxische Konditionen eine signifikante Reduktion der Neurosphären-Proliferation, was in den CSB-defizienten Zellen verstärkt war. Aus diesem Grund wurde in proliferierenden Kleinhirn-Neurosphären die Transkription der HIF-1-induzierten Gene VEGF, GLUT-1 und HMOX1 unter Hypoxie analysiert. Deren Induktion war speziell für die Gene VEGF und GLUT-1 in den CSB-defizienten Sphären signifikant reduziert. Die verminderte Expression der genannten Gene ließ sich durch Zugabe des HDAC-Inhibitors SAHA sowie des Sirtuin-Inhibitors Sirtinol an die normale Induktion in Wildtyp-Neurosphären angleichen. Diese Befunde deuten zum einen darauf hin, dass CSB eine Rolle bei der Aktivierung der Hypoxie-abhängigen Transkription spielt und zum anderen, dass dieser Mechanismus über die Modulation der Protein-Acetylierung gesteuert wird. Unter Verwendung von CSB-defizienten embryonalen Mausfibroblasten konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass diese Zellen unter hypoxischen Bedingungen signifikant nicht in der Lage sind, die proteasomal regulierte HIF-1-Untereinheit HIF-1 α adäquat zu stabilisieren. Eine Stabilisierung von HIF-1 α ist essentiell für die transkriptionelle Antwort auf Hypoxie. Die Stabilisierung von HIF-1 α in den CSB-defizienten Zellen konnte durch SAHA und den Proteasom-Inhibitor β -Lacton wiederhergestellt werden. Dies lässt vermuten, dass CSB auch eine Rolle bei der Regulation des Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbaus von Proteinen spielt und dadurch Einfluss auf die Transkription nimmt. Zusammengefasst lassen die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse darauf schließen, dass die neurologischen Defekte bei CS-Patienten im Zusammenhang mit einer unzureichenden transkriptionellen Antwort auf geringe Sauerstoffkonzentrationen im Gehirn stehen könnten.

Summary

Cockayne Syndrome (CS) is an autosomal recessive disorder characterized by a variety of clinical symptoms including neurodevelopmental impairment, growth retardation, increased photosensitivity and signs of premature aging. While patients with the classical form (CS type I) display normal fetal development, symptoms arise in the first or second year of life. The predominant neurological defects are demyelination of the white matter and neuronal atrophy particularly within the cerebellum resulting in an impaired motor control.

About 80% of all CS-cases are caused by mutations in the CSB gene. CSB plays an important role in transcription-coupled repair (TCR), a subpathway of nucleotide excision repair. TCR is essential for the repair of certain types of DNA damage including UV-induced lesions in the skin. However, as most neurological disorders of CS patients cannot simply be explained by a defect in TCR, CSB is considered to have additional functions. It is strongly assumed that CSB plays a role in neuronal development and transcription. Recently, it has been reported that human CSB-deficient fibroblasts are unable to cope with low oxygen concentrations and therefore cannot activate hypoxia-induced signaling. Based on these findings it has been hypothesized that the hypoxic response, which is essential for brain development, is dysregulated in CSB-deficient organisms. The aim of this work was to investigate the effect of hypoxic conditions on CSB-mediated brain development and transcription in a mouse model.

Given that CSB-deficient mice showed dysregulated motor coordination in previous studies, the focus of the first investigations of this work was set on apparent CS-symptoms in the mice. It was found that at the age of eight weeks the CSB-deficient mice had significant lower body and brain weights compared to littermates. Because apoptotic processes could be excluded, the neural development of the cerebellum was analyzed. Histological examinations of the cerebellum at postnatal day 12 showed no obvious developmental defects of the Purkinje and Bergmann glia cells and the granule cell layer. The myelination status of the white matter was also comparable to wildtype animals. This suggests only a mild appearance of the neurological CS-phenotype in the CSB-deficient mice.

As it has been shown that human CSB-deficient fibroblasts show a dysregulated hypoxic response, the expression of hypoxia-induced genes in the cerebellum was analyzed. It was observed that the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was significantly reduced in the cerebellum of CSB-deficient mice. This resulted in a significantly reduced number and rarefication of blood vessels in the cerebellum. Furthermore, a significantly decreased expression of the histone acetyltransferase p300 on mRNA and protein level was observed. P300 is a cofactor of the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and is essential for the transactivation of HIF-1-inducible gene expression. A reduced level of p300 was observed particularly within the Purkinje cells, which are extremely sensitive for changes in oxygen concentration. To investigate the effect of physiologically low oxygen concentrations on the brain development in CSB-deficient cells, neurospheres from cerebellar neural stem cells were generated and characterized by analyzing classical developmental parameters. No

differences in migration or differentiation of the progenitor cells into neurons and oligodendrocytes could be observed under hypoxic conditions. However, hypoxic conditions resulted in a significant reduction of the neurosphere proliferation, an effect which was enhanced in CSB-deficient cells. Therefore the expression of HIF-1-inducible genes VEGF, GLUT-1 and HMOX was analyzed in proliferating cerebellar neurospheres. The reduced induction of those genes in the CSB-deficient cells was significant for VEGF and GLUT-1. However, reduced expression could be restored to levels observed in wildtype neurospheres by adding HDAC inhibitor SAHA or sirtuin inhibitor sirtinol. These results indicate that on the one hand CSB plays a role in activating hypoxia-induced transcription and on the other hand this mechanism is regulated by modulating protein acetylation.

Using CSB-deficient embryonic mouse fibroblasts it could be shown that these cells are significantly unable to stabilize the proteasomal regulated HIF-1 subunit HIF-1 α under hypoxic conditions. Stabilization of HIF-1 α is essential for a proper transcriptional hypoxic response. It could be restored in the CSB-deficient cells by SAHA and the proteasome inhibitor β -Lacton. This leads to the assumption that CSB plays also a role in the regulation of the ubiquitin-mediated proteasomal degradation of proteins and therefore influences transcription. All together these results suggest a connection between the neuropathology of CS patients and an improper response to low oxygen concentrations in the brain.

Inhalt

ABKÜRZUNGEN	I
ZUSAMMENFASSUNG	IV
SUMMARY	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 COCKAYNE SYNDROM – EIN VIELFÄLTIGES KRANKHEITSBILD	1
1.1.1 Klinische Merkmale und molekulare Grundlagen des Cockayne Syndroms	1
1.1.2 Die Rolle von CSA und CSB bei der Reparatur von DNS-Schäden	2
1.1.3 Weitere Funktionen von CSB	5
1.1.4 Das CSB-/- Mausmodell	8
1.2 HYPOXIE-INDUZIERTER SIGNALWEGE	9
1.2.1 Bedeutung der Sauerstoff-Homöostase für das Gehirn	9
1.2.2 Stabilisierung von HIF-1 α	10
1.2.3 CSB und Hypoxie	12
1.3 AUFBAU UND ENTWICKLUNG DES GEHIRNS	14
1.3.1 Zelltypen und Kompartimente im zentralen Nervensystem	14
1.3.2 Das Kleinhirn im Fokus	16
1.3.3 Neurosphären als Modell für neurale Entwicklung	18
1.4 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	19
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 MATERIAL	20
2.1.1 Versuchstiere	20
2.1.2 Chemikalien	20
2.1.3 Zusammensetzung der Zellkulturmedien	23
2.1.4 Puffer und Lösungen	23
2.1.5 Primersequenzen	25
2.1.6 Antikörper und Färbelösungen	26
2.1.7 Zubehör	27
2.1.8 Geräte	27
2.1.9 Computersoftware	28
2.2 TIERHALTUNG	29
2.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	29
2.3.1 Isolation von primären embryonalen Mausfibroblasten	29
2.3.2 Kultivierung von primären embryonalen Mausfibroblasten	30
2.3.2 Hypoxie-Experimente in primären embryonalen Mausfibroblasten	30
2.3.3 Isolation von neuronalen Vorläuferzellen	30
2.3.4 Kultivierung von Neurosphären	31
2.3.5 Bestimmung der Proliferation von Neurosphären mittels BrdU-Assay	31
2.3.6 Bestimmung der Migration von Neurosphären	32

2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	32
2.4.1 Isolation von DNS aus Ohr- und Schwanzbiopsien	32
2.4.2 Genotypisierung	32
2.4.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS.....	34
2.4.4 Isolation von RNS aus dem Gehirn.....	34
2.4.5 Isolation von RNS aus Neurosphären.....	34
2.4.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNS und RNS	35
2.4.7 Herstellung von komplementärer DNS (cDNS).....	35
2.4.8 Bestimmung der Genexpression mittels semi-quantitativer Realtime-PCR.....	36
2.5 BIOCHEMISCHE METHODEN	37
2.5.1 Gewebelyse.....	37
2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	37
2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.5.4 Western Blot Analyse.....	38
2.6 IMMUNHISTO- UND ZYTOCHEMISCHE METHODEN	39
2.6.1 Immunhistochemische Analysen von Paraffinschnitten.....	39
2.6.2 Immunhistochemische Analysen von Gefrierschnitten	40
2.6.3 Immunhistochemische Analysen von Vibratomschnitten.....	40
2.6.4 Immunzytochemische Analyse von Neurosphären.....	41
2.7 STATISTISCHE ANALYSE	41
3 ERGEBNISSE	42
3.1 MILD AUSGEPRÄGTER NEUROPATHOLOGISCHER PHÄNOTYP IN CSB-DEFIZIENTEN MÄUSEN	42
3.2 VERRINGERTE ANZAHL AN BLUTGEFÄßEN IM CEREBELLUM CSB-DEFIZIENTER MÄUSE	46
3.3 REDUZIERTE EXPRESSION VON p300 IM CEREBELLUM CSB-DEFIZIENTER MÄUSE	48
3.4 ANALYSE DER NEURALEN ENTWICKLUNG UNTER HYPOXIE IM NEUROSPHÄRENMODELL	50
3.5 GESTÖRTE TRANSKRIPTIONELLE ANTWORT AUF HYPOXIE IN CSB-DEFIZIENTEN NEUROSPHÄREN.....	55
3.6 WIEDERHERSTELLUNG DER GESTÖRTEN TRANSKRIPTIONELLEN ANTWORT AUF HYPOXIE IN CSB-DEFIZIENTEN NEUROSPHÄREN DURCH HDAC-INHIBITOREN	56
3.7 GESTÖRTE STABILISIERUNG VON HIF-1A IN CSB-DEFIZIENTEN EMBRYONALEN MAUSFIBROBLASTEN	57
3.8 WIEDERHERSTELLUNG DER HIF-1A-STABILISIERUNG DURCH INHIBIERUNG VON HISTON-DEACETYLASEN UND DEM PROTEASOM	58
4 DISKUSSION	61
5 LITERATUR.....	71
ANHANG.....	X
DANKSAGUNG.....	X
ERKLÄRUNG.....	XI

1 Einleitung

1.1 Cockayne Syndrom – ein vielfältiges Krankheitsbild

1.1.1 Klinische Merkmale und molekulare Grundlagen des Cockayne Syndroms

Alfred Cockayne, ein englischer Arzt, beschrieb im Jahr 1936 ein kleinwüchsiges Geschwisterpaar, das neben seiner körperlichen Fehlentwicklung durch eine Atrophie der Retina und Gehörlosigkeit auffiel (Cockayne, 1936). Bei einer weiteren Untersuchung knapp zehn Jahre später vermerkte er eine deutliche Progression der beschriebenen Symptome und verwies auf eine stark zunehmende mentale Störung (Cockayne, 1946). Das beschriebene Krankheitsbild wurde erstmals 1958 in einer wissenschaftlichen Publikation nach ihm benannt (Marie *et al.*, 1958). Bei dem sogenannten Cockayne Syndrom (CS) handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, deren betroffene Patienten eine mittlere Lebenserwartung von nur zwölf Jahren aufweisen (Nance und Berry, 1992). Die klassischen Merkmale des Syndroms sind: Kleinwuchs, starke mentale Retardierung mit einer einhergehenden Mikrozephalie, Gangstörungen, krankhafte Veränderungen des Auges, erhöhte Photosensitivität der Haut und eine Progerie-ähnliche Anatomie (Ozdirim *et al.*, 1996). Während das Geburtsgewicht der meisten Patienten normal ist, treten Anzeichen für Wachstumsstörungen und Mikrozephalie erst innerhalb der ersten beiden Lebensjahre auf (Nance *et al.*, 1992). Die häufigste dermale Manifestation von CS sind UV-bedingte Hautausschläge, die auf einen Defekt in der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) zurückzuführen sind. Auf ähnlichen DNS-Reparaturdefekten beruhen die dem CS verwandten neurokutanen Erkrankungen Xeroderma pigmentosum (XP) und Trichothiodystrophie (TTD) (Lehmann, 2003). Während XP-Patienten durch eine extreme Photosensitivität charakterisiert sind und ein 1.000-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Hautkrebs besitzen, ist das Risiko für eine Krebserkrankung bei CS und TTD normal (Kraemer *et al.*, 2007).

Neben dem klassischen Cockayne Syndrom (CS Typ I) gibt es eine schwerwiegendere Ausprägung der Erkrankung (CS Typ II), die auch bekannt als Zerebro-okulo-fazioskelettales Syndrom (COFS) oder Pena-Shokeir-Syndrom Typ II ist und bereits zum Zeitpunkt der Geburt auftritt. Eine schwächere Variante des Cockayne Syndroms stellt CS Typ III dar (Neilan, 1993). CS Typ I wird hauptsächlich in zwei Komplementationsgruppen eingeteilt: Cockayne Syndrom Gruppe A (CSA) und Gruppe B (CSB) (Tanaka *et al.*, 1981). Mutationen in der Komplementationsgruppe CSB treten mit rund 80% am häufigsten auf (Mallery *et al.*, 1998).

Die Funktion von CSB wurde erstmals entdeckt, als ein Gen, damals noch bekannt als ERCC6 (*excision-repair cross-complementing 6*), den Reparaturdefekt in UV-bestrahlten CSB-defizienten humanen Zellen (CS1AN) korrigierte (Troelstra *et al.*, 1992b). Dieses Gen

auf Chromosom 10q11-21 (Troelstra *et al.*, 1992a) kodiert für ein 168 kDa großes Protein, das, als Mitglied der SWI2/SNF2 Familie, über eine DNS-abhängige ATPase-Aktivität verfügt (Selby und Sancar, 1997b). Man geht davon aus, dass Mitglieder der SWI2/SNF2 Proteinfamilie eine Rolle bei der Interaktion von Proteinen und DNS spielen und – ähnlich wie Helikasen – einen Einfluss auf die Genexpression durch Veränderungen der Chromatinstruktur nehmen können (Peterson und Tamkun, 1995).

Mutationsanalysen haben ergeben, dass eine Vielzahl an verschiedenen Mutationsarten an diversen Stellen im CSB-Gen existiert und oftmals in einer Verkürzung des Proteinprodukts resultiert (Mallery *et al.*, 1998). Die Diagnostik des klassischen Cockayne Syndroms (CS Typ I) erfolgt in der Regel nach äußeren Kriterien wie postnatalen Wachstumsdefiziten und progressiven neurologischen Störungen und wird bei Verdacht anhand von Sequenzanalysen der Gene CSA und CSB verifiziert (Neilan, 1993).

1.1.2 Die Rolle von CSA und CSB bei der Reparatur von DNS-Schäden

Zelluläre DNS unterliegt dem ständigen Einfluss von exo- und endogenen Agentien, die zu schadhafte Veränderungen der DNS-Struktur führen. Nicht nur die Einwirkung von Noxen wie Strahlung oder mutagene Substanzen führen zu Läsionen, sondern auch Prozesse während der DNS-Replikation und diversen Stoffwechselfvorgängen resultieren in spontanen Veränderungen der DNS. Normalerweise wird die Mehrheit der Schäden erkannt und hauptsächlich durch zwei unterschiedliche DNS-Reparaturmechanismen repariert: Nukleotid- (NER) und Basenexzisionsreparatur (BER). Erstere erkennt und repariert Intrastrang-Quervernetzungen und große an die DNS gebundene Moleküle, während letztere üblicherweise für die Beseitigung von Einzelstrangbrüchen und kleineren Modifikationen (z.B. Oxidation) an Basen verantwortlich ist (Friedberg, 2003). Man unterscheidet zwischen zwei Formen der NER: der globalen Genom-Reparatur (GGR), welche Läsionen innerhalb des gesamten Genoms beseitigt, und der transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR), welche Schäden repariert, die in aktiv transkribierten Genen lokalisiert sind und deren Transkription behindern. Zu den durch TCR am häufigsten beseitigten Schäden zählen UV-induzierte Cyclobutanpyrimidin-Dimere (CPD), die meist durch die Vernetzung zweier im DNS-Strang benachbarter Thyminbasen entstehen (de Laat *et al.*, 1999).

Die Überempfindlichkeit von Zellen aus CS-Patienten für die mutagenen Effekte von UV-Strahlung zeigt sich darin, dass die Zellen nach UV-Exposition eine enorme Verzögerung in der Wiederherstellung der RNS-Synthese aufweisen (Mayne und Lehmann, 1982). Die hinzukommenden Defizite in der Reparatur von UV-induzierten CPDs in aktiv transkribierten Genen erklären sich durch eine wesentliche Rolle von CSA und CSB bei der transkriptionsgekoppelten Reparatur (Venema *et al.*, 1990). Der Einfluss von CSB auf die TCR beginnt bereits bei der Transkription selbst, da CSB die Anordnung von Nukleosomen an der DNS-Doppelhelix modifiziert, die DNS um sich selbst windet und dabei den Kontakt zwischen DNS und der RNS Polymerase II (RNS Pol II) moduliert (Beerens *et al.*, 2005).

CSB interagiert zudem mit diversen transkriptionellen Proteinkomplexen, stimuliert diese und verstärkt die RNS-Elongation durch Pol II (Selby und Sancar, 1997a). So weisen CSB-defiziente Zellen eine um etwa 50% reduzierte Transkriptionsaktivität auf (Balajee *et al.*, 1997). Die Elongation der RNS während der Transkription wird durch die beiden Helikase-Untereinheiten des Transkriptionsfaktors IIIH (TFIIH) XPB und XPD begünstigt, welche mit der Endonuklease XPG interagieren, einem weiteren Interaktionspartner von CSB (Iyer *et al.*, 1996). TFIIH, eine essentielle Komponente des RNS Pol II Transkriptions-Initiationskomplexes, ist aber nicht nur wichtig für die Elongation bei der Transkription, sondern auch für eine funktionelle TCR. Kommt es zu einem DNS-Schaden in einem aktiv transkribierten Gen, stoppt RNS Pol II an dieser Stelle und interagiert verstärkt mit CSB (van den Boom *et al.*, 2004). Nun initiiert CSB die transkriptionsgekoppelte Reparatur, indem es – als Mitglied der SWI2/SNF2 Familie – durch seine ATP-Hydrolyseaktivität eine Konformationsänderung der Chromatinstruktur bewirkt und direkt an die DNS bindet (Citterio *et al.*, 2000). Im nächsten Schritt rekrutiert CSB neben sämtlichen an der NER beteiligten Reparaturproteinen seinen Interaktionspartner CSA, der ebenfalls mit TFIIH über dessen Untereinheit p44 interagiert (Henning *et al.*, 1995). CSA ist ein Bestandteil des E3-Ubiquitinligasekomplexes aus DDB1 (DNS-bindendes Protein 1), Cullin 4A, dem RING Finger Protein Roc1 und dem COP9 Signalosom (CSN), wobei letzteres die Cullin-basierende E3-Ubiquitinligaseaktivität reguliert (Groisman *et al.*, 2003). CSA wird also durch CSB an die Stelle des UV-induzierten Schadens rekrutiert und aktiviert den Transkriptionsfaktor XAB2 (XPA bindendes Protein 2), ein Gerüstprotein, das die Chromatinstruktur an der Läsionsstelle stützt (Fousteri *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass RNS Pol II nach induziertem UV-Schaden polyubiquitinyliert wird und dieser Prozess abhängig von CSA und CSB ist (Bregman *et al.*, 1996). Dies lässt vermuten, dass die E3-Ubiquitinligaseaktivität des CSA-Komplexes an der Ubiquitinylierung und dem proteasomalen Abbau von RNS Pol II bei der TCR beteiligt ist. Nach der Rekrutierung der NER Reparaturproteine durch CSA und CSB beginnt die eigentliche Reparatur: die Helikasen XPB und XPD entwinden die DNS-Helix um die Läsionsstelle und die rekrutierten Proteine XPA und RPA verifizieren den DNS-Schaden. XPG und XPF/ERCC1, beides Endonukleasen, fügen 3' und 5' der Läsion Schnitte ein und entfernen schließlich ein 25-30 Nukleotide langes DNS-Oligonukleotid (Fousteri und Mullenders, 2008). Die entstandene Lücke wird, abhängig von den Faktoren PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und RFC (Replikationsfaktor C), durch die Polymerasen δ und ϵ repariert, wobei der intakte Strang als Kopie für die Synthese dient. Die verbleibende Lücke wird durch DNS-Ligase I geschlossen und die Transkription kann fortgesetzt werden (Aboussekhra *et al.*, 1995).

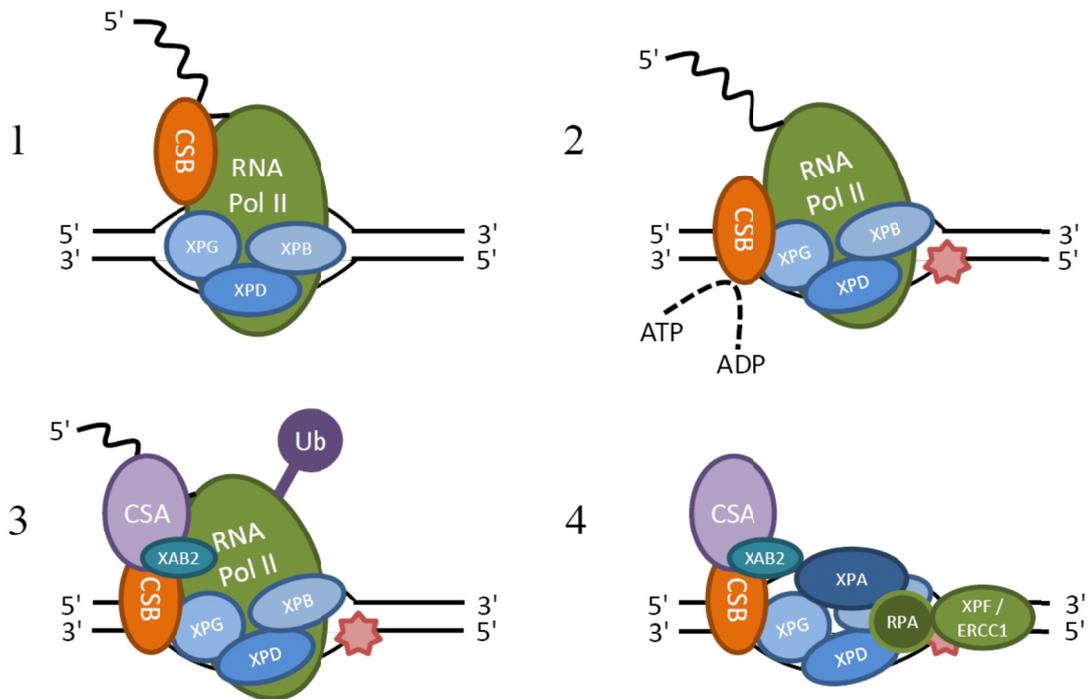


Abbildung 1

Die Rolle von CSB bei der Transkription und transkriptionsgekoppelten DNS-Reparatur (TCR).

1 CSB bindet an RNS Pol II und XPG und stimuliert die Transkription. Die Elongation der RNS wird durch die Helikasen XPB und XPD gewährleistet. 2 RNS Pol II stoppt aufgrund eines DNS-Schadens und interagiert verstärkt mit CSB, welches durch ATP-Hydrolyse die Chromatinstruktur verändert und TCR-Reparaturproteine rekrutiert. 3 Der CSA-Komplex vermittelt durch seine E3-Ubiquitinligaseaktivität den proteasomalen Abbau von RNS Pol II. Das Gerüstprotein XAB2 stabilisiert die fragile Chromatinstruktur. 4 Die Proteine XPA und RPA verifizieren den DNS-Schaden, welcher durch die Endonukleasen XPG und XPF/ERCC1 entfernt wird (nach Licht *et al.*, 2003).

Neben UV können auch Agentien wie Cisplatin DNS-Schäden induzieren, die durch NER repariert werden. Cisplatin, ein planarer Komplex aus einem zentralen Platinatom mit je zwei Chlorid- und Amminliganden, schädigt die DNS durch Querverknüpfungen zweier benachbarter Guanin-Basen (GpG) eines DNS-Strangs (Basu und Krishnamurthy, 2010). Es kommt zu einem Transkriptionsstop von RNS Pol II an der Läsion, was als Signal für die Initiation der TCR dient (Damsma *et al.*, 2007). Mit den UV- bzw. Cisplatin-induzierten DNS-Schäden ist ein rascher Anstieg des Transkriptionsfaktors p53 in der Zelle assoziiert (Levine, 1997), der durch die Blockade von RNS Pol II veranlasst wird (Ljungman *et al.*, 1999). Das Tumorsuppressorprotein p53, der sogenannte „Wächter des Genoms“, spielt eine große Rolle bei der zellulären Antwort auf DNS-Schäden. Es transaktiviert die Transkription von Genen, die bei der Zellzykluskontrolle (z.B. p21), DNS-Reparatur (z.B. GADD45, *growth arrest and DNA damage-inducible 45*) und Apoptose (z.B. Bax) beteiligt sind (de Laurenzi und Melino, 2000). Es ist bekannt, dass CSB ein direkter Bindepartner von p53 ist (Wang *et al.*, 1995). Außerdem wurde gezeigt, dass UV-Exposition in CSB-defizienten Zellen vermehrt Apoptose induziert und dies mit einer verstärkten Expression und Stabilisierung von p53 einhergeht (Balajee *et al.*, 2000). Es scheint, dass CSB und p53 gegenseitig um eine

Bindung an das Chromatin konkurrieren und damit die Reparatur von DNS-Läsionen und das Überleben der Zelle regulieren (Lake *et al.*, 2011). Kürzlich wurde gefunden, dass CSA und CSB einen Komplex mit p53 und Mdm2, einer E3 Ubiquitinligase, bilden und darüber die Mdm2-vermittelte Ubiquitinylierung von p53 regulieren. In Abwesenheit von CSA und CSB ist die Ubiquitinylierung von p53 durch Mdm2 reduziert, was zu einem stabil erhöhten Level an p53 in gestressten CS-Zellen führt (Latini *et al.*, 2011). Dies würde bedeuten, dass CSB den Mdm2-abhängigen Abbau von p53 vermittelt.

1.1.3 Weitere Funktionen von CSB

Die essentielle Rolle von CSB bei der TCR ist allgemein anerkannt und liefert eine recht eindeutige Erklärung für die UV-Hypersensitivität in Cockayne Syndrom Patienten (Venema *et al.*, 1990). Doch neben einer Überempfindlichkeit der Haut nach UV-Exposition zeigen CS-Patienten auch eine Vielzahl an neurologisch bedingten Störungen, die nicht allein durch einen Defekt in der TCR erklärt werden können. Dazu zählen Demyelinisierung und eine fortschreitende Atrophie der weißen Substanz in Cerebrum und Cerebellum, sowie Kalzium-Ablagerungen in den subkortikalen Basalganglien und der cerebralen weißen Substanz (Itoh *et al.*, 1999). Weitere Merkmale sind cerebellare Atrophien und der Verlust von Neuronen – in erster Linie Purkinjezellen – im Cerebellum, sowie Mikrozephalie, welche vermutlich durch eine Kombination aus früh gestörtem Hirnwachstum und progressiver postnataler Neurodegeneration bedingt ist (Weidenheim *et al.*, 2009).

Als eine mögliche Erklärung für die starke Neurodegeneration in CS-Patienten wird die vermehrte Ansammlung von oxidativen Produkten im Gehirn diskutiert. In einer Studie an CS-Autopsien wurden verstärkt Produkte von oxidativem Stress in einigen Teilen des Gehirns gefunden (Hayashi *et al.*, 2001). In CSB-defizienten Leberzellen und Fibroblasten wurde zudem gezeigt, dass eine gestörte mitochondrielle Reparatur des oxidativen Produkts 8-Oxoguanin (8-oxoG) vorliegt (Stevnsner *et al.*, 2002). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden in allen lebenden Zellen endogen als Nebenprodukt des normalen Metabolismus und durch exogene Umweltfaktoren produziert. Endogene ROS werden größtenteils während der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien von eukaryotischen Zellen produziert und stellen daher ein großes Risiko für Schäden an der mitochondrialen DNS (mtDNS) dar. Eine der häufigsten oxidativen DNS-Läsionen ist 8-oxoG, welches fehlerhaft mit Adenin bei der DNS-Replikation binden und somit zu einer Transversion führen kann (Dianov *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass Defekte in der mtDNS-Reparatur mit Neurodegeneration assoziiert sind (Wilson und Bohr, 2007). Die Reparatur von 8-oxoG erfolgt in erster Linie durch den Prozess der Basenexzisionsreparatur (BER), deren erster Schritt eine Läsions-spezifische DNS-Glykosylase erfordert (Lindahl, 1993). Die defekte Reparatur von 8-oxoG in CSB-defizienten Zellen geht auch mit einer reduzierten Expression der 8-oxoG DNS-Glykosylase OGG1 einher (Dianov *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse sprechen für eine mögliche Rolle des CSB Proteins bei der BER. Hinweise hierfür wurden auch dadurch gefunden, dass CSB bei

oxidativem Stress in den Mitochondrien angereichert wird und sowohl mit mitochondrieller DNS, als auch dem Reparaturprotein OGG1 direkt interagiert (Kamenisch *et al.*, 2010).

Wie unter 1.1.2 bereits erwähnt, scheint CSB aber auch eine essentielle Bedeutung für die Transkription zu haben. In einer Transkriptomanalyse zeigten CSB-defiziente Zellen, die mit CSB transfiziert wurden, große Genexpressionsunterschiede zu ihren Kontrollzellen (Newman *et al.*, 2006). Dies bestätigt den Befund, dass die generelle Transkriptionsaktivität in CSB-defizienten Zellen reduziert ist (Balajee *et al.*, 1997). Zurückzuführen ist dies vermutlich auf die Chromatin-verändernde ATPase-Aktivität von CSB (Citterio *et al.*, 2000). Chromatin ist eine hoch kondensierte Struktur, die das Gerüst für essentielle nukleare Prozesse wie Transkription, Replikation und DNS-Reparatur darstellt. Nukleosome stellen die elementaren Bestandteile des Chromatins dar und bestehen aus einem Oktamer aus je zwei Untereinheiten der Histone H2A, H2B, H3 und H4, um die 147 Basenpaare genomische DNS gewickelt sind. Die kondensierte Form während Mitose und Meiose wird als Heterochromatin bezeichnet, die locker verpackte Form, welche für Transkription, Replikation und DNS-Reparatur benötigt wird, als Euchromatin. Durch Veränderungen in der Chromatin-Struktur kann die Genexpression reguliert werden. Hauptsächlich geschieht dies durch ATP-abhängige Veränderung der Nukleosomen oder Modifikationen der Histone (Herceg und Murr, 2011). Zu den häufigsten kovalenten Histonmodifikationen gehören Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung und Ubiquitinylierung. Verschiedene Positionen an jedem der Histone können unterschiedlich modifiziert werden und führen zu einer Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten. Dieser sogenannte Histon-Code entscheidet letztlich über die Aktivierung oder Inaktivierung eines Gens (Goll und Bestor, 2002). Beispielsweise bewirkt die Acetylierung von Lysinresten am N-Terminus der Histone eine Aktivierung der Transkription. Viele Transkriptionsregulatoren besitzen daher eine intrinsische Histonacetyltransferase- (HAT) oder Histondeacetylase- (HDAC) Aktivität, mit der sie nicht nur durch die Acetylierung von Histonen, sondern auch die Genexpression von anderen Proteinsubstraten (z. B. Transkriptionsfaktoren) regulieren (Kuo und Allis, 1998).

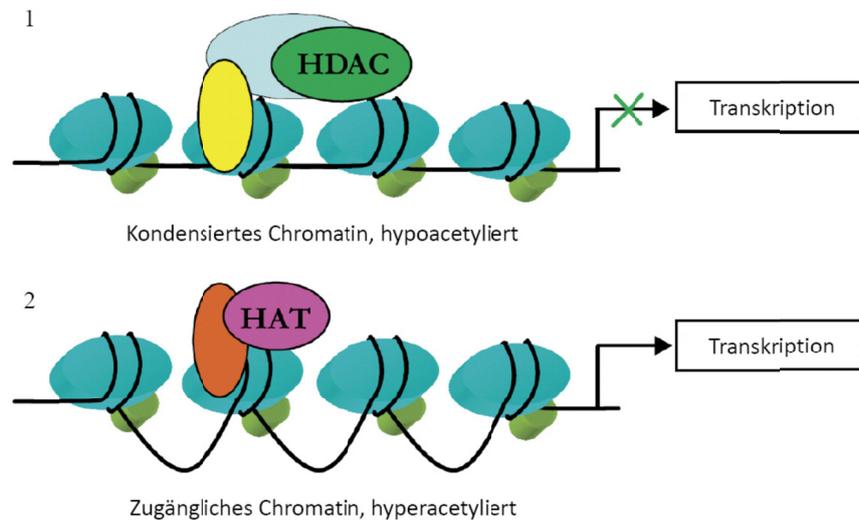


Abbildung 2

Der Einfluss von Histonacetyltransferasen und –deacetylasen auf die Transkription.

1 Histondeacetylasen (HDACs) entfernen Acetylgruppen von acetylierten Lysinresten am N-Terminus von Histonen und ermöglichen das Binden des dadurch positiv geladenen Lysins mit dem negativ geladenen Phosphatgerüst der DNS. Das hypoacetylierte Chromatin kondensiert und die Transkription wird blockiert. **2** Histonacetyltransferasen (HAT) fügen Acetylgruppen an Histone und ermöglichen den Zugang von Transkriptionsfaktoren an die hyperacetylierte Promotorregion der DNS. Die Transkription kann somit stattfinden (nach Peixoto und Lansiaux, 2006).

Offensichtlich hat CSB nicht nur direkt durch seine ATPase-Aktivität, sondern auch indirekt über die Gene, die es reguliert, einen Einfluss auf die Chromatinstruktur. So wurde gezeigt, dass es signifikante Übereinstimmung der CSB-regulierten Gene mit Genen gibt, die durch HDAC-Inhibitoren, DNS-Methylierungsinhibitoren, poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-1) und andere Faktoren, die die Chromatinstruktur beeinflussen, reguliert sind (Newman *et al.*, 2006). In derselben Studie wurde auch gezeigt, dass die Behandlung von CSB-profizienten Zellen mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) zu einer partiellen Angleichung des Transkriptom an das von CSB-defizienten Zellen führt. Des Weiteren wurde gefunden, dass nach UV-Bestrahlung die Transkriptions-Initiation auch in nicht geschädigten Genen verzögert ist und dies mit einer defekten Acetylierung des Histons H4 in bestimmten Promotorregionen einhergeht (Proietti-De-Santis *et al.*, 2006). All diese Befunde lassen darauf schließen, dass CSB neben seiner Funktion in der Reparatur von DNS-Schäden auch einen großen Einfluss auf die generelle Transkription und Genexpression hat, was eine Erklärung für die im CS-Patienten beobachteten neurologischen Defekte darstellen kann.

Jean-Marc Egly (Filippi *et al.*, 2008) stellte erstmals die Hypothese auf, dass CSB einen transkriptionellen Einfluss auf einen Mechanismus haben muss, der offenbar erst nach der Geburt zum Tragen kommt, da die neuronale embryonale Entwicklung von CS Typ I-Patienten normal erfolgt und erst in den ersten beiden Lebensjahren Fehlentwicklungen zu beobachten sind (Nance *et al.*, 1992). Da der betroffene Mechanismus innerhalb der fötalen Entwicklung offenbar durch die Versorgung durch die Plazenta sichergestellt ist und

gleichzeitig essentiell für die neuronale Entwicklung ist, postulierte er, dass es sich hierbei um die Sauerstoff-Homöostase handeln könne. Passend zu dieser Theorie fand er, dass CSB-defiziente Fibroblasten unfähig sind, auf geringe Sauerstoffkonzentrationen angemessen zu reagieren und entsprechende Signalwege zu aktivieren (Filippi *et al.*, 2008). Offen bleibt jedoch die Frage, ob CSB-Defizienz zu einer gestörten Hypoxie-Antwort im Gehirn bzw. in neuronalen Zellen führt.

1.1.4 Das CSB-/- Mausmodell

Da die Analyse der CSB-vermittelten Hirnentwicklung in einem humanen Zellmodell beinahe unmöglich ist, wurde für diese Arbeit ein CSB-defizientes Mausmodell benutzt, das von der Gruppe um Jan Hoeijmakers generiert wurde (van der Horst *et al.*, 1997). Die C57/BL6 CSB-defizienten Mäuse wurden mit einer homozygoten *Nonsense*-Mutation am Lysin K337 versehen, wodurch ein Stop-Codon entstand, das zu einem Abbruch der Protein-Synthese und einem unvollständigen und nicht-funktionierenden CSB-Protein führte. Diese Mutation war angelehnt an ein heterozygot mutiertes Allel einer humanen CSB-defizienten Zelllinie (CS1AN), die durch SV40-Transfektion von humanen Fibroblasten eines CS-Patienten generiert wurde (Troelstra *et al.*, 1992b). Die CSB -/- Mäuse zeigen alle reparaturbedingten Charakteristika von humanen CS-Patienten: eine erhöhte UV-Sensitivität, eine vollständige Inaktivierung der TCR, keine Defekte in der GGR und eine stark verzögerte Wiederaufnahme der RNS-Synthese nach UV-Bestrahlung. Anders als im Menschen, haben die Mäuse eine normale Lebenserwartung und sind anfällig für UVB-vermittelte Tumoren in der Haut. Die kurze Lebensspanne von CS-Patienten und das bewusste Vermeiden von Sonnenstrahlungsexposition könnten den Unterschied zum Ausbleiben von Hautkrebs im Patienten erklären (van der Horst *et al.*, 1997). Der Grundlevel an oxidativen DNS-Modifikationen in Zellen aus CSB -/- Mäusen unterscheidet sich nicht von Wildtyp-Zellen und steigt auch im Alter nicht an. Dem entsprechend ist die BER-Reparaturrate in CSB-/- Zellen nur leicht beeinflusst und scheint keine Bedeutung für den Phänotyp in CSB-defizienten Mäusen zu haben (Osterod *et al.*, 2002).

Erste neurologische Untersuchungen der CSB -/- Mäuse ergaben keine großen Abweichungen zum Wildtyp. Die Neuromyelinisierung des optischen Nervs im Zentralnervensystem und des peripheren Ischiasnerv in 18 Wochen und 14 Monate alten Tieren erschien normal (van der Horst *et al.*, 1997) und auch Übersichtsfärbungen an Gehirnschnitten von 6 Monate und 70-100 Wochen alten Mäusen ergaben keine offensichtlichen anatomischen und histologischen Unterschiede (Jaarsma *et al.*, 2011). Allerdings begannen einige CSB -/- Mäuse im Alter von 6 Monaten ein stereotypisches hyperaktives Verhalten zu zeigen, das eine beginnende Gehörlosigkeit vermuten lässt. Die Durchführung verschiedener Verhaltenstests bei 18 Wochen alten Mäusen zeigten, dass leichte neurologische Störungen vorlagen: CSB -/- Mäuse waren im „Offenen-Feld-Test“ weniger aktiv, insbesondere während der ersten 30 Sekunden, und benötigen daher offenbar länger, um sich an eine neue Umgebung anzupassen. Außerdem

hatten sie Schwierigkeiten, sich auf dem rotierenden Zylinder des Rotarod-Testes zu halten, was auf Störungen der Motorkoordination und Balance hindeutet, welche beide durch Funktionen im Kleinhirn gesteuert werden (van der Horst *et al.*, 1997). Eine genauere Analyse der neuropathologischen Symptome in den CSB *-/-* Mäusen wurde aber noch nicht durchgeführt und soll ein Ziel dieser Arbeit sein.

Eine deutliche Verstärkung des relativ mild ausgeprägten neurologischen Phänotyps der CSB *-/-* Mäuse ließ sich durch eine komplette Inaktivierung der NER durch zusätzliche Mutationen im XPA, XPC oder XPD Gen erzielen (Jaarsma *et al.*, 2011), (Laposa *et al.*, 2007), (Murai *et al.*, 2001), (Revet *et al.*, 2012), (van der Pluijm *et al.*, 2007). In wie weit ein Zusammenspiel der verschiedenen NER-Reparaturproteine einen Einfluss auf die neuronale Entwicklung nimmt, muss allerdings noch geklärt werden.

1.2 Hypoxie-induzierte Signalwege

1.2.1 Bedeutung der Sauerstoff-Homöostase für das Gehirn

Die strukturelle und funktionelle Erhaltung der Hirnfunktionen hängt wesentlich von einer ausreichenden Sauerstoffversorgung ab. Das Gehirn verbraucht große Mengen an Energie und ist daher besonders sensibel gegenüber Änderungen des Sauerstoffpartialdrucks. Das Erkennen und Reagieren auf verminderte Sauerstoffkonzentrationen (Hypoxie) ist daher essentiell für das Überleben von Zellen im Gehirn. (Sharp und Bernaudin, 2004). Andererseits können zu hohe Mengen an Sauerstoff toxische Effekte haben und oxidativen Stress verursachen, was schwerwiegende Folgen für die Hirnfunktion hat (Erecinska und Silver, 2001). Daher muss sich die Sauerstoffkonzentration im Gehirn innerhalb eines Levels befinden, der ausreichend hoch ist, um alle Funktionen der neuronalen Zellen zu gewährleisten, und ausreichend niedrig, um die Entstehung von ROS zu vermeiden. Sie liegt im Gehirn von Säugetieren bei ~1 bis 5% O₂ (Sharp *et al.*, 2004).

Für die Entwicklung des Gehirns ist eine adäquate Antwort auf Hypoxie essentiell. Mäuse, in deren neuronalen Zellen der Hypoxie-induzierbare Faktor HIF-1 α ausgeschaltet ist, weisen erhebliche Defekte in der Gehirnentwicklung auf (Tomita *et al.*, 2003). Im Gehirn wird HIF-1 α von Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen exprimiert (Chavez *et al.*, 2000). HIF-1 ist ein Sauerstoff-abhängiger Transkriptionsfaktor, der die Expression einer Vielzahl an Genen transaktiviert. Diese wirken auf die Gefäßneubildung (Angiogenese, z.B. Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor VEGF), die Erweiterung der Blutgefäße (Vasodilatation, z.B. induzierbare Stickoxidsynthase iNOS), die Produktion von Erythrozyten (Erythropoese, z.B. Erythropoietin EPO), den Eisenstoffwechsel (z.B. Transferrin), die Zellzykluskontrolle (z.B. p21), den Energiestoffwechsel (z.B. Glucosetransporter-1 GLUT-1) und viele weitere Prozesse (Sharp *et al.*, 2004). Erstmals entdeckt wurde HIF-1 bei der Beobachtung, dass in Leberzellen nach hypoxischer Stimulation am 3'-Enhancer, dem sogenannten Hypoxie-

responsiven Element (HRE), des EPO-Gens ein Faktor bindet, der die Transkription von EPO induziert (Semenza und Wang, 1992). Der heterodimere Transkriptionsfaktor HIF-1 besteht aus zwei Untereinheiten: HIF-1 α , einem 120 kDa großen Protein und HIF-1 β , einem 91-94 kDa großen Protein, die ein funktionales Dimer bilden (Wang und Semenza, 1995). Während HIF-1 β konstitutiv in allen Zellen vorhanden ist, ist HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen labil, kann aber unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert werden. HIF-1 β wurde ursprünglich als ARNT (Ah-Rezeptor nuklearer Translokator) bezeichnet, da es an den Dioxinrezeptor AhR (Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor) binden kann (Jiang *et al.*, 1996). Neben HIF-1 α gibt es noch zwei weitere Isoformen, nämlich HIF-2 α und HIF-3 α , deren Funktion aber nicht im Detail bekannt ist (Lee *et al.*, 2004).

1.2.2 Stabilisierung von HIF-1 α

Um zu verstehen, wie HIF-1 α stabilisiert wird, muss man sich den Aufbau des Transkriptionsfaktors ansehen. Beide Untereinheiten von HIF-1 besitzen eine basische Helix-Loop-Helix (bHLH) Domäne, über die HIF-1 an DNA bindet und eine PER/ARNT/SIM (PAS) Domäne, die Signalfunktionen hat (Jiang *et al.*, 1996). Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1 α an den Prolinresten P402 und P564 durch die Prolylhydroxylasen PHD1-3 Fe(II)-abhängig hydroxyliert. Die beiden Prolinreste sind in der O₂-abhängigen Degradationsdomäne (ODDD) lokalisiert (Fandrey *et al.*, 2006). Diese posttranslationale Modifikation dient als Erkennungsmotiv für das Tumorsuppressorprotein von-Hippel-Lindau (pVHL), welches durch seine E3 Ubiquitinligaseaktivität die Ubiquitylierung von HIF-1 α und dessen proteasomalen Abbau vermittelt (Haase, 2009). Ubiquitin (Ub) ist ein 76 Aminosäuren großes Polypeptid, das an sein Zielsubstrat über einen mehrstufigen Prozess folgender Enzyme gebunden wird: das Ub-aktivierende Enzym E1, das Ub-konjugierende Enzym E2 und die Ub-Proteinligase E3. Während poly-Ubiquitylierung das Zielsubstrat für den proteasomalen Abbau markiert, kann eine mono-Ubiquitylierung die Proteinfunktion verändern (Wilkinson, 2000). Das poly-ubiquitylierte Protein bindet an das 26S Proteasom, das aus einer 20S- und zwei 19S-Untereinheiten zusammengebaut ist, wird entfaltet, durch das Enzym E4 deubiquityliert und in das Innere des Proteasoms transportiert, wo es in seine einzelnen Peptide zersetzt wird (Hochstrasser, 1996). Ubiquitin-Monomere werden durch die carboxy-terminale Hydrolase recycelt, kurze Peptidfragmente und Aminosäuren des abgebauten Proteins werden in der Protein-Neusynthese wiederverwertet (Klimaschewski, 2003). Unter hypoxischen Bedingungen entgeht HIF-1 α dem proteasomalen Abbau, da die Hydroxylierung seiner Prolinreste gehemmt ist und es dadurch stabilisiert wird. Mit Unterstützung diverser Faktoren wie z.B. dem Hitzeschockprotein HSP90 kann es in den Nukleus wandern und dort mit HIF-1 β dimerisieren (Fandrey *et al.*, 2006).

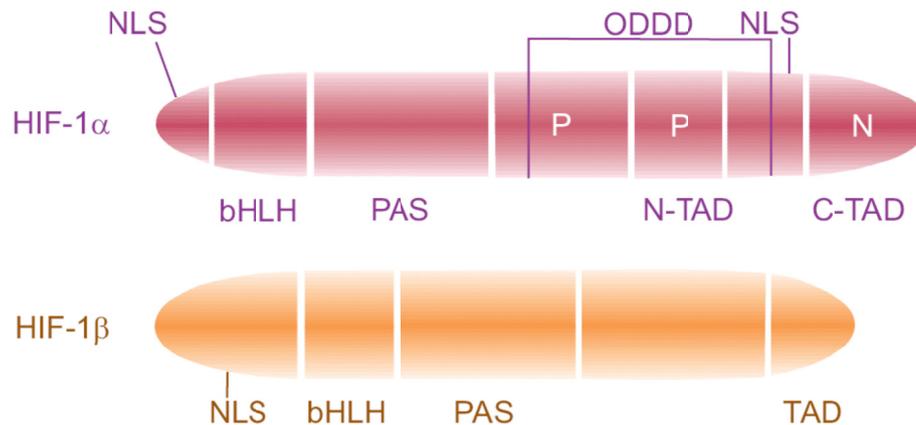


Abbildung 3

Struktureller Aufbau der HIF-1 Untereinheiten.

Die Sauerstoff-induzierte Untereinheit HIF-1 α (826 Aminosäuren) und die konstitutiv exprimierte Untereinheit HIF-1 β (789 Aminosäuren) gehören zu den basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)/PER/ARNT/SIM (PAS) Proteinen. Die bHLH/PAS-Domäne vermittelt das gegenseitige Binden der Untereinheiten und die Bindung von HIF-1 an die DNS. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1 α an den Prolinresten P 402 und 564 der O₂-abhängigen Degradationsdomäne (ODDD) hydroxyliert. Dies dient als Signal für den proteasomalen Abbau der Untereinheit. Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 α stabilisiert und über das Kernlokalisierungssignal NLS in den Zellkern eingeschleust. Dort interagiert der Transkriptionsfaktor HIF-1 über die N- und C-terminale Transaktivierungsdomäne TAD mit diversen Cofaktoren. Unter normoxischen Bedingungen verhindert die Hydroxylierung des Asparaginrestes N 803 die Bindung von HIF-1 α mit seinem Cofaktor CBP/p300 (Berchner-Pfannschmidt *et al.*, 2008).

Im Zellkern bindet der HIF-1 Komplex an regulatorische DNS-Sequenzen seiner Zielgene, den sogenannten Hypoxie-responsiven Elementen (HRE), die in der Promotor- oder Enhancer-Region der HIF-1-Zielgene lokalisiert sind (Wenger *et al.*, 2005). Die HIF-1-vermittelte Aktivierung ihrer Transkription erfordert die Rekrutierung von Cofaktoren wie CREB (cAMP responsives Element bindendes)-Bindeprotein (CBP)/p300 an die C-terminale TAD. CBP/p300, beides Protein- und Histonacetyltransferasen (HAT), regulieren die Chromatinstruktur durch die Acetylierung von Histonen in der Promotorregion und weiteren an der Transkription beteiligten Coaktivatoren und aktivieren dadurch die Transkription der HIF-1-abhängigen Gene (Ruas *et al.*, 2005). Es wurde auch gezeigt, dass die HAT-Aktivität von CBP/p300 eine wichtige Rolle für die Gehirnentwicklung spielt (Li *et al.*, 2002).

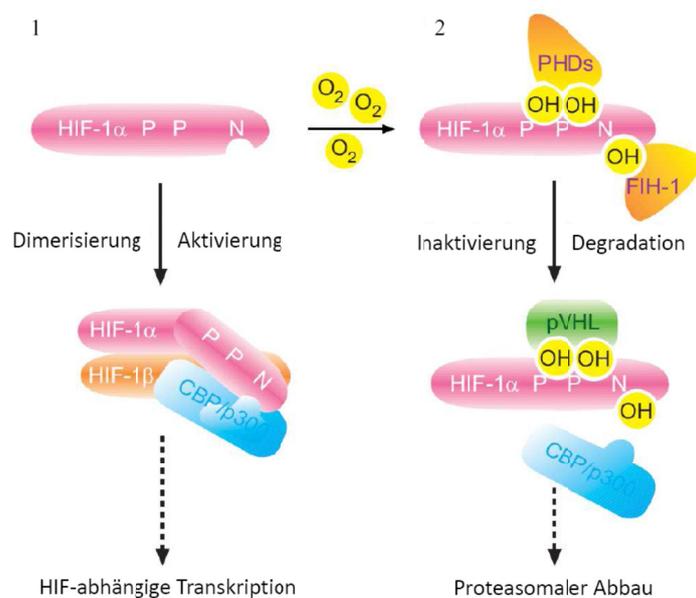


Abbildung 4

Die Sauerstoff-abhängige Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1.

1 Unter hypoxischen Bedingungen dimerisieren die HIF-1-Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β und binden an den Promotor von Hypoxie-induzierten Zielgenen. Nach Rekrutierung der Coaktivatoren CBP/p300 wird die HIF-1-abhängige Transkription transaktiviert. **2** Unter normoxischen Bedingungen werden die Prolylreste P 402 und 564 von HIF-1 α hydroxyliert, was zu einer Ubiquitinylierung der Untereinheit durch das von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) und seinem proteasomalen Abbau führt. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 kann nicht mehr ausgebildet werden. Die Hydroxylierung des Asparaginrestes N 803 durch den HIF-1-inhibierenden Faktor FIH-1 verhindert die Bindung der C-terminalen Transaktivierungsdomäne mit dem Coaktivator CBP/p300 (nach Berchner-Pfannschmidt *et al.*, 2008).

1.2.3 CSB und Hypoxie

Wie unter 1.1.2 beschrieben, beeinflusst CSB die Aktivität des Tumorsuppressorproteins p53 bei DNS-Schäden. Nach UV-induzierten Schädigungen der DNS in CSB-defizienten Zellen wurde eine verstärkte Expression und Stabilisierung von p53 einhergehend mit erhöhten Level an Apoptose beobachtet (Balajee *et al.*, 2000). Die Induktion des programmierten Zelltods in Reparatur-defizienten Zellen beruht auf einer der Hauptaufgaben zellulärer Prozesse: je nach Schwere eines Zellschadens muss entschieden werden, ob die Zelle überleben soll und der Schaden repariert wird, oder ob die Zelle zu stark geschädigt ist und kontrolliert zerstört werden muss (Frontini und Proietti-De-Santis, 2009). Dasselbe gilt für die Antwort auf Hypoxie. Unter geringen Sauerstoffbedingungen wird HIF-1 α stabilisiert und das Zellüberleben gewährleistet. Dauern hypoxische Konditionen zu lange, oder sind sie zu stark, induziert die Zelle die Stabilisierung von p53, was letztlich zu Apoptose führt (Sermeus und Michiels, 2011). Interessanterweise wurde beobachtet, dass zwar auch unter leicht reduzierten Sauerstoffkonditionen p53 exprimiert wird und an die Promotoren seiner Zielgene bindet, es deren Expression allerdings nicht transaktivieren kann. p53 benötigt nämlich für die

Transkription seiner Zielgene den gleichen Coaktivator wie HIF-1, die Histonacetyltransferase p300 (Schmid *et al.*, 2004). Beide Proteine, p53 und HIF-1, binden an die Cystein/Histidin-reiche Domäne CH1 von p300 (Freedman *et al.*, 2002). Daher wird vermutet, dass HIF-1 und p53 um den limitiert vorhandenen Cofaktor p300 konkurrieren. Eine zentrale Rolle bei der Verteilung des Cofaktors nimmt CSB ein, welches direkt mit p300 interagiert. Es wurde gezeigt, dass CSB, selbst ein Zielgen von HIF-1, verantwortlich für die Verteilung von p300 zwischen HIF-1 und p53 bei der hypoxischen Antwort ist (Filippi *et al.*, 2008). In CSB-defizienten humanen Fibroblasten, die mit Hypoxie-nachahmenden Substanzen wie Desferrioxamin (DFO) und Kobaltchlorid (CoCl₂) behandelt wurden, wurde der p53-Signalweg verstärkt induziert. Im Gegensatz dazu hat zwar HIF-1 an die Promotorregionen seiner Zielgene gebunden, konnte deren Expression allerdings nicht transaktivieren. Dies ist auf eine gestörte Rekrutierung von p300 an den Promotor der Zielgene und einer daraus hergehenden gestörten Acetylierung des Chromatins an der Stelle zurückzuführen (Filippi *et al.*, 2008). CSB scheint also eine essentielle Rolle bei der Antwort auf Hypoxie einzunehmen.

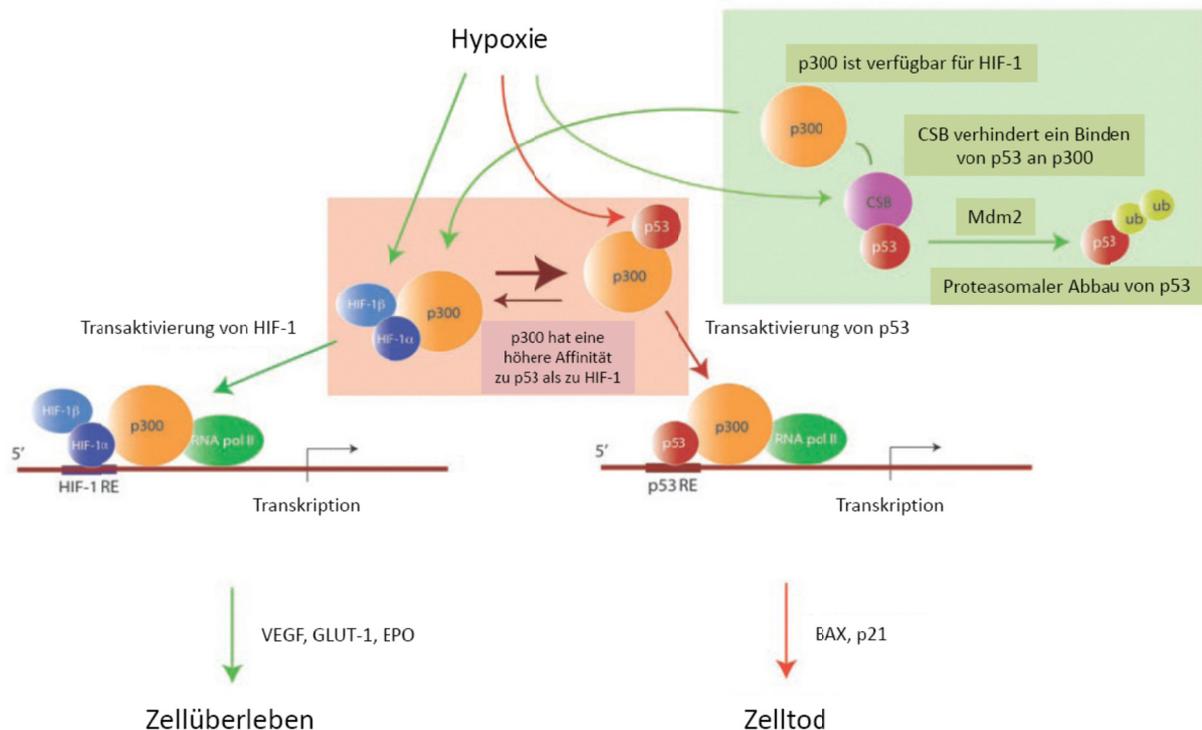


Abbildung 5

Das Zusammenspiel zwischen CSB, p300, p53 und HIF-1 bei der Hypoxie-vermittelten Transkription.

Hypoxischer Stress reguliert die HIF-1-abhängige Antwort auf Hypoxie, die zu einer Expression von Genen wie VEGF, GLUT-1 und EPO und damit zum Überleben der Zelle führt. Bei starken hypoxischen Konditionen wird p53 induziert, was durch Aktivierung von Zielgenen wie BAX und p21 zum Zelltod führt. Welcher der beiden Signalwege aktiviert wird, darüber entscheidet die Rekrutierung des gemeinsamen, limitiert vorhandenen Cofaktors p300 an die responsiven Elemente (RE) der Zielgene von HIF-1 und p53. CSB scheint für die Verteilung von p300 zwischen beiden Signalwegen eine große Rolle zu spielen. Selbst induziert unter Hypoxie bindet es an p53 und vermittelt dessen Ubiquitinierung durch Mdm2 und den daraus resultierenden proteasomalen Abbau von p53. p300 ist nun verfügbar für die Transaktivierung der HIF-1-induzierten Gene. In Abwesenheit von CSB wird stattdessen p53 stabilisiert und Apoptose induziert (nach Frontini *et al.*, 2009)

1.3 Aufbau und Entwicklung des Gehirns

1.3.1 Zelltypen und Kompartimente im zentralen Nervensystem

Das Gehirn, Bestandteil des zentralen Nervensystems (ZNS), ist hauptsächlich aus zwei verschiedenen Zelltypen zusammengesetzt: Neuronen und Gliazellen. Neuronen, auch Nervenzellen genannt, kommunizieren miteinander über synaptische Transmission und kontrollieren damit alle körpereigenen Funktionen. Ein typischer Neuron ist aus Dendriten, einem Zellkörper und einem Axon aufgebaut, welcher die Erregungsleitung über weite Strecken ermöglicht. Am Axonende (präsynaptische Endigung) kommt es zur Freisetzung von Neurotransmittern. Dabei wird das Signal über Synapsen chemisch auf andere Nervenzellen übertragen (Kandel *et al.*, 2000).

Die mengenmäßig größte Zellpopulation im Gehirn stellen Gliazellen dar. Sie liefern das Stützgerüst für Neurone und teilen sich auf in Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Astrozyten versorgen die Nervenzellen über Kontakte zu Blutgefäßen und gewährleisten eine Trennung von Gehirn und Blutkreislauf (Blut-Hirn-Schranke). Oligodendrozyten bilden Markscheiden aus Myelin, mit denen sie die Axone der Neurone umhüllen und für eine raschere synaptische Transmission isolieren. Der hohe Fettgehalt im Myelin erscheint im Gehirn weiß gefärbt, daher bezeichnet man das Gewebe, das rein aus Nervenfasern besteht, als weiße Substanz im Gegensatz zur grauen Substanz, die überwiegend aus Nervenzellkörpern besteht (Kandel *et al.*, 2000).

Mikroglia werden zwar zu den Gliazellen gezählt, mittlerweile jedoch ist bekannt, dass sie, anders als das Nervensystem, welches aus dem ektodermalen Keimblatt gebildet wird, mesenchymalen Ursprungs sind und von Monozyten abstammen, die während der Embryogenese in das Gehirn migriert sind. Zudem existieren im Gehirn Makrophagen, die zwar nicht zu den Mikroglia zählen, aber dieselbe phagozytotische Funktion wie sie besitzen (Guillemin und Brew, 2004). Ein weiterer, für die Hirnfunktionen wichtiger Zelltyp sind Endothelzellen. Sie bilden gemeinsam mit den Astrozyten die Blut-Hirn-Schranke aus, versorgen das Gehirn mit Sauerstoff, Energiesubstraten und essentiellen Aminosäuren und schützen es vor toxischen Substanzen und im Blut zirkulierenden Neurotransmittern (Kandel *et al.*, 2000).

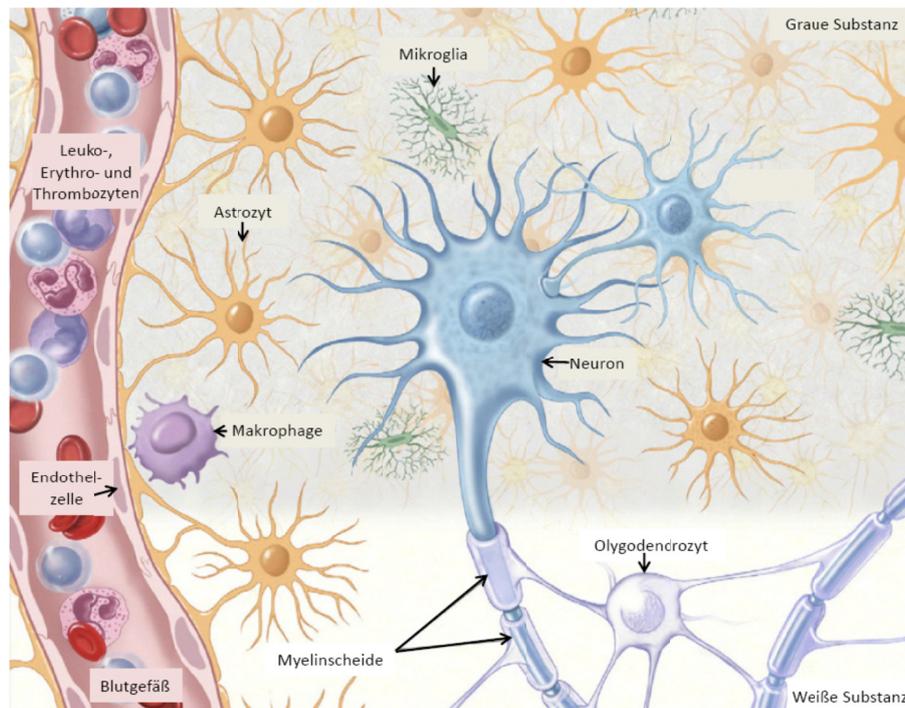


Abbildung 6

Darstellung der verschiedenen Zelltypen im Gehirn.

Neuronen, Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia), Makrophagen, Endothelzellen und im Blut zirkulierende Zellen (Leuko-, Erythro- und Thrombozyten) sind in ihrem anatomischen Zusammenspiel mengenmäßig dargestellt. Astrozyten bilden gemeinsam mit Endothelzellen die Blut-Hirn-Schranke und gewährleisten die Versorgung der Nervenzellen. Oligodendrozyten isolieren durch Bildung von Myelinscheiden die Axone der Neurone. Mikroglia und Makrophagen dienen der Abwehr von Pathogenen im Gehirn. In der grauen Substanz sind die Zellkörper der Nervenzellen, in der weißen Substanz ihre Fasern angesiedelt (nach Brooks *et al.*, 2008).

Das ZNS von Wirbeltieren ist aufgeteilt in Gehirn und Rückenmark (Medulla spinalis). Dem Rückenmark, das der Kommunikation des Gehirns mit den inneren Organen, der Haut und den Muskeln dient, schließt sich der Hirnstamm an, welcher die Informationen von und an das Gehirn weiterleitet. Der Hirnstamm, besteht aus verlängertem Mark (Medulla oblongata), Brücke (Pons) und Mittelhirn (Mesencephalon). Das verlängerte Mark beinhaltet mehrere Zentren, die wichtige vegetative Funktionen, wie Kreislauf und Atmung koordinieren. Die Brücke fungiert im Wesentlichen als Leitungsstruktur zwischen Cerebrum und Cerebellum. Die Aufgaben des Mittelhirns beinhalten die Koordination von visuellen und auditorischen Reflexen. Das an die Brücke angrenzende Kleinhirn (Cerebellum) steuert die sensomotorische Koordination und ist für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zuständig. Das dem Mittelhirn angeschlossene Zwischenhirn (Diencephalon) besteht im Wesentlichen aus zwei Strukturen: dem Thalamus, der als zentrale Sammel- und Verarbeitungsstelle für alle Informationen des Großhirns angesehen wird, und dem Hypothalamus, welcher als übergeordnetes Steuerungszentrum des vegetativen Nervensystems z.B. das Aufrechterhalten der Homöostase und den Schlaf-Wach-Rhythmus reguliert und die Hormonproduktion in den

Hypophysen steuert. Die beiden Hemisphären des Großhirns (Cerebrum, auch: Telencephalon) bestehen aus einem stark gefalteten cerebralen Cortex und drei tieferliegenden Strukturen: den Basalganglien, dem Hippocampus und dem Mandelkern. In den Basalganglien werden motorische Funktionen gesteuert, der Hippocampus dient dem Aufbau des Gedächtnisses und im Mandelkern werden Emotionen verarbeitet (Kandel *et al.*, 2000).

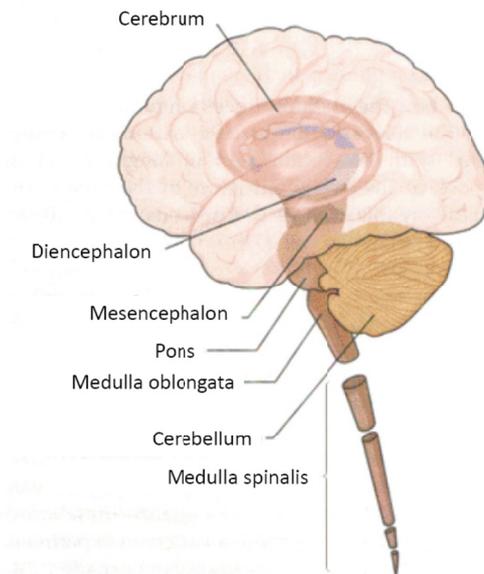


Abbildung 7

Die Kompartimente des zentralen Nervensystems.

Das zentrale Nervensystem von Wirbeltieren ist aus sieben Kompartimenten zusammengesetzt, die mit dem gesamten Organismus kommunizieren. Von dort aus werden alle essentiellen Körperfunktionen gesteuert und eingehende Informationen verarbeitet (nach Kandel *et al.*, 2000).

1.3.2 Das Kleinhirn im Fokus

Da die Neuropathologie des Kleinhirns eine der Hauptcharakteristika des Cockayne Syndroms darstellt (Soffer *et al.*, 1979) wird im Folgenden der Aufbau dieses Hirnkompartiments genauer betrachtet. Anatomisch besteht es aus zwei Hemisphären, die über den medial gelegenen Kleinhirnwurm (Vermis) miteinander verbunden sind. Die Kleinhirnrinde (cerebellarer Cortex) ist vielfach gefaltet und setzt sich aus drei Schichten zusammen: der Molekularschicht (Stratum moleculare), der Purkinjezellschicht (Stratum ganglionare) und der Körnerzellschicht (Stratum granulosum) (Baehr und Frotscher, 2003). Obwohl das Kleinhirn im Menschen nur etwa zehn Prozent des Hirngesamtgewichts ausmacht, enthält es mehr Neurone als der Rest des gesamten Gehirns (Glickstein, 2007). Die Molekularschicht besteht aus einzelnen Neuronen (z.B. Korbzellen), den Axonen der Körnerzellen (Parallelfasern) und den weit verzweigten Dendritenbäumen der Purkinjezellen.

Letztere haben verhältnismäßig große Zellkörper, die in der Purkinjezellschicht exakt in einer Reihe angeordnet sind (Baehr *et al.*, 2003). Es handelt sich bei ihnen um inhibitorische Neuronen, da sie GABA (Gamma-Aminobuttersäure) als Neurotransmitter nutzen (Gahwiler, 1975). In der innersten Schicht (Körnerzellschicht) befinden sich dicht gedrängt mehr als 95% aller Neurone des Kleinhirns, die Körnerzellen. Diese nutzen Glutamat als Neurotransmitter und wirken als einzige Zellen des cerebellaren Cortexes erregend auf ihre Zielzellen (Baehr *et al.*, 2003).

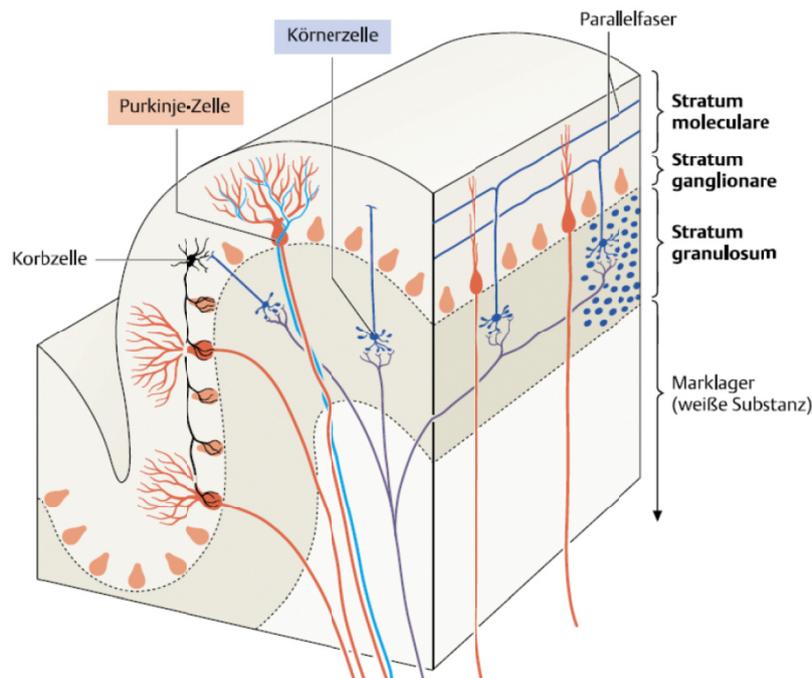


Abbildung 8

Der Aufbau des cerebellaren Cortexes.

Die mehrfach gefaltete Kleinhirnrinde ist aus drei Schichten aufgebaut. In der Molekularschicht (Stratum moleculare) sind die Dendritenbäume der Purkinjezellen, die Parallelfasern (Axone) der Körnerzellen und vereinzelte Neuronen (Korbzellen) angesiedelt. Die Purkinjezellschicht (Stratum ganglionare) besteht aus den nebeneinander aufgereihten Zellkörpern der Purkinjezellen. Deren Axone ziehen sich durch die Körnerzellschicht (Stratum granulosum) bis zur weißen Substanz und stellen den einzigen Ausgang der Kleinhirnrinde dar (nach Baehr *et al.*, 2003).

Als einzige Astrozyten in der Purkinje- und Molekularschicht gelten die Bergmann Gliazellen (de Blas, 1984). Sie nehmen einen starken Einfluss auf die Entwicklung und Ausbildung der Dendritenbäume von Purkinjezellen, indem sie ihnen als Wachstumssubstrat dienen (Lordkipanidze und Dunaevsky, 2005).

Defekte im Kleinhirn führen in der Regel zu einer Dysfunktion der Feinmotorik (Diener *et al.*, 1993). Bei CS-Patienten treten Störungen der Bewegungskoordination wie Ataxie oder Spastizität auf, die durch eine gestörte motorische Feinabstimmung durch das Kleinhirn verursacht wird. Neben einer verstärkten Demyelinisierung der weißen Substanz im Cerebellum weisen die Patienten eine starke Atrophie der Purkinjezellen auf (Weidenheim *et*

al., 2009). Von Purkinjezellen ist bekannt, dass sie besonders sensitiv für geringe Sauerstoffkonzentrationen sind. Da ihnen der Glutamat-Transporter EAAT4 und das Glykolyse-Enzym Aldolase C fehlen, können sie unter Sauerstoffmangel nur begrenzt Energie generieren (Welsh *et al.*, 2002).

Die Entwicklung des Kleinhirns läuft im Menschen folgendermaßen ab: Purkinjezellen entstehen aus der Ventrikularzone des Neuralrohr (Neuroepithel) und migrieren zu ihrer Zielposition, der Purkinjezellschicht (Schilling, 2000). Aus dem Neuralrohr ausgewanderte Neuroblasten bilden die äußere granuläre Schicht (*external granular layer*, EGL), proliferieren dort, differenzieren zu Körnerzellen aus und migrieren als solche in die innere granuläre Schicht (IGL) vorbei an den Purkinjezellen (Ten Donkelaar *et al.*, 2003). Dies führt zu einer extremen Vergrößerung des Kleinhirns und der Ausbildung einer reifen, gefurchten Kleinhirnstruktur (Goldowitz und Hamre, 1998). Purkinjezellen sind zum Zeitpunkt der Geburt ausdifferenziert, die Proliferation und Migration von Körnerzellen dauert noch während des ersten Lebensjahres an (Ten Donkelaar *et al.*, 2003). In der Maus ist die Kleinhirnentwicklung bereits in den ersten 3-4 Wochen abgeschlossen (Goldowitz *et al.*, 1998).

1.3.3 Neurosphären als Modell für neurale Entwicklung

Lange Zeit war die Theorie verbreitet, dass die neuronale Entwicklung des ZNS mit der Geburt abgeschlossen und eine *de novo*-Synthese von Neuronen unmöglich ist. Mittlerweile wurde diese Theorie widerlegt und man weiß, dass neurale Vorläuferzellen auch im ausgewachsenen Gehirn in den Hirnventrikeln existieren und jederzeit in Neuronen und Gliazellen ausdifferenzieren können (Alvarez-Buylla und Lois, 1995). Damals wurde gezeigt, dass Zellen, die aus adulten Mäusegehirnen isoliert wurden, in Anwesenheit des epidermalen Wachstumsfaktors EGF proliferierten und Nestin exprimierten, ein Intermediärfilament, das in neuroepithelialen Stammzellen existiert (Reynolds *et al.*, 1992). Im Anschluss an die Proliferation entwickelten sie die Morphologie von Neuronen und Astrozyten (Reynolds und Weiss, 1992). Bei der beschriebenen Zellpopulation handelt es sich um Neurosphären. Das sind sich selbst erneuernde neurale Vorläuferzellen, die in serumfreien Medium in Anwesenheit von EGF sphärenartige Zellklumpen ausbilden (Louis und Reynolds, 2005). Nach Entzug des Wachstumsfaktors können sie in die drei häufigsten Zelltypen des ZNS ausdifferenzieren: Neuronen (positiv für β (III)-Tubulin), Astrozyten (positiv für saures Gliafaserprotein GFAP) und Oligodendrozyten (positiv für O4) (Fritsche *et al.*, 2011). Dieses dreidimensionale Zellsystem repräsentiert ein *in vitro* Modell, das die grundlegenden Prozesse der Gehirnentwicklung wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose nachahmt (Moors *et al.*, 2009). Auch wenn Neurosphären keine Synapsen ausbilden und demnach kein funktionelles Informationsnetzwerk darstellen, so repräsentieren sie doch das Zusammenspiel zwischen den einzelnen neuronalen Zelltypen deutlich realistischer als neurale Monokulturen (Betts, 2010).

1.4 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten die Hintergründe des neuropathologischen Phänotyps von Cockayne Syndrom (CS) Patienten analysiert werden. CS-Patienten weisen eine Dysfunktion des Kleinhirns auf, die auf Atrophie von Zellen des Kleinhirns beruht und in einer gestörten Feinmotorik resultiert (Weidenheim *et al.*, 2009). Die genetische Grundlage für CS liegt in der Regel in Mutationen des CSB-Gens (Mallery *et al.*, 1998). CSB spielt eine Rolle bei der Reparatur von DNS-Schäden, hat aber auch Einfluss auf die Transkription von Genen (Balajee *et al.*, 1997). In CSB-defizienten Fibroblasten wurde gezeigt, dass die Hypoxie-induzierte transkriptionelle Antwort gestört ist (Filippi *et al.*, 2008). Dies führte zu der Hypothese, dass CS-Patienten aufgrund einer unzureichenden Antwort auf geringe Sauerstoffkonzentrationen im Gehirn den zuvor beschriebenen neuropathologischen Phänotyp entwickeln. Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass das Syndrom sich erst nach der Geburt entwickelt, sobald die Sauerstoffversorgung nicht mehr durch die maternale Plazenta gewährleistet ist. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von CSB auf die neuronale Entwicklung und die Hypoxie-induzierte Transkription zu analysieren.

Als Grundlage für die Untersuchungen wurde ein CSB-defizientes Mausmodell herangezogen, dessen neuropathologischer Phänotyp histo-, molekularbiologisch und biochemisch analysiert wurde. Des Weiteren wurde in Neurosphären, einem dreidimensionalen Zellmodell für neurale Entwicklung, der Effekt von geringen Sauerstoffkonzentrationen untersucht. Um den Mechanismus des CSB-Proteins auf die Hypoxie-vermittelte Transkription besser zu verstehen, wurde schließlich die Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1 in embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) analysiert.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- 1) Gibt es morphologische Auffälligkeiten im Gehirn von CSB-defizienten Mäusen, die dem humanen Phänotyp von CS-Patienten entsprechen?
- 2) Kann eine gestörte Hypoxie-Antwort den CS-Phänotyp im Mausmodell erklären?
- 3) Welchen Effekt haben geringe Sauerstoffkonzentrationen auf die neurale Entwicklung bei CSB-Defizienz *in vitro*?
- 4) Wie wirkt sich Hypoxie auf die HIF-1-vermittelte Transkription von CSB-defizienten Neurosphären *in vitro* aus?
- 5) Welcher Mechanismus ist für die gestörte transkriptionelle Antwort auf Hypoxie bei CSB-Defizienz verantwortlich?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Als Mausmodell für das Cockayne Syndrom wurden CSB-defiziente C57/BL6 Mäuse verwendet, für deren Generierung die Mutation des CSB (ERCC6) Gens in der Zelllinie eines Cockayne Syndrom Patienten (CS1AN) zu Grunde lag (Troelstra *et al.*, 1992b). Die Tiere wurden freundlicherweise von Harry van Steeg (RIVM Bilthoven) bereitgestellt. Zur Erstellung dieser Mausmutante wurde ein vorzeitiges Stopcodon in das CSB Gen eingebaut, was zu einem verfrühten Translationsstop des CSB Proteins führt. Alle identifizierten funktionellen Domänen des CSB Proteins können nicht mehr produziert werden (van der Horst *et al.*, 1997).

2.1.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller / Firmensitz
ABC	Vector / Berlingame, USA
Accutase	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
Acrylamid 30%	Applichem / Darmstadt
AEC	Vector / Berlingame, USA
Agarose	Invitrogen / Carlsbad, USA
Antibiotika / Antimykotika (100x)	Invitrogen / Carlsbad, USA
Aprotinin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
APS	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
β -Lacton	Cayman Chemical Company / Michigan, USA
BrdU Reagenz	Roche / Basel, Schweiz
BrdU Substratlösung	Roche / Basel, Schweiz
BrdU Waschlösung	Roche / Basel, Schweiz
Bromphenolblau	Merck / Darmstadt
BSA Albumin Fraktion V	Carl Roth / Karlsruhe
CaCl ₂	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
DAB	Vector / Berlingame, USA
DAPI	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA

DEPC	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
DirectPCR-Tail	Peqlab / Erlangen
DMEM High Glucose	PAA Laboratories / Pasching, Österreich
DMSO	Carl Roth / Karlsruhe
DNS-Molekulargewichtsmarker X	Roche / Basel, Schweiz
DNase I	Promega / Madison, USA
DNase I Puffer	Promega / Madison, USA
DPBS	Invitrogen / Carlsbad, USA
DTT	Carl Roth / Karlsruhe
EDTA	Merck / Darmstadt
EGF	Invitrogen / Carlsbad, USA
Ethanol	Carl Roth / Karlsruhe
FCS	Invitrogen / Carlsbad, USA
First-Strand Buffer (5x)	Promega / Madison, USA
FixDenat Lösung	Roche / Basel, Schweiz
Fluoreszenz-Einbettmedium	Citifluor / London, UK
Fluoromount	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
GelRed (10.000x)	Biotium / Hayward, USA
Glycerin	Merck / Darmstadt
Glycin	Carl Roth / Karlsruhe
GoTaq Polymerase	Promega / Madison, USA
GoTaq Reaktionspuffer (5x)	Promega / Madison, USA
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
Hämatoxylinlösung	Vector / Berlingame, USA
Hams F12	Invitrogen / Carlsbad, USA
HCl	Carl Roth / Karlsruhe
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
Isopropanol	Carl Roth / Karlsruhe
Kaiser's Glycerin-Gelatine	Merck / Darmstadt
KCl	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
Kresylviolett	Merck / Darmstadt
Laminin	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
Leupeptin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
L-Glutamin (100x)	Invitrogen / Carlsbad, USA
Meerrettich-Peroxidase Substrat-Lösung	Biozym / Hessisch Oldendorf
Methanol	Carl Roth / Karlsruhe
Methylacetat	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
MEM	Invitrogen / Carlsbad, USA
MgCl ₂ (50mM)	Invitrogen / Carlsbad, USA
Milchpulver	Carl Roth / Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega / Madison, USA

N2-Supplement	Invitrogen / Carlsbad, USA
Na ₂ HPO ₄	Merck / Darmstadt
NaCl	Carl Roth / Karlsruhe
Natriumazid	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
Natriumfluorid (1M)	Applichem / Darmstadt
Natriumorthovanadat	Applichem / Darmstadt
Normales Serum	Vector / Berlingame, USA
O.C.T. Compound Einbettmedium	Sakura / Torrance, CA
Oligo(dT)15-Primer	Promega / Madison, USA
Papain	Worthington / Lakewood, USA
Paraffin Paraplast Plus	McCormick / Richmond, USA
PCR Nucleotide Mix	Promega / Madison, USA
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories / Pasching, Österreich
Pepstatin (1 mg/ml)	Applichem / Darmstadt
Paraformaldehyd	Carl Roth / Karlsruhe
PMSF	Applichem / Darmstadt
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
Poly-Mount	Polysciences / Warrington, USA
Precision Plus Protein Standard	BioRad / Hercules, USA
Primer	Operon / Köln
Proteinase K (20 µg/ml)	Qiagen / Hilden
rRNasin	Promega / Madison, USA
RotiQuant Bradford-Reagenz	Carl Roth / Karlsruhe
SAHA	Cayman Chemical Company / Michigan, USA
SDS	Carl Roth / Karlsruhe
Sirtinol	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
Stop Solution	Promega / Madison, USA
Sucrose	Carl Roth / Karlsruhe
SYBR Green	Invitrogen / Carlsbad, USA
Triiodthyronin T ₃	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
TEMED	Carl Roth / Karlsruhe
Tris	Carl Roth / Karlsruhe
Triton-X 100	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
TRIzol	Invitrogen / Carlsbad, USA
Trypsin-EDTA (0,05%)	Invitrogen / Carlsbad, USA
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
Tween-20	Carl Roth / Karlsruhe
Xylol	Carl Roth / Karlsruhe

2.1.3 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Differenzierungsmedium für Neurosphären:

375 ml DMEM High Glucose
125 ml Hams F12
2% B27-Supplement
1x Penicillin / Streptomycin

Nährmedium für primäre embryonale Mausfibroblasten:

500 ml DMEM High Glucose
1x Antibiotika / Antimykotika
1% L-Glutamin
10% FCS

Proliferationsmedium für Neurosphären:

375 ml DMEM High Glucose
125 ml Hams F12
2% B27-Supplement
20 ng/ml EGF in DPBS (mit 0,1% BSA und 1 mM DTT)
20 ng/ml FGF in DPBS (mit 0,1% BSA und 1 mM DTT)
1x Penicillin / Streptomycin

2.1.4 Puffer und Lösungen

Lyselösung für die Isolation von neuronalen Vorläuferzellen

MEM
2% Papain
1% DNase I

Lysepuffer für die Proteinanalyse:

1% Triton-X 100
0,32 M Succrose
5 mM EDTA pH 8,0
10 mM Tris/HCl pH 8,0

1x PBS pH 7,4

0,9 mM CaCl₂
0,5 mM MgCl₂
2,7 mM KCl
1,5 mM KH₂PO₄
137,9 mM NaCl
8,1 mM Na₂HPO₄

4% PFA-Lösung

4% Paraformaldehyd
0,02 M Na₂HPO₄ pH 7,0
5% Succrose

6x SDS-Auftragspuffer

0,35 M Tris/HCl pH 6,8
10% SDS
33% Glycerin
0,6 M DTT
0,01% Bromphenolblau

1x TAE

40 mM Tris
20 mM Acetat
1 mM EDTA

1x TBS pH 7,6

50 mM Tris
150 mM NaCl

1x TE

10 mM Tris/HCl pH 8,0
1 mM EDTA

1x Transferpuffer

50 mM Tris
40 mM Glycin
0,037% SDS
20% Methanol

1x Tris-Glycin-Puffer (Laemmli-Puffer)

0,2 M Glycin
0,02 M Tris
0,1% SDS

Trypsin-Inhibitor-Lösung für die Isolation von neuronalen Vorläuferzellen

DMEM
1% Trypsin-Inhibitor (1 mg/ml)
0,5% BSA (50 µg/ml)
1% DNase I

2.1.5 Primersequenzen

CSB 4	5'-GCT GCT TAT AAT AAT CCT CAT CTC C -3'
CSB 5	5'-ATC TGC GTG TTC GAA TTC GCC AAT G -3'
CSB 6	5'-GTC TTC TGA TGA CGT TAG CTA TGA G -3'
GLUT-1 vw	5'-TAG ACT CCA TCA TGG GCA AT-3'
GLUT-1 rw	5'-TTT CAT CTC CTG CAG GTC TC-3'
HMOX1 vw	5'-AGC ACA GGG TGA CAG AAG AG -3'
HMOX1 rw	5'-TAA ATT CCC ACT GCC ACT GT-3'
p300 vw	5'-CGA CAA AAT CAC CCT GAA TC-3'
p300 rw	5'-TTT CTT CAA AGG CAA ACA GG-3'
RPS6 vw	5'-ATT CCT GGA CTG ACA GAC AC-3'
RPS6 rw	5'-GTT CTT CTT AGT GCG TTG CT-3'
VEGF vw	5'-CAG ATG TGA ATG CAG ACC AA-3'
VEGF rw	5'-CAC ATC TGC AAG TAC GTT CG-3'

2.1.6 Antikörper und Färbelösungen

Primärantikörper:

<i>Antigen</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Hersteller</i>
Aktivierte				
Caspase-3	Kaninchen	1:250	IHC	Cell Signaling / Danvers, USA
α -Tubulin	Maus	1:10.000	WB	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
β -Actin	Maus	1: 10.000	WB	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
β (III)-Tubulin	Maus	1:100	ICC	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
BrdU	Kaninchen	1:100	ELISA	Roche / Basel, Schweiz
Calbindin	Kaninchen	1:500	IHC	Swant / Marly, Schweiz
Calbindin	Maus	1:500	IHC	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
CD31	Ratte	1:100	IHC	Abcam / Cambridge, UK
GFAP	Kaninchen	1:250	IHC	Sigma-Aldrich / St. Louis, USA
HIF-1 α	Kaninchen	1:2.000	WB	Bethyl / Montgomery, USA
MBP	Ratte	1:100	IHC	Merck Millipore / Billerica, USA
NeuN	Maus	1:100	IHC	Merck Millipore / Billerica, USA
O4	Maus	1:100	ICC	Merck Millipore / Billerica, USA
p300	Kaninchen	1:200	WB	Santa Cruz / Santa Cruz, USA
p300	Maus	1:50	IHC	Abcam / Cambridge, UK
S100B	Kaninchen	1:100	IHC	Swant / Marly, Schweiz

Sekundärantikörper:

<i>Bezeichnung</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Markierung</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-Maus	Kaninchen	1:5.000	Peroxidase	GE Healthcare / Chalfont St Giles, UK
Anti-Maus	Pferd	1:200	Biotin	Vector / Berlingame, USA
Anti-Maus	Ziege	1:100	AF 488	Invitrogen / Carlsbad, USA
Anti-Maus	Ziege	1:250	AF 546	Invitrogen / Carlsbad, USA
Anti-Maus	Ziege	1:1.000	AF 555	Invitrogen / Carlsbad, USA
Anti-Kaninchen	Schwein	1:5.000	Peroxidase	GE Healthcare / Chalfont St Giles, UK
Anti-Kaninchen	Ziege	1:1.000	AF 488	Invitrogen / Carlsbad, USA
Anti-Kaninchen	Ziege	1:1.000	AF 555	Invitrogen / Carlsbad, USA
Anti-Kaninchen	Ziege	1:200	Biotin	Vector / Berlingame, USA
Anti-Ratte	Ziege	1:1.000	AF 488	Invitrogen / Carlsbad, USA
Anti-Ratte	Ziege	1:200	AF 594	Invitrogen / Carlsbad, USA

2.1.7 Zubehör

Bezeichnung		Hersteller / Firmensitz
8-Kammer-Objektträger		BD Biosciences / Franklin Lakes, USA
24er Zellkulturplatte		TPP / Trasadingen, Schweiz
96er Zellkulturplatte		TPP / Trasadingen, Schweiz
Biosphere Filter Spitzen	(1-1.000 µl)	Sarstedt / Nümbrecht
Kryomold		Sakura / Torrance, USA
Erlenmeyerkolben		Schott / Mainz
Filterpapier		Whatman / Springfield Mill, UK
Glasflaschen		Schott / Mainz
Injektionskanüle	25 G	Braun / Melsungen
Mikroliterpipetten Research	(1-1.000 µl)	Eppendorf / Hamburg
Neubauer-Zählkammer		Brand / Wertheim
Nitrozellulose-Membran		Whatman / Springfield Mill, UK
Petrischale	100 mm	Greiner Bio One / Frickenhausen
Pipettenspitzen ohne Filter	(1-1.000 µl)	Sarstedt / Nümbrecht
Pipettierhilfe Pipetus		Hirschmann / Eberstadt
Plastikküvette		Sarstedt / Nümbrecht
Reaktionsgefäße	(0,5-2,0 ml)	Eppendorf / Hamburg
Realtime-PCR-Platte		Thermo Fischer Scientific / Schwerte
Skalpell		Braun / Melsungen
Ssniff Futtermittel		Ssniff Spezialdiäten / Soest
Superfrost Ultra Plus Objektträger		Thermo Fischer Scientific / Schwerte
UV-Küvette mikro		Brand / Wertheim
Zellkulturflasche Cellstar	T75	Greiner Bio One / Frickenhausen
Zellkulturflasche Cellstar	T175	Greiner Bio One / Frickenhausen
Zellsieb		BD Biosciences / Franklin Lakes, USA
Zentrifugierröhrchen	15 ml	TPP / Trasadingen, Schweiz
Zentrifugierröhrchen	50 ml	TPP / Trasadingen, Schweiz

2.1.8 Geräte

Bezeichnung	Hersteller / Firmensitz
Analysenwaage CP124S	Sartorius / Göttingen
Blottingapparatur	Biometra / Göttingen
Elektrophoresekammer	BioRad / Hercules, USA
FluorChem 8900	Biozym / Hessisch Oldendorf

Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss / Jena
Gefrierschrank -20°C	Liebherr / Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C Hera Freeze	Thermo Fischer Scientific / Schwerte
Gelkammer für SDS-PAGE	BioRad / Hercules, USA
Hybridisierungssofen	Stuart Scientific / Staffordshire, UK
Inkubator Hera Cell 150 (für Hypoxie)	Thermo Fischer Scientific / Schwerte
Inkubator Hera Cell 240	Thermo Fischer Scientific / Schwerte
Kryotom CM3050 S	Leica / Wetzlar
Kühlschrank +4°C	Liebherr / Bulle, Schweiz
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss / Jena
McIlwain Gewebeschnaider	Mickle / Surrey, UK
Netzgerät für Elektrophorese E835	Consort / Turnhout, Belgien
Netzgerät für SDS-PAGE EV202	Peqlab / Erlangen
Photometer Bio	Eppendorf / Hamburg
Plattenlesegerät Infinite M200 Pro	Tecan / Männedorf, Schweiz
Realtime-PCR System iQ5	BioRad / Hercules, USA
Schlittenmikrotom HM 400	Thermo Fischer Scientific / Schwerte
Sterilbank Hera Safe	Thermo Fischer Scientific / Schwerte
Thermocycler TGradient	Biometra / Göttingen
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf / Hamburg
TissueLyser II	Qiagen / Hilden
Wasserbad	Memmert / Schwabach
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Thermo Fischer Scientific / Schwerte

2.1.9 Computersoftware

Programm	Verwendung
AlphaView SA	Fluoreszenz- und Chemilumineszenz-Detektion, Densitometrische Auswertungen
AxioVision	Mikroskopische Bildanalyse
BioRad iQ5	Realtime-PCR-Datenauswertung
GraphPad Prism	Statistische Auswertungen
Image J	Bildbearbeitung
Metamorph	Mikroskopische Bildanalyse

2.2 Tierhaltung

Die C57BL/6 Mäuse wurden unter standardisierten Haltungsbedingungen gezüchtet. (12 h Hell-Dunkel-Zyklus, Raumtemperatur: 20-24°C, 70% Luftfeuchtigkeit). Futterpellets und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Die Tiere wurden einmal wöchentlich am selben Wochentag in saubere Käfige umgesetzt. Nach der Geburt blieben die Nachkommen 4-5 Wochen bei der Mutter und wurden anschließend mit gleichgeschlechtlichen und gleichaltrigen Tieren gehalten.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Isolation von primären embryonalen Mausfibroblasten

Für die Isolation von primären embryonalen Mausfibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts* / MEFs) wurden trächtige Mäuse an Tag 15 der Embryonalentwicklung durch Begasung mit hochprozentigem CO₂ und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Der gesamte Uterus wurde entnommen, in DPBS gewaschen und die Embryonen von ihrer Plazenta und den übrigen Gewebeteilen befreit. Nach dem Abspülen von Blutresten mit DPBS und dem Entfernen von Kopf und Leber wurde jeder Embryo in einem geringen Volumen DPBS mit dem Skalpell mechanisch zerkleinert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 3 ml 0,05% Trypsin-EDTA wurde das Gewebe für 15 min bei 37°C aufgeschlossen. Die enzymatische Reaktion wurde mit 10 ml Nährmedium (siehe 2.1.3) blockiert und das angedaute Gewebe durch ein Zellsieb (Porengröße 100 µm) filtriert. Die gereinigte Zellsuspension wurde bei 1.000 U/min für 5 min pelletiert, in 10 ml Nährmedium aufgenommen und in Nährmedium in T75 Zellkulturflaschen angezogen. Die Zellen wurden passagiert, sobald sie in einem konfluenten Monolayer gewachsen waren. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und durch Inkubation mit 0,05% Trypsin-EDTA bei 37°C für 5 min vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Durch Zugabe von 10 ml Serum-haltigem Nährmedium wurde die Trypsin-Aktivität blockiert und die abgelösten Zellen bei 1.000 U/min für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml Nährmedium aufgenommen und die Zellen in T175 Zellkulturflaschen ausgesät. Nach Passage 1 wurden die Zellen wie oben beschrieben von der Zellkulturflasche abgelöst und in Nährmedium + 10% DMSO bei -80°C eingefroren, um später in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert zu werden.

2.3.2 Kultivierung von primären embryonalen Mausfibroblasten

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten MEFs wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, sofort in 30 ml Nährmedium (siehe 2.1.3) aufgenommen und bei 1.000 U/min für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml Nährmedium aufgenommen und die Zellen in T175 Zellkulturflaschen ausgesät. Sobald sie in einem konfluenten Monolayer gewachsen waren, wurden sie mit DPBS gewaschen und wie unter 2.3.1 beschrieben vom Zellboden abgelöst. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und die MEFs auf eine Konzentration von $0,6-1 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden zu jeweils 8 ml auf Petrischalen (100 mm Durchmesser) ausgesät und im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.3.2 Hypoxie-Experimente in primären embryonalen Mausfibroblasten

Um die Protein-Expression von HIF-1 α in MEFs zu untersuchen wurden die Zellen für mehrere Stunden (4h, 7h und 24h) bei einer Sauerstoffkonzentration von 1% O₂ inkubiert. Zudem wurde die Auswirkung verschiedener Inhibitoren auf die Stabilisierung von HIF-1 α analysiert. Hierfür erfolgte die Inhibierung des Proteasoms mit 8 μ M β -Lacton, auch bekannt als clasto-Lactacystin (Dick *et al.*, 1996), welches in Methylacetat gelöst den Zellen verabreicht wurde. Die Inhibierung von Histondeacetylasen (HDACs) erfolgte mit 100 bzw. 200 nM SAHA (Suberoylanilid-Hydroxaminsäure) (Richon *et al.*, 1998), welches in DMSO gelöst wurde. Um die Stabilität von HIF-1 α zu gewährleisten, wurden die Zellen direkt aus dem Inkubator auf Eis gestellt und in kaltem DPBS mit einem Zellschaber von der Petrischale gelöst und bei 1200 U/min für 5 min bei 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 80 μ l Lysepuffer (siehe 2.1.4) unter Zugabe von Protease-Inhibitoren (1‰ Leupeptin, 1‰ Pepstatin, 1‰ Aprotinin, 1% PMSF), Protein-Phosphatase-Inhibitoren (5% Natriumfluorid, 1% Natriumorthovanadat) und dem Reduktionsmittel DTT (1%) aufgenommen und 15 min auf Eis lysiert. Durch 15 min Zentrifugation bei 14.000 U/min und 4°C wurde das Proteinlysate von Zelltrümmern befreit und konnte für die Analyse der Protein-Expression mittels Western Blot eingesetzt werden.

2.3.3 Isolation von neuronalen Vorläuferzellen

Für die Generierung von murinen Neurosphären wurden zuerst neurale Vorläuferzellen aus dem Kleinhirn von 3 Tage alten Mäusen isoliert. Hierfür wurden die Jungtiere per Dekapitation getötet, die abgetrennten Köpfe in DPBS transferiert, das Gehirn ausgelöst und in MEM Medium überführt. Groß- und Kleinhirn wurden voneinander getrennt, von Meningen und Blutgefäßen vollständig befreit und das Kleinhirn in 2 ml MEM

aufgenommen. Das Gewebe wurde durch Zugabe von 1 ml Lyselösung (siehe 2.1.4) 30 min bei 37°C verdaut und im Anschluss 1 ml des Überstandes entfernt. Das Gewebe wurde in der verbleibenden Lösung homogenisiert und die Lysereaktion mit 1 ml Trypsin-Inhibitor-Lösung (siehe 2.1.4) gestoppt. Die Zellen wurden 5 min bei 2.500 U/min abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml Proliferationsmedium (siehe 2.1.3) aufgenommen und die Zellen mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in einer Petrischale (Durchmesser 100 mm) mit 20 ml Proliferationsmedium ausplattiert. Die Zellen wurden bei 37°C und 7,5% CO₂ kultiviert.

2.3.4 Kultivierung von Neurosphären

Aus den isolierten neuralen Vorläuferzellen bilden sich frei-schwimmende dreidimensionale Strukturen, die sogenannten Neurosphären. Die Sphären wurden alle zwei Tage mit Proliferationsmedium (siehe 2.1.3) 1:2 gefüttert. Um das Wachstum und das Überleben der Neurosphären zu steigern, wurden die Sphären nach 2 Wochen mit dem McIlwain Gewebeschnaider wöchentlich auf eine Breite von 250 µm zerkleinert, um ihre Proliferationsrate zu steigern.

2.3.5 Bestimmung der Proliferation von Neurosphären mittels BrdU-Assay

Die Proliferation von Neurosphären kann indirekt durch die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt werden. Diese wird beim BrdU-Assay durch die Quantifizierung der DNS-Synthese ermittelt. Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidinanalogon, das spezifisch während der DNS-Synthese in die DNS eingebaut wird. Durch einen Antikörper gegen BrdU können dann Zellen identifiziert werden, in deren DNS BrdU eingebaut wurde.

Für die Bestimmung der Proliferation von Neurosphären mittels BrdU-Einbau wurden pro Tier je 4 Sphären einzeln in die Vertiefungen einer 96er Zellkulturplatte in 100 µl Proliferationsmedium (siehe 2.1.3) gesetzt. Als Negativkontrolle wurde Proliferationsmedium ohne Sphären ausplattiert. Die Sphären wurden für ca. drei Tage bei 37°C und 7,5% CO₂ unter 21% O₂ bzw. 1% O₂ inkubiert. Nach 48 h wurden 10 µl BrdU Markierungslösung, bestehend aus BrdU Reagenz 1:100 in Proliferationsmedium ohne Wachstumsfaktoren, zugegeben und die Sphären weitere 16 h inkubiert. Danach wurden sie einzeln in 25 µl Accutase in einer 96er Zellkulturplatte pipettiert und 10 min bei 37°C inkubiert. Dadurch wurden die Zellverbände aufgelöst und eine Einzelzellsuspension durch Resuspendieren hergestellt. Um die Zellen zu trocknen, wurde die Accutase mit heißer Luft aus einem Haarfön entfernt. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit 200 µl FixDenat Lösung fixiert und die genomische DNS für die Detektion des eingebauten BrdU denaturiert. Nach Entfernung der Fixierungslösung wurden die Zellen in 100 µl des Peroxidase-konjugierten Anti-BrdU Antikörpers (1:100 verdünnt) 1 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit

je 200 μl BrdU Waschlösung gewaschen und 100 μl der BrdU Substratlösung (Substratkomponente B 1:100 A) 5 min zugegeben. Bei dem Substrat handelte es sich um Luminol mit dem Signalverstärker 4-Iodophenol, welches in oxidierter Form leuchtet. Das Chemilumineszenzsignal wurde am Plattenlesegerät Infinite M200 Pro dokumentiert.

2.3.6 Bestimmung der Migration von Neurosphären

Für die Migration von Neurosphären sind der Entzug von Wachstumsfaktoren und eine Proteinmatrix erforderlich, an der die Sphären anheften können. Hierzu wurden 8-Kammer-Objektträger mit Poly-D-Lysin (1 mg/ml in dH_2O) bedeckt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Oberfläche wurde mit dH_2O gewaschen und mit Laminin-Lösung (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in dH_2O) erneut 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit dH_2O gewaschen und jeweils fünf Sphären in 500 μl Differenzierungsmedium (siehe 2.1.3) in je eine Kammer verteilt. Damit die Sphären unbegrenzt migrieren können, wurde ein ausreichender Abstand zum Rand der Kammer und den anderen Sphären eingehalten. Die Kultivierung der Zellen fand bei 37°C , 7,5% CO_2 und 21% O_2 bzw. 1% O_2 statt. Nach 48 h wurde der Migrationsradius der ausgewanderten Zellen unter dem Mikroskop dokumentiert und je vier radiale Migrationsdistanzen pro Sphäre bestimmt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolation von DNS aus Ohr- und Schwanzbiopsien

Für die Genotypisierung der Tiere wurden entweder Schwanzspitzen oder das Gewebe aus den Ohrstanzen verwendet und daraus DNS mittels des DirectPCR-Tail Lysereagens isoliert. Dazu wurde das Gewebe in 100 μl des Lysereagens mit 1 μl Proteinase K (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) über Nacht bei 55°C lysiert und anschließend die Proteinase K-Aktivität für 45 min bei 85°C inaktiviert. Die in dem gewonnenen Lysat gelöste DNS wurde direkt in die Genotypisierungs-PCR eingesetzt.

2.4.2 Genotypisierung

Für die Amplifikation der DNS aus dem Maus-Gewebe wurden sequenzspezifische Primer benutzt, die je nach Genotyp unterschiedlich große Fragmente amplifizieren. Einer der drei Primer (CSB 6) bindet an eine Sequenz im CSB Gen, die sowohl im Wildtyp, als auch im

Knockout existiert. In Kombination mit einem zweiten Primer (CSB 5) amplifiziert er im CSB-defizienten Allel ein Fragment von 490 bp. Dieser zweite Primer ist homolog zu einer Sequenz innerhalb des transfizierten Konstrukts, das nur im Knockout vorhanden ist. Ein dritter Primer (CSB 4) hingegen ist homolog zu einer Sequenz im CSB Locus, die bei der Generation der CSB-defizienten Mäuse durch den Einbau des Insert zerstört wurde und deren Sequenzabfolge folglich nur im Wildtyp-Allel existiert. Das von diesem Primer amplifizierte Fragment hat eine Größe von 195 bp.

Für die Amplifikation der DNS wurde folgender Ansatz erstellt:

dH ₂ O	12,5 µl
GoTaq Reaktionspuffer (5x)	5,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,5 µl
PCR Nucleotide Mix (je 10 mM)	0,5 µl
Primer CSB 4 (10 µM)	2,0 µl
Primer CSB 5 (10 µM)	1,0 µl
Primer CSB 6 (10 µM)	2,0 µl
GoTaq Polymerase	0,5 µl
DNS	1,0 µl

Die Amplifikation von DNS gliedert sich stets in drei Schritte:

1. Hitze-Denaturierung der doppelsträngigen DNS, um sie vollständig in ihre Einzelstränge zu zerlegen.
2. Anlagerung der Primer durch Absenkung der Reaktionstemperatur auf ein Level, bei dem sich stabile Doppelstrangbereiche zwischen den Primern und der DNS bilden.
3. Verlängerung der angelagerten Primer durch DNS-Neusynthese. Bei 72°C entwickelt die GoTaq Polymerase ihre größte Aktivität und gewährleistet eine optimale Elongation der Primer.

Die Reaktion fand demnach unter folgenden Bedingungen im Thermocycler statt:

	94°C	5 min	} 40 Zyklen
Denaturierung	94°C	1 min	
Anlagerung	63°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min	
	72°C	5 min	

2.4.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung der amplifizierten DNS-Fragmente im elektrischen Feld um eine qualitative Aussage über ihre Größe treffen zu können. Die Auftrennung erfolgte in einem 1,2%-igen Agarosegel. Dazu wurden 0,3 g Agarose in 25 ml 1x TAE aufgekocht, mit 1,5 µl GelRed (interkaliert in Nukleinsäuren) versetzt und in eine Elektrophoresekammer gegossen. Nach dem Erhärten der Agarose wurde die Kammer mit 1x TAE überschichtet. Die Proben und der DNS-Molekulargewichtsmarker X (0,07 bis 12,2 kbp) wurden in die Geltaschen aufgetragen und bei 65 V aufgetrennt. Anschließend wurden die DNS-Banden mittels UV-Licht detektiert und am FluorChem 8900 dokumentiert.

2.4.4 Isolation von RNS aus dem Gehirn

Die Mäuse wurden in einem Alter von 10 Wochen durch Begasung mit hochprozentigem CO₂ und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurde das Gefäßsystem mit 50 ml DPBS (4°C) mittels einer Injektionskanüle perfundiert. Nach Abtrennung des Kopfes wurde das Schädeldach mit einer kleinen Schere zu beiden Seiten geöffnet, das Gehirn freigelegt und vorsichtig von der Schädelbasis gelöst. Für die RNS-Isolation wurde eine Groß- und eine Kleinhirnhälfte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Isolation bei -80°C gelagert. Gewebestücke wurden in 1 ml TRIzol aufgenommen und mit Hilfe einer Stahlkugel in einem 2 ml Reaktionsgefäß im TissueLyser (27x/sec) für 2 min homogenisiert. Das Homogenisat wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäß umgefüllt, 5 min bei RT inkubiert und nach Zugabe von 200 µl Chloroform kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubation von 3 min bei RT wurden die Proben für 15 min bei 15.000 U/min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltene RNS in 500 µl Isopropanol präzipitiert und für 10 min bei 15.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und 5 min bei 12.000 U/min zentrifugiert. Nach vollständigem Entfernen des Ethanol wurde das Pellet für ca. 10 min getrocknet und die RNS in 20 µl DEPC-H₂O bei 56°C gelöst und bei -80°C gelagert.

2.4.5 Isolation von RNS aus Neurosphären

Ca. 100 Neurosphären (entsprechen ungefähr 1×10^6 Zellen) wurden nach der Hypoxie-Behandlung auf Eis gelagert und in 500 µl TRIzol aufgenommen. Durch Resuspendieren wurden die Sphären voneinander gelöst und eine vollständige Lyse der Zellen gewährleistet. Die anschließende Phenol/Chloroform-Isolation von RNS wurde wie unter 2.4.4 durchgeführt. Das RNS-Pellet wurde in 10 µl DEPC-H₂O bei 56°C gelöst und bei -80°C gelagert

2.4.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNS und RNS

Nukleinsäuren absorbieren aufgrund Ihrer aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen Wellenlängen im UV-Bereich bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm. Im Bereich der Optischen Dichte (OD) von 0,1 bis 1 ist die Extinktion bei 260 nm proportional zur Nukleinsäure-Konzentration. Eine OD von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNS einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg/ml und bei einzelsträngiger RNS von 40 µg/ml. Dem gegenüber liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm, das bedingt ist durch die Absorption aromatischer Seitenketten der Aminosäuren. Aus dem Verhältnis der OD bei 260 nm und 280 nm kann die Reinheit der Nukleinsäurepräparation bestimmt werden. Bei DNS gilt je nach Lösungsmittel ein Wert von 1,8, bei RNS ein Wert von 1,8 bis 2,0 als rein. Niedrigere Werte lassen auf eine Kontamination der Nukleinsäurelösung mit Proteinresten schließen. Zur Berechnung der Konzentration werden folgende Gleichungen genutzt:

$$\text{dsDNS-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{RNS-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Für die Messung wurde jeweils 1 µl der Nukleinsäurelösung mit 99 µl 1x TAE gemischt, in eine UV-Küvette überführt und die Absorption bei 260 nm gemessen.

2.4.7 Herstellung von komplementärer DNS (cDNS)

Die instabile mRNA wurde mittels M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverser Transkriptase in stabile cDNS umgeschrieben. Für die reverse Transkription benötigt das Enzym ein Starteroligonukleotid, von dem aus die cDNS enzymatisch synthetisiert wird. Hierfür wurden Oligo(dT)15-Primer eingesetzt, die sich an den terminalen Poly-A-Schwanz der mRNA anheften und als Startpunkt für die Elongation gelten.

Zunächst wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, bei dem 1 µg isolierter mRNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 1x DNase I Puffer und 1 U DNase in DEPC-H₂O für 30 min bei 37°C von Verunreinigungen mit DNS befreit wurde. Nach Zugabe von 1 µl Stop Solution wurde die enzymatische Reaktion bei 65°C für 10 min beendet. Nach Zugabe von 1 µl Oligo(dT)15-Primer wurde die Oligonukleotid-Anlagerung an den terminalen Poly-A-Schwanz der mRNA bei 60°C für 5 min durchgeführt. Für die eigentliche cDNS-Synthese wurde der Lösung folgender Ansatz zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert:

DEPC-H ₂ O	12,0 µl
First-Strand Buffer (5x)	8,0 µl
PCR Nucleotide Mix (je 10 mM)	4,0 µl
rRNasin	2,0 µl
M-MLV Reverse Transkriptase	2,0 µl

Die Reaktion wurde mit einer Inkubation von 10 min bei 70°C abgeschlossen und die cDNS kurzfristig bei 4°C bzw. langfristig bei -20°C gelagert.

2.4.8 Bestimmung der Genexpression mittels semi-quantitativer Realtime-PCR

Die semi-quantitative Realtime-PCR ist eine Amplifikationsmethode, die eine Quantifizierung der amplifizierten Transkripte nach jedem Amplifikationszyklus in Echtzeit ermöglicht. Dies erfolgt durch den Einsatz eines Fluoreszenz-Farbstoffes (SYBR Green), der in doppelsträngige DNS interkaliert und dessen Signal somit proportional zur Menge an amplifizierter DNS steigt. Durch eine anschließende Schmelzkurvenanalyse kann die Länge des amplifizierten DNS-Fragments überprüft werden und somit die Spezifität der PCR nachgewiesen werden. Dabei wird die Temperatur langsam und kontinuierlich erhöht. Bei einer für das amplifizierte Fragment spezifischen Schmelztemperatur wird dessen Doppelstrang aufgetrennt und der gesamte Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt, was in einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenz sichtbar wird.

Für die Realtime-PCR wurde folgender Ansatz erstellt:

DEPC-H ₂ O	9,00 µl
SYBR Green	12,50 µl
Primer vorwärts (10 µM)	1,25 µl
Primer rückwärts (10 µM)	1,25 µl
cDNS (siehe 2.4.7)	1,00 µl

Die Reaktion fand unter folgenden Bedingungen im Realtime-PCR System iQ5 statt:

Denaturierung	94°C	20 sec	} 40 Zyklen
Anlagerung	56°C	20 sec	
Elongation	72°C	30 sec	

Für die Schmelzkurvenanalyse wurde ausgehend von einer Temperatur von 56°C ein Temperaturanstieg von jeweils 0,5°C alle 10 sec bis zu einer Endtemperatur von 95°C durchgeführt.

Als interne Kontrolle für die Normierung wurde das Gen des ribosomalen Proteins S6 (RPS6) verwendet, das unabhängig von Behandlung und genetischem Hintergrund der Proben immer annähernd gleich exprimiert wird. Für die Auswertung der Genexpression wurde zunächst der Ct-Wert (*cycle threshold*) bestimmt, welcher eine theoretische Größe darstellt, bei der das durch Amplifikation entstandene Fluoreszenzsignal erstmalig den Schwellenwert der Hintergrund-Fluoreszenz überschreitet. Dieser Teil der Amplifikationskurve soll im

exponentiellen Bereich liegen, was einer optimalen Amplifikationseffizienz entspricht. Je früher dieser Schwellenwert überschritten wird, desto größer ist die Ausgangsmenge eines bestimmten Transkripts vor der Amplifikation.

Für die Berechnung der Genexpression eines bestimmten Gens X wurde folgende Formel herangezogen:

$$\begin{aligned} & \text{Relative Genexpression des Gens X von Probe A bezogen auf Probe B} \\ & = 2^{-\{[\text{Ct}(\text{Gen X, A}) - \text{Ct}(\text{RPS6, A})] - [\text{Ct}(\text{Gen X, B}) - \text{Ct}(\text{RPS6, B})]\}} \end{aligned}$$

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Gewebelyse

Für die Gewebelyse zur Gewinnung von zytosolischem Protein wurde Hirngewebe verwendet, das wie unter 2.4.4 präpariert und kryokonserviert wurde. Circa 30 mg des Groß- bzw. Kleinhirns wurden in 200 µl Lysepuffer (siehe 2.1.4) unter Zugabe von Protease-Inhibitoren (1‰ Leupeptin, 1‰ Pepstatin, 1‰ Aprotinin, 1% PMSF), Protein-Phosphatase-Inhibitoren (5% Natriumfluorid, 1% Natriumorthovanadat) und dem Reduktionsmittel DTT (1%) homogenisiert. Hierzu wurde das Gewebe mit einer Stahlkugel im TissueLyser für 2 min bei einer Frequenz von 27/sec aufgeschlossen. Die Lyse fand für 15 min auf Eis statt. Unlösliche Bestandteile wurden für 10 min bei 4°C mit 14.000 U/min abzentrifugiert, die im Überstand gelösten Proteine abgenommen und bei -80°C gelagert.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Durch Bindung des Farbstoffes Coomassie-Blau an basische Aminosäuren wird er von einem kationischen (rot) in einen anionischen (blau) Zustand versetzt und absorbiert UV-Licht bei einer Wellenlänge von 595 nm. Diese Absorptionsänderung ist proportional zur Proteinkonzentration und wird daher zu deren photometrischen Bestimmung verwendet. Hierfür wurden 799 µl dH₂O mit 1 µl Proteinlysat und 200 µl RotiQuant Bradford-Reagenz in einer Plastikkuvette 5 min bei RT inkubiert und die Absorption anschließend bei 595 nm gemessen. Zur Bestimmung der Konzentration wurden die Absorptionsmessungen auf eine Eichgerade mit BSA bezogen.

2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vor der Analyse der Proteine muss ihre Sekundär- und Tertiärstruktur durch Hitze-Denaturierung aufgebrochen und Disulfidbrücken mit Reduktionsmitteln gespalten werden. Die Auftrennung der Proteine in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgt nach ihrem Molekulargewicht, welches umgekehrt proportional zu ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld ist. Das anionische Tensid SDS überdeckt dabei die Eigenladung der Proteine und verleiht ihnen eine konstante negative Ladung, aufgrund derer sie nach Anlegen einer elektronischen Spannung auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden.

Zur Probenvorbereitung wurden 20 µg Protein mit 6x SDS-Auftragspuffer (siehe 2.1.4) versetzt und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die denaturierten Proteine und ein Protein-Größenmarker (Precision Plus Protein Standard) wurden auf ein 6-15%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und in 1x Tris-Glycin-Puffer bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel konzentriert und bei 120 V im Trenngel aufgetrennt (Laemmli, 1970). Zur einfacheren Darstellung wird im Folgenden die Zusammensetzung eines 12%-igen SDS-Polyacrylamidgels beschrieben:

Trenngel:	1,7 ml	dH ₂ O
	2,0 ml	30% Acrylamid
	1,3 ml	1,5 M Tris (pH 8,8)
	0,05 ml	10% SDS
	0,05 ml	10% APS
	0,002 ml	TEMED
Sammelgel:	0,68 ml	dH ₂ O
	0,17 ml	30% Acrylamid
	0,13 ml	1,5 M Tris (pH 6,8)
	0,01 ml	10% SDS
	0,01 ml	10% APS
	0,001 ml	TEMED

2.5.4 Western Blot Analyse

Um spezifische Proteine mittels Immunreaktion nachweisen zu können, müssen sie nach ihrer Auftrennung im Gel auf eine Membran transferiert werden. Dies erfolgte im Semi-Dry-Blot-Verfahren, bei dem die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen wurden. Hierfür wurde das auf der Membran liegende Gel von je drei Schichten in Transferpuffer (siehe 2.1.4) getränktem Whatman-Filterpapier in einer Blottingapparatur eingefasst und eine Stromstärke von 100 mA pro Gel für 1,5 h angelegt. Anschließend wurden unspezifische Bindestellen mit 5% Milchpulver bzw. 5% BSA in 1x TBS-T (+0,1% Tween-20) 1 h bei RT geblockt. Die

Membran wurde mit dem in 1x TBS-T verdünnten primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBS-T wurde sie mit dem entsprechend in 1x TBS-T verdünnten Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde sie erneut dreimal mit 1x TBS-T gewaschen und die Meerrettich-Peroxidase Substrat-Lösung nach Zusammenfügen der beiden Substrat-Komponenten für 5 min aufgetragen. Die Detektion des Chemilumineszenz-Signals wurde am FluorChem 8900 dokumentiert. Zur Normalisierung der untersuchten Proteinbanden wurden α -Tubulin und β -Actin auf derselben Membran nachgewiesen.

2.6 Immunhisto- und zytochemische Methoden

2.6.1 Immunhistochemische Analysen von Paraffinschnitten

Für die Anfertigung von Paraffinschnitten des Gehirns wurden die Tiere nach ihrer Tötung mit einer 4%-igen PFA-Lösung (siehe 2.1.4) perfundiert und das entnommene Gehirn darin fixiert. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Überführung in Xylol wurde das Gewebe entwässert und in flüssigem Paraffin eingebettet. Von den Wachsblöcken wurden mit dem Schlittenmikrotom 3 μ m dicke Schnitte angefertigt, auf Superfrost Ultra Plus Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 40°C im Hybridisierungsöfen getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol entparaffinisiert, in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70% Ethanol) rehydriert und in dH₂O gewaschen. Nach der Rehydrierung des Gewebes wurde eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte für 20 min im kochenden Wasserbad in 1x TE erwärmt, um die durch die Formalinfixierung verursachten Proteinvernetzungen wieder aufzuheben und ein Erkennen der Epitope durch den Antikörper wieder zu ermöglichen. Nach Waschen mit 1x PBS wurden die Schnitte mit 1% normalem Serum (Spezies des zweiten Antikörpers) in 1x PBS für 20 min bei RT geblockt um ein unspezifisches Binden des Antikörpers zu verhindern. Anschließend wurde der erste Antikörper in 1x PBS + 0,1% BSA verdünnt und die Schnitte damit über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Negativkontrolle wurde 1x PBS + 0,1% BSA aufgetragen. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte mit 1x PBS gewaschen und mit dem Biotin-/Meerrettich-Peroxidase-markierten Sekundärantikörper (verdünnt in 1% normalem Serum in 1x PBS) 30 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 1x PBS wurden endogene Peroxidasen durch Inkubation mit 0,6%iger H₂O₂-Lösung in 80% Methanol für 30 min blockiert und die Schnitte erneut mit 1x PBS gewaschen. Die Signaldetektion erfolgte mittels der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC). Hierbei wird durch die starke Affinität von Avidin zu Biotin eine Signalverstärkung erzielt, die auf einen großen Komplex aus Peroxidase-gekoppelten Avidin-Biotin-Bindungen am spezifisch gebundenen Sekundärantikörper zurückzuführen ist. Als Substrat für die Peroxidase wird H₂O₂ zugegeben und in Folge der Reaktion kommt es zur Oxidation der Chromogene 3-

Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu einem roten bzw. braunen Endprodukt. Eine Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Hämatoxylinlösung, bei der sich nach Anheben des pH-Wertes durch Spülen in Leitungswasser die Zellkerne blau färben. Zum Eindecken der Schnitte wurde flüssige Kaiser's Glycerin-Gelatine verwendet. Die Aufnahmen der Färbung erfolgten am Lichtmikroskop.

2.6.2 Immunhistochemische Analysen von Gefrierschnitten

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Tiere nach ihrer Tötung mit 1x PBS perfundiert, das Gehirn entnommen und sagittal geteilt. Je eine Gehirnhälfte wurde mit der Schnittfläche nach unten in O.C.T. Compound Einbettmedium in ein Kryomold eingebettet und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewebe wurde bei -80°C gelagert.

Die Gewebeschnitte wurden am Kryostat bei einer Schnittdicke von 6 µm angefertigt und auf Superfrost Ultra Plus Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden sie 2 h bei RT getrocknet und mit 1x PBS gewaschen. Der primäre Antikörper wurde in 1x PBS verdünnt und die Schnitte über Nacht bei 4° damit inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte in 1x PBS gewaschen und der Sekundärantikörper in 1x PBS verdünnt aufgetragen. Nach einer Inkubation von 2 h bei RT wurden die Schnitte in 1x PBS gewaschen und mit Fluoreszenz-Einbettmedium (inkl. DAPI 1:2.000) eingedeckt. Die Fluoreszenz-Aufnahmen wurden am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

2.6.3 Immunhistochemische Analysen von Vibratomschnitten

Als Vorbereitung für die Anfertigung von Vibratomschnitten wurden die Tiere nach ihrer Tötung mit 1x PBS und anschließend mit 4%-iger PFA-Lösung (siehe 2.1.4) perfundiert. Die Gehirne wurde entnommen und über Nacht bei 4°C in 4%-iger PFA-Lösung nachfixiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Gehirne bis zu ihrer Verwendung über mehrere Tage in 1x PBS unter der Zugabe von 0.04% Natriumazid bei 4°C gelagert.

Die Gehirne wurde sagittal geteilt und mit der Schnittfläche nach unten in erhitzter 4% Agarose/1x PBS in einen Block gegossen. Nach Erkalten der Agarose wurden aus dem Block am Vibratom Schnitte zu je 50 µm Dicke angefertigt. Diese wurden in 1x PBS aufgefangen und jeweils in die mit 1x PBS gefüllten Vertiefungen einer 96er Zellkulturplatte überführt. Von dort wurden sie in eine 24er Zellkulturplatte überführt und für 1 h in je 500 µl 1x PBS + 0,2% Triton-X 100 + 10% normales Ziegen Serum geblockt. Der Primärantikörper wurde in 1x PBS + 0,2% Triton-X 100 + 1% normales Ziegen Serum + Hoechst 33258 (1 µg/ml) verdünnt und über Nacht bei 4°C das Gewebe darin inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal mit 1x PBS gewaschen und der Sekundärantikörper in 1x PBS + 0,2% Triton-X 100 + 1% normales Ziegen Serum verdünnt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte

lichtgeschützt für 1h. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut dreimal mit 1x PBS gewaschen und auf Objektträger aufgezogen. Das Eindecken der Schnitte erfolgte mit Fluoromount. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

2.6.4 Immunzytochemische Analyse von Neurosphären

Nach der Migrationsanalyse der Neurosphären wurden die Zellen mit 4% PFA für 30 min bei 37°C auf dem Objektträger fixiert und im Anschluss mit 1x PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (verdünnt in 1x PBS + normales Ziegen Serum) erfolgte für 30 min bei 37°C. Anschließend wurde mit 1x PBS gewaschen und der sekundäre Antikörper in 1x PBS + 1% Hoechst 33258 verdünnt. Die Inkubation mit diesem erfolgte erneut für 30 min bei 37°C. Im Anschluss wurden die Objektträger mit 1x PBS gewaschen und wässrigem Einbettmedium (Poly-Mount) eingedeckt.

2.7 Statistische Analyse

Die erhobenen Daten wurden als Rohdaten oder nach entsprechender Verrechnung tabellarisch erfasst und mit der Statistiksoftware GraphPad Prism analysiert. Dabei wurden Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) bzw. Standardfehler des Mittelwerts (SEM) ermittelt und graphisch dargestellt. Die Errechnung der statistischen Signifikanz eines Vergleichs zweier Datengruppen erfolgte mit dem Student'schen t-Test. Dabei wurden Zusammenhänge zwischen den Datengruppen als signifikant betrachtet, wenn die maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit des statistischen Tests (p) kleiner als 5% war.

3 Ergebnisse

3.1 Mild ausgeprägter neuropathologischer Phänotyp in CSB-defizienten Mäusen

Zuerst wurde das ausgewählte CSB-defiziente Mausmodell bezüglich seines neuropathologischen Phänotyps untersucht. Da zwei Hauptcharakteristika von CS-Patienten Kleinwuchs und Mikrozephalie sind (Ozdirim *et al.*, 1996), wurden CSB-defiziente SKH-1 Mäuse nach ihrem Körper- und Gehirngewicht im Alter von acht Wochen untersucht. Wie in Abbildung 9 dargestellt, ergab dies eine signifikante Reduktion der Körper- und Gehirnmasse in den CSB-defizienten Mäusen. Im Verlauf der weiteren Untersuchungen wurden ausschließlich C57/BL6 Mäuse verwendet, um einen Effekt des genetischen Hintergrunds der SKH-1 Mäuse auf die Hirnfunktion auszuschließen.

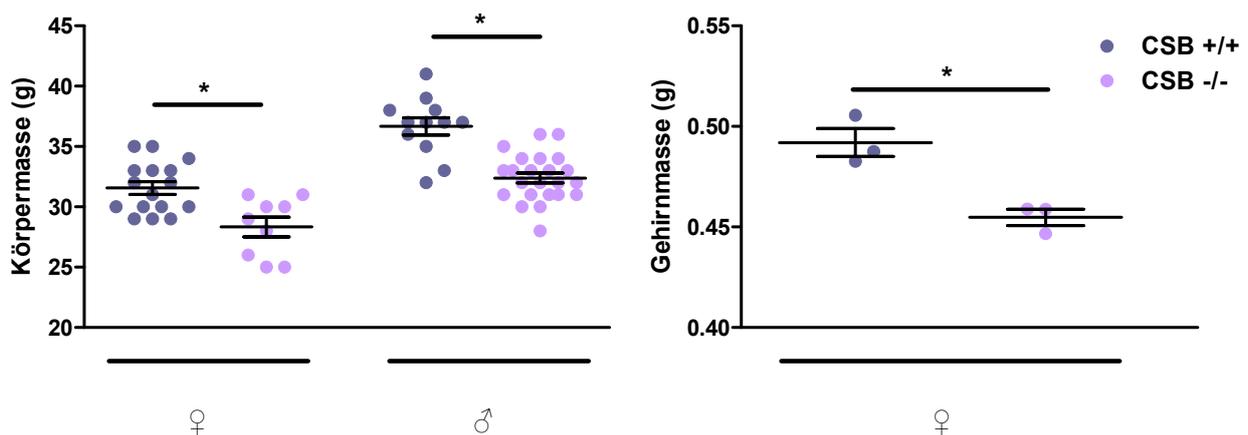


Abbildung 9

Körper- und Gehirnmasse von CSB-pro- und -defizienten SKH-1 Mäusen.

Im Alter von acht Wochen ist das Körpergewicht von weiblichen und männlichen CSB-defizienten Tieren, sowie die Gehirnmasse in weiblichen CSB-defizienten Tieren signifikant reduziert. Dargestellt sind die Einzelwerte und ihr Mittel \pm SEM. * $p < 0,05$ Student'scher t-Test.

Um zu bestimmen, ob die reduzierte Gehirnmasse auf eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen im Gehirn zurückzuführen ist, wurden Gehirne von zehn Wochen alten C57/BL6 Mäusen auf den Marker aktivierte Caspase-3 hin untersucht. Die Effektor-Caspase-3 ist ein klassischer Apoptose-Marker, deren proteolytische Aktivierung eine essentielle Komponente der meisten Apoptose-Signalwege ist (Wilson, 1998). An Paraffinschnitten von je drei Tieren pro Genotyp wurden immunhistochemische Färbungen gegen aktivierte Caspase-3 angefertigt. Die Detektion des Signals erfolgte mit DAB (braun), eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylinlösung (blau). Als Positivkontrolle wurden Schnitte UVB-bestrahlter muriner Haut verwendet. Die Färbung ergab so gut wie keine apoptotischen Zellen

im gesamten Gehirn beider Genotypen zu diesem Zeitpunkt. In Abbildung 10 sind exemplarisch Übersichtsaufnahmen aus der Kleinhirnrinde dargestellt.

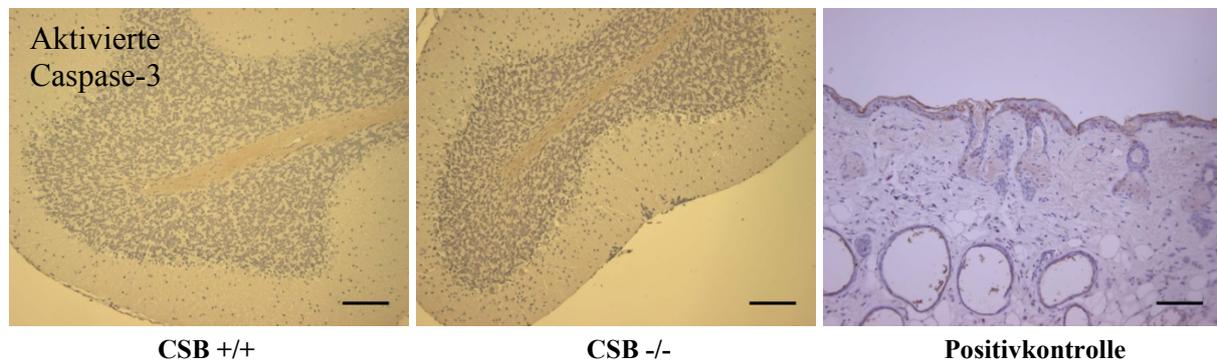


Abbildung 10

Immunhistochemische Färbung von apoptotischen Zellen im Kleinhirn

Die Aufnahmen zeigen keine Hinweise für apoptotische Zellen in den Kleinhirnen beider Genotypen. Von Gehirnen zehn Wochen alter C57/BL6 Mäuse wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit einem Antikörper gegen den Apoptose-Marker aktivierte Caspase-3 gefärbt. Die Darstellung des Signals erfolgte mit DAB (braun), die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylinlösung (blau). Als Positivkontrolle wurden Schnitte UVB-bestrahlter muriner Haut verwendet. Maßstab 100 µm.

Da trotz der reduzierten Gehirnmasse der CSB-defizienten Tiere keine apoptotischen Zellen beobachtet werden konnte, wurden die Gehirne zu einem früheren Zeitpunkt noch während ihrer Entwicklung analysiert. Eine gestörte neuronale Entwicklung könnte ebenfalls die reduzierte Gehirnmasse erklären. Von CS-Patienten ist bekannt, dass neurologische Störungen erstmalig nach der Geburt in den ersten beiden Lebensjahren auftreten (Nance *et al.*, 1992). Daher wurde die Entwicklung des Gehirns in den Mäusen entsprechend zum Zeitpunkt p12 (postnataler Tag 12) untersucht. In CS-Patienten ist das Kleinhirn besonders geschädigt (Soffer *et al.*, 1979). Bei ihnen ist neben einer Atrophie von Purkinje- und Körnerzellen und einer daraus folgenden verstärkten Proliferation von Bergmann Gliazellen in den entstandenen Freiräumen eine gestörte Myelinisierung der cerebellaren weißen Substanz zu beobachten (Weidenheim *et al.*, 2009).

Das Kleinhirn der Mäuse wurde daher nach folgenden Aspekten untersucht: Entwicklung der Purkinjezellen, Ausprägung der Bergmann Gliazellen, Dicke der Körnerzellschichten (innere und äußere) und Expression des Myelin-Basischen Proteins MBP. Purkinjezellen wurden durch das von ihnen exprimierte Kalzium-bindende Protein Calbindin (Bastianelli, 2003) dargestellt. Körnerzellen wurden durch das Neuronen-spezifische Protein NeuN dargestellt, welches nicht von Purkinjezellen exprimiert wird (Mullen *et al.*, 1992). Gliazellen wurden mit Antikörpern gegen das saure Gliafaserprotein GFAP und das für Bergmann Gliazellen spezifische S100B (Hachem *et al.*, 2007) angefärbt. Die Myelinisierung der weißen Substanz wurde durch MBP dargestellt, das häufigste Myelin-Membranprotein (Deber und Reynolds, 1991). Die Färbungen wurden an Vibratomschnitten von Paraffin-fixierten Gehirnen angefertigt und mit Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Die

Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33258. Von jedem Genotyp wurden drei Tiere analysiert.

In Abbildung 11 sind exemplarisch für jeden Genotyp Aufnahmen der Färbungen dargestellt. Wie in Abbildung 11a und c zu erkennen, ergaben die Färbungen keine eindeutigen Hinweise auf eine Atrophie der Purkinje- und Körnerzellschichten in den CSB-defizienten Kleinhirnen zum Zeitpunkt p12. Die Zellkörper und Dendriten der Purkinjezellen waren in der Regel gleichmäßig entwickelt. Einzelne Abweichungen waren nicht Genotyp-spezifisch. Auch die innere und äußere Körnerzellschicht war normal ausgeprägt. In Abbildung 11a und b sieht man, dass die Entwicklung und Verzweigung der Bergmann Gliazellen ebenfalls vergleichbar zwischen den beiden Genotypen war und keine verstärkte Proliferation der Gliazellen beobachtet wurde. Abbildung 11d zeigt Aufnahmen, bei denen die Menge an MBP in beiden Genotypen einigermaßen vergleichbar ist. Die Myelinisierung des Kleinhirns war in den Kleinhirnen mancher CSB-defizienter Tiere reduziert beobachtet, allerdings variierte die Intensität stark zwischen den einzelnen Individuen. Insgesamt konnten also keine offensichtlichen morphologischen Defekte in den Kleinhirnen von CSB-defizienten Mäusen beobachtet werden.

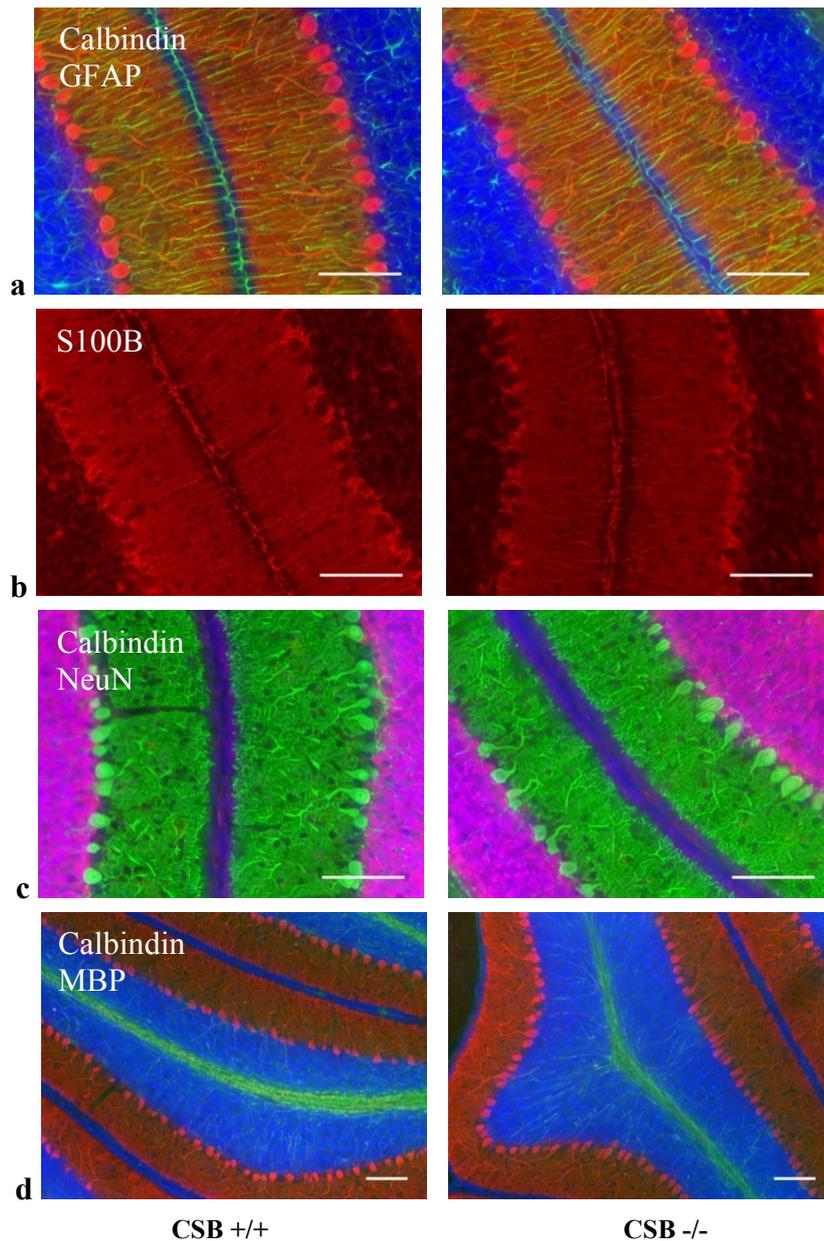


Abbildung 11

Immunhistochemische Analyse der Entwicklung des Kleinhirns zum Zeitpunkt p12

Die Morphologie des Kleinhirns zwölf Tage alter CSB-pro- und -defizienter C57/BL6 Mäuse ist weitestgehend identisch. **a** Darstellung der Molekular- und Körnerzellschicht. Die Zellkörper der Calbindin-exprimierenden Purkinjezellen (rot) und ihre in der Molekularschicht stark verzweigten Dendritenbäume sind in beiden Genotypen relativ gleichmäßig ausgeprägt. Auch die Verteilung der Gliazellen (grün) ist vergleichbar. **b** Die S100B-positiven Bergmann Gliazellen (rot) breiten sich in beiden Genotypen gleichmäßig parallel innerhalb der Molekularschicht aus und umwachsen Zellkörper und Dendriten der Purkinjezellen. Zur besseren Darstellung wurde hier auf eine Gegenfärbung verzichtet. **c** Darstellung der inneren und äußeren Körnerzellschicht mittels NeuN-positiver Neuronen (rot). Die Innere Körnerzellschicht weist ein stärkeres Signal auf, da hier die Neurone eng gedrängt angelagert sind. Die äußere Körnerzellschicht am Ende der Molekularschicht (Calbindin-positiv Purkinjezellen / grün) ist in beiden Genotypen gleich stark ausgebildet, was auf eine vergleichbare Entwicklungsstufe in den beiden Genotypen schließen lässt. **d** Darstellung der Myelinisierung der weißen Substanz durch das Myelin-Basische Protein MBP (grün). Auf den ausgewählten Bildern ist die Myelinisierung im Marklager beider Genotypen vergleichbar. Eine etwas schwächer ausgeprägte Myelinisierung war in einzelnen Individuen zu beobachten. Die Purkinje- und Molekularschicht ist durch Calbindin dargestellt (rot). Die Gegenfärbung aller Kerne erfolgte mit Hoechst 33258 (blau). Maßstab 100 μm .

3.2 Verringerte Anzahl an Blutgefäßen im Cerebellum CSB-defizienter Mäuse

Es wurde gezeigt, dass in CSB-defizienten Fibroblasten die Transkription von Hypoxie-induzierten Genen gestört ist (Filippi *et al.*, 2008). Da eine transkriptionelle Anpassung an die generell geringen Sauerstoffkonzentrationen im Gehirn ein für die neuronale Entwicklung essentieller Mechanismus ist, wurde vermutet, dass eine gestörte Hypoxie-induzierte Transkription in den CSB-defizienten Mäusen die Verhaltensauffälligkeiten erklären könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Genexpression des HIF-1-induzierten Gens VEGF (Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) in den Kleinhirnen von je drei CSB-pro bzw. -defizienten C57/BL6 Mäusen im Alter von zehn Wochen verglichen. VEGF ist für die Vaskulogenese (Gefäßneubildung) und Angiogenese (Stabilisierung bereits gebildeter Gefäße) verantwortlich (Neufeld *et al.*, 1999). Dazu wurde den Tieren das Gehirn entnommen und aus dem Kleinhirn RNS isoliert. Die Genexpression wurde mittels semi-quantitativer Realtime-PCR bestimmt. Als nicht-reguliertes, konstitutiv exprimiertes Haushaltsgen wurde das ribosomale Protein S6 (RPS6) verwendet. Wie in Abbildung 12 gezeigt, ist die Expression von VEGF auf mRNA-Ebene in den CSB-defizienten Kleinhirnen signifikant um 30% reduziert.

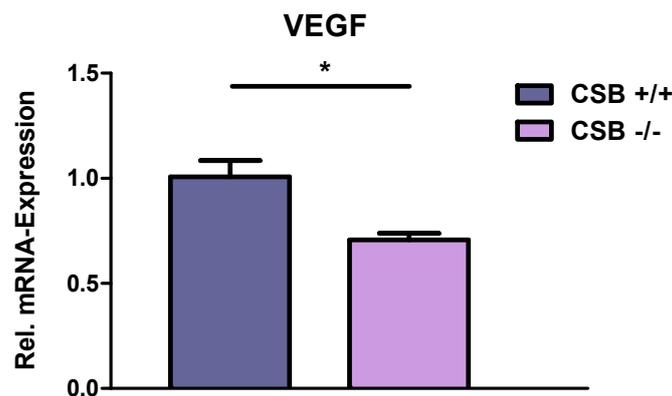


Abbildung 12

Expression des Hypoxie-induzierten Gens VEGF im Kleinhirn

VEGF ist in den Kleinhirnen von CSB-/- C57/BL6 Mäusen im Alter von zehn Wochen signifikant um 30% reduziert. Die Expression von VEGF auf mRNA-Ebene wurde im Kleinhirn von jeweils drei Tieren pro Genotyp mittels semi-quantitativer Realtime-PCR ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte +SEM, normiert auf RPS6. Alle Werte wurden auf den Mittelwert der Wildtyp-Expression bezogen. * $p < 0,05$ Student'scher t-Test.

Um die Auswirkungen einer reduzierten Expression von VEGF in den Kleinhirnen der CSB-defizienten Mäuse zu überprüfen, wurde das Gehirn mit einem Antikörper gegen das Glykoprotein CD31 (*cluster of differentiation 31*), auch bekannt als PECAM-1 (Plättchen / Endothel Zelladhäsionsmolekül-1), gefärbt. CD31 wird von Leukozyten und Blutplättchen exprimiert, sowie von den interzellulären Verbindungen der Endothelzellen, die die Innenseite von Blutgefäßen auskleiden (Newman, 1994).

Je drei C57/BL6 Mäusen pro Genotyp wurde das Gehirn entnommen und kryokonserviert. Die CD31-Färbung wurde an Gefrierschnitten durchgeführt und mit einem Fluoreszenzmarkierten Antikörper (rot) nachgewiesen. Repräsentative Aufnahmen der Färbung sind in Abbildung 13a dargestellt. Die quantitative Auswertung der Aufnahmen ist in Abbildung 13b gezeigt. Hierfür wurden von jedem Kleinhirn drei repräsentative Aufnahmen ausgewählt und die absolute Anzahl der gefärbten Blutgefäße sowie das flächenmäßige Signalverhältnis aus Blutgefäßen pro Gesamtfläche ausgewertet. Die Analyse ergab, dass im Kleinhirn von CSB-defizienten Mäusen eine signifikant geringere Anzahl an Blutgefäßen ausgebildet ist, die insgesamt eine geringere Fläche einnehmen.

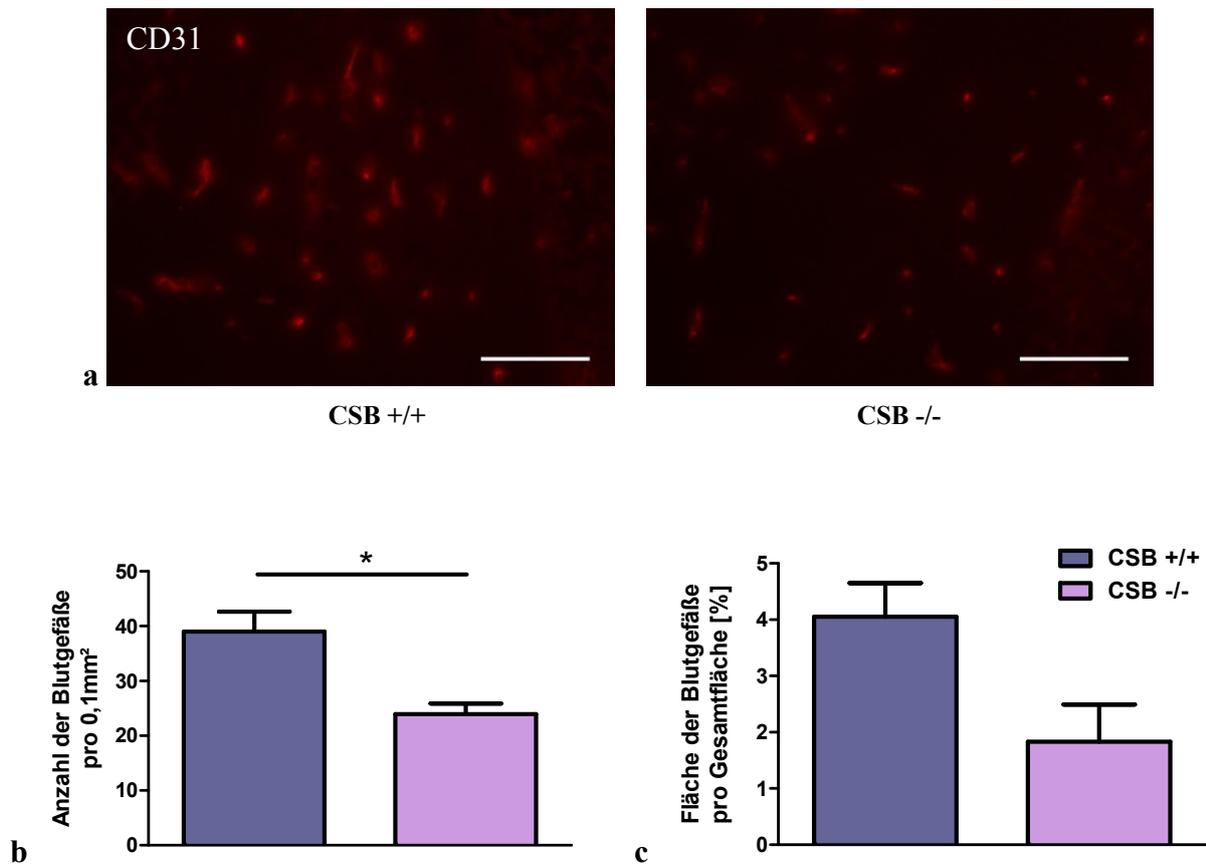


Abbildung 13

Verteilung der Blutgefäße im Kleinhirn

In CSB-defizienten Tieren ist eine signifikant geringere Anzahl an Blutgefäßen ausgebildet. **a** Immunhistochemische Färbung der Blutgefäße im Kleinhirn von zehn Wochen alten C57/BL6 Mäusen auf Gefrierschnitten mit einem Antikörper gegen CD31 (rot). Das Bild zeigt repräsentativ die Verteilung der Blutgefäße im Kleinhirn. Maßstab 100 μ m. **b+c** Je drei Tiere pro Genotyp wurden histologisch untersucht. Von jedem Tier wurden drei Areale nach der Anzahl der Blutgefäße und ihrer Fläche ausgewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte +SEM pro Tier. * $p < 0,05$ Student'scher t-Test.

3.3 Reduzierte Expression von p300 im Cerebellum CSB-defizienter Mäuse

Um zu erklären, wodurch eine gestörte Transkription des Hypoxie-induzierbaren Gens VEGF und eine daraus resultierende Reduktion der Blutgefäße im Kleinhirn von CSB-defizienten Mäusen verursacht ist, wurde die Expression von p300 analysiert. P300 ist ein essentieller Cofaktor für die Aktivierung der Hypoxie-vermittelten Transkription (Ruas *et al.*, 2005). CSB, als direkter Interaktionspartner, scheint wichtig für die Rekrutierung von p300 an die Promotorregion seiner Zielgene zu sein (Frontini *et al.*, 2009). Bei der gestörten Hypoxie-induzierten Transkription in Fibroblasten wurde ein reduzierter Level von p300 an der Promotorregion von VEGF unter Hypoxie-ähnlichen Bedingungen beobachtet (Filippi *et al.*, 2008).

Die Expression von p300 wurde auf mRNA-Ebene mittels semi-quantitativer Realtime-PCR und auf Proteinebene im Western Blot bei je vier bzw. drei Tieren pro Genotyp analysiert. Hierfür wurde aus dem Kleinhirn RNA und Protein isoliert. Als Haushaltsgen für die Genexpression wurde RPS6 analysiert. Für die Normierung der Proteinanalyse diente β -Actin. Um festzustellen, welche Zellen im Kleinhirn in erster Linie p300 exprimieren und somit wichtig für die Hypoxie-induzierte Transkription sind, wurden Paraffinschnitte von ebenfalls je drei Tieren mit einem Antikörper gegen p300 gefärbt. Die Detektion des Signals erfolgte mit AEC (rot). In Abbildung 14 sind zwei repräsentative Aufnahmen dargestellt. Die Analyse der p300-Expression auf mRNA- und Proteinebene ergab, dass in den Kleinhirnen von CSB-defizienten Mäusen generell reduzierte Mengen an p300 vorliegen. Dieser Effekt ist auf Proteinebene signifikant und ist insbesondere in den Purkinjezellen deutlich zu beobachten.

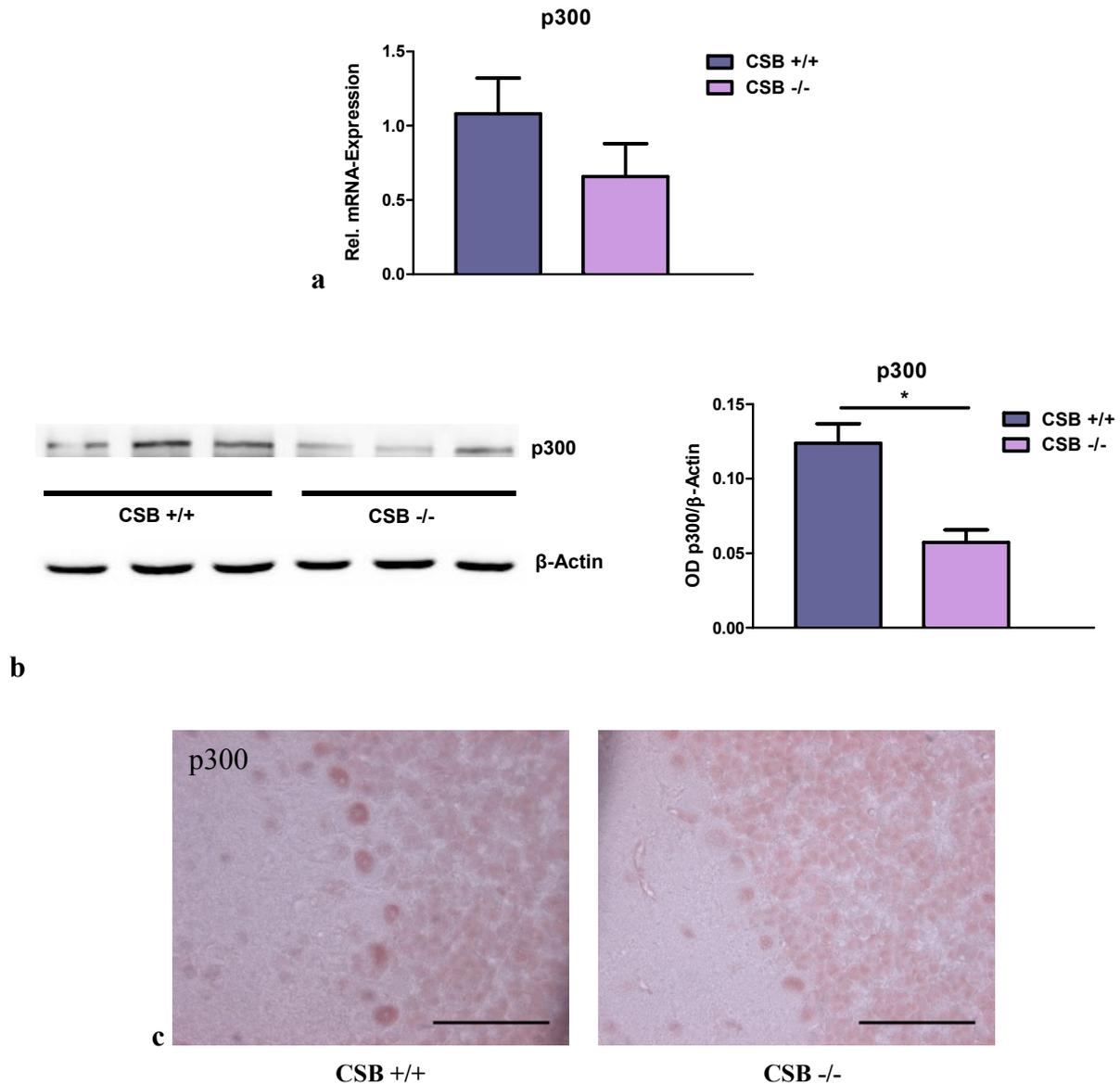


Abbildung 14

Die Expression von p300 im Kleinhirn

Der HIF-1-Cofaktor p300 ist im Kleinhirn von CSB-defizienten C57/BL6 Mäusen reduziert exprimiert. **a** Die Genexpression von p300 auf mRNS-Ebene wurde im Kleinhirn von jeweils vier Tieren pro Genotyp durch semi-quantitative Realtime-PCR bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte +SEM, normiert auf RPS6. Alle Werte wurden auf den Mittelwert der Wildtyp-Expression bezogen. **b** Die Expression des p300 Proteins wurde im Kleinhirnllysate von je drei Tieren pro Genotyp mittels Western Blot bestimmt. Die densitometrische Auswertung der auf β -Actin normierten p300-Banden ergab eine signifikante Reduktion der p300 Expression in den CSB-defizienten Kleinhirnen, wie im rechten Diagramm dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte +SEM, bezogen auf den Mittelwert der Wildtyp-Expression. * $p < 0,05$ Student'scher t-Test. **c** Paraffinschnitte der Gehirne wurden mit einem Antikörper gegen p300 gefärbt und das Signal mit AEC (rot) dargestellt. Bei den stark gefärbten Zellen im Wildtyp handelt es sich um die Zellkörper der Purkinjezellen, die Körnerzellen zeigen ein schwächeres Signal. Das Signal für p300 ist in den CSB-defizienten Purkinjezellen deutlich schwächer ausgeprägt. Maßstab 50 μ m.

3.4 Analyse der neuralen Entwicklung unter Hypoxie im Neurosphärenmodell

Das Neurosphärenmodell ist ein dreidimensionales Zellsystem aus neuralen Vorläuferzellen, das genutzt werden kann, um grundlegende Prozesse der Gehirnentwicklung wie Proliferation, Differenzierung und Migration *in vitro* zu untersuchen (Moors *et al.*, 2009). Um zu überprüfen, ob eine gestörte Hypoxie-induzierte Transkription den CS-Phänotyp erklären kann, wurden aus dem Kleinhirn generierte Neurosphären unter Hypoxie kultiviert (1% O₂) und bezüglich der klassischen Entwicklungsparameter analysiert. Insgesamt wurden aus drei Tieren pro Genotyp zum Zeitpunkt p3 (postnatal Tag 3) Neurosphären isoliert. Die Assays wurden mit Neurosphären durchgeführt, die drei bis vier Wochen in Kultur waren.

Für die Bestimmung der Migration wurden pro Tier zehn Neurosphären mit 250 µm Durchmesser auf einer Proteinmatrix in Differenzierungsmedium ohne die Wachstumsfaktoren EGF und FGF kultiviert. Als endpunktspezifische Migrationskontrollen wurde EGF (Positivkontrolle, 20 ng/ml) und PP2 (Negativkontrolle, 10 µM) hinzugegeben. EGF scheint die Migration von neuralen Zellen deutlich zu verstärken (Grimm *et al.*, 2010), wohingegen der src-Kinaseinhibitor PP2 ihre Migration hemmt (Hishiki *et al.*, 2011). Nach 48 h Kultivierung bei 21% bzw. 1% O₂ wurde die Migrationsdistanz der Zellen aus den Neurosphären am Mikroskop bestimmt. Dabei wurden von jeder Sphäre vier radiale Migrationswerte ermittelt und zusammengefasst. Abbildung 15a zeigt exemplarisch die Migration einer CSB-defizienten Neurosphäre nach 48 h unter hypoxischen Bedingungen. Die Migrationsdistanzen in den CSB-pro- und -defizienten sowohl unter norm- als auch unter hypoxischen Bedingungen waren in allen Neurosphären vergleichbar. In Abbildung 15b ist das Ergebnis der gemessenen Migration aller Sphären zusammengefasst dargestellt. Als endpunktspezifische Kontrolle wurde eine verstärkte Induktion der Migration durch den Wachstumsfaktor EGF erzielt. Unter Zugabe von PP2 wurde hingegen die Migration deutlich gehemmt. In beiden Genotypen war die Migration sowohl unter norm- als auch unter hypoxischen Konditionen nicht beeinflusst.

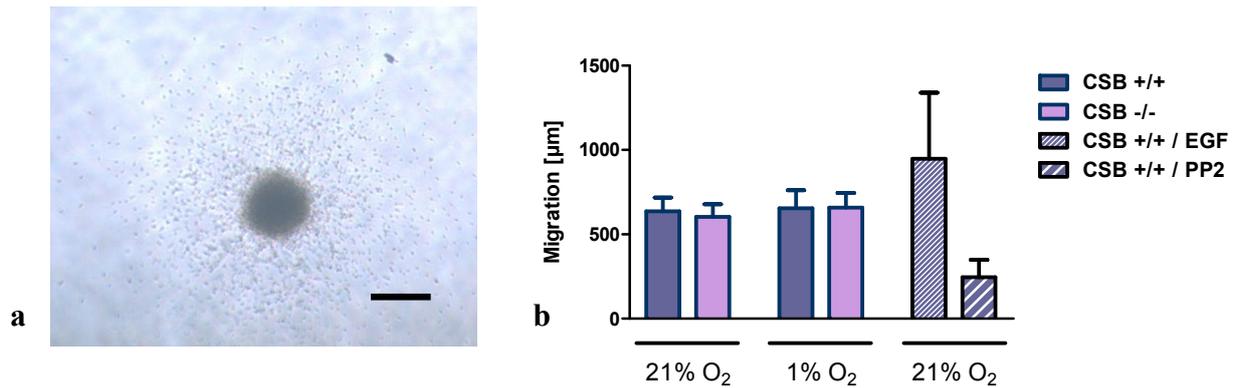


Abbildung 15

Migration der Neurosphären unter hypoxischen Bedingungen

Die Migration von Neurosphären nach Kultivierung unter 1% O₂ für 48 h ist sowohl in CSB-pro- als auch in CSB-defizienten Zellen nicht beeinflusst. **1** Exemplarische Darstellung einer migrierten CSB-defizienten Neurosphäre unter hypoxischen Bedingungen. Maßstab 300 µm. **2** Migrationsdistanzen der Neurosphären in µm. Von je drei C57/BL6 Mäusen pro Genotyp wurden zum Zeitpunkt p3 Neurosphären aus dem Kleinhirn isoliert. Diese wurden nach vier Wochen für 48 h bei 1% O₂ unter differenzierenden Konditionen kultiviert. Von jedem Tier wurde die Migration von zehn Neurosphären bestimmt. Dazu wurden bei jeder Sphäre vier radiale Migrationsdistanzen gemessen. Die Mittelwerte +SD der vier Einzelwerte wurden für alle Genotypen und Behandlungen zusammengefasst. Als Positivkontrolle für die Migration wurde EGF, als Negativkontrolle PP2 verwendet.

Im Anschluss wurden die migrierten Kleinhirn-Neurosphären mit 4% PFA fixiert und mit Antikörpern gegen β (III)-Tubulin und O4 gefärbt. Exemplarisch sind in den Abbildungen 16 und 17 repräsentative Aufnahmen dieser Färbungen dargestellt. Die Detektion erfolgte mit Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern (rot). β (III)-Tubulin wird im Zytoskelett von Neuronen exprimiert und ist ein klassischer Neuronen-Marker (Alexander *et al.*, 1991). Das Antigen O4 wird üblicherweise für die Charakterisierung von Oligodendrozyten verwendet (Keilhauer *et al.*, 1985). Von jedem Tier wurden je fünf Sphären pro Marker gefärbt. Die individuellen Unterschiede zwischen den Neurosphären waren zum Teil sehr groß. Daher wurden je drei repräsentative Aufnahmen ausgewählt und die Anzahl der Neuronen bzw. Oligodendrozyten bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen ausgewertet. Als Negativkontrolle für die Differenzierung von Neuronen wurde der Wachstumsfaktor EGF hinzugegeben, der die neuronale Differenzierung hemmt (Ayuso-Sacido *et al.*, 2010). Für die Differenzierung von Oligodendrozyten wurde als Positivkontrolle das Schilddrüsenhormon Triiodthyronin T₃ (3 nM) zugegeben, da Schilddrüsenhormone deren Reifung positiv beeinflussen (Calza *et al.*, 2002). Als Negativkontrolle wurde das Knochen-morphogene Protein BMP7 (100 ng/ml) zugegeben, welches die Differenzierung von Oligodendrozyten hemmt (Deleyrolle *et al.*, 2006). Die Auswertung ergab, dass die Differenzierung der Neurosphären in Neuronen oder Oligodendrozyten weder durch CSB-Defizienz, noch durch hypoxische Bedingungen beeinflusst ist.

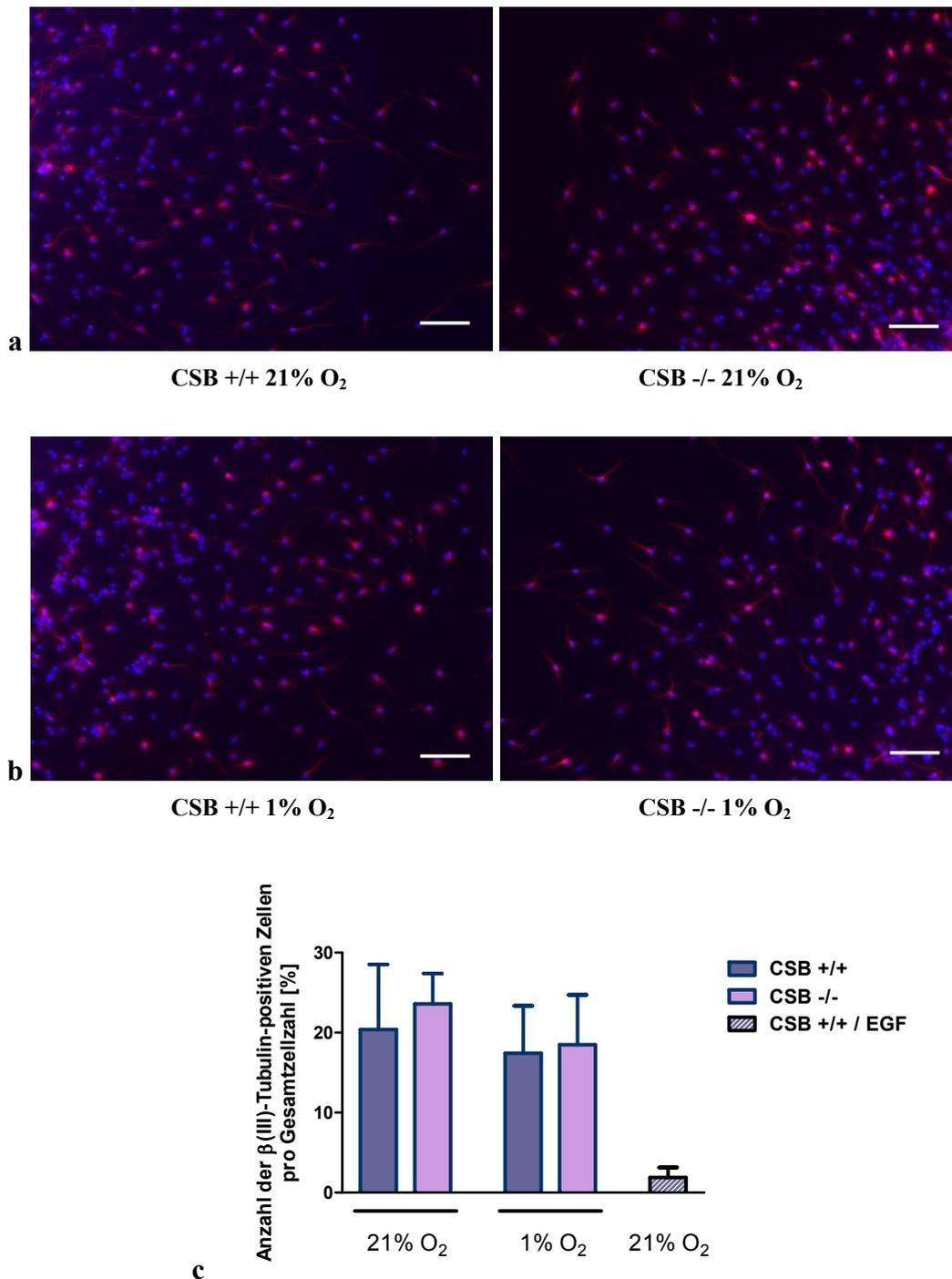


Abbildung 16

Differenzierung von β(III)-Tubulin-positiven Zellen unter Hypoxie

Die Differenzierung von Neuronen aus den cerebellaren Neurosphären ist weder durch CSB-Defizienz, noch durch hypoxische Bedingungen beeinflusst. **a-c** Von je drei C57/BL6 Mäusen pro Genotyp wurden zum Zeitpunkt p3 Neurosphären aus dem Kleinhirn isoliert. Die Färbung der differenzierten Zellen erfolgte nach 48 h Migration bei 21% bzw. 1% O₂. **a+b** Exemplarische Darstellung von ausdifferenzierten Neuronen aus einer CSB-pro- bzw. -defizienten Neurosphäre unter norm- bzw. hypoxischen Bedingungen. Die Färbung erfolgte mit einem Antikörper gegen β(III)-Tubulin (rot). Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33258 (blau). Maßstab 100 µm. **c** Je drei repräsentative Ausschnitte aus fünf migrierten Sphären pro Tier wurden ausgewertet und die Mittelwerte der β(III)-Tubulin-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl +SD dargestellt. Als Negativkontrolle für die Differenzierung von Neuronen wurde EGF appliziert.

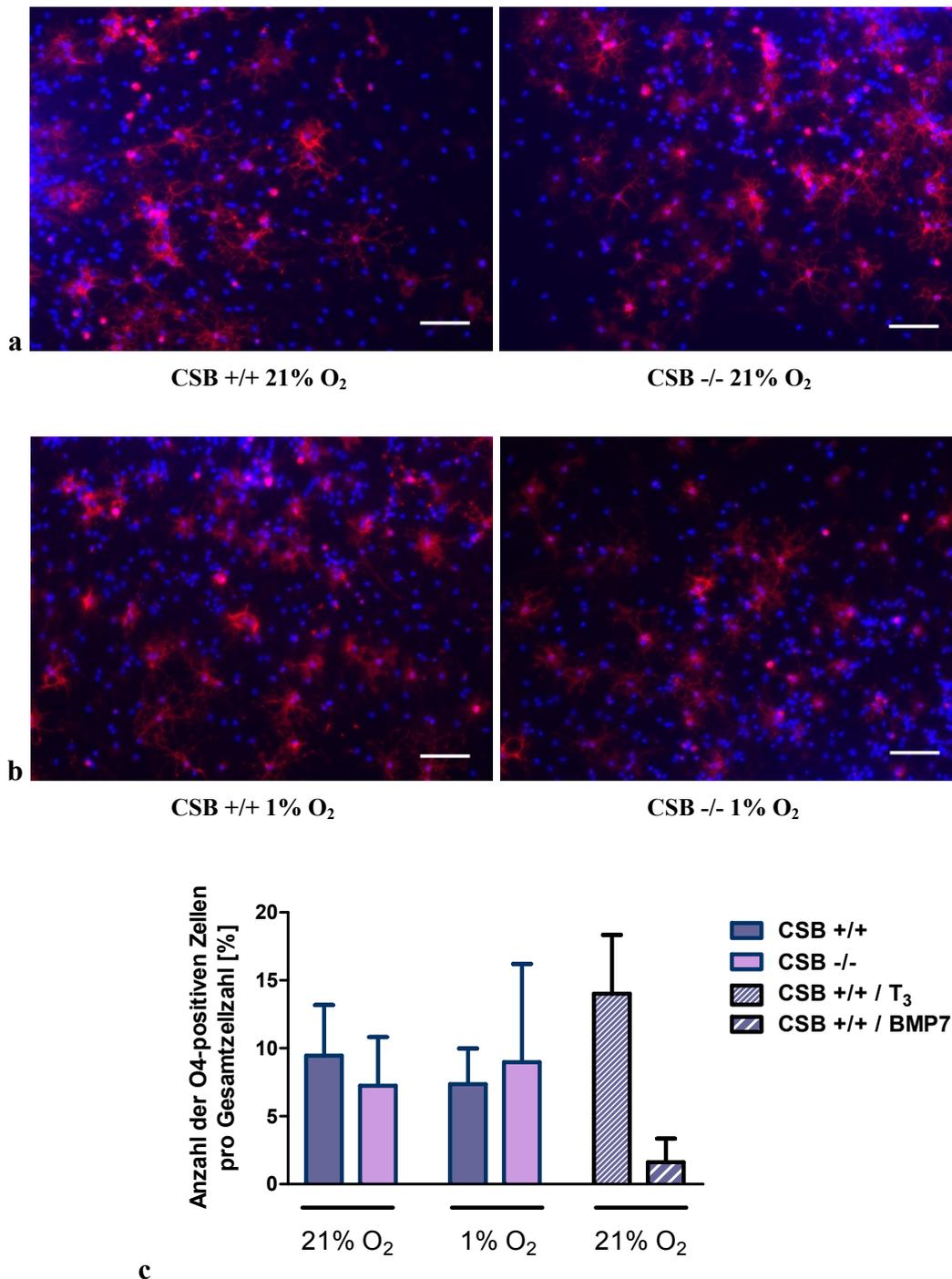


Abbildung 17

Differenzierung von O4-positiven Zellen unter Hypoxie

Die Differenzierung von Oligodendrozyten aus den cerebellaren Neurosphären ist weder durch CSB-Defizienz, noch durch hypoxische Bedingungen beeinflusst. **a-c** Von je drei C57/BL6 Mäusen pro Genotyp wurden zum Zeitpunkt p3 Neurosphären aus dem Kleinhirn isoliert. Die Färbung der differenzierten Zellen erfolgte nach 48 h Migration bei 21% bzw. 1% O₂. **a+b** Exemplarische Darstellung von ausdifferenzierten Oligodendrozyten aus einer CSB-pro- bzw. -defizienten Neurosphäre unter norm- bzw. hypoxischen Bedingungen. Die Färbung erfolgte mit einem Antikörper gegen den Marker O4 (rot). Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33258 (blau). Maßstab 100 μ m. **c** Je drei repräsentative Ausschnitte aus fünf migrierten Sphären pro Tier wurden ausgewertet und die Mittelwerte der O4-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl \pm SD dargestellt. Als Kontrollen wurde die Differenzierung von Oligodendrozyten mit T₃ verstärkt und mit BMP7 inhibiert.

Als letzter Parameter der neuralen Entwicklung wurde die Proliferation der Kleinhirn-Neurosphären betrachtet. Dies erfolgte durch den Nachweis von Bromdesoxyuridin (BrdU), das als Thymidinanalogon spezifisch während der DNS-Synthese in die DNS eingebaut wird (Wessels, 1964) und durch einen Antikörper nachgewiesen werden kann. Die Menge an eingebautem BrdU ist proportional zur Proliferation der Neurosphären.

Damit die Sphären alle unter gleichen Bedingungen proliferierten, wurden sie am Vortag auf eine Breite von 250 μm zerkleinert. Von jedem Tier wurden vier Sphären gleicher Größe in zwei unabhängigen Experimenten mit einer Woche Abstand für 72 h bei 21% bzw. 1% O_2 kultiviert. Der BrdU-Einbau in den letzten 16 h der Kultivierung wurde luminometrisch bestimmt. In jedem Experiment wurde die mittlere Proliferation der Wildtyp-Neurosphären bei 21% O_2 gleich 100% gesetzt und die Einzelwerte darauf bezogen. Beide Experimente wurden in Abbildung 18 zusammengefasst. Die Behandlung mit Hypoxie reduziert die Proliferation der CSB-profizienten Zellen signifikant um 60%. Die Proliferation der CSB-defizienten Sphären unter normoxischen Bedingungen ist vergleichbar mit der von Wildtyp-Sphären. Allerdings reduziert die Behandlung mit Hypoxie die Proliferation von CSB-defizienten Sphären signifikant um 75%. Dieser Effekt, den Hypoxie auf die Proliferation von Neurosphären hat, ist daher in den CSB-defizienten Zellen deutlich verstärkt. Aufgrund der geringen Experimentanzahl ergibt sich für diesen Effekt eine Irrtumswahrscheinlichkeit des t-Tests (p) von 0,08 was nach gewählter Definition nicht als signifikant gewertet wird. Es liegt aber ein starker Trend vor, dass Hypoxie eine verstärkte Hemmung der Proliferation in CSB-defizienten Neurosphären verursacht.

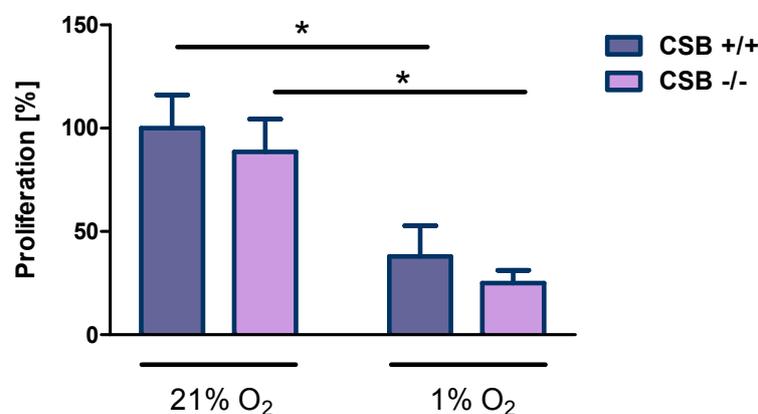


Abbildung 18

Proliferation von Neurosphären unter hypoxischen Bedingungen

Die Proliferation von Kleinhirn-Neurosphären ist unter Hypoxie signifikant reduziert. Dieser Effekt ist in den CSB-defizienten Neurosphären verstärkt ausgeprägt. Neurosphären von je drei C57/BL6 Mäusen pro Genotyp wurden zum Zeitpunkt p3 aus dem Kleinhirn isoliert. Je vier gleich große Neurosphären pro Tier wurden in zwei unabhängigen Experimenten auf ihre Proliferation getestet. Hierfür wurden sie für 72 h bei 21% bzw. 1% O_2 unter proliferierenden Bedingungen kultiviert und der BrdU-Einbau in den letzten 16 h der Kultivierung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte beider Experimente +SEM. Die Einzelwerte wurden auf den jeweiligen Mittelwert der Wildtyp-Normoxie-Kontrollen (entspricht 100% Proliferation) bezogen. *p<0,05 Student'scher t-Test.

3.5 Gestörte transkriptionelle Antwort auf Hypoxie in CSB-defizienten Neurosphären

Da hypoxische Konditionen einen Effekt auf die Proliferation von Neurosphären zu haben scheinen, wurde ihre Genexpression unter diesen Bedingungen näher betrachtet. In humanen Fibroblasten wurde eine schwächere Induktion der VEGF-Genexpression unter hypoxischen Bedingungen oder nach Behandlung mit den Hypoxie-simulierenden Substanzen Desferrioxamin und Kobaltchlorid bei CSB-Defizienz beobachtet (Filippi *et al.*, 2008). Um herauszufinden, ob dieser Effekt auch in CSB-defizienten cerebellaren Neurosphären zu finden ist und eine mögliche Erklärung für den neuropathologischen Phänotyp liefert, wurde die Transkription dreier HIF-1-induzierter Gene in proliferierenden Sphären unter 1% O₂ nach 24 h betrachtet: VEGF, GLUT-1 und HMOX1. Das für die Angiogenese essentielle VEGF wurde bereits in den Kleinhirnen von CSB-defizienten Mäusen reduziert gefunden (siehe 3.2). Der Glukosetransporter GLUT-1 versorgt das Gehirn mit Energie und ist daher elementar für die Entwicklung (Maher *et al.*, 1994). Die durch Hypoxie induzierbare Hämoxygenase-1 (HMOX1) baut Häm zu Eisen und Kohlenstoffmonoxid ab, welche von entscheidender Bedeutung für die Gefäßneubildung sind (Kim *et al.*, 2011). Die Analyse der mRNS-Expression erfolgte mittels semi-quantitativer Realtime-PCR. Zur Normierung wurde das nicht-regulierte Haushaltsgen RPS6 verwendet, die Expression bei 21% O₂ wurde für jeden Genotyp gleich 1 gesetzt. Abbildung 19 zeigt die Expressionsdiagramme. In den Wildtyp-Neurosphären ist die Expression aller drei untersuchten Gene unter hypoxischen Bedingungen doppelt so stark induziert wie in den CSB-defizienten Sphären. Für die Gene VEGF und GLUT-1 ist dieser Effekt signifikant, die Genexpression von HMOX1 verfolgt aber auch einen sehr ähnlichen Trend.

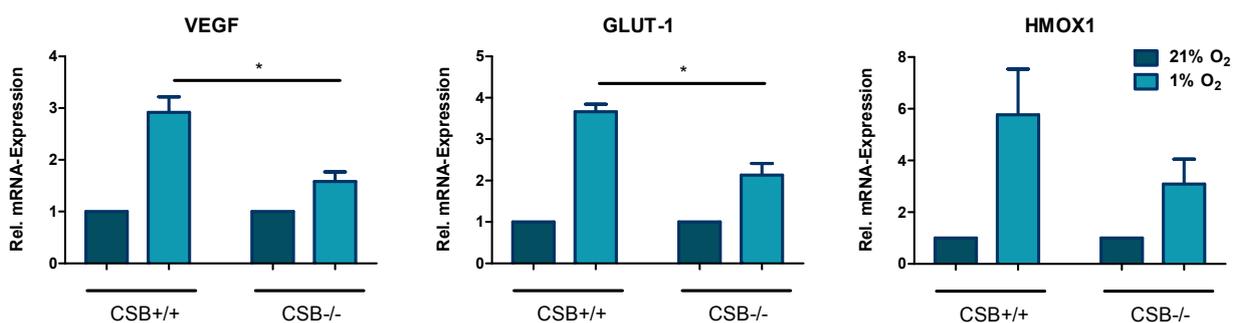


Abbildung 19

Expression der HIF-1-induzierten Gene VEGF, GLUT-1 und HMOX1 in proliferierenden Neurosphären

Die Induktion der mRNS-Expression von VEGF, GLUT-1 und HMOX1 durch Hypoxie (1% O₂) ist in CSB-defizienten Neurosphären größtenteils signifikant abgeschwächt. Neurosphären von jeweils sechs C57/BL6 Mäusen pro Genotyp wurden 24 h bei 21% bzw. 1% O₂ unter proliferierenden Konditionen kultiviert und die Genexpression der untersuchten Gene mittels semi-quantitativer Realtime-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM, normiert auf RPS6. Die Expression bei 21% O₂ wurde bei jedem Genotyp gleich 1 gesetzt. *p<0,05 Student'scher t-Test.

3.6 Wiederherstellung der gestörten transkriptionellen Antwort auf Hypoxie in CSB-defizienten Neurosphären durch HDAC-Inhibitoren

Da in humanen Fibroblasten gezeigt wurde, dass die gestörte Hypoxie-induzierte Transkription in den CSB-defizienten Zellen mit einer defekten Acetylierung des Histons H4 am VEGF-Promotor nach DFO-Behandlung einhergeht (Filippi *et al.*, 2008), wurde analysiert, welchen Effekt eine Veränderung der Netto-Acetylierung auf die Hypoxie-induzierte Transkription in Neurosphären hat. Hierfür wurden die Histondeacetylase-Inhibitoren Suberoylanilid-Hydroxaminsäure (SAHA) und Sirtinol appliziert. SAHA ist ein sehr wirkungsvoller HDAC-Inhibitor, der alle Histondeacetylasen der Klasse I und II hemmt (Butler *et al.*, 2002). Bei Sirtinol handelt es sich um einen Inhibitor der Sirtuine, Histondeacetylasen Klasse III (Mai *et al.*, 2005).

Proliferierende Kleinhirn-Neurosphären wurden mit den in DMSO gelösten HDAC-Inhibitoren jeweils 1,5 h vorinkubiert und im Anschluss für 24 h bei 21% bzw. 1% O₂ kultiviert. Es wurde der Effekt der HDAC-Inhibitoren auf die Genexpression der Hypoxie-induzierten Gene VEGF, GLUT-1 und HMOX1 mittels semi-quantitativer Realtime-PCR analysiert. Als Haushaltsgen wurde RPS6 herangezogen. In Abbildung 20 ist die normierte Expression im Diagramm dargestellt. Die Expression bei 21% O₂ ohne Zugabe von HDAC-Inhibitoren wurde bei jedem Genotyp gleich 1 gesetzt.

In Abbildung 20a ist gezeigt, dass in den Wildtyp-Neurosphären die Expression von VEGF unter Hypoxie fünffach aufreguliert ist. Wie bereits in Kapitel 3.5 beobachtet, ist die Induktion der VEGF-Expression unter Hypoxie mit einer nur zweifachen Aufregulation in den CSB-defizienten Sphären signifikant gestört. Unter Zugabe von 100 nM SAHA kann die gestörte VEGF-Expression in den CSB-defizienten Sphären unter Hypoxie auf eine dreifache Aufregulation signifikant gesteigert und so dem Expressionslevel der Wildtyp-Sphären unter Hypoxie zumindest angenähert werden. Ein ähnlicher Trend ist in der Expression von GLUT-1 und HMOX1 (Abbildung 20b+c) zu beobachten. Die Expression von GLUT-1 in den CSB-defizienten Sphären unter Hypoxie kann durch SAHA sogar fast auf das Hypoxie-induzierte Expressionslevel der Wildtyp-Sphären angeglichen werden. Zu vermerken ist, dass SAHA scheinbar unabhängig von der O₂-Konzentration und dem Genotyp die Expression aller untersuchten Gene induzieren kann.

Eine ähnlicher Trend wie durch die Behandlung mit SAHA ist auch mit 2 µM Sirtinol zu erzielen (Abbildung 20d-f). Unter Hypoxie ist VEGF in den Wildtyp-Neurosphären achtfach aufreguliert, in den CSB-defizienten Sphären allerdings nur fünffach. Die Expression in den CSB-defizienten Sphären kann durch 2 µM Sirtinol wieder verstärkt werden. Dieser Effekt ist deutlicher für das Gen GLUT-1 zu erkennen, bei dem die Expression in den CSB-defizienten Sphären unter Hypoxie durch Sirtinol fast auf das Wildtyp-Expressionslevel bei Hypoxie angeglichen werden kann. Für HMOX1 ist dieser Effekt so gut wie nicht zu beobachten. Auch unter normoxischen Bedingungen induziert Sirtinol die Expression aller drei Gene, scheint aber die Expression in den Wildtyp-Neurosphären unter Hypoxie nicht weiter zu verstärken.

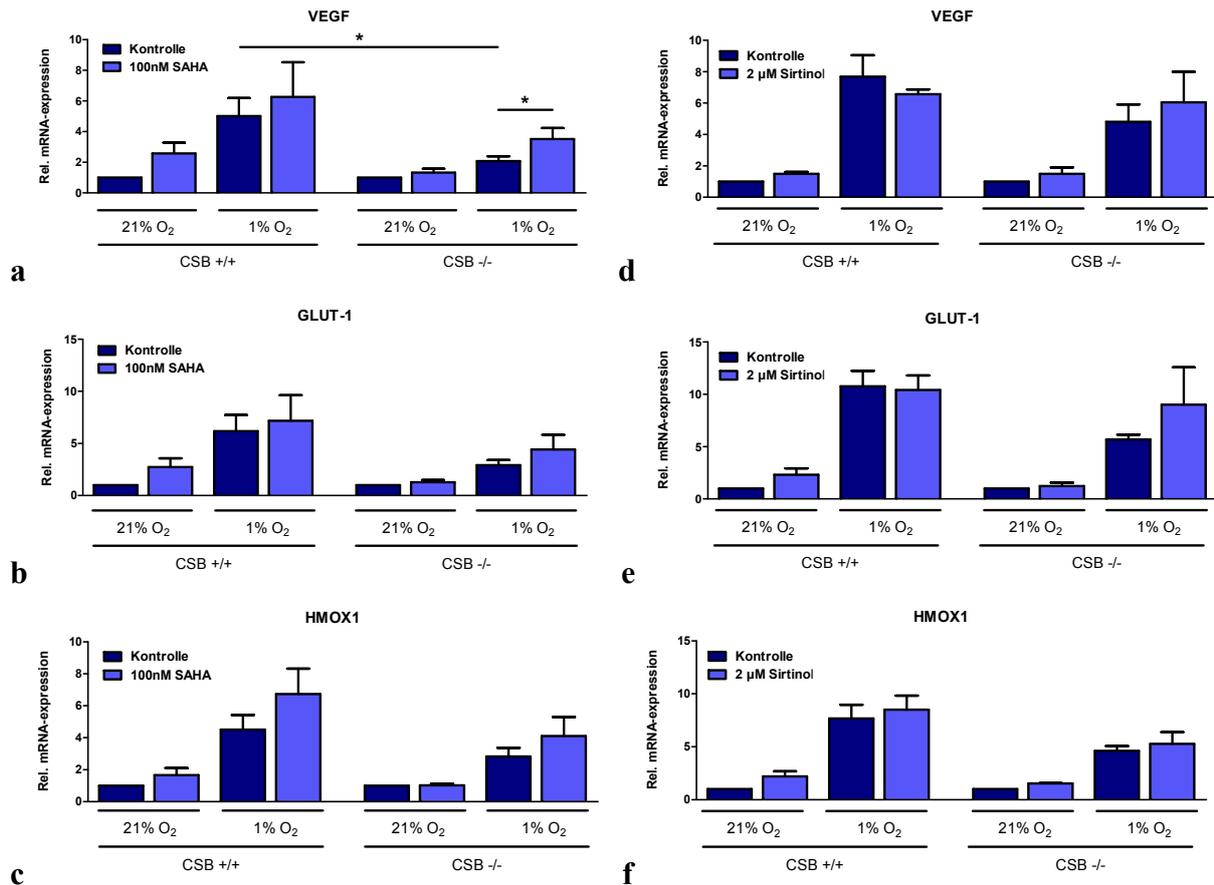


Abbildung 20

Effekt von SAHA und Sirtinol auf die Hypoxie-induzierte Transkription in Neurosphären

Die reduzierte Expression der HIF-1-abhängigen Gene VEGF, GLUT-1 und HMOX1 in CSB-defizienten Neurosphären kann durch die HDAC-Inhibitoren SAHA und Sirtinol revertiert werden. Kleinhirn-Neurosphären von jeweils sechs (**a-c**) bzw. drei (**d-f**) C57/BL6 Mäusen pro Genotyp wurden 24 h bei 21% bzw. 1% O₂ unter proliferierenden Konditionen unter Applikation der HDAC-Inhibitoren SAHA (100 nM, **a-c**) und Sirtinol (2 µM, **d-f**) kultiviert. Die Genexpression der untersuchten Gene wurde mittels semi-quantitativer Realtime-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM, normiert auf RPS6. Die Expression bei 21% O₂ ohne Zugabe von HDAC-Inhibitoren wurde bei jedem Genotyp gleich 1 gesetzt. *p < 0,05 Student'scher t-Test.

3.7 Gestörte Stabilisierung von HIF-1α in CSB-defizienten embryonalen Mausfibroblasten

In den vorangegangenen Kapiteln (3.5 und 3.6) wurde gezeigt, dass CSB-defiziente Neurosphären Schwierigkeiten haben, unter hypoxischen Bedingungen eine adäquate transkriptionelle Antwort zu entwickeln. In CSB-defizienten humanen Fibroblasten ging diese Störung nicht mit einer veränderten Stabilisierung von HIF-1α einher (Filippi *et al.*, 2008). Da die Stabilisierung von HIF-1α von essentieller Bedeutung für die Hypoxie-induzierte Antwort ist, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, in wie weit CSB-defiziente Mauszellen in der Lage sind, HIF-1α unter diesen Bedingungen zu stabilisieren. Da Neurosphären

mengenmäßig stark begrenzt sind, wurden für die Untersuchung der HIF-1 α -Stabilisierung embryonale Mausfibroblasten (MEFs) verwendet. Diese wurden aus Maus-Embryonen zum Zeitpunkt E15 (embryonaler Tag 15) präpariert und kultiviert. Für die Analyse der HIF-1 α -Stabilisierung wurden die Zellen in fünf unabhängigen Experimenten für vier bzw. sieben Stunden bei 1% O₂ kultiviert und Proteine isoliert. Die Analyse erfolgte im Western Blot, für die densitometrische Auswertung wurde die Expression auf das konstitutiv exprimierte Haushaltsprotein α -Tubulin normiert. Abbildung 21 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer repräsentativen Western Blot Analyse. Wie erwartet kam es nach vier Stunden Hypoxie zu einer Stabilisierung von HIF-1 α in den Wildtyp-MEFs, die nach sieben Stunden weiter verstärkt wurde. Dagegen zeigten die CSB-defizienten MEFs weder nach vier noch nach sieben Stunden eine Stabilisierung von HIF-1 α . Dieser beobachtete Effekt ist nach vier Stunden signifikant und zeigt auch nach sieben Stunden noch denselben Trend.

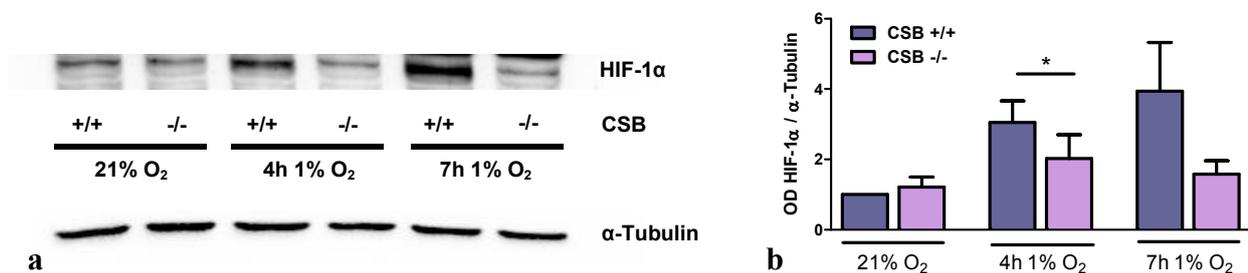


Abbildung 21

Hypoxie-induzierte Stabilisierung von HIF-1 α in embryonalen Mausfibroblasten

Die Stabilisierung von HIF-1 α ist in CSB-defizienten embryonalen Mausfibroblasten signifikant gestört. In fünf unabhängigen Experimenten wurden embryonale Mausfibroblasten für vier bzw. sieben Stunden bei 1% O₂ kultiviert und im Anschluss Proteine daraus isoliert. **a** Die Analyse der Stabilisierung von HIF-1 α erfolgte im Western Blot. Exemplarisch ist das Ergebnis einer repräsentativen Western Blot Analyse dargestellt. **b** Für die densitometrische Auswertung wurde die Intensität der HIF-1 α -Banden auf die des konstitutiv exprimierten Haushaltsproteins α -Tubulin normiert. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten \pm SEM. Jeder Wert wurde auf die Wildtyp-Normoxie-Kontrolle bezogen. * $p < 0,05$ Student'scher t-Test.

3.8 Wiederherstellung der HIF-1 α -Stabilisierung durch Inhibierung von Histon-Deacetylasen und dem Proteasom

Da gezeigt wurde, dass die gestörte Transkription von HIF-1-abhängigen Genen bei CSB-Defizienz in Neurosphären durch den HDAC-Inhibitor SAHA revertiert werden konnte, sollte dessen Effekt auf die Stabilisierung von HIF-1 α analysiert werden. Hierfür wurden embryonale Mausfibroblasten 1,5 h mit verschiedenen Konzentrationen von SAHA vorinkubiert und die Stabilisierung von HIF-1 α im Western Blot analysiert. In Abbildung 22 ist das Ergebnis einer Analyse dargestellt.

Erwartungsgemäß kam es in den CSB-profizienten MEFs zu einer Stabilisierung von HIF-1 α nach acht Stunden 1% O₂. Wie bereits in Kapitel 3.7 beobachtet, wurde HIF-1 α in den CSB-defizienten MEFs unter Hypoxie nicht stabilisiert. Nach Zugabe von SAHA konnte in diesen Zellen jedoch eine deutliche Stabilisierung erzielt werden. Auch unter normoxischen Bedingungen konnten sowohl 100 als auch 200 nM SAHA eine Stabilisierung von HIF-1 α in beiden Genotypen erzeugen. Die Stabilisierung von HIF-1 α unter Hypoxie in den Wildtyp-MEFs wurde durch SAHA ebenfalls nochmals verstärkt.

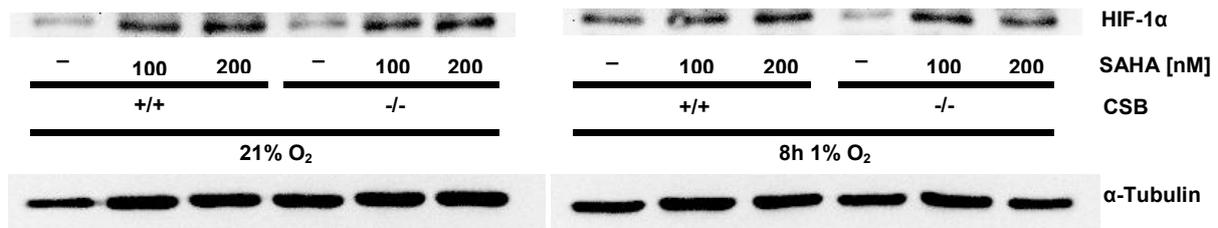


Abbildung 22

Einfluss von SAHA auf die Stabilisierung von HIF-1 α

Die gestörte Stabilisierung von HIF-1 α in CSB-defizienten embryonalen Mausfibroblasten kann durch den HDAC-Inhibitor SAHA wiederhergestellt werden. MEFs wurden für acht Stunden unter Zugabe des HDAC-Inhibitors SAHA (100 bzw. 200 nM) bei 21% oder 1% O₂ kultiviert, Proteine daraus isoliert und die Stabilisierung von HIF-1 α unter Zugabe von SAHA in einer Western Blot Analyse dargestellt. Sowohl 100 als auch 200 nm SAHA können die in CSB-defizienten Mausfibroblasten reduzierte Stabilisierung von HIF-1 α wiederherstellen

Da gezeigt wurde, dass SAHA einen Effekt auf die Stabilisierung von HIF-1 α hat, stellte sich die Frage, wie dieser mechanistisch zu erklären ist. Die Destabilisierung von HIF-1 α wird in der Regel unter normoxischen Bedingungen durch eine Ubiquitylierung von HIF-1 α und einen dadurch vermittelten proteasomalen Abbau verursacht (Haase, 2009). Es wurde gezeigt, dass auch HDAC-Inhibitoren die proteasomale Aktivität beeinflussen können (Fotheringham *et al.*, 2009). Um zu untersuchen, ob das Proteasom einen Einfluss auf die Destabilisierung von HIF-1 α in CSB-defizienten Zellen hat, wurden embryonale Mausfibroblasten mit β -Lacton behandelt. β -Lacton, auch bekannt als Lactacystin, interagiert mit der 20S Untereinheit des Proteasoms und inhibiert dessen Aktivität (Dick *et al.*, 1996). Embryonale Mausfibroblasten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit 8 μ M β -Lacton eine Stunde vorinkubiert und daraus Protein zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert (4 h, 7 h und 24 h). In Abbildung 23 ist das Ergebnis einer repräsentativen Western Blot Analyse dargestellt.

Wie erwartet kommt es in den Wildtyp-MEFs nach vier, sieben und 24 h 1% O₂ zu einer Stabilisierung von HIF-1 α . Die CSB-defizienten MEFs können hingegen, wie bereits in Kapitel 3.7 gezeigt, HIF-1 α zu keinem Zeitpunkt unter Hypoxie stabilisieren. Unter normoxischen Bedingungen kann durch die Inhibierung des Proteasoms mit β -Lacton eine Stabilisierung von HIF-1 α in beiden Genotypen erzielt werden. Unter hypoxischen Bedingungen kann die Stabilisierung von HIF-1 α in den Wildtyp-MEFs durch β -Lacton kaum noch erhöht werden. Allerdings kann die HIF-1 α -Stabilisierung in den CSB-defizienten MEFs

unter Hypoxie durch Inhibierung des Proteasoms fast auf das Wildtyp-Niveau wiederhergestellt werden.

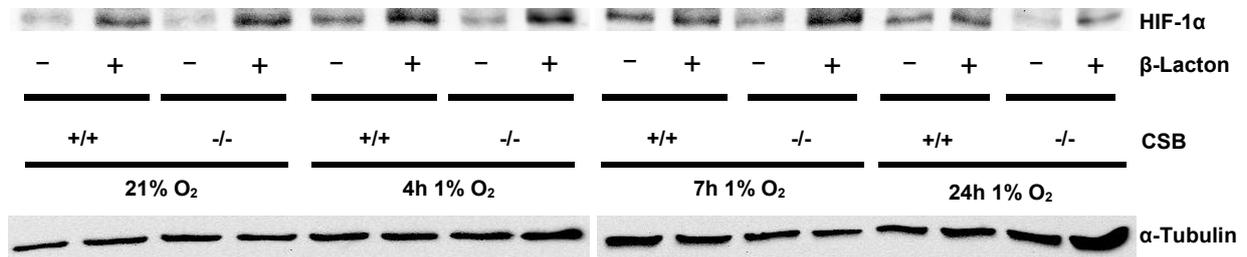


Abbildung 23

Einfluss von β-Lacton auf die Stabilisierung von HIF-1α

Die gestörte Stabilisierung von HIF-1α in CSB-defizienten embryonalen Mausfibroblasten kann – ähnlich wie durch SAHA – durch den Proteasom-Inhibitor β-Lacton revertiert werden. Embryonale Mausfibroblasten wurden für vier, sieben und 24 h unter Zugabe des Proteasom-Inhibitors β-Lacton (8 μM) bei 1% O₂ kultiviert und Proteinlysate isoliert. Es ist das Ergebnis einer repräsentativen Western Blot Analyse der Stabilisierung von HIF-1α nach Zugabe von β-Lacton dargestellt. Zu jedem betrachteten Zeitpunkt kann β-Lacton die in CSB-defizienten Mausfibroblasten reduzierte Stabilisierung von HIF-1α wiederherstellen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des CSB-Proteins bei der neuronalen Entwicklung und Hypoxie-induzierten Transkription analysiert werden. Dabei sollte anhand eines CSB-defizienten Mausmodells geklärt werden, ob eine gestörte Hypoxie-Antwort die Ursache für die neuropathologischen Merkmale des Cockayne Syndrom (CS)-Phänotyps darstellt und wie sich geringe Sauerstoffkonzentrationen auf die neuronale Entwicklung und HIF-1-vermittelte Transkription in CSB-defizienten Zellen auswirken.

Ein Hauptcharakteristikum von CS, nämlich eine erhöhte Photosensitivität, lässt sich durch eine Akkumulation von UV-induzierten Schäden in der Haut aufgrund einer gestörten TCR gut erklären (Venema *et al.*, 1990). Bei weiteren Merkmalen von CS wie Wachstumsdefiziten und insbesondere den neurologischen Störungen fällt es schwer, diese ausschließlich durch einen Defekt in der DNS-Reparatur zu erklären. Zu den neurologischen Auffälligkeiten zählen Demyelinisierung und eine fortschreitende Atrophie der weißen Substanz in Cerebrum und Cerebellum (Itoh *et al.*, 1999). Außerdem wird eine ausgeprägte Mikrozephalie und die Atrophie von Neuronen – in erster Linie Purkinjezellen – im Kleinhirn beobachtet, was zu Störungen der Motorkoordination führt (Weidenheim *et al.*, 2009). Interessanterweise läuft die fötale neuronale Entwicklung von CS-Patienten weitestgehend normal ab und die meisten Symptome treten erstmalig in den ersten beiden Lebensjahren auf (Nance *et al.*, 1992). Basierend auf diesen Beobachtungen stellte Jean-Marc Egly die Hypothese auf, dass CSB einen Einfluss auf einen für die Gehirnentwicklung essentiellen Mechanismus haben muss, der während der fötalen Entwicklung von untergeordneter Bedeutung ist oder kompensiert werden kann und erst nach der Geburt zum Tragen kommt. Er vermutete, dass es sich hierbei um den Mechanismus der Sauerstoff-Homöostase handeln könne, da er herausfand, dass CSB-defiziente Fibroblasten unfähig sind, auf geringe Sauerstoffkonzentrationen transkriptionell angemessen zu reagieren und entsprechende Signalwege zu aktivieren (Filippi *et al.*, 2008). Dass CSB auch einen Einfluss auf die Transkription haben kann, wird schon länger diskutiert (van Gool *et al.*, 1997). Beispielweise wurde gefunden, dass die generelle Transkriptionsaktivität in CSB-defizienten Zellen reduziert ist (Balajee *et al.*, 1997) und CSB-defiziente Zellen große Genexpressionsunterschiede zu ihren Kontrollzellen aufweisen (Newman *et al.*, 2006). Eine mögliche Erklärung für den Einfluss von CSB auf die Transkription von Genen ist eine Veränderung der Chromatin-Struktur durch die ATPase-Aktivität von CSB (Citterio *et al.*, 2000).

Ob tatsächlich eine gestörte transkriptionelle Hypoxie-Antwort für die neuronale Fehlentwicklung bei CS verantwortlich ist, sollte in dieser Arbeit geklärt werden. Dafür wurde ein CS-Mausmodell herangezogen, das an die humane CSB-defiziente Zelllinie CS1AN (Troelstra *et al.*, 1992b) angelehnt war. Diese Mäuse zeigen eine vollständige Deaktivierung der TCR und eine damit einhergehende erhöhte UV-Sensitivität der Haut (van der Horst *et al.*, 1997). Neurologische Untersuchungen bei sechs Monate und 70-100 Wochen alten Mäusen ergaben keine offensichtlichen anatomischen und histologischen Unterschiede (Jaarsma *et al.*, 2011). Die Mäuse wiesen jedoch Verhaltensauffälligkeiten wie ein stereotypes

hyperaktives Verhalten im Alter von sechs Monaten auf. Verhaltenstests im Alter von 18 Wochen zeigten zudem, dass CSB-defiziente Mäuse im „Offenen-Feld-Test“ weniger aktiv sind, Schwierigkeiten bei der Orientierung in neuen Umgebungen haben und im Rotarod-Test Probleme bei der Motoroordination und Balance aufweisen, was durch Funktionen im Kleinhirn gesteuert wird (van der Horst *et al.*, 1997). Da jedoch davon ausgegangen wird, dass es sich beim neuropathologischen Phänotyp von CS eher um eine neuronale Entwicklungsstörung als um degenerative Erscheinung handelt, wurden in dieser Arbeit die Tiere zu einem früheren Zeitpunkt als bisher in der Literatur beschrieben analysiert. Als erstes Charakteristikum galt das Körper- und Gehirngewicht. Dabei wurde festgestellt, dass CSB-defiziente Tiere im Alter von acht Wochen unabhängig von ihrem Geschlecht eine signifikant reduzierte Körper- und Gehirnmasse aufwiesen. Dies stimmt mit dem humanen CS-Phänotyp überein, bei dem ebenfalls Wachstumsstörungen und Mikrozephalie beobachtet werden (Ozdirim *et al.*, 1996). Für die Gewichtsanalysen wurden haarlose Mäuse (SKH-1/hr) herangezogen, da diese üblicherweise in der Arbeitsgruppe für die Durchführung von Bestrahlungsexperimenten verwendet werden. Da jedoch das *hairless* Gen (*hr*) im Gehirn exprimiert wird, wurden alle weiteren Analysen an C57/BL6 Mäusen durchgeführt um einen Einfluss des genetischen *hr*-Hintergrunds auf die Resultate auszuschließen. Ein Einfluss auf die Gehirnmasse ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da morphologische Untersuchungen keine Auswirkungen von *hr* auf das Gehirn gezeigt haben (Cachon-Gonzalez *et al.*, 1999).

Um sicher zu gehen, dass es sich beim CS-Phänotyp im Mausmodell nicht primär um Neurodegeneration handelt, wurden Gehirne von Mäusen im Alter von zehn Wochen nach Anzeichen für Apoptose untersucht. Immunhistochemische Färbungen gegen den Apoptose-Marker aktivierte Caspase-3 wiesen nur äußerst selten apoptotische Zellen im Gehirn und insbesondere im Kleinhirn beider Genotypen auf. Zur Überprüfung der Färbung wurde UVB-bestrahlte Haut analysiert, welche eindeutig eine starke Ansammlung an apoptotischen Zellen in der Epidermis zeigte. Auch wenn nicht alle Apoptose-Signalwege eine Aktivierung von Caspase-3 benötigen, so sind doch die meisten Formen des programmierten Zelltods mit diesem Marker abgedeckt (Wilson, 1998), was vermuten lässt, dass die Ataxie der CSB-defizienten Mäuse nicht auf eine verstärkte Apoptose zurückzuführen ist.

Aus diesem Grund wurde der Fokus der Untersuchungen auf die Entwicklung des Kleinhirns gelegt. Bei einer schwer ausgeprägten Entwicklungsstörung des Kleinhirns, wie z.B. bei der Defizienz des Schilddrüsenhormons, werden alle Parameter einer gestörten Kleinhirnentwicklung zum Zeitpunkt p12 sichtbar (Horn und Heuer, 2010): die Dendriten der Purkinjezellen sind stark verkürzt, was in einer dünneren Molekularschicht resultiert. Darüber hinaus ist die Proliferation der unreifen Körnerzellen hinausgezögert, was zu einer verdickten äußeren granulären Schicht und einer reduzierten Anzahl an ausdifferenzierten Körnerzellen in der inneren granulären Schicht führt. Auch die Fortsätze der Bergmann Gliazellen sind verkürzt. Um die Kleinhirnentwicklung in den CSB-defizienten Mäusen zu analysieren, wurden sie ebenfalls an Tag p12 hinsichtlich derselben Parameter untersucht. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen offensichtlich. Eine Deformation der Purkinjezellen trat zwar je nach Region in beiden Genotypen auf, war aber vermutlich durch die Schneide- und Färbeprozedur bedingt. Die Dicke der Körnerzell- und Molekularschicht

und Verzweigung der Bergmann Gliazellen war in beiden Genotypen gleichmäßig ausgeprägt. Unterschiede in der Intensität der Myelinisierung der weißen Substanz waren zwar in manchen aber nicht allen CSB-defizienten Tieren zu beobachten, und daher vermutlich individuell bedingt. Aus diesem Ergebnis lässt sich daher schließen, dass der neuropathologische CS-Phänotyp in den CSB-defizienten Mäusen sehr mild ausgeprägt sein muss und nur in einer reduzierten Gehirnmasse und defekten Motorkoordination der Tiere deutlich wird. Die Auswirkung der CSB-Mutation in den Mäusen ist also nicht vergleichbar mit den klinischen Merkmalen von CS-Patienten, die deutlich stärker ausgeprägt sind. Dies wird auch darin deutlich, dass die CSB-defizienten Mäuse eine normale Lebenserwartung haben, wohingegen CS-Patienten durchschnittlich bereits im Kindesalter von zwölf Jahren versterben (Nance *et al.*, 1992). Andere Forschungsgruppen haben gezeigt, dass sich eine Verstärkung des CS-Phänotyps in den CSB-defizienten Mäusen und damit eine Angleichung an den humanen Phänotyp nur durch eine zusätzliche Mutation in den Genen XPA, XPC oder XPD erzielen lässt (Jaarsma *et al.*, 2011), (Laposa *et al.*, 2007), (Murai *et al.*, 2001), (Revet *et al.*, 2012), (van der Pluijm *et al.*, 2007). Wie bereits erwähnt, wurde gezeigt, dass humane CSB-defiziente Fibroblasten eine gestörte Hypoxie-Antwort aufweisen und unfähig sind, entsprechende Signalwege zu aktivieren (Filippi *et al.*, 2008). Das Erkennen und Reagieren auf geringe Sauerstoffkonzentrationen im Gehirn ist essentiell für die Entwicklung und das Überleben der Zellen (Sharp *et al.*, 2004). Der wichtigste Faktor, der für das Überleben einer Zelle unter hypoxischen Bedingungen von essentieller Bedeutung ist, ist der Hypoxie-induzierbare Faktor HIF-1 α . HIF-1 α ist ein Transkriptionsfaktor, der seine Wirkung durch die Regulation einer Reihe von Genen entfaltet, die unter anderem eine Rolle bei der Angiogenese, Zellzykluskontrolle und dem Energiestoffwechsel spielen (Sharp *et al.*, 2004). Die essentielle Bedeutung von HIF-1 α wird anhand von entsprechend defizienten Mäusen deutlich, die erhebliche Defekte in der Gehirnentwicklung aufweisen (Tomita *et al.*, 2003). Verantwortlich für die Expression von HIF-1 α im Gehirn und dadurch die Expression von Hypoxie-induzierten Genen sind Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen (Chavez *et al.*, 2000). Da im Gehirn physiologisch stets geringe Sauerstoffkonzentrationen von \sim 1-5% O₂ vorherrschen (Sharp *et al.*, 2004), wurde in dieser Arbeit die Expression Hypoxie-induzierter Gene im Kleinhirn zehn Wochen alter Mäuse analysiert. Dabei wurde gefunden, dass das HIF-1-induzierte Gen VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) in CSB-defizienten Tieren signifikant reduziert exprimiert ist. Die Expression von VEGF wird unter Hypoxie durch die Bindung des Faktors HIF-1 an die Enhancer-Region von VEGF transaktiviert (Forsythe *et al.*, 1996). VEGF hat neben seiner angiogenetischen Funktion auch einen positiven Einfluss auf die Ausbildung von Nervenfortsätzen (Genetos *et al.*, 2010). Die Expression von VEGF ist auch für die embryonale Entwicklung essentiell (Carmeliet *et al.*, 1996). Ausgehend von der reduzierten VEGF-Expression in den Kleinhirnen CSB-defizienter Mäuse wurde die Ausbildung von Blutgefäßen durch eine immunhistologische Analyse der Expression des Endothelzell-Markers CD31 untersucht. Die Anzahl von Blutgefäßen in den Kleinhirnen CSB-defizienter Mäuse war signifikant reduziert und es lag eine Rarefizierung der Blutgefäße vor. Dies könnte in einer gestörten Sauerstoffversorgung des Gehirns und damit verstärkten hypoxischen Konditionen sowie zellulären Schädigungen in den CSB-

defizienten Mäusen resultieren. Gerade zu dem frühen Zeitpunkt kann eine Sauerstoffunterversorgung schwerwiegende Schäden hinterlassen, die die Koordinationsstörungen der CSB-defizienten Mäuse zu einem späteren Zeitpunkt erklären könnten. Interessanterweise wurde in CS-Patienten nach ihrem Tod im Alter von 7-18 Jahren eine eher gestiegene Dichte an Blutgefäßen beobachtet (Hayashi *et al.*, 2011). Dies könnte aber aufgrund der extrem fortgeschrittenen Mikrozephalie bedingt sein, die das Verhältnis Blutgefäße/Hirnmasse deutlich erhöht. Eine Analyse der Blutgefäße in jüngeren humanen Autopsieproben wäre in der erwähnten Studie daher von Vorteil gewesen.

Für die Vermittlung der Hypoxie-induzierten Antwort ist der limitiert vorhandene HIF-1-Cofaktor p300 essentiell. Er acetyliert die Hypoxie-responsiven Elemente (HRE) HIF-1-induzierter Gene und transaktiviert somit deren Transkription (Ruas *et al.*, 2005). Auf mRNA- und Proteinlevel wurde in dieser Arbeit in den Kleinhirnen CSB-defizienter Mäuse eine generell verminderte Expression von p300 beobachtet, die auf Proteinebene signifikant war. Es wird vermutet, dass CSB als direkter Interaktionspartner von p300 dessen Rekrutierung an die HRE der Zielgene vermittelt (Frontini *et al.*, 2009). Eine generell verminderte Expression von p300 wie in den Kleinhirnen CSB-defizienter Mäuse würde daher eine reduzierte VEGF-Expression und daraus resultierend eine gestörte Angiogenese erklären. Darüber hinaus wird p300, welches im Gehirn unter hypoxischen Konditionen verstärkt exprimiert wird (Tan *et al.*, 2009), eine neuroprotektive Rolle zugesprochen (Rouaux *et al.*, 2003). Die reduzierte Expression von p300 wurde insbesondere in den Purkinjezellen des Kleinhirns beobachtet. Sie sind besonders empfindlich für Hypoxie, da ihnen der Glutamat-Transporter EAAT4 und das Glykolyse-Enzym Aldolase C fehlen und sie bei Sauerstoffmangel nur begrenzt Energie generieren können (Welsh *et al.*, 2002). Eine gestörte transkriptionelle Hypoxie-Antwort und daraus folgend eine Atrophie der Purkinjezellen, den größten Neuronen des Kleinhirns, könnte daher als Erklärung für die gestörte Motorkoordination und Ataxie der Tiere dienen.

Da der CS-Phänotyp in den CSB-defizienten Mäusen nur mild ausgeprägt ist und keine morphologischen Auffälligkeiten im Gehirn zu beobachten waren, wurden die Auswirkungen geringer Sauerstoffkonzentrationen, wie sie auch physiologisch im Gehirn vorkommen, im Zellmodell analysiert. Für neurowissenschaftliche Untersuchungen bieten sich primäre Zellen an, allerdings ist die Verwendung von neuronalen Monokulturen nur begrenzt sinnvoll, da das Zusammenspiel der einzelnen neuronalen Zelltypen dabei nicht berücksichtigt wird. Daher wurden Neurosphären als Modellsystem verwendet. Dieses dreidimensionale Zellsystem besteht aus neuronalen Vorläuferzellen, die sphärenartige Zellklumpen ausbilden (Louis *et al.*, 2005). Diese können jederzeit in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten ausdifferenzieren und repräsentieren ein geeignetes Modell für die Untersuchung grundlegender Gehirnentwicklungsprozesse wie Proliferation, Migration und Differenzierung *in vitro* (Fritsche *et al.*, 2011). Die neuronalen Vorläuferzellen wurden zum Zeitpunkt p3 aus dem Kleinhirn generiert und die Auswirkung von 48h 1% O₂ auf die neurale Entwicklung anhand klassischer Parameter untersucht. Es war verwunderlich, dass offenbar hypoxische Konditionen bei beiden Genotypen keinen Einfluss auf die Migration der Zellen hatten. Allerdings ist die Migration von Zellen aus Neurosphären das bedeutsamste Kriterium und eine 48 h andauernde Hypoxie bzw. die Auswirkungen der CSB-Defizienz in den Mauszellen

offenbar nicht ausreichend, um die Migration zu beeinflussen. Da in humanen CS-Patienten eine Atrophie der Neuronen im Kleinhirn und eine reduzierte Myelinisierung der weißen Substanz durch Oligodendrozyten beobachtet wurde (Weidenheim *et al.*, 2009), wurde die Ausdifferenzierung von β (III)-Tubulin-positiven Neuronen und O4-positiven Oligodendrozyten aus den Kleinhirnsphären betrachtet. Die Anzahl der Neuronen bzw. Oligodendrozyten schwankte zum Teil stark innerhalb eines Genotyps, weshalb auch hier insgesamt kein Einfluss der hypoxischen Konditionen bzw. des Genotyps ausgemacht werden konnte. Allerdings wurde eine signifikante Reduktion der Neurosphären-Proliferation durch Hypoxie beobachtet. Dieser Effekt stimmt mit Untersuchungen überein, die zeigen, dass neurale Stammzellen bei 1% O₂ eine reduzierte Proliferationsrate aufweisen (Santilli *et al.*, 2010). Die Reduktion der Proliferation durch Hypoxie war in den CSB-defizienten Sphären nochmals deutlich verstärkt. Dieser Effekt war aufgrund der definierten maximal zulässigen Irrtumswahrscheinlichkeit des Student'schen t-Tests (p) kleiner 5% mit $p = 0,08$ zwar nicht signifikant, zeigte aber einen starken Trend. Möglicherweise ließe sich mit einer Erhöhung der Experimentanzahl eine statistische Signifikanz des beobachteten Unterschiedes erzielen. Eine wahrscheinliche Erklärung für die verstärkte Hemmung der Proliferation in den CSB-defizienten Sphären ist ein verstärkter Zellzyklusarrest unter hypoxischem Stress. Von CSB-defizienten Zellen weiß man nämlich, dass sie p21, den Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen, überexprimieren (Cleaver *et al.*, 2007). Eine reduzierte Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen nach der Geburt unter den physiologisch geringen Sauerstoffkonzentrationen im Gehirn könnte auch die Mikrozephalie bei CS erklären.

Analog zur Untersuchung der Expression Hypoxie-induzierter Gene im Kleinhirn CSB-defizienter Mäuse wurden die Transkription der Gene VEGF, GLUT-1 und HMOX1 in proliferierenden Kleinhirn-Neurosphären unter hypoxischen Konditionen analysiert. In Wildtyp-Neurosphären wurde wie erwartet durch Hypoxie eine normale Induktion der Gene erzielt, wohingegen CSB-defiziente Sphären – ähnlich wie humane CSB-defiziente Fibroblasten (Filippi *et al.*, 2008) – nur eine halb so starke Expression aufwiesen. VEGF und HMOX1, welches Häm zu Eisen und Kohlenstoffmonoxid abbaut und dadurch ähnlich wie VEGF von entscheidender Bedeutung für die Gefäßneubildung und die Sauerstoffversorgung des Gehirns ist (Kim *et al.*, 2011), wurden ebenso reduziert gefunden wie der Glukosetransporter GLUT-1. GLUT-1 ermöglicht die Diffusion von Glukose über die Blut-Hirn-Schranke und versorgt dadurch das Gehirn mit Energie (Maher *et al.*, 1994). Eine defekte GLUT-1 Produktion führt zu Mikrozephalie und Ataxie (Ullner *et al.*, 2009), wie sie auch in den CSB-defizienten Mäusen beobachtet wurden. Analog zu den Befunden, in denen die Expression von p300 in den CSB-defizienten Kleinhirnen reduziert war, wurde auch die Expression von p300 in den Neurosphären analysiert. Dabei wurden keine Expressionsunterschiede sichtbar, was vermutlich auf Zell- bzw. Gewebeunterschiede zurückzuführen ist.

In den humanen CSB-defizienten Fibroblasten ging die reduzierte Expression von VEGF unter Hypoxie-ähnlichen Konditionen mit einer reduzierten Bindung der Histonacetyltransferase (HAT) p300 an die HRE von VEGF und daraus folgend mit einer reduzierten Acetylierung der Histone am VEGF-Promotor einher (Filippi *et al.*, 2008). Dies

lässt die Vermutung zu, dass eine adäquate Modulation des Acetylierungsgrades eine Normalisierung der Hypoxie-induzierten Genexpressionsänderung in CSB-defizienten Zellen bewirken könnte. Acetylgruppen werden in der Regel von HATs an Proteine und Histone angeheftet. Diese Übertragung ist reversibel und kann durch eine andere Enzymgruppe, die Histondeacetylasen (HDACs), rückgängig gemacht werden. Im Fall der Deacetylierung von Histonen führt dies zu einer kondensierten Chromatinstruktur und einer Blockierung der Transkription von Genen (Ververis und Karagiannis, 2011). Inhibiert man HDACs, kann durch den Erhalt der Acetylierung am Promotor die Transkription gewährleistet werden. Ein sehr wirkungsvoller Inhibitor der HDACs Klasse I und II ist SAHA (Suberoylanilid-Hydroxaminsäure), dessen Effekte im Gehirn bereits gezeigt wurden (Hockly *et al.*, 2003). So ist die Bildung von Langzeit-Erinnerungen im alternden Gehirn mit einer Veränderung der Histon-Acetylierung assoziiert und durch SAHA wiederherstellbar (Peleg *et al.*, 2010). Auch die Ausbildung von Synapsen kann durch Behandlung mit HDAC-Inhibitoren wiederhergestellt werden (Guan *et al.*, 2009). Die Behandlung einer Vielzahl an neurodegenerativen Erkrankungen mit HDAC-Inhibitoren steht aktuell im Fokus der Forschung (Majdzadeh *et al.*, 2008). So hat die Applikation von HDAC-Inhibitoren bei der Parkinson-, Alzheimer und Huntington-Erkrankung bereits vielversprechende Effekte gezeigt (Chuang *et al.*, 2009). Viele neurodegenerative Erkrankungen sind folglich auf eine unausgeglichene Homöostase der Acetylierung zurückzuführen (Saha und Pahan, 2006).

Im vorliegenden Fall verstärkt eine Behandlung der Neurosphären mit dem HDAC-Inhibitor SAHA die Expression Hypoxie-induzierbarer und gleichzeitig für die Gehirnentwicklung essentieller Gene. Die in den CSB-defizienten Sphären zum Teil signifikant gestörte Expression von VEGF, GLUT-1 und HMOX1 kann – ohne dass es der Expression von CSB bedarf – durch SAHA wiederhergestellt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das CSB-Protein nicht essentiell für die Hypoxie-induzierte transkriptionelle Antwort ist und dass sein Fehlen durch Modulation der Nettoacetylierung kompensiert werden kann. Darüber hinaus bieten diese Befunde einen möglichen Anhaltspunkt für eine Therapie des CS. Da Neurosphären mengenmäßig sehr stark limitiert sind, konnte für die beobachteten Effekte zum Teil keine statistische Signifikanz errechnet werden. Dies ist auf eine zu geringe Anzahl an Experimenten zurückzuführen und wird aber mit der Durchführung weiterer Experimente verfolgt.

Ein ähnlicher Trend wie durch die Behandlung der Neurosphären mit SAHA konnte auch durch den Sirtuin-Inhibitor Sirtinol erzielt werden. Sirtuine (SIRT1-7), welche homolog zum Gen Sir2 in Hefe sind, gelten als HDACs Klasse III und benötigen für die Deacetylierung von Lysinresten das Koenzym Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) (Ververis *et al.*, 2011). Es wurde gezeigt, dass das Sirtuin SIRT6 eine Deacetylierung an den HIF-1-responsiven Promotoren verursacht und dadurch die Transkription HIF-1-induzierter Gene blockiert (Zhong *et al.*, 2010). Ein weiteres Sirtuin, SIRT1, inaktiviert HIF-1 α durch Deacetylierung seines Lysinrestes K674, was eine Rekrutierung von p300 und damit die Transaktivierung seiner Zielgene unterbindet (Lim *et al.*, 2010). Auch von SIRT3 wurde gezeigt, dass es HIF-1 α destabilisieren und die Transkription seiner Zielgene verhindern kann (Finley *et al.*, 2011). Sirtuine spielen also eine wichtige Rolle bei der Blockierung der transkriptionellen Antwort

auf Hypoxie (Leiser und Kaeberlein, 2010). Dies könnte erklären, warum die Inhibierung von Sirtuinen unter hypoxischen Bedingungen, wie in den CSB-defizienten Neurosphären beobachtet, die Expression der HIF-1-responsiven Gene wiederherstellt. CSB-Defizienz könnte also mit einer verstärkten Aktivität von Sirtuinen assoziiert sein. Daher gilt auch die Inhibierung von Sirtuinen als möglicher Therapieansatz von CS-Patienten. Für den SIRT2-Inhibitor AK1, ein Sulfbenzoesäure-Derivat, wurde zum Beispiel ein nicht-toxischer Effekt und darüber hinaus eine potentielle neuroprotektive Funktion beschrieben (Spires-Jones *et al.*, 2012). Zusammenfassend deuten diese Befunde zum einen darauf hin, dass CSB eine Rolle bei der Aktivierung der Hypoxie-abhängigen Transkription spielt und zum anderen, dass dieser Mechanismus über die Modulation der Protein-Acetylierung gesteuert wird.

Trotzdem bleibt die Frage, welche Rolle HIF-1 α selbst in CSB-defizienten Zellen spielt. Immerhin konnte gezeigt werden, dass auch CSB ein direktes Target von HIF-1 ist (Filippi *et al.*, 2008). Da Neurosphären mengenmäßig stark begrenzt sind und auch kein geeigneter Antikörper für den Nachweis von HIF-1 α für Proteinlysate aus Neurosphären gefunden werden konnte, wurden CSB-defiziente embryonale Mausfibroblasten für die weiteren Analysen verwendet. Anders als in humanen CSB-defizienten Fibroblasten (Filippi *et al.*, 2008) wurde in den CSB-defizienten MEFs eine signifikante Destabilisierung der proteasomal regulierten HIF-1-Untereinheit HIF-1 α nach Behandlung mit 1% O₂ gefunden. Das Unvermögen von CSB-defizienten Zellen, HIF-1 α zu stabilisieren, kann die gestörte Transkription von Hypoxie-induzierbaren Genen *in vivo* und *in vitro* erklären. Warum in humanen CSB-defizienten Fibroblasten keine veränderte Stabilisierung von HIF-1 α gefunden wurde, kann zum einen speziesbedingt sein, aber auch dadurch, dass in dieser Studie (Filippi *et al.*, 2008) mit einer transformierten Zelllinie gearbeitet wurde. Darüber hinaus wurden die Zellen nicht mit reduzierten Sauerstoffkonzentrationen behandelt, sondern nur mit Hypoxie-imitierenden Substanzen wie Desferrioxamin (DFO) und Kobaltchlorid (CoCl₂).

Interessanterweise konnte die gestörte Stabilisierung von HIF-1 α in den CSB-defizienten MEFs durch verschiedene Konzentrationen SAHA wiederhergestellt werden. Eine veränderte Histon-Nettoacetylierung wie auf Transkriptionsebene kann diesen Effekt nur bedingt erklären. Allerdings wurde gezeigt, dass SAHA auch einen Effekt auf die proteasomale Aktivität hat (Fotheringham *et al.*, 2009). Aufgrund der anti-angiogenetischen Wirkungsweise von HDAC-Inhibitoren (Kong *et al.*, 2006) ist in der Tumorforschung bislang primär der Effekt von HDAC-Inhibitoren auf eine Destabilisierung von HIF-1 α untersucht worden (Kim *et al.*, 2001). Allerdings ist – wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt – ein Effekt in beide Richtungen, nämlich in Richtung einer Stabilisierung wie auch einer Destabilisierung von HIF-1 α möglich, der vermutlich dosisabhängig ist. Sicher scheint nur zu sein, dass HDAC-Inhibitoren ihre zellulären Effekte auch über das Proteasom steuern (Chen *et al.*, 2011). Die Destabilisierung von HIF-1 α läuft in der Regel durch eine Ubiquitylierung des Proteins ab, die als Erkennungsmotiv für den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg und den daraus folgenden proteasomalen Abbau dient (Kaluz *et al.*, 2006). Dies lässt vermuten, dass CSB auch eine Rolle bei der Regulation des Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbaus von Proteinen spielt und dadurch Einfluss auf die Transkription nimmt. Um eine mögliche Rolle des Proteasoms bei der Destabilisierung von HIF-1 α in CSB-defizienten Zellen nachzuweisen,

wurden die Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor β -Lacton behandelt, welcher mit der 20S Untereinheit des Proteasoms interagiert und dessen Aktivität inhibiert (Dick *et al.*, 1996). Eine Inhibierung des Proteasoms konnte den in den CSB-defizienten MEFs offenbar verstärkt induzierten proteasomalen Abbau von HIF-1 α verhindern und seine Stabilisierung bewirken. Dies lässt vermuten, dass die Ubiquitin-vermittelte proteasomale Aktivität in den CSB-defizienten Zellen derart verändert ist, dass es zu einem verstärkten Abbau von HIF-1 α kommt.

Für die These einer veränderten proteasomalen Aktivität in CSB-defizienten Zellen gibt es mehrere Anhaltspunkte: In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde gezeigt, dass CSB-defiziente Zellen eine reduzierte Ubiquitinylierung von p53 aufweisen. Dabei wurde behauptet, dass die Gesamtmenge aller ubiquitinylierten Proteine sich von der in CSB-profizienten Zellen nicht unterscheidet. In der veröffentlichten Abbildung ist allerdings zu erkennen, dass CSB-defiziente Zellen eine verstärkte Ubiquitinylierung aufweisen (Latini *et al.*, 2011), was der These entspricht, dass der Ubiquitin-Proteasom-Signalweg in den CSB-defizienten Zellen verstärkt ist. Weiterhin ist bekannt, dass CSB eine Ubiquitin-bindende Domäne (UBD) besitzt, welche essentiell für die Funktionalität des CSB-Proteins ist (Anindya *et al.*, 2010). So könnte CSB beispielsweise über seine UBD an ubiquitinyliertes HIF-1 α binden und dessen proteasomalen Abbau verhindern. Ein Fehlen von CSB hätte dadurch einen wie in dieser Arbeit beobachteten verstärkten Abbau von HIF-1 α zur Folge.

Ein anderer möglicher Mechanismus, wie CSB den Abbau von Proteinen beeinflussen könnte, ergibt sich aus seiner Bindung über den RNS Pol II-Komplex an den Transkriptionsfaktor TFIID (Tantini, 1998). TFIID interagiert mit SUG1, einer Untereinheit des 26S Proteasoms (Weeda *et al.*, 1997). Für eine erfolgreiche TCR induzierter DNS-Schaden muss die RNS Pol II ubiquitinyliert (Somesh *et al.*, 2005) und proteasomal abgebaut werden (Ratner *et al.*, 1998). Dieser Mechanismus ist in CSB-defizienten Zellen gestört (Bregman *et al.*, 1996), was ebenfalls für einen Zusammenhang zwischen CSB und der Modifikation bzw. dem Abbau von Proteinen spricht. Die Ubiquitinylierung der RNS Pol II ist scheinbar nicht nur für eine funktionelle TCR, sondern auch generell für die Kontrolle transkriptioneller Prozesse notwendig, was die Rolle von CSB bei der Transkription unterstreicht (Muratani und Tansey, 2003).

Ein weiteres Protein, dem die Ubiquitinylierung der RNS Pol II zugeschrieben wird, ist CSA (Groisman *et al.*, 2003). CSB interagiert funktionell mit CSA und kann sogar selbst von CSA ubiquitinyliert werden (Groisman *et al.*, 2006). CSA ist ein Bestandteil des E3-Ubiquitinligasekomplexes aus DDB1 (DNS-bindendes Protein 1), Cullin 4A, dem RING Finger Protein Roc1 und dem COP9 Signalosom (CSN) (Groisman *et al.*, 2003). Das Signalosom ist homolog zum Deckel des 26S Proteasom, der 19S-Untereinheit des Proteasoms (Henke *et al.*, 1999). Das Signalosom scheint die Interaktion von CSB mit CSA zu stabilisieren (Groisman *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass CSN5, die fünfte Untereinheit des COP9 Signalosoms, HIF-1 α stabilisieren kann, indem es die Hydroxylierung seiner Prolinreste verhindert (Bemis *et al.*, 2004). Die Defizienz von CSB könnte also auch über CSA und das Signalosom eine fehlerhafte Stabilisierung von HIF-1 α erklären

Zusammengefasst lassen die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse darauf schließen, dass CSB eine Rolle bei der Modifikation von Proteinen durch Acetylierung und der Regulation ihres Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbaus spielt und dadurch Einfluss auf die Transkription nimmt. Die neurologischen Defekte bei CS-Patienten könnten folglich im Zusammenhang mit einer unzureichenden transkriptionellen Antwort auf geringe Sauerstoffkonzentrationen im Gehirn stehen. Zukünftige Arbeiten sollten sich auf folgende Punkte konzentrieren: zum einen muss geklärt werden, durch welchen exakten Mechanismus die Transkription Hypoxie-induzierter Gene in den CSB-defizienten Neurosphären gestört ist. Hierfür könnte mittels einer Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) der Status der Histon-Acetylierung in den Promotorregionen HIF-1-abhängiger Gene oder aber die Bindung der HAT p300 an diese Regionen analysiert werden. Sollte es keine Unterschiede in der Acetylierung geben, so muss davon ausgegangen werden, dass CSB-Defizienz die Expression bereits stromaufwärts z.B. durch einen verstärkten Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbau von HIF-1 α modifiziert. Ein Nachweis von HIF-1 α in den Neurosphären wäre dafür notwendig.

Zum anderen wäre es interessant zu überprüfen, ob die Applikation von HDAC-Inhibitoren, die die transkriptionellen Unterschiede in den CSB-defizienten Zellen ausgleichen konnten, einen positiven Effekt auf die neuronale Entwicklung *in vivo* hat. Viele neurodegenerative Erkrankungen werden mittlerweile durch HDAC-Inhibitoren therapiert (Chuang *et al.*, 2009) und bieten daher auch einen interessanten Ansatz für die Therapie von CS. Da sowohl für SAHA (Hockly *et al.*, 2003), als auch für den HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) eine Aufnahme im Gehirn nachgewiesen werden konnte (Avila *et al.*, 2007), wären beide Substanzen vielversprechende Kandidaten für eine Therapie der CSB-defizienten Mäuse *in vivo*.

Ein weiterer Anhaltspunkt für zukünftige Analysen wäre die Rolle der Endothelzellen beim CS-Phänotyp. Nicht nur die reduzierte Anzahl an Blutgefäßen spricht dafür, dass Endothelzellen an der Ausbildung der CS-Symptome beteiligt sein könnten, sondern auch die Bedeutung der Hypoxie-vermittelten Antwort für die Angio- und Vaskulogenese. Das Transkriptionsmuster der in dieser Arbeit analysierten Gene und Proteine sollte daher auch in Endothelzellen untersucht werden.

Zuletzt sollte in Betracht gezogen werden, den neurologischen Phänotyp der CSB-defizienten Mäuse zu verstärken und so dem humanen Krankheitsbild anzupassen. Ein gleichzeitiges Ausschalten der Gene CSB und XPC, welches alleine keinen neuropathologischen Phänotyp verursacht, bewirkt zum Beispiel eine stark ausgeprägte Störung der Myelinbildung (Revet *et al.*, 2012). Außerdem weisen die CSB- und XPC-defizienten Mäuse eine starke Ataxie und eine extreme Schädigung der Purkinjezellen im Kleinhirn auf (Laposa *et al.*, 2007). Ein Ausschalten von CSB und XPA führt ebenfalls zur Ausbildung einer starken Ataxie und morphologischen Veränderungen im Kleinhirn: einer Verkürzung der Purkinjezell-Dendriten, einer reduzierten Neurogenese und verstärkter Apoptose der Zellen in der äußeren Körnerzellschicht (Murai *et al.*, 2001). Das gemeinsame Ausschalten von Reparaturgenen scheint also den Spezies-bedingten mild ausgeprägten Phänotyp von CSB-defizienten Mäusen zu verstärken (van der Pluijm *et al.*, 2007). Interessant wäre es nun, die Auswirkungen eines

gemeinsamen Defekts von CSB und CSA zu betrachten. Ein dadurch vermutlich ebenfalls verstärkter CS-Phänotyp könnte neue Fragen beantworten und ein Ablesen des Therapieerfolgs von *in vivo* Studien erleichtern. Das neue Modell würde vielerlei Aspekte der Rolle von CSB und CSA bei der Ausbildung des neuropathologischen CS-Phänotyps klären können.

5 Literatur

1. Aboussekhra A, Biggerstaff M, Shivji MK, Vilpo JA, Moncollin V, Podust VN, Protic M, Hubscher U, Egly JM, and Wood RD (1995) Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell*, **80**, 859-868.
2. Alexander JE, Hunt DF, Lee MK, Shabanowitz J, Michel H, Berlin SC, MacDonald TL, Sundberg RJ, Rebhun LI, and Frankfurter A (1991) Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III beta-tubulin by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 4685-4689.
3. Alvarez-Buylla A and Lois C (1995) Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells*, **13**, 263-272.
4. Anindya R, Mari PO, Kristensen U, Kool H, Giglia-Mari G, Mullenders LH, Fousteri M, Vermeulen W, Egly JM, and Svejstrup JQ (2010) A ubiquitin-binding domain in Cockayne syndrome B required for transcription-coupled nucleotide excision repair. *Mol Cell*, **38**, 637-648.
5. Avila AM, Burnett BG, Taye AA, Gabanella F, Knight MA, Hartenstein P, Cizman Z, Di Prospero NA, Pellizzoni L, Fischbeck KH, and Sumner CJ (2007) Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest*, **117**, 659-671.
6. Ayuso-Sacido A, Moliterno JA, Kratovac S, Kapoor GS, O'Rourke DM, Holland EC, Garcia-Verdugo JM, Roy NS, and Boockvar JA (2010) Activated EGFR signaling increases proliferation, survival, and migration and blocks neuronal differentiation in post-natal neural stem cells. *J Neurooncol*, **97**, 323-337.
7. Baehr M and Frotscher M (2003) Neurologisch-topische Diagnostik. *Georg Thieme Verlag*.
8. Balajee AS, May A, Dianov GL, Friedberg EC, and Bohr VA (1997) Reduced RNA polymerase II transcription in intact and permeabilized Cockayne syndrome group B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4306-4311.
9. Balajee AS, Proietti de Santis L, Brosh RM, Jr., Selzer R, and Bohr VA (2000) Role of the ATPase domain of the Cockayne syndrome group B protein in UV induced apoptosis. *Oncogene*, **19**, 477-489.
10. Bastianelli E (2003) Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum*, **2**, 242-262.
11. Basu A and Krishnamurthy S (2010) Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids*, **2010**.
12. Beerens N, Hoeijmakers JH, Kanaar R, Vermeulen W, and Wyman C (2005) The CSB protein actively wraps DNA. *J Biol Chem*, **280**, 4722-4729.

13. Bemis L, Chan DA, Finkielstein CV, Qi L, Sutphin PD, Chen X, Stenmark K, Giaccia AJ, and Zundel W (2004) Distinct aerobic and hypoxic mechanisms of HIF- α regulation by CSN5. *Genes Dev*, **18**, 739-744.
14. Berchner-Pfannschmidt U, Frede S, Wotzlaw C, and Fandrey J (2008) Imaging of the hypoxia-inducible factor pathway: insights into oxygen sensing. *Eur Respir J*, **32**, 210-217.
15. Betts KS (2010) Growing knowledge: using stem cells to study developmental neurotoxicity. *Environ Health Perspect*, **118**, A432-A437.
16. Bregman DB, Halaban R, van Gool AJ, Henning KA, Friedberg EC, and Warren SL (1996) UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11586-11590.
17. Brooks PJ, Cheng TF, and Cooper L (2008) Do all of the neurologic diseases in patients with DNA repair gene mutations result from the accumulation of DNA damage? *DNA Repair (Amst)*, **7**, 834-848.
18. Butler LM, Zhou X, Xu WS, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA, and Richon VM (2002) The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11700-11705.
19. Cachon-Gonzalez MB, San-Jose I, Cano A, Vega JA, Garcia N, Freeman T, Schimmang T, and Stoye JP (1999) The hairless gene of the mouse: relationship of phenotypic effects with expression profile and genotype. *Dev Dyn*, **216**, 113-126.
20. Calza L, Fernandez M, Giuliani A, Aloe L, and Giardino L (2002) Thyroid hormone activates oligodendrocyte precursors and increases a myelin-forming protein and NGF content in the spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3258-3263.
21. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, and Nagy A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, **380**, 435-439.
22. Chavez JC, Agani F, Pichiule P, and LaManna JC (2000) Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in the brain of rats during chronic hypoxia. *J Appl Physiol*, **89**, 1937-1942.
23. Chen HP, Denicola M, Qin X, Zhao Y, Zhang L, Long XL, Zhuang S, Liu PY, and Zhao TC (2011) HDAC inhibition promotes cardiogenesis and the survival of embryonic stem cells through proteasome-dependent pathway. *J Cell Biochem*, **112**, 3246-3255.
24. Chuang DM, Leng Y, Marinova Z, Kim HJ, and Chiu CT (2009) Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci*, **32**, 591-601.

25. Citterio E, van den Boom V, Schnitzler G, Kanaar R, Bonte E, Kingston RE, Hoeijmakers JH, and Vermeulen W (2000) ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Mol Cell Biol*, **20**, 7643-7653.
26. Cleaver JE, Hefner E, Laposa RR, Karentz D, and Marti T (2007) Cockayne syndrome exhibits dysregulation of p21 and other gene products that may be independent of transcription-coupled repair. *Neuroscience*, **145**, 1300-1308.
27. Cockayne EA (1936) Dwarfism with retinal atrophy and deafness. *Arch Dis Child*, **11**, 1-8.
28. Cockayne EA (1946) Dwarfism with Retinal Atrophy and Deafness. *Arch Dis Child*, **21**, 52-54.
29. Damsma GE, Alt A, Brueckner F, Carell T, and Cramer P (2007) Mechanism of transcriptional stalling at cisplatin-damaged DNA. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 1127-1133.
30. de Blas AL (1984) Monoclonal antibodies to specific astroglial and neuronal antigens reveal the cytoarchitecture of the Bergmann glia fibers in the cerebellum. *J Neurosci*, **4**, 265-273.
31. de Laat WL, Jaspers NG, and Hoeijmakers JH (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev*, **13**, 768-785.
32. de Laurenzi V and Melino G (2000) Evolution of functions within the p53/p63/p73 family. *Ann N Y Acad Sci*, **926**, 90-100.
33. Deber CM and Reynolds SJ (1991) Central nervous system myelin: structure, function, and pathology. *Clin Biochem*, **24**, 113-134.
34. Deleyrolle L, Marchal-Victorion S, Dromard C, Fritz V, Saunier M, Sabourin JC, Tran Van Ba C, Privat A, and Hugnot JP (2006) Exogenous and fibroblast growth factor 2/epidermal growth factor-regulated endogenous cytokines regulate neural precursor cell growth and differentiation. *Stem Cells*, **24**, 748-762.
35. Dianov G, Bischoff C, Piotrowski J, and Bohr VA (1998) Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts. *J Biol Chem*, **273**, 33811-33816.
36. Dianov G, Bischoff C, Sunesen M, and Bohr VA (1999) Repair of 8-oxoguanine in DNA is deficient in Cockayne syndrome group B cells. *Nucleic Acids Res*, **27**, 1365-1368.
37. Dick LR, Cruikshank AA, Grenier L, Melandri FD, Nunes SL, and Stein RL (1996) Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J Biol Chem*, **271**, 7273-7276.
38. Diener HC, Hore J, Ivry R, and Dichgans J (1993) Cerebellar dysfunction of movement and perception. *Can J Neurol Sci*, **20 Suppl 3**, S62-S69.

39. Erecinska M and Silver IA (2001) Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol*, **128**, 263-276.
40. Fandrey J, Gorr TA, and Gassmann M (2006) Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc Res*, **71**, 642-651.
41. Filippi S, Latini P, Frontini M, Palitti F, Egly JM, and Proietti-De-Santis L (2008) CSB protein is (a direct target of HIF-1 and) a critical mediator of the hypoxic response. *EMBO J*, **27**, 2545-2556.
42. Finley LW, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, Teruya-Feldstein J, Moreira PI, Cardoso SM, Clish CB, Pandolfi PP, and Haigis MC (2011) SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. *Cancer Cell*, **19**, 416-428.
43. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, and Semenza GL (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, **16**, 4604-4613.
44. Fotheringham S, Epping MT, Stimson L, Khan O, Wood V, Pezzella F, Bernards R, and La Thangue NB (2009) Genome-wide loss-of-function screen reveals an important role for the proteasome in HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Cell*, **15**, 57-66.
45. Fousteri M and Mullenders LH (2008) Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res*, **18**, 73-84.
46. Fousteri M, Vermeulen W, van Zeeland AA, and Mullenders LH (2006) Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Mol Cell*, **23**, 471-482.
47. Freedman SJ, Sun ZY, Poy F, Kung AL, Livingston DM, Wagner G, and Eck MJ (2002) Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5367-5372.
48. Friedberg EC (2003) DNA damage and repair. *Nature*, **421**, 436-440.
49. Fritsche E, Gassmann K, and Schreiber T (2011) Neurospheres as a model for developmental neurotoxicity testing. *Methods Mol Biol*, **758**, 99-114.
50. Frontini M and Proietti-De-Santis L (2009) Cockayne syndrome B protein (CSB): linking p53, HIF-1 and p300 to robustness, lifespan, cancer and cell fate decisions. *Cell Cycle*, **8**, 693-696.
51. Gahwiler BH (1975) The effects of GABA, Picrotoxin and bicuculline on the spontaneous bioelectric activity of cultured cerebellar Purkinje cells. *Brain Res*, **99**, 85-95.

52. Genetos DC, Cheung WK, Decaris ML, and Leach JK (2010) Oxygen tension modulates neurite outgrowth in PC12 cells through a mechanism involving HIF and VEGF. *J Mol Neurosci*, **40**, 360-366.
53. Glickstein M (2007) What does the cerebellum really do? *Curr Biol*, **17**, R824-R827.
54. Goldowitz D and Hamre K (1998) The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci*, **21**, 375-382.
55. Goll MG and Bestor TH (2002) Histone modification and replacement in chromatin activation. *Genes Dev*, **16**, 1739-1742.
56. Grimm I, Ullsperger SN, and Zimmermann H (2010) Nucleotides and epidermal growth factor induce parallel cytoskeletal rearrangements and migration in cultured adult murine neural stem cells. *Acta Physiol (Oxf)*, **199**, 181-189.
57. Groisman R, Kuraoka I, Chevallier O, Gaye N, Magnaldo T, Tanaka K, Kisselev AF, Harel-Bellan A, and Nakatani Y (2006) CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome. *Genes Dev*, **20**, 1429-1434.
58. Groisman R, Polanowska J, Kuraoka I, Sawada J, Saijo M, Drapkin R, Kisselev AF, Tanaka K, and Nakatani Y (2003) The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell*, **113**, 357-367.
59. Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJ, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R, Bradner JE, DePinho RA, Jaenisch R, and Tsai LH (2009) HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*, **459**, 55-60.
60. Guillemin GJ and Brew BJ (2004) Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol*, **75**, 388-397.
61. Haase VH (2009) The VHL tumor suppressor: master regulator of HIF. *Curr Pharm Des*, **15**, 3895-3903.
62. Hachem S, Laurenson AS, Hugnot JP, and Legraverend C (2007) Expression of S100B during embryonic development of the mouse cerebellum. *BMC Dev Biol*, **7**, 17.
63. Hayashi M, Itoh M, Araki S, Kumada S, Shioda K, Tamagawa K, Mizutani T, Morimatsu Y, Minagawa M, and Oda M (2001) Oxidative stress and disturbed glutamate transport in hereditary nucleotide repair disorders. *J Neuropathol Exp Neurol*, **60**, 350-356.
64. Hayashi M, Miwa-Saito N, Tanuma N, and Kubota M (2011) Brain vascular changes in Cockayne syndrome. *Neuropathology*.
65. Henke W, Ferrell K, Bech-Otschir D, Seeger M, Schade R, Jungblut P, Naumann M, and Dubiel W (1999) Comparison of human COP9 signalosome and 26S proteasome lid'. *Mol Biol Rep*, **26**, 29-34.

66. Henning KA, Li L, Iyer N, McDaniel LD, Reagan MS, Legerski R, Schultz RA, Stefanini M, Lehmann AR, Mayne LV, and Friedberg EC (1995) The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIF. *Cell*, **82**, 555-564.
67. Herceg Z and Murr R (2011) Mechanisms of histone modifications. *Handbook of Epigenetics - Elsevier Academic Press*.
68. Hishiki T, Saito T, Sato Y, Mitsunaga T, Terui E, Matsuura G, Saito E, Shibata R, Mise N, Yokoyama Y, and Yoshida H (2011) Src kinase family inhibitor PP2 induces aggregation and detachment of neuroblastoma cells and inhibits cell growth in a PI3 kinase/Akt pathway-independent manner. *Pediatr Surg Int*, **27**, 225-230.
69. Hochstrasser M (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*, **30**, 405-439.
70. Hockly E, Richon VM, Woodman B, Smith DL, Zhou X, Rosa E, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Mahal A, Lowden PA, Steffan JS, Marsh JL, Thompson LM, Lewis CM, Marks PA, and Bates GP (2003) Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2041-2046.
71. Horn S and Heuer H (2010) Thyroid hormone action during brain development: more questions than answers. *Mol Cell Endocrinol*, **315**, 19-26.
72. Itoh M, Hayashi M, Shioda K, Minagawa M, Isa F, Tamagawa K, Morimatsu Y, and Oda M (1999) Neurodegeneration in hereditary nucleotide repair disorders. *Brain Dev*, **21**, 326-333.
73. Iyer N, Reagan MS, Wu KJ, Canagarajah B, and Friedberg EC (1996) Interactions involving the human RNA polymerase II transcription/nucleotide excision repair complex TFIIF, the nucleotide excision repair protein XPG, and Cockayne syndrome group B (CSB) protein. *Biochemistry*, **35**, 2157-2167.
74. Jaarsma D, van der Pluijm I, de Waard MC, Haasdijk ED, Brandt R, Vermeij M, Rijksen Y, Maas A, van Steeg H, Hoeijmakers JH, and van der Horst GT (2011) Age-related neuronal degeneration: complementary roles of nucleotide excision repair and transcription-coupled repair in preventing neuropathology. *PLoS Genet*, **7**, e1002405.
75. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, and Semenza GL (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **271**, 17771-17778.
76. Kaluz S, Kaluzova M, and Stanbridge EJ (2006) Proteasomal inhibition attenuates transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) via specific effect on the HIF-1alpha C-terminal activation domain. *Mol Cell Biol*, **26**, 5895-5907.
77. Kamenisch Y, Fousteri M, Knoch J, von Thaler AM, Fehrenbacher B, Kato H, Becker T, Dollé MET, Kuiper R, Majora M, Schaller M, van der Horst GTJ, van Steeg H, Röcken M, Rapaport D, Krutmann J, Mullenders LH and Berneburg M (2010) Proteins of nucleotide and base excision repair pathway interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging. *J Exp Med*, **207**, 379-390.

78. Kandel ER, Schwartz JM, and Jessel TM (2000) Principles of neural science. *Elsevier New York*.
79. Keilhauer G, Meier DH, Kuhlmann-Krieg S, Nieke J, and Schachner M (1985) Astrocytes support incomplete differentiation of an oligodendrocyte precursor cell. *EMBO J*, **4**, 2499-2504.
80. Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, Kim CW, and Kim KW (2001) Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med*, **7**, 437-443.
81. Kim YM, Pae HO, Park JE, Lee YC, Woo JM, Kim NH, Choi YK, Lee BS, Kim SR, and Chung HT (2011) Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, **14**, 137-167.
82. Klimaschewski L (2003) Ubiquitin-dependent proteolysis in neurons. *News Physiol Sci*, **18**, 29-33.
83. Kong X, Lin Z, Liang D, Fath D, Sang N, and Caro J (2006) Histone deacetylase inhibitors induce VHL and ubiquitin-independent proteasomal degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol*, **26**, 2019-2028.
84. Kraemer KH, Patronas NJ, Schiffmann R, Brooks BP, Tamura D, and Digiovanna JJ (2007) Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience*, **145**, 1388-1396.
85. Kuo MH and Allis CD (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays*, **20**, 615-626.
86. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
87. Lake RJ, Basheer A, and Fan HY (2011) Reciprocally regulated chromatin association of Cockayne syndrome protein B and p53 protein. *J Biol Chem*, **286**, 34951-34958.
88. Laposa RR, Huang EJ, and Cleaver JE (2007) Increased apoptosis, p53 up-regulation, and cerebellar neuronal degeneration in repair-deficient Cockayne syndrome mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1389-1394.
89. Latini P, Frontini M, Caputo M, Gregan J, Cipak L, Filippi S, Kumar V, Velez-Cruz R, Stefanini M, and Proietti-De-Santis L (2011) CSA and CSB proteins interact with p53 and regulate its Mdm2-dependent ubiquitination. *Cell Cycle*, **10**, 3719-3730.
90. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, and Kim KW (2004) Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*, **36**, 1-12.
91. Lehmann AR (2003) DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie*, **85**, 1101-1111.
92. Leiser SF and Kaeberlein M (2010) A role for SIRT1 in the hypoxic response. *Mol Cell*, **38**, 779-780.

93. Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331.
94. Li Q, Xiao H, and Isobe K (2002) Histone acetyltransferase activities of cAMP-regulated enhancer-binding protein and p300 in tissues of fetal, young, and old mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **57**, B93-B98.
95. Licht CL, Stevnsner T, and Bohr VA (2003) Cockayne syndrome group B cellular and biochemical functions. *Am J Hum Genet*, **73**, 1217-1239.
96. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, and Park JW (2010) Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell*, **38**, 864-878.
97. Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**, 709-715.
98. Ljungman M, Zhang F, Chen F, Rainbow AJ, and McKay BC (1999) Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response. *Oncogene*, **18**, 583-592.
99. Lordkipanidze T and Dunaevsky A (2005) Purkinje cell dendrites grow in alignment with Bergmann glia. *Glia*, **51**, 229-234.
100. Louis SA and Reynolds BA (2005) Generation and differentiation of neurospheres from murine embryonic day 14 central nervous system tissue. *Methods Mol Biol*, **290**, 265-280.
101. Maher F, Vannucci SJ, and Simpson IA (1994) Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J*, **8**, 1003-1011.
102. Mai A, Massa S, Lavu S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R, Mariotti FR, Chiani F, Camilloni G, and Sinclair DA (2005) Design, synthesis, and biological evaluation of sirtinol analogues as class III histone/protein deacetylase (Sirtuin) inhibitors. *J Med Chem*, **48**, 7789-7795.
103. Majdzadeh N, Morrison BE, and D'Mello SR (2008) Class IIA HDACs in the regulation of neurodegeneration. *Front Biosci*, **13**, 1072-1082.
104. Mallery DL, Tanganelli B, Colella S, Steingrimsdottir H, van Gool AJ, Troelstra C, Stefanini M, and Lehmann AR (1998) Molecular analysis of mutations in the CSB (ERCC6) gene in patients with Cockayne syndrome. *Am J Hum Genet*, **62**, 77-85.
105. Marie J, Leveque B, and Hesse JC (1958) Nanism with deaf-mutism and retinitis pigmentosa (Cockayne syndrome). *Arch Fr Pediatr*, **15**, 1101-1103.
106. Mayne LV and Lehmann AR (1982) Failure of RNA synthesis to recover after UV irradiation: an early defect in cells from individuals with Cockayne's syndrome and xeroderma pigmentosum. *Cancer Res*, **42**, 1473-1478.
107. Moors M, Rockel TD, Abel J, Cline JE, Gassmann K, Schreiber T, Schuwald J, Weinmann N, and Fritsche E (2009) Human neurospheres as three-dimensional

- cellular systems for developmental neurotoxicity testing. *Environ Health Perspect*, **117**, 1131-1138.
108. Mullen RJ, Buck CR, and Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, **116**, 201-211.
109. Murai M, Enokido Y, Inamura N, Yoshino M, Nakatsu Y, van der Horst GT, Hoeijmakers JH, Tanaka K, and Hatanaka H (2001) Early postnatal ataxia and abnormal cerebellar development in mice lacking Xeroderma pigmentosum Group A and Cockayne syndrome Group B DNA repair genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13379-13384.
110. Muratani M and Tansey WP (2003) How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 192-201.
111. Nance MA and Berry SA (1992) Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet*, **42**, 68-84.
112. Neilan EG (1993) Cockayne Syndrome. *GeneReviews*.
113. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, and Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, **13**, 9-22.
114. Newman JC, Bailey AD, and Weiner AM (2006) Cockayne syndrome group B protein (CSB) plays a general role in chromatin maintenance and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 9613-9618.
115. Newman PJ (1994) The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann N Y Acad Sci*, **714**, 165-174.
116. Osterod M, Larsen E, Le Page F, Hengstler JG, van der Horst GT, Boiteux S, Klungland A, and Epe B (2002) A global DNA repair mechanism involving the Cockayne syndrome B (CSB) gene product can prevent the in vivo accumulation of endogenous oxidative DNA base damage. *Oncogene*, **21**, 8232-8239.
117. Ozdirim E, Topcu M, Ozon A, and Cila A (1996) Cockayne syndrome: review of 25 cases. *Pediatr Neurol*, **15**, 312-316.
118. Peixoto P and Lansiaux A (2006) Histone-deacetylases inhibitors: from TSA to SAHA. *Bull Cancer*, **93**, 27-36.
119. Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, gis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, and Fischer A (2010) Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science*, **328**, 753-756.
120. Peterson CL and Tamkun JW (1995) The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem Sci*, **20**, 143-146.
121. Proietti-De-Santis L, Drane P, and Egly JM (2006) Cockayne syndrome B protein regulates the transcriptional program after UV irradiation. *EMBO J*, **25**, 1915-1923.

122. Ratner JN, Balasubramanian B, Corden J, Warren SL, and Bregman DB (1998) Ultraviolet radiation-induced ubiquitination and proteasomal degradation of the large subunit of RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair. *J Biol Chem*, **273**, 5184-5189.
123. Revet I, Feeney L, Tang AA, Huang EJ, and Cleaver JE (2012) Dysmyelination not demyelination causes neurological symptoms in preweaned mice in a murine model of Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 4627-4632.
124. Reynolds BA, Tetzlaff W, and Weiss S (1992) A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, **12**, 4565-4574.
125. Reynolds BA and Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, **255**, 1707-1710.
126. Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, and Marks PA (1998) A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3003-3007.
127. Rouaux C, Jokic N, Mbebi C, Boutillier S, Loeffler JP, and Boutillier AL (2003) Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *EMBO J*, **22**, 6537-6549.
128. Ruas JL, Poellinger L, and Pereira T (2005) Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription. *J Cell Sci*, **118**, 301-311.
129. Saha RN and Pahan K (2006) HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ*, **13**, 539-550.
130. Santilli G, Lamorte G, Carlessi L, Ferrari D, Rota Nodari L, Binda E, Delia D, Vescovi AL, and De Filippis L (2010) Mild hypoxia enhances proliferation and multipotency of human neural stem cells. *PLoS One*, **5**, e8575.
131. Schilling K (2000) Lineage, development and morphogenesis of cerebellar interneurons. *Prog Brain Res*, **124**, 51-68.
132. Schmid T, Zhou J, Kohl R, and Brune B (2004) p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Biochem J*, **380**, 289-295.
133. Selby CP and Sancar A (1997a) Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11205-11209.
134. Selby CP and Sancar A (1997b) Human transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 is a DNA-stimulated ATPase but is not a helicase and does not disrupt the ternary transcription complex of stalled RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **272**, 1885-1890.
135. Semenza GL and Wang GL (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, **12**, 5447-5454.

136. Sermeus A and Michiels C (2011) Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell Death Dis*, **2**, e164.
137. Sharp FR and Bernaudin M (2004) HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 437-448.
138. Soffer D, Grotsky HW, Rapin I, and Suzuki K (1979) Cockayne syndrome: unusual neuropathological findings and review of the literature. *Ann Neurol*, **6**, 340-348.
139. Somesh BP, Reid J, Liu WF, Sogaard TM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, and Svejstrup JQ (2005) Multiple mechanisms confining RNA polymerase II ubiquitylation to polymerases undergoing transcriptional arrest. *Cell*, **121**, 913-923.
140. Spires-Jones TL, Fox LM, Rozkalne A, Pitstick R, Carlson GA, and Kazantsev AG (2012) Inhibition of Sirtuin 2 with Sulfolobenzoic Acid Derivative AK1 is Non-Toxic and Potentially Neuroprotective in a Mouse Model of Frontotemporal Dementia. *Front Pharmacol*, **3**, 42.
141. Stevnsner T, Nyaga S, de Souza-Pinto NC, van der Horst GT, Gorgels TG, Hogue BA, Thorslund T, and Bohr VA (2002) Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B. *Oncogene*, **21**, 8675-8682.
142. Tan XL, Zhai Y, Gao WX, Fan YM, Liu FY, Huang QY, and Gao YQ (2009) p300 expression is induced by oxygen deficiency and protects neuron cells from damage. *Brain Res*, **1254**, 1-9.
143. Tanaka K, Kawai K, Kumahara Y, Ikenaga M, and Okada Y (1981) Genetic complementation groups in cockayne syndrome. *Somatic Cell Genet*, **7**, 445-455.
144. Tantin D (1998) RNA polymerase II elongation complexes containing the Cockayne syndrome group B protein interact with a molecular complex containing the transcription factor IIIH components xeroderma pigmentosum B and p62. *J Biol Chem*, **273**, 27794-27799.
145. Ten Donkelaar HJ, Lammens M, Wesseling P, Thijssen HO, and Renier WO (2003) Development and developmental disorders of the human cerebellum. *J Neurol*, **250**, 1025-1036.
146. Tomita S, Ueno M, Sakamoto M, Kitahama Y, Ueki M, Maekawa N, Sakamoto H, Gassmann M, Kageyama R, Ueda N, Gonzalez FJ, and Takahama Y (2003) Defective brain development in mice lacking the Hif-1alpha gene in neural cells. *Mol Cell Biol*, **23**, 6739-6749.
147. Troelstra C, Landsvater RM, Wiegant J, van der Ploeg M, Viel G, Buys CH, and Hoeijmakers JH (1992a) Localization of the nucleotide excision repair gene ERCC6 to human chromosome 10q11-q21. *Genomics*, **12**, 745-749.
148. Troelstra C, van GA, de WJ, Vermeulen W, Bootsma D, and Hoeijmakers JH (1992b) ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell*, **71**, 939-953.

149. Ullner PM, Di Nardo A, Goldman JE, Schobel S, Yang H, Engelstad K, Wang D, Sahin M, and De Vivo DC (2009) Murine Glut-1 transporter haploinsufficiency: postnatal deceleration of brain weight and reactive astrocytosis. *Neurobiol Dis*, **36**, 60-69.
150. van den Boom V, Citterio E, Hoogstraten D, Zotter A, Egly JM, van Cappellen WA, Hoeijmakers JH, Houtsmuller AB, and Vermeulen W (2004) DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. *J Cell Biol*, **166**, 27-36.
151. van der Horst GT, van SH, Berg RJ, van Gool AJ, de WJ, Weeda G, Morreau H, Beems RB, van Kreijl CF, de Gruijl FR, Bootsma D, and Hoeijmakers JH (1997) Defective transcription-coupled repair in Cockayne syndrome B mice is associated with skin cancer predisposition. *Cell*, **89**, 425-435.
152. van der Pluijm I, Garinis GA, Brandt RM, Gorgels TG, Wijnhoven SW, Diderich KE, de Wit J, Mitchell JR, van Oostrom C, Beems R, Niedernhofer LJ, Velasco S, Friedberg EC, Tanaka K, van Steeg H, Hoeijmakers JH, and van der Horst GT (2007) Impaired genome maintenance suppresses the growth hormone--insulin-like growth factor 1 axis in mice with Cockayne syndrome. *PLoS Biol*, **5**, e2.
153. van Gool AJ, Citterio E, Rademakers S, van Os R, Vermeulen W, Constantinou A, Egly JM, Bootsma D, and Hoeijmakers JH (1997) The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. *EMBO J*, **16**, 5955-5965.
154. van Hoffen A, Natarajan AT, Mayne LV, van Zeeland AA, Mullenders LH, and Venema J (1993) Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells. *Nucleic Acids Res*, **21**, 5890-5895.
155. Venema J, Mullenders LH, Natarajan AT, van Zeeland AA, and Mayne LV (1990) The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4707-4711.
156. Ververis K and Karagiannis TC (2011) Potential non-oncological applications of histone deacetylase inhibitors. *Am J Transl Res*, **3**, 454-467.
157. Wang GL and Semenza GL (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **270**, 1230-1237.
158. Wang XW, Yeh H, Schaeffer L, Roy R, Moncollin V, Egly JM, Wang Z, Freidberg EC, Evans MK, and Taffe BG (1995) p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet*, **10**, 188-195.
159. Weeda G, Rossignol M, Fraser RA, Winkler GS, Vermeulen W, van't Veer JC, Ma L, Hoeijmakers JH, and Egly JM (1997) The XPB subunit of repair/transcription factor TFIIH directly interacts with SUG1, a subunit of the 26S proteasome and putative transcription factor. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2274-2283.

160. Weidenheim KM, Dickson DW, and Rapin I (2009) Neuropathology of Cockayne syndrome: Evidence for impaired development, premature aging, and neurodegeneration. *Mech Ageing Dev*, **130**, 619-636.
161. Welsh JP, Yuen G, Placantonakis DG, Vu TQ, Haiss F, O'Hearn E, Molliver ME, and Aicher SA (2002) Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. *Adv Neurol*, **89**, 331-359.
162. Wenger RH, Stiehl DP, and Camenisch G (2005) Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*, **2005**, re12.
163. Wessels NK (1964) DNA synthesis, mitosis, and differentiation in pancreatic acinar cells in vitro. *J Cell Biol*, **20**, 415-433.
164. Wilkinson KD (2000) Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol*, **11**, 141-148.
165. Wilson DM and Bohr VA (2007) The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)*, **6**, 544-559.
166. Wilson MR (1998) Apoptosis: unmasking the executioner. *Cell Death Differ*, **5**, 646-652.
167. Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, Guimaraes A, Marinelli B, Wikstrom JD, Nir T, Clish CB, Vaitheesvaran B, Iliopoulos O, Kurland I, Dor Y, Weissleder R, Shirihai OS, Ellisen LW, Espinosa JM, and Mostoslavsky R (2010) The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell*, **140**, 280-293.

Anhang

Danksagung

Mein Dank gilt all denjenigen, die die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jean Krutmann für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, das rege Interesse an meiner Forschungstätigkeit und die konstruktiven und motivierenden Gespräche.

Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Darüber hinaus möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Dr. Marc Majora bedanken. Von seiner wissenschaftlichen Erfahrung durfte ich immens profitieren und danke ihm für die tolle Betreuung während der letzten drei Jahre.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Kollegen Dr. Christine Götz, Kevin Sondenheimer, Maren Schneider, Ingo Uthe und Elisabeth Springer für die großartige Zusammenarbeit und ihre technische Unterstützung.

Den ehemaligen Mitarbeitern der AG Krutmann und dem Team der AG Haendeler danke ich für die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Ebenfalls möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. Ellen Fritsche und ihren Mitarbeiterinnen Dr. Marta Barenys und Janette Schuwald bedanken – ihre Unterstützung bei der Durchführung der Neurosphären-Experimente war extrem beeindruckend.

Vielen Dank auch an Frau Dr. Heike Heuer und Dr. Sigrun Horn vom Fritz-Lipmann-Institut in Jena dafür, dass sie ihre cerebellare Expertise mit mir geteilt und mir einen Forschungsaufenthalt an ihrem Institut ermöglicht haben.

Dem Graduiertenkolleg GRK 1033 (Molecular Targets of the Aging Process and Strategies for the Prevention of Aging) danke ich für die finanzielle Unterstützung und die Ermöglichung, meine Forschungsergebnisse auf diversen internationalen Konferenzen zu präsentieren. Den Institutionen iGRAD und dem Selma-Meyer-Mentoring der HHU Düsseldorf verdanke ich ein herausragendes Qualifizierungsprogramm.

Zuletzt möchte ich ein ganz liebes „Vergelt’s Gott“ meiner Familie aussprechen – ohne die Unterstützung von meinem Mann, meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde noch keiner anderen Fakultät vorgelegt. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 15. Juni 2012

Christine Schumacher