

Die Rolle des Homeobox-Transkriptionsfaktors TOX3 in neuronalen Progenitor-Zellen und Stammzellen



Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Zsuzsa Kaiser geb. Kovács
aus Dresden

Düsseldorf, den 27.05.2013

Angefertigt am Institut für Neurologie
der Universitätsklinik an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Herr Prof. Dr. Axel Methner
Koreferent: Herr Prof. Dr. Hermann Aberle

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2013

“Before the full potential of neural stem cells can be realized, we need to learn what controls their proliferation, as well as the various pathways of differentiation available to their daughter cells” (Gage, 2000).

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Stammzellen.....	1
1.1.1 Neurale Stammzellen im zentralen Nervensystem	3
1.1.2 Neurale Progenitor-Zellen <i>in vivo</i>	4
1.1.3 Neurale Progenitor-Zellen <i>in vitro</i>	5
1.1.4 Nestin, ein potentieller Stammzellmarker.....	7
1.1.5 Weitere spezifische Zelltyp- und Stammzellmarker	8
1.1.6 Die Rolle des Notch-Signalweges im zentralen Nervensystem	9
1.1.7 Die Rolle des TGF β -Signalweges im zentralen Nervensystem.....	10
1.1.7.1 Die TGF β -Signalkaskade	11
1.1.7.2 Verschiedene Funktionen von TGF β	12
1.2 Glioblastome	13
1.2.1 Glioblastom-Stammzell-Theorie	13
1.2.2 Glioblastom - Subpopulationen zur besseren Charakterisierung.....	14
1.3 TOX3, ein Mitglied der Homeobox-Proteine.....	15
1.3.1 Aufbau von TOX3	16
1.3.2 TOX3, ein neuronaler Transkriptionsfaktor	17
1.3.3 Vorkommen von TOX3 in der sich entwickelnden Maus.....	18
1.3.4 Potentielle Rolle von TOX3 in diversen Krankheitsbildern	19
2. Zielsetzung dieser Arbeit	21
3. Materialien	22
3.1 Chemikalien.....	22
3.2 Enzyme	22
3.2.1 Restriktionsenzyme.....	22
3.2.2 Diverse Enzyme.....	22
3.3 Kits.....	22
3.4 Antikörper	23
3.4.1 Primärantikörper.....	23
3.4.2 Sekundärantikörper	24
3.5 Medien	24
3.5.1 Medium für Bakterien.....	24
3.5.2 Medium für Zellkultur	25
3.6 Puffer und Lösungen	26
3.7 Bakterien	26
3.7.1 Escherichia Coli (<i>E.coli</i>)	26
3.7.2 One Shot [®] ccdB Survival [™]	27
3.8 Primärkulturen und immortalisierte Zelllinien.....	27
3.8.1 Neurale Progenitor-Zellen (NPCs).....	27
3.8.2 Neuro-2a (N2a)	27
3.8.3 CHO	27
3.8.4 HEK-293GP	27
3.8.5 Glioblastom-stammzellähnliche Zelllinien (GS7, GS8 und GS9)	27
3.9 Tiere	28
3.10 Plasmide	28
3.10.1 Expressionsplasmide.....	28
3.10.2 Reporter-Plasmide	29
3.10.3 ENTR [™] Plasmide	29
3.10.4 shRNA-Plasmide.....	30
3.11 Oligonukleotide.....	30
3.11.1 Primer für Klonierungen	30

3.11.2 RT-PCR Primer und Probes.....	30
3.12 Generierung der TOX3-K29A-Mutante	31
3.13 Geräte.....	32
3.14 Computerprogramme	33
3.14.1 NEBCutter	33
3.14.2 Graph Pad Prism 0.5	33
3.14.3 ImageJ	33
3.14.4 BD AttoVision Version 1.7/855	34
3.14.5 Photoshop und MS Office Programme	34
4. Methoden.....	35
4.1 Zellkulturtechniken	35
4.1.1 Primärkultur	35
4.1.2 Glioblastom-stammzellähnliche-Zelllinien.....	36
4.1.2.1 Generierung von stabilen Glioblastomen.....	36
4.1.3 Immortalisierte Zelllinien.....	37
4.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	37
4.1.5 Transiente Transfektion.....	38
4.1.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	38
4.1.7 Proliferationsassay (Celltiterblue® -Test)	38
4.2 Molekularbiologische Techniken	39
4.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien	39
4.2.2 Transformation von <i>E. coli</i>	39
4.2.3 DNA-Isolierung.....	40
4.2.4 RNA-Isolierung	40
4.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration	41
4.2.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten über Agarose-Gelelektrophorese.....	41
4.2.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	42
4.2.8 DNA-Restriktionsanalysen	42
4.2.9 Ligation.....	42
4.2.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	43
4.2.11 Klonierung.....	44
4.2.12 Reverse Transkription (komplementäre DNA).....	45
4.2.13 Quantitative PCR (RT-PCR).....	46
4.2.14 <i>In situ</i> Hybridisierung gegen TOX3.....	46
4.3 Proteinbiochemische Techniken.....	47
4.3.1 Herstellung und Aufreinigung eines rekombinanten Fusionsprotein mit GST- Anhang.....	47
4.3.2 Extraktion von Proteinlysaten.....	49
4.3.3 Quantitative Proteinbestimmung.....	49
4.3.4 SDS-Polyacrilamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
4.3.5 Immunoblot (IB).....	50
4.3.6 Immunpräzipitation (IP).....	50
4.3.7 <i>In situ</i> Ko-Immunpräzipitation (InCell-Ko-IP)	51
4.3.8 Immunhistochemie/ Immunzytochemie	52
4.3.9 Stimulationsagenzien.....	53
4.3.10 Luminometrie	54
4.3.10.1 Dual-Luziferase Verfahren	54
4.3.10.2 LUMIER (Luminescence-based mammalian interactome mapping technology)-Screen	55
5. Ergebnisse.....	57
5.1 Generierung und Charakterisierung TOX3-spezifischer Antikörper	57
5.2 TOX3 ist im Mausembryo am Entwicklungstag 13.5 (E13.5) am stärksten exprimiert.....	59

5.2.1 Ähnliches Expressionsprofil zwischen TOX3 und Mushashi1 in der subventrikulären Zone detektiert	60
5.3 TOX3-Vorkommen in dem Tiermodell „ <i>Danio rerio</i> “	61
5.4 TOX3 wird in NPCs exprimiert	62
5.4.1 TOX3 wird hauptsächlich im Nukleus von Neurosphären exprimiert	64
5.4.2 TOX3 wird in Nestin-positiven Zellen exprimiert.....	65
5.4.3 TOX3 wird durch Mitglieder des Notch-Signalweges beeinflusst.....	67
5.4.4 TOX3 hat einen positiven Effekt auf die Nestin-Promoteraktivität, welcher durch die Mitglieder des Notch-Signalweges beeinflusst wird.....	68
5.4.5 TGF β reprimiert die TOX3-Expression auf mRNA-Ebene und Proteinebene.....	69
5.4.6 Herunterregulierung von TOX3 in NPCs mit <i>small hairpin</i> RNAs.....	71
5.5 Entdeckung potentieller Interaktionspartner durch den LUMIER-Screen	72
5.5.1 Endogenes HDAC1 interagiert mit TOX3 in NPCs	74
5.5.2 Trichostatin A (TSA) reprimiert die TOX3-Expression	76
5.5.3 TSA hat toxischen Effekt auf NPCs und inhibiert positiven Effekt von TOX3 auf Nestin-Promoter	78
5.5.4 TOX3-Mutante ist instabil	80
5.6 Entdeckung von TOX3 in Glioblastom-stammzellähnlichen Linien über Screen-Verfahren	81
5.6.1 Nachweis von TOX3-Expression in Glioblastom-stammzellähnlichen Linien	82
5.6.2 TOX3 beeinflusst die Zellproliferation in Glioblastom-stammzellähnlichen Zellen negativ	83
5.6.3 Herunterregulierung von TOX3 zeigt keine Veränderung auf die Zellproliferation ..	84
5.6.4 Stabile SH#3-Linie zeigt geringere Zellzahl und spindelförmigere Morphologie.....	86
5.6.5 Stabile GS7-YFP-TOX3 Zelllinie zeigt veränderte Morphologie	88
5.6.6 TOX3-Expression verringert Proliferationsverhalten.....	89
6. Diskussion	91
6.1 Hohe TOX3-Expression in E13.5 Mäusen	91
6.2 TOX3 zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie Musashi1.....	92
6.3 TOX3 hauptsächlich in proliferierenden Nestin-positiven Zellen	92
6.4 Die TOX3-Expression wird durch Faktoren, die die Differenzierung induzieren negativ beeinflusst.....	94
6.4.1 Potentielle TOX3-Reprimierung durch Zellveränderung	94
6.5 TOX3 interagiert mit HDAC1, ein Ko-Regulator zwischen Neurogenese und Gliogenese	95
6.5.1 Die potentielle Wechselwirkung zwischen HDAC1 und TOX3	96
6.5.2 Einfluss von Trichostatin A auf HDAC1 und TOX3.....	96
6.5.3 Potentielle Einfluss von TOX3 auf Zellsterberate	98
6.5.4 TOX3-Reprimierung durch TSA zeigt Morphologieveränderung	99
6.5.5 Punktmutante von TOX3 ist instabil	99
6.6 TOX3 verringert Proliferationsrate in Glioblastom-Linien	100
6.7 Stabile TOX3 Glioblastom-Linie zeigt reduzierte Neurosphärenbildung	101
7. Zusammenfassung	103
8. Summary	105
9. Anhang	107
9.1 Abkürzungsverzeichnis.....	107
9.2 Abbildungsverzeichnis.....	109
9.3 Tabellenverzeichnis.....	110
9.4 Literaturverzeichnis.....	111
9.5 Lebenslauf	122
9.6 Danksagung	123
9.7 Erklärung	125

1. Einleitung

1.1 Stammzellen

Allgemein sind Stammzellen eine Population von Körperzellen, die die Fähigkeit haben sich unbegrenzt zu erneuern (prolifrieren) und in verschiedene Zelltypen auszureifen (differenzieren). Dabei wird zwischen totipotenten, pluripotenten und multipotenten Stammzellen unterschieden. Die totipotente Stammzelle, wie die befruchtete Eizelle zeichnet sich dadurch aus, dass sie in geeigneter Umgebung, der Gebärmutter, fähig ist zu einem vollständigen Organismus heranzuwachsen. Die pluripotente Stammzelle wiederum, wie die Embryonale Stammzelle (ES-Zelle) besitzt die Fähigkeit in jede Zelle eines Organs zu differenzieren, außer dem Trophoplast der Plazenta. Die Quelle der ES-Zellen ist die Blastozyste, die während der Embryonalentwicklung (Embryogenese) im Blastozystenstadium (Blastulation) gebildet wird (Ulfig, Kurzlehrbuch, 2005). Nach der Blastulation folgt die Gastrulation. Sie beginnt mit einer u-förmigen Einstülpung der Blastozyste, die drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) entstehen lässt. Durch den Ursprung aus den drei Keimblättern wird unterschieden zwischen neuralen Stammzellen, die dem Ektoderm entspringen, Stammzellen des Pankreas, die aus dem Endoderm entspringen und Stammzellen des Blutes und Immunsystems, die aus dem Mesoderm entspringen. Sie werden als multipotente Stammzellen bezeichnet, da sie nur noch ein begrenztes Repertoire an Ausdifferenzierungsmöglichkeiten in einen speziellen Zelltyp besitzen (Hall und Watt, 1989; Weissmann, 2000). Generell sind Stammzellen für die Regeneration eines Gewebes von besonderer Wichtigkeit. Im Laufe eines Lebens nimmt jedoch die Anzahl von Stammzellen ab und lässt damit Krankheiten entstehen. Die Wissenschaft ist dementsprechend bemüht die Mechanismen der Selbsterneuerung zu klären, um den Regenerierungsprozess und damit den Erhalt der Stammzellhaftigkeit aufrechtzuerhalten. Die ES-Zelle besitzt die unbegrenzte Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung in jeden Zelltyp. Daher scheint besonders sie attraktiv für die Wissenschaft zu sein. Ihre klinische Anwendung ist jedoch umstritten. Zum einen gilt die Blastozyste als früher Embryo, welcher unter den Würdeschutz des Menschen im Grundgesetz fällt und damit ethisch in Frage gestellt wird (Günther et al., 2008a). Ebenso führen Transplantationsversuche von ES-Zellen zu unvorhergesehenen Tumorbildungen (Teratomen), Fehlbildungen und zu starken Immunreaktionen (van der Bogt et al., 2006, Salem und Thiernemann, 2010). Der Grund liegt in der Oberflächenstruktur und den darauf befindlichen Histokompatibilitäts-Antigenen, die Zell- und Gewebsspezifisch sind. Die Empfängerzelle erkennt das Transplantat als Fremdkörper und stößt es ab. Neben den ES-

Zellen bilden daher die sogenannten Progenitor-Zellen oder Precursor-Zellen eine Alternative. Diese vordifferenzierten Zellen, stammen aus der asymmetrischen Teilung der multipotenten Stammzelle ab und verfügen über eine begrenzte Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Gage, 2000). Hierdurch fallen sie nicht unter das Embryonenschutzgesetz und ihre begrenzte Proliferationsrate verringert die Tumorigenität. Progenitor-Zellen des Nervensystems bilden weitere neuronale oder gliale Progenitor-Zellen mit begrenzter Zellteilung aus, die sich schließlich in funktionstüchtige Neurone oder Astrozyten bzw. Oligodendrozyten ausdifferenzieren. Besonders in den letzten 10 Jahren konnte eine dynamische Entwicklung auf dem Gebiet der Stammzellforschung verzeichnet werden. Diese führte dazu, dass verschiedene Nomenklaturen von Stammzelle und Progenitor- oder Precursor-Zelle akzeptiert worden sind, sodass in einigen Veröffentlichung die Progenitor-Zelle synonym zur Stammzelle oder wie die Vorläuferzelle des blutbildenden Systems beschrieben steht.

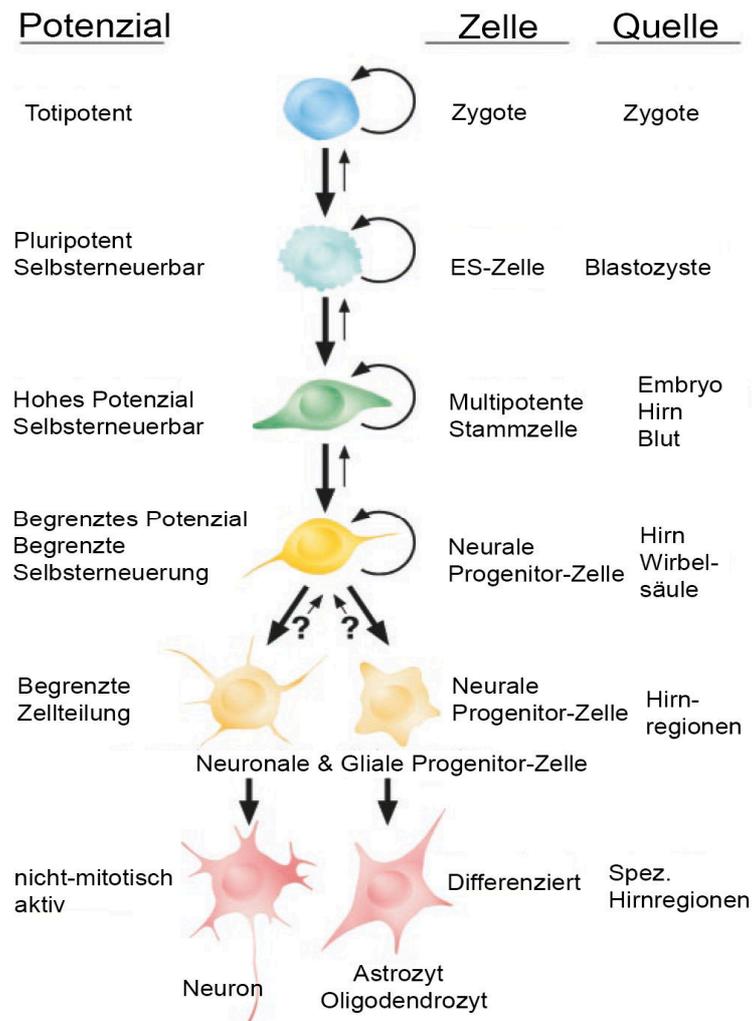


Abbildung 1: Stammzellklassen die zur Nervenzellbildung beitragen. Schematische Darstellung über die verschiedenen Klassen von Stammzellen in Hinblick auf neurale Kapazität. Die befruchtete Eizelle (Zygote) gilt als totipotente Stammzelle, die einen gesamten Organismus entstehen lässt. Die aus der Blastozyste gewonnene Embryonale Stammzelle (ES-Zelle) kann in jede Zelle eines Organs differenzieren, daher wird sie als pluripotent bezeichnet. Die multipotente Stammzelle kann sich je nach Ursprungsgewebe (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm) in einen speziellen Zelltyp differenzieren und ist unbegrenzt zur Selbsterneuerung fähig. Neurale Progenitor-Zellen mit begrenzter Fähigkeit zur Selbsterneuerung bilden neuronale und gliale Progenitor-Zellen, die wiederum zu Neuron bzw. Astrozyt oder Oligodendrozyt differenzieren. Modifizierte Abbildung von Gage, 2000.

1.1.1 Neurale Stammzellen im zentralen Nervensystem

Lange Zeit wurde der Glaube verbreitet, dass neurale Stammzellen ausschließlich in der frühen Embryogenese existieren. In den 60er Jahren konnte dies durch Altman und seine Mitarbeiter revidiert werden. Er wies nach, dass die Nervenzellbildung (Neurogenese) auch nach der Geburt (postnatal) im Hippokampus stattfindet (Altman und Das, 1965). Weitere Isolierungsversuche zeigten, dass die Neurogenese im zentralen Nervensystem auf zwei Regionen begrenzt ist. Sowohl die subventrikuläre Zone des lateralen Ventrikels als auch die subgranuläre Zone des Gyrus Dentatus im Hippokampus enthalten neurale Stammzellen,

wodurch noch im adulten Alter die Neurogenese stattfinden kann (Morshead et al., 1994; Weiss et al., 1996; Palmer et al., 1997). Besonders in der subventrikulären Zone konnten retrovirale und Nukleosid-Markierungsversuche zeigen, dass verschiedene Zellpopulationen existieren (Morshead et al., 1994), wie Neurone, Gliazellen und weitere proliferierende Zellen (Doetsch et al., 1997). Diese Region wird daher besonders als Stammzellnische angesehen (Noctor et al., 2004). Mit zunehmenden Alter nimmt die Anzahl an neuralen Stammzellen ab (Alvarez-Buylla et al., 2001). Die auftretenden Degenerationen von Neuronen (z.B. Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson) oder Entzündungen des Nervensystems (z.B. Multiple Sklerose) sind nur einige neurodegenerative Erkrankungen, deren Hoffnung auf Heilung in der regenerativen Medizin steckt (Kolios und Moodley, 2013). Das Potenzial von neuralen Stammzellen und die Regulierungsmechanismen die dazu dienen die Proliferation aufrecht zu erhalten, sind bislang nicht geklärt. Weitere Charakterisierungsstudien sind daher erforderlich um sie als mögliche Therapieform gezielt einsetzen zu können.

1.1.2 Neurale Progenitor-Zellen *in vivo*

Neurale Stammzellen werden schon früh in der Embryogenese, beginnend mit der Bildung des Neuralrohrs (Neurulation) gebildet. Sie treiben die Ausbildung des zentralen Nervensystems und des peripheren Systems an. Die aus dem Neuralrohr abstammenden epithelialen-Zellen bilden dabei die neuralen multipotenten Stammzellen, die durch asymmetrische Teilung neurale Progenitor-Zellen hervorbringen, die eine wichtige Ressource zur Aufrechterhaltung des zentralen Nervensystems darstellen. In der frühen Embryonalentwicklung geht die neurale Progenitor-Zelle zunächst eine symmetrische Zellteilungsphase ein, die zwei identische Zellen hervorbringt. Dies führt zu einer extensiven Proliferation innerhalb der ventrikulären Zone. Im weiteren Verlauf der Entwicklung findet die asymmetrische Zellteilung statt, die gleichzeitig den Beginn der Neurogenese darstellt und die subventrikuläre Zone ausbildet (Morshead et al., 1994; Doetsch et al., 1997; Morshead et al., 1998; Noctor et al., 2004). Hierbei gehen aus einer Zelle, eine neurale und eine basale Progenitor-Zelle oder auch ein unreifes Neuron hervor. Die basale Progenitor-Zelle migriert in die subventrikuläre Zone, wo sie sich weiter teilt um anschließend erneut zwei Neurone zu generieren, die in die kortikale Platte einwandern. Das unreife Neuron indessen migriert ohne Zellteilung in den Kortex, während die weiterhin mitotisch-aktive Progenitor-Zelle dazu dient die Proliferationsrate aufrecht zu erhalten. Die wiederholte asymmetrische Zellteilung trägt zur Bildung unterschiedlicher Neurone bei und damit zur Entwicklung des Kortex (Mérot et al., 2009; Kageyama et al., 2009). Im weiteren

Entwicklungsverlauf findet eine Veränderung in Richtung Gliogenese statt, so dass Progenitor-Zellen gliale Zellen hervorbringen, die über die subventrikuläre Zone in den Kortex einwandern. Transplantationsversuche haben gezeigt, dass Zellen aus einer Gliogenese kommenden Region innerhalb einer neurogenen Hippokampusregion zur Neuronenbildung gebracht werden können (Horner et al., 2000). Dies zeigt, dass Faktoren von angrenzenden Zellen sezerniert werden und das Ursprungsverhalten von undifferenzierten oder vordifferenzierten Progenitor-Zellen verändern können. Der Übergang zwischen Neurogenese und Gliogenese ist demnach abhängig von der Entwicklungsdauer und der Umgebung.

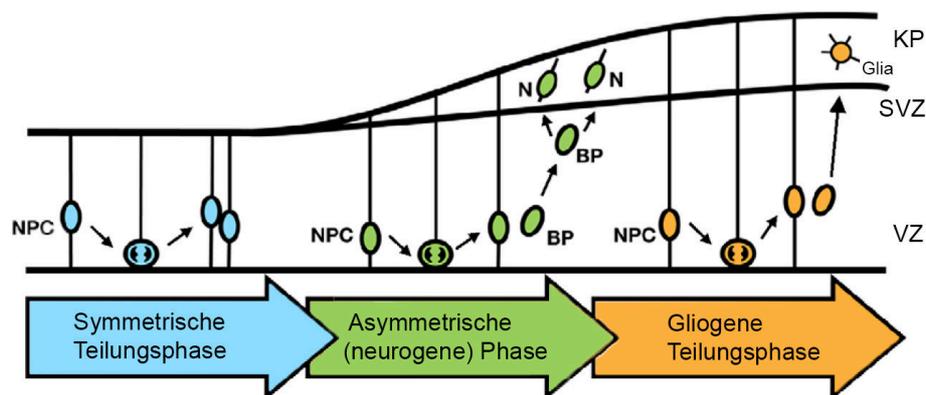


Abbildung 2: Proliferation und Differenzierung von neuronalen Progenitor-Zellen. Die schematische Darstellung zeigt, dass neuronale Progenitor-Zellen (NPCs) zur symmetrischen als auch asymmetrischen Zellteilung und Proliferation befähigt sind. In der symmetrischen Phase werden zwei identische Tochterzellen generiert, die zur Erhöhung der Proliferationsrate beitragen. Durch die asymmetrische Teilung differenziert eine Tochterzelle zur basalen Progenitor-Zelle (BP), die wiederum zwei Neurone (N) hervorbringt, die in die kortikale Platte (KP) einwandern. In der gliogenen Teilungsphase findet ebenfalls eine asymmetrische Zellteilung statt, die zur Bildung von Gliazellen beiträgt. Modifizierte Abbildung von Kageyama et al., 2009.

1.1.3 Neuronale Progenitor-Zellen *in vitro*

Um Einflüsse von Zytokinen bzw. anderen Faktoren auf neuronale Progenitor-Zellen zu untersuchen wird bevorzugt die *in vitro* Kultivierung nach Reynolds und Weiss (1992) verwendet. Ihnen gelang es erstmals neuronale Progenitor-Zellen aus der ganglionischen Eminenz (GE) zu isolieren und die optimalen Bedingungen der *in vitro* Kultivierung herauszufinden. Die GE ist als Vorläuferstruktur der subventrikulären Zone anzusehen und spielt damit eine Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystems von Säugetieren. Hierbei bildet sich aus der Innenseite des Vorderhirnbläschens eine Ganglienvorwölbung, die in zwei Regionen aufgeteilt werden kann. Die eine wird als mediale GE (MGE) bezeichnet, woraus das Pallidum hervorgeht, während die andere Region als laterale GE (LGE) bezeichnet wird, woraus sich das Striatum bildet. Neuronale Progenitor-Zellen werden durch Ausbildung von Globus pallidus und Putamen (beides Striatum) nach außen zu der ventrikulären Zone gedrängt und bilden im

weiteren Verlauf die subventrikuläre Zone (Noctor et al., 2004). Sowohl die dorsal-laterale ventrikuläre Zone, als auch die MGE und LGE enthalten neurale Progenitor-Zellen, deren differenzierte Neurone zum Kortex migrieren und dadurch an der Entwicklung des Kortex beteiligt sind (Kriegstein und Noctor, 2004).

Nach der Isolierung der neuralen Progenitor-Zellen und der Zugabe von Wachstumsfaktoren, wie dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, engl. *epidermal growth factor*) und dem basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF-2, engl. *basic fibroblast growth factor-2*) kommt es zu einer klonalen Aggregatsbildung dieser Zellen. Diese werden als Neurosphären bezeichnet und enthalten sowohl neurale als auch terminierte Progenitor-Zellen (Okano, 2002). Durch Dissoziation der Neurosphären und Rekultivierung in wachstumsfaktorhaltigem Medium werden terminierte Progenitor-Zellen ausselektiert. Die wiederholt entstehende Neurosphärenbildung zeigt rückwirkend, dass es sich um neurale Progenitor-Zellen handelt und nicht um terminierte Progenitor-Zellen (Bottai et al., 2003).

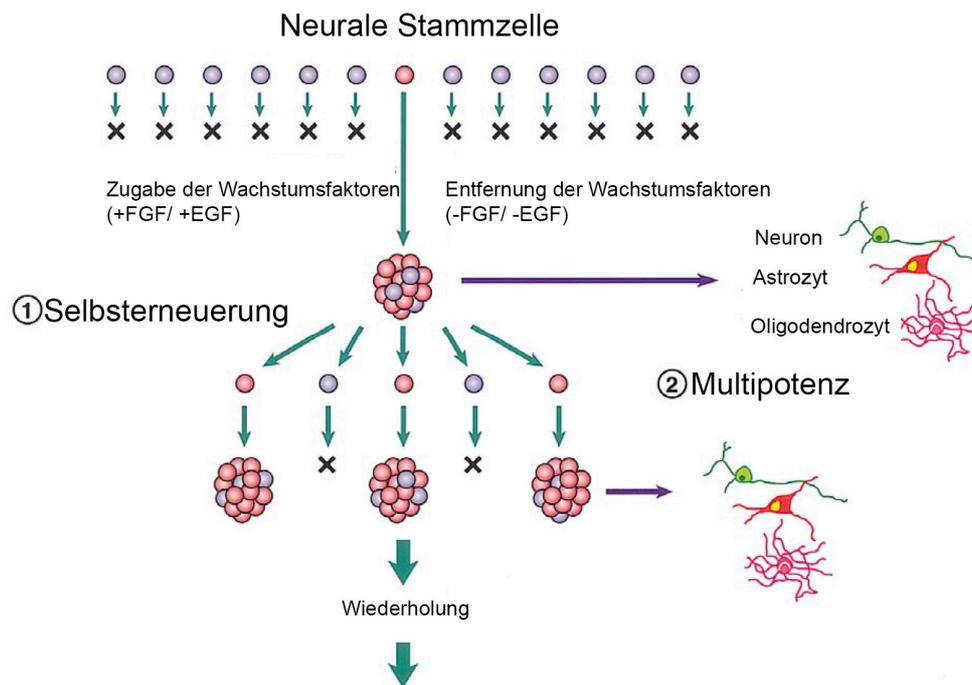


Abbildung 3: *In vitro* Kultivierung von neuralen Stammzellen. Dissoziierte Zellen aus der ganglionischen Eminenz (GE) werden unter serum-freien mit FGF- und EGF-haltigem Medium kultiviert. Unter diesen Bedingungen bilden sie klonale neurosphärenartige Aggregate, die frei im Medium schwimmen. Nach wiederholter Dissoziation bilden die einzelnen Zellen erneut Neurosphären (1). Durch asymmetrische Teilung werden sowohl multipotente neurale Progenitor-Zellen, als auch terminierte Progenitor-Zellen gebildet, die zu keiner weiteren Sphärenbildung befähigt sind (x). Wiederum durch Wachstumsfaktorentzug kommt es zur Ausdifferenzierung in die drei Hauptzelltypen des zentralen Nervensystems; Neuron, Astrozyt und Oligodendrozyt. Modifizierte Abbildung von Okano, 2002.

Die Sphärenbildung dient dazu die ursprüngliche physiologische Umgebung innerhalb des zentralen Nervensystems zu imitieren. Diese Aggregatsbildung wird dabei durch

Vorhandensein von Adhäsionsproteinen und extrazellulärer Matrix (EZM) unterstützt (Lobo et al., 2003). Die dreidimensionale Struktur ermöglicht den Zellen untereinander zu kommunizieren und durch Sezernierung von Faktoren das Neurosphärenwachstum zu fördern. Durch wiederholtes dissoziieren werden terminierte Progenitor-Zellen ausselektiert, um den Erhalt von neuronalen Progenitor-Zellen zu fördern. Ein wichtiger Faktor spielt dabei die Größe der Sphäre. Hierdurch kann die Diffusionsgeschwindigkeit in den innersten Zellverband beeinträchtigt und ungewollt zum Zellsterben oder zum Ausdifferenzieren führen. Demzufolge werden sie auch auf beschichtete Kulturschalen als Einzelschicht unter wachstumsfaktorhaltigen Bedingungen kultiviert. In dieser Arbeit wurde zumeist die adhärierende Einzelschicht bevorzugt eingesetzt um den Einfluss verschiedener stimulierender Agenzien zu untersuchen. Einfachheitshalber werden die neuronalen Progenitor-Zellen in dieser Arbeit in ihrer Kurzschreibweise als NPCs (*engl. neural progenitor cells*) weitergeführt.

1.1.4 Nestin, ein potentieller Stammzellmarker

Zur Identifizierung neuraler Stammzellen wird der Stammzellmarker Nestin verwendet (Hockfield und McKay, 1985; Lendahl et al., 1990; Wiese et al., 2004). Nestin wurde erstmals in neuroepithelialen Stammzellen der Ratte (Lendahl et al., 1990), anschließend im Menschen (Dahlstrand et al., 1992) und der Maus entdeckt (Yang et al., 2001). Durch Thymidin - Autoradiographie und durchflusszytometrische Analysen konnte gezeigt werden, dass das zur Klasse VI der intermediären Proteinfilamente gehörende Protein in Regionen von sich differenzierenden Zellen vorkommt (Frederiksen und McKay, 1988; Dahlstrand et al., 1995; Michalczyk und Ziman, 2005). Die subventrikuläre Zone, die als Stammzellnische gilt enthält besonders Nestin-exprimierende Populationen. Hierbei finden sich neben den neuronalen Stammzellen, als auch Progenitor-Zellen, die in der Literatur als Astrozyten-ähnliche radiale Gliazellen beschrieben werden (Frederiksen und McKay, 1988). Diese Zellen besitzen ebenfalls multipotente Eigenschaften im Gegensatz zu den klassischen Astrozyten. Beiden gemeinsam ist jedoch die Expression des gliären fibrillären aziden Proteins (GFAP, *engl. glial fibrillary acidic protein*) (Hockfield und McKay, 1985; Laywell et al., 2000). Während die Astrozyte nur eine stützende Funktion aufweist, ist die radiale Gliazelle zur asymmetrischen Teilung fähig und bringt unter anderem Neurone hervor (Malatesta et al., 2000; Noctor et al., 2001). In Folge der Differenzierung in Richtung Neuron oder Astrozyt, wird Nestin durch andere Neurofilamente ersetzt (Frederiksen und McKay, 1988; Dahlstrand et al., 1992; Dahlstrand et al., 1995). Dies beweist, dass Nestin hauptsächlich in mitotisch-aktiven Zellen

mit Stammzellpotenzial vorliegt. Weitere Nestin-exprimierende Mikroglia-Zellen (Takamori et al., 2009) und eine kleine Population von GFAP-exprimierenden Zellen im Neocortex (Ernst und Christie, 2006) bilden dabei die Ausnahme.

1.1.5 Weitere spezifische Zelltyp- und Stammzellmarker

Zur weiteren Identifizierung von Zelltypen im Nervensystem sind Marker notwendig, die charakteristisch zwischen den drei Zelltypen; Astrozyt, Neuron und Oligodendrozyt unterscheiden können. Als Neuronen-spezifischer Marker gilt unter anderem das mikrotubulär-assoziierte Protein-2 (MAP-2, *engl. microtubule-associated protein 2*). MAP-2 reguliert die Stabilität und Struktur der Mikrotubuli, die neuronale Morphogenese, die Dynamik des Zytoskeletts, sowie die Organellenweiterleitung in Axone und Dendriten (Sánchez et al., 2000). Ein weiterer wichtiger Bestandteil in Neuronen bilden die zur dritten Klasse gehörenden β -Tubuline (β -TubulinIII). Sie sind wichtige Bestandteile des Mikrotubuli-Netzwerkes, die durch Bildung von Heterodimeren mit der α -Tubulin Untereinheit helikale Hohlkörper bilden, wodurch sich sogenannte Mikrotubuli zusammenlagern. Durch das dynamische Mikrotubuli-Netzwerk werden zytoplasmatische Transporte von Vesikeln, Chromosomen-Verteilungen in der Meiose/Mitose und Axon-Migration von Neuronen möglich gemacht (Westermann und Weber, 2003). Ein weiterer Zelltyp bildet die Oligodendrozyte. Dieser gliäre Zelltyp weist viele Zellfortsätze auf, die das Oberflächen-Antigen Sulfatid O4 präsentieren (Sommer und Schachner, 1981). Oligodendrozyten bilden die sogenannte Myelinschicht um die Fortsätze (Axone) von Neuronen zu umhüllen und sie so elektrisch zu isolieren. Wie bereits erwähnt, exprimieren sowohl reife Astrozyten als auch multipotente radiale Gliazellen GFAP, die sich durch Doppelfärbung mit dem Nestin-Stammzellmarker voneinander unterscheiden lassen (Doetsch et al., 1999; Laywell et al., 2000; Rieske et al., 2007). Astrozyten machen dabei den größten Teil, der im Gehirn vorkommenden Zelltypen aus. Sie unterstützen Neurone und versorgen sie zugleich mit Nährstoffen. Das nachweislich gliäre Intermediärfilament dient dazu die Morphologie zu unterstützen und bewirkt gleichzeitig die Beweglichkeit der Zelle (Eng et al., 2000). Der nukleäre Transkriptionsfaktor PAX6 (*engl. paired-box gene 6*) wird wiederum als stammzellspezifischer Marker angesehen, welcher hauptsächlich die Proliferation, Differenzierung und Migration von Astrozyten reguliert (Maekawa et al., 2005; Sakurai und Osumi, 2008). Prominin (auch CD133) wird ebenfalls als stammellspezifischer Marker eingesetzt (Kania et al., 2005). Prominin gehört zur Familie von Oberflächen-Glykoproteinen, die sowohl in normalen als auch in diversen Krebs-Zelltypen hochreguliert vorkommen (Florek

et al., 2005). Das promyelozytische Leukämieprotein PML (*engl. promyelocytic leukemia protein*) spielt eine Rolle in der Regulation von Zellteilungen, Differenzierung von NPCs (Regad et al., 2009) und fungiert als Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor (Li et al., 2009). Zu den Stammzellmarkern wird ebenfalls das RNA-bindende Protein Musashi1 gezählt. Es reguliert die Expression von Ziel-mRNA auf Translationsebene und spielt eine Rolle in der Differenzierung und dem Erhalt von Stammzellen im zentralen Nervensystem (Lan et al., 2010). Durch Einsetzung dieser Marker ist es möglich Aufschluss über die Zelltypen und ihr Stammzellpotenzial zu gewinnen.

1.1.6 Die Rolle des Notch-Signalweges im zentralen Nervensystem

Eine wichtige Eigenschaft von Stammzellen ist die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, welche durch den Notch-Signalweg gefördert wird. Wie in der Literatur beschrieben, ist der Notch-Signalweg in viele Prozesse der Säugetierentwicklung involviert (Artavanis-Tsakonas et al., 1999), insbesondere in der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Erstmals wurde das Notch-Gen in der Fruchtfliege (*D. melanogaster*) nachgewiesen. Der als 300 kDa große Transmembranrezeptor enthält extrazelluläre epidermale Wachstumsfaktoranhänge, die mit den Domänen von Notch-Liganden (Delta und Jagged in Vertebraten; Delta und Serrate in *D. melanogaster*; LAG2 und APX-1 in *C. elegans*) interagieren. Bislang wurden vier Notch-Gene (Notch 1-4) und fünf Liganden in Vertebraten (Jagged 1 und 2; Delta 1, 2 und 3) identifiziert (Ohishi et al., 2000). In Folge einer neuronalen Differenzierung werden neurale Gene, wie die basischen Helix-Loop-Helix (bHLH, *engl. basic helix-loop-helix*) Transaktivatoren Mash1 bzw. Neurogenin2 exprimiert (Kageyama et al., 2007). Sie induzieren die Expression des Liganden Delta, der wiederum sezerniert wird um an den Notch-Rezeptor der Nachbarzelle zu binden. Diese Interaktion führt zu zwei Spaltungen, zum einen durch die extrazelluläre Metalloprotease ADAM die außerhalb der Transmembrandomäne von Notch spaltet (Brou et al., 2000), zum anderen zur proteolytischen Spaltung innerhalb der Transmembrandomäne durch Presenilin-1, einem Enzym innerhalb des γ -Sekretasekomplexes (Mumm et al., 2000; Fortini, 2001). Hierdurch wird die intrazelluläre Domäne von Notch abgespalten und wandert in den Nukleus, wo es zu einer Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor RBPj kommt. Dieser als Transkriptionsaktivator agierende Komplex, induziert wiederum die Transkriptionsrepressoren zur HES-Familie (*engl. hairy/enhancer split*) gehörende *Hes1* und *Hes5* Gene, wodurch die neuronale Differenzierung dieser Zelle inhibiert wird (Kageyama et al., 2007). Demzufolge führt eine Differenzierung in ein Neuron dazu, dass durch Zell-Zell

Interaktion mit der Nachbarzelle der vorhandene Notch-Rezeptor angeregt wird für den Erhalt der neuralen Stammzelle zu sorgen (Hitoshi et al., 2002; Alexson et al., 2006; Kageyama et al., 2009). Dieser Prozess kann durch den γ -Sekretase-Inhibitor DAPT (engl. *N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester*) gehemmt werden, wodurch die Verteilung von neuronalen Zytoskelett-Proteinen und damit die neuronale Differenzierung gefördert wird (Kanungo et al., 2008).

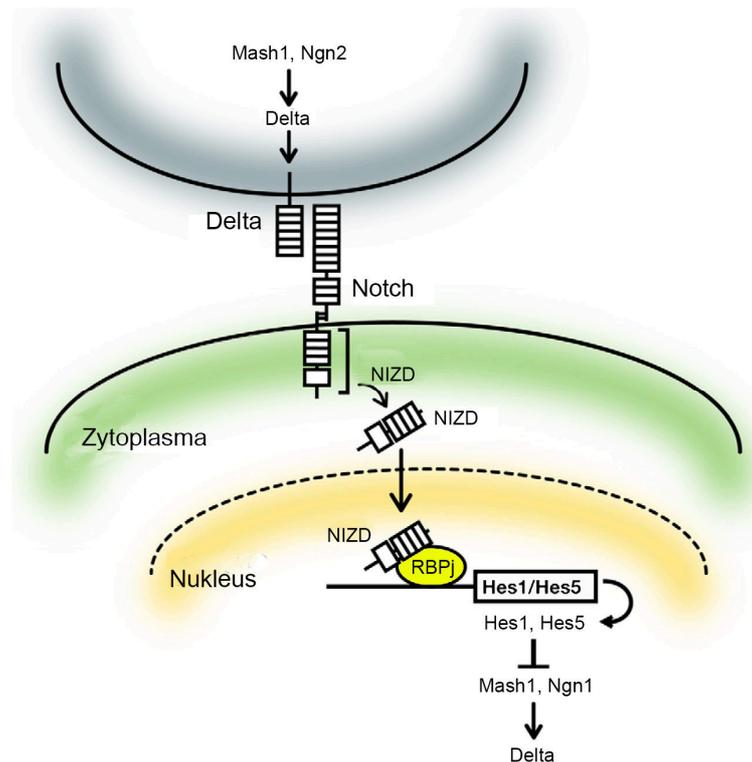


Abbildung 4: Der Notch-Signalweg. Schematische Darstellung des Signalweges, der durch den Liganden Delta durch Zell-Zellkontakt mit dem Notch-Rezeptor aktiviert wird. Die intrazelluläre Domäne von Notch (NIZD) wird durch Presenilin-1 abgespalten und wandert in den Nucleus, wo es zu einer Komplexbildung mit RBPj kommt. Hierdurch werden die Transkriptionsrepressoren *Hes1/Hes5* angeschaltet, die wiederum inaktivieren die weitere Expression des Delta-Liganden. Modifizierte Abbildung von Kageyama et al., 2009.

1.1.7 Die Rolle des TGF β -Signalweges im zentralen Nervensystem

Aus einigen Studien ist ebenfalls bekannt, dass der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF β , engl. *transforming growth factor beta*) an der Differenzierung von neuronalen Stammzellen beteiligt ist und zytoprotektive Eigenschaften mit sich bringt, wodurch ihm eine wichtige Rolle in der Gehirnentwicklung zuteil wird (Roussa et al., 2004; Vogel et al., 2010; Dobolyi et al., 2012).

Die Familie von TGF β s zählt zur Superfamilie von Wachstumsfaktoren, die mehr als 100 Proteine zu sich zählt. Mehr als 40 verschiedene Zytokine sind dabei in Säugetierzellen beschrieben. Neben den Zytokinen Aktivin, den knochenbildenden Proteinen (BMPs, *engl. bone morphogenetic proteins*) und den Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (GDFs, *engl. growth differentiation factors*), wird diese Superfamilie besonders durch die multifunktionelle Gruppe von TGF β s repräsentiert. Diese lassen sich in die drei Isoformen (TGF β 1-3) in Säugetierzellen klassifizieren (Böttner et al., 2000). Die Isoformen TGF β 2 und TGF β 3 sind dabei größtenteils in NPCs, sich differenzierender Neurone und in radialen Gliazellen vorhanden, während TGF β 1 hauptsächlich in mesenchymalen Zellen von Meningen vorkommt (Flanders et al., 1991; Miller, 2003). Wie oben beschrieben, gehören eine Vielzahl von Zytokinen zur Superfamilie von TGF β s, die wiederum in verschiedene Signalwege, wie in den Smad-Weg und in den Nicht-Smad-Weg, einschließlich Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Weg (MAPK-Weg), Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weg (PI3K-Weg)/AKT-Weg und Rho-ähnlichen GTPase Signalweg involviert sind (Shi und Massagué, 2003). Der hierdurch bestehende *Crosstalk* bewirkt die Vielzahl der Prozesse, einschließlich Zellwachstum, Differenzierung, Beweglichkeit und Zellsterben in die TGF β involviert ist.

1.1.7.1 Die TGF β -Signalkaskade

Die für die Signalweiterleitung benötigten Rezeptoren werden in drei Klassen eingeteilt: TGF β -Typ I (TGFR β I oder auch ALK, 53 kDa), TGF β -Typ II (TGFR β II, 70-100 kDa) und TGF β -Typ III (TGFR β III, 200-400 kDa). Besonders die Rezeptoren TGFR β I und TGFR β II kommen hierbei in fast jeder Säugetierzelle vor, einschließlich in Krebszellen (Massagué et al., 1992; Massagué und Weis-Garcia, 1996). Sie zählen zu den Glykoproteinen, die als transmembranständige Serin/Threonin-Proteinkinasen identifiziert wurden. Über ihre Cysteinereichen extrazellulären Domänen gehen sie eine Bindung mit einem Liganden ein, die zu einer Komplexbildung aus TGF β RI und TGF β RII führt und nachfolgend die Phosphorylierung von zytoplasmatischen Proteinen bewirkt. Die Kinase-Aktivität zwischen den Rezeptoren ist dabei unterschiedlich. Während TGF β RII konstitutiv aktiv ist, erfordert die Aktivierung von TGFR β I zunächst, dass der Ligand an TGFR β II bindet um sich schließlich an TGFR β I binden zu können. Durch eben diese Komplexbildung verursacht TGF β RII eine Konformationsänderung von TGFR β I, wodurch die Serin/Threonin-Kinase-Aktivität aktiviert wird (Dennler et al., 2002). Besonders die Transkriptionsfaktoren Smad2 bzw. Smad3 werden dabei in dem TGF β -

Signalweg phosphoryliert (Derynck, 1994). Diese zählen zur Familie von Smad-Proteinen (*engl. sma-mad-homology proteins*), die durch TGF β 1 phosphoryliert werden und dementsprechend zu den rezeptorregulierten (R)Smads zählen. Sowohl am N-terminalen, als auch am C-terminalen Ende der Smad-Proteine befinden sich jeweils zwei sogenannte MH1/MH2-Domänen (*engl. mad homology domains*). MH1 fungiert dabei als Bindeglied zur DNA, während MH2 mit weiteren regulatorischen Faktoren (Aktivatoren/Inhibitoren) eine Bindung eingehen kann (Shi et al., 1998). Nach Aktivierung der (R)Smads binden diese über ihre MH2-Domäne an Co-Smads (Smad4). Dieser Komplex wandert in den Nukleus um die Transkription von Zielgenen zu regulieren (Dennler et al., 2002). Durch Zugabe des selektiven Alk4,5,7-Inhibitors (*engl. activin receptor-like kinase*) SB431542 kann der TGF β /Smad-Signalweg wiederum inhibiert werden. SB431542 hemmt die katalytische Eigenschaft des TGF β I-Rezeptors, wodurch der Transkriptionsfaktor Smad2 nicht phosphoryliert werden kann (Callahan et al., 2002; Laping et al., 2002). Generell wird vermutet, dass die zelltypspezifische Verteilung der Rezeptoren, die Bindungsdauer der Liganden, sowie die Protein-Verteilung eine Rolle spielen, um die Wirkung bzw. die TGF β -Antwort zu erzeugen (Dennler et al., 2002).

1.1.7.2 Verschiedene Funktionen von TGF β

TGF β wird multiple Funktionen nachgesagt, unter anderem wurde es ursprünglich als „Sarkoma Wachstumsfaktor“ bezeichnet, da es das Wachstum in Nierenzelllinien von Ratten induzieren kann (Anzano et al., 1983). Seit seiner Entdeckung konnten eine Reihe weiterer biologischer Prozesse aufgedeckt werden. Dabei scheint sein Effekt vom Zelltyp abhängig zu sein. Beispielsweise fördert TGF β das Wachstum von Fibroblasten, Osteoblasten und anderen Mesenchymen-Zellen, während es das Wachstum von Epithelzellen und neuroektodermalen Zellen inhibiert (Falk et al., 2008). Im Zusammenhang mit Neuronen zeigt es neben seinen zytoprotektiven Eigenschaften (Kriegelstein und Unsicker, 1994; Farkas et al., 2003) auch neuronenfördernde Eigenschaften (Brionne et al., 2003; Roussa et al., 2004; Vogel et al., 2010). Im Gegensatz zu der sonst inhibierenden Wirkung auf proliferierende Zellen, wirkt TGF β in tumorartigen Zellen wiederum als Mitogen. Weiter konnte mit ihm entzündungshemmende Eigenschaften in Verbindung gebracht werden. In Folge einer Schädigung des zentralen Nervensystems durch Entzündungen, wie z.B. bei Multipler Sklerose, oder durch Neurodegenerationen, wie z.B. Alzheimer oder Parkinson, werden mikrogliale Zellen aktiviert, die signalfördernde Zytokine, unter anderem TGF β in die Umgebung sezernieren. TGF β fördert die Wundheilung und trägt zur Herunterregulierung der aktivierten Mikrogliazellen bei,

die bei zu hoher Aktivität wiederum schädigend wirken (Boche et al., 2006). Ebenfalls konnte seine Beteiligung an der Zellmigration im Kortex während der Entwicklung nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich *in vitro*, dass TGF β den Zell-Zellkontakt zwischen glären Zellen verringert, während fokale Verankerungen verstärkt werden (Siegenthaler und Miller, 2005). Schließlich konnte eine Beteiligung von TGF β an der Wundheilung in Folge von Läsionen beobachtet werden. Hierbei konnte seine Beteiligung an der Produktion von Molekülen, wie Laminin und Fibronectin, die elementare Bestandteile der EZM sind, nachgewiesen werden. Demnach scheint TGF β die Zusammensetzung der EZM und damit die Narbenbildung zu fördern (Moon und Fawcett, 2001; Brionne et al., 2003).

1.2 Glioblastome

Glioblastome sind Tumore, die primär von neuroektodermalem Gewebe abgeleitet sind. Humane Glioblastome zählen dabei zu den häufigsten und aggressivst auftretenden primären Hirntumorformen, die durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Grad IV eingestuft werden. Dieser Grad spiegelt seine schlechte Prognose wieder, dass trotz Diagnosestellung und Therapiebehandlung keine endgültige Heilung erreicht werden kann. Charakteristisch für Glioblastome sind unter anderem ihre glären Strukturen, wodurch auch Astrozytome zu ihnen gezählt werden (Kleihues et al., 1993). Glioblastome tauchen meist in den Großhemisphären auf, bevorzugt im Frontal- und den Temporallappen und führen durch ihr schnelles und invasives Wachsen dazu Hirngewebe zu verdrängen und damit zu komprimieren. Die genaue Ursache für solche Entstehung ist trotz jahrelanger Forschung bislang nicht aufgeklärt, jedoch könnte die Ursache in einer einzigen entarteten Zelle zu finden sein.

1.2.1 Glioblastom-Stammzell-Theorie

Zur vollständigen Charakterisierung von Glioblastomen ist es wichtig den Ursprung bzw. die Ursprungszelle und die damit einhergehenden Mutationen zu identifizieren. Schon seit einigen Jahren wird dabei der Krebs-Stammzell-Hypothese nachgegangen. Hierbei wird vermutet, dass Glioblastome aus geringen Zellpopulationen mit entarteter Stammzelleigenschaft hervorkommen (Clarke et al., 2006). Erstmals wurden Tumore mit Stammzelleigenschaft in Patienten mit Leukämie entdeckt und schließlich in soliden Tumoren, wie Glioblastomen, Medulloblastomen und Ependymomen (Ignatova et al., 2002; Galli et al., 2004; Lee et al., 2006). Durch ihren Stammzellcharakter sind sie zur Selbsterneuerung befähigt und können

durch orthotopische Transplantation eine erneute Initiierung des Hirntumors einleiten. Gleichzeitig haben sie die Fähigkeit in den neuronalen, astrozytären oder oligodendrozytären Phänotyp zu differenzieren (Vescovi et al., 2006). Des Weiteren lassen sie sich, wie neurale Stammzellen, in serum-freiem Medium mit Wachstumsfaktoren (FGF und EGF) als Neurosphäre in Kultur halten (Lee et al., 2006). Dies wiederum bestärkt erneut die Hypothese, dass sich aus entarteten neuronalen Stammzellen Glioblastome entwickeln können (Vescovi et al., 2006). Die hinzukommende Resistenz gegen Strahlentherapie und pharmakologische Behandlung (Bao et al., 2006; Liu et al., 2006) bestärkt die Suche nach *in vitro* und *in vivo* Modellen. Erschwerend kommt jedoch hinzu, dass einige Studien andeuten, dass trotz gleicher Kultur-Bedingungen unterschiedliche Wachstumsverhalten beobachtet werden. Diese könnte darauf zurückzuführen sein, dass eine Heterogenität innerhalb der Glioblastom-Zellen vorliegt. Dies bedeutet, dass unterschiedliche Zelltypen unterschiedliche Populationen hervorbringen oder dass es sich um gleiche Zellen mit unterschiedlicher genetischer Veränderung handelt (Beier et al., 2007). Zum besseren Verständnis werden daher Glioblastom-Zelllinien mit Stammzellcharakter etabliert, die über mehrere Monate hinweg *in vitro* mittels Neurosphären-Kultivierungsmethode kultivierbar sind (Hemmati et al., 2003; Galli et al., 2004; Lee et al., 2006; Günther et al., 2008b).

1.2.2 Glioblastom - Subpopulationen zur besseren Charakterisierung

Anhand von genetischen Expressionsanalysen ist nachgewiesen worden, dass innerhalb von Glioblastomen verschiedene Subtypen existieren (Phillips et al., 2006; Günther et al., 2008b). Molekulargenetische Studien haben diesbezüglich darauf hingewiesen, dass die Heterogenität der verschiedenen Glioblastom-Kulturen möglicherweise auf das Alter der Patienten, der verschiedenen genetischen Signalwege und damit auf die unterschiedliche Expressionsstärke von RNA und Protein zurückzuführen ist (Ohgaki und Kleihues, 2007). Um diese Zellen über einen längeren Zeitraum zu charakterisieren wird daher vermehrt die Stammzell-Kultivierungsmethode eingesetzt (Günther et al., 2008b). In Kooperation mit Frau Professor Kathrin Lamszus wurden zu weiteren Charakterisierungszwecken einige in dieser Arbeitsgruppe etablierten Glioblastom-stammzellähnlichen Linien (Günther et al., 2008b) an uns weitergegeben.

Von insgesamt neun GS-Linien unterscheiden sich vier (GS3, GS5, GS8, GS9) darin, dass sie eine Veränderung in der Expression von neuronalen Entwicklungsgenen zeigen. Sie zeigen eine

Veränderung in der Differenzierung der drei Zelltypen (Neuron, Astrozyt und Oligodendrozyt), weisen eine hohe CD133 (Stammzellmarker)-Expression auf, wachsen sphärenartig und führen *in vivo* zu hoch invasiven Tumoren. Die anderen fünf Linien (GS1, GS2, GS4, GS6, GS7) zeigen wiederum ähnliche Expressionsmuster in den EZM-ähnlichen Genen auf. Sie haben nur eine begrenzte Differenzierungsmöglichkeit, wachsen adhärent, als auch semi-adhärent und exprimieren nur wenig CD133. Auch die Tumorigenität, wie das invasive Wachstumsverhalten *in vivo*, tritt hiernach reduziert auf. Die Identifizierung potentieller Kandidaten, die für diese Unterschiede zuständig sein können und damit eine Rolle in der Pathogenese spielen können, ist daher Gegenstand weiterer Untersuchungen.

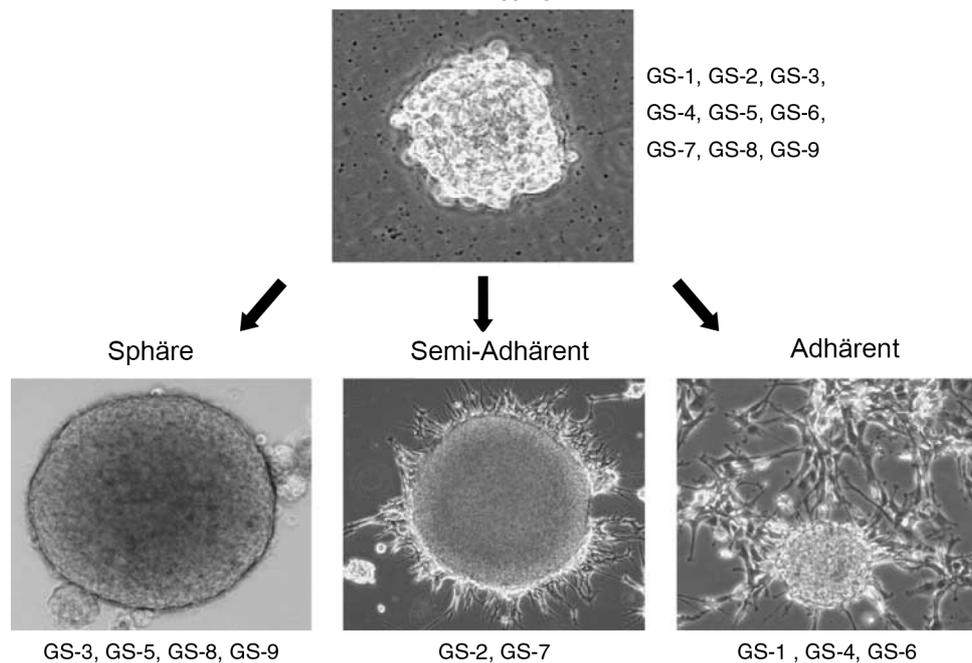


Abbildung 5: Wachstumsverhalten der Glioblastom-stammzellähnlichen Zelllinien unter Stammzellbedingungen. Die neun isolierten Glioblastom-Zelllinien mit Stammzeleigenschaft (GS; Glioblastom-stammzellähnliche Zelllinie) zeigen als Primärkultur ein sphärenartiges Wachstumsverhalten auf. Diese sind abgeleitet aus einzelnen Zellen. Nach mehreren Kultivierungspassagen zeigen GS-3, GS-5, GS-8, GS-9 weiter einen Sphärencharakter, während GS-2, GS-7 teils-adhärenz wachsen. GS-1, GS-4 und GS-6 wiederum sind hauptsächlich adhärenz wachsend. Modifizierte Abbildung von Günther et al., 2008b.

1.3 TOX3, ein Mitglied der Homeobox-Proteine

TOX3 ist ein Mitglied der TOX-Familie, worunter drei weitere Mitglieder gezählt werden (TOX, TOX2 und TOX4), die alle in Säugetierzellen vorkommen. Sie sind stark homolog miteinander und durch die gleiche Lokalisierung der CpG-Inseln des Promotors wird angenommen, dass sie durch Verdopplung entstanden sind (O'Flaherty und Kaye, 2003).

1.3.2 TOX3, ein neuronaler Transkriptionsfaktor

2008 wurde TOX3 erstmals im Zusammenhang mit dem konstitutiv aktiven sieben Transmembranprotein GPR39 in unserer Arbeitsgruppe identifiziert (Dittmer et al., 2008). Durch Überexpression von GPR39 in HEK-293T Zellen wurde die Expression von TOX3 als auch dem Ko-Regulator CITED1 (*engl. CREB-binding protein/p300-interacting transactivator with Asp/Glu-rich C-terminal domain*) detektiert (Dittmer et al., 2011).

Weitere Arbeitsgruppen, wie Yuan und Mitarbeiter (2009) zeigten, dass TOX3 ein Kalzium-abhängiger neuronaler Transkriptionsfaktor ist, welcher durch Interaktion mit dem cAMP-Antwort-Element-bindenden Protein namens CREB (*engl. cAMP response element-binding protein*) und CBP (*engl. CREB-binding protein*) die Kalzium-abhängige Transkription in Neuronen reguliert. Lange Zeit war bekannt, dass CREB mit CBP einen Komplex eingehen kann, der wiederum eine vermittelte Transkription über das Kalzium-abhängige Antwort-Element (CRE, *engl. cyclic AMP response element*) bewerkstelligt. Durch die Interaktion von TOX3 an diesen Komplex bzw. an einen der Bindungspartner wurde deutlich, dass diese Interaktion wichtig ist für den Effekt von TOX3 auf die vermittelte Kalzium-abhängige Genexpression. Die Kalzium-abhängige Transkription hat überdies einen Einfluss auf neuronale Antworten und damit einen Einfluss auf zelluläre Konsequenzen, wie Dendriten-Wachstum oder auf das Langzeit-Gedächtnis (Qiu und Ghosh, 2008). Noch ist unklar, ob TOX3 an beide Proteine (CREB-CBP Komplex) gleichzeitig bindet oder ein kompetitiver Vorgang stattfindet. Vermutlich verhilft TOX3 durch seine Bindung an die kleine Furche innerhalb der DNA dazu (Travers, 2003), dass der Komplex in die Nähe des Transkriptionsstarts kommt und so eine vereinfachte CRE-vermittelte Transkription einleitet. Eine Herunterregulierung von TOX3 führt ebenfalls zu einer Verminderung der endogenen c-fos Expression, die darüber hinaus auch eine vollständige Blockierung der KCl-induzierten Aktivierung durch den c-fos Promoter bewerkstelligt. Der Transkriptionsfaktor c-fos ist ein indirekter Marker für neuronale Aktivität, der meist dort exprimiert wird, wo Neurone aktiv sind (Dragunow und Faull, 1989). Weitere Arbeiten zeigten, dass TOX3 in verschiedenen Gewebearten hochreguliert vorzufinden ist, unter anderem im Magen-Darm-Trakt, dem Ileum, sowie im Nervensystem, wie dem Gehirn, dem Frontallappen und dem Okzipitallappen (Dittmer et al., 2011). Die Überexpression von TOX3 in neuronalen Zellen schützt diese Zellen vor Zelltod, indem die transkriptionellen Aktivitäten von zytoprotektiven Promotoren verstärkt wird (Dittmer et al., 2011). Hierbei konnte geklärt werden, dass TOX3 stromabwärts des zytoprotektiven Signalwegs zusammen mit dem Ko-Regulator CITED1, welcher nicht direkt an die DNA bindet, involviert ist und gleichzeitig den Zellschutz synergistisch verstärkt (Dittmer et al., 2011). Dabei zeigte sich, dass

der Einfluss der Transkription durch TOX3 in neuronalen Zellen abhängig von dem Vorkommen von CITED1 oder phosphoryliertem CREB ist. Eine erst kürzlich erschienene Publikation offenbarte ebenfalls, dass durch die Inaktivierung von TOX3 eine Veränderung in der neuronalen Entwicklung eintritt (Tessema et al., 2012). Durch Herunterregulierung von TOX3 in Brustkrebszellen (MCF7/Calu3) wurden 275 Gene beeinflusst. Durch Klassifizierung der Gene in ihrer Funktion zeigte sich, dass besonders Gene involviert sind, die an der Entwicklung von Synapsen beteiligt sind, sowie Gene, die einen Einfluss auf die axonale Orientierung haben (Tessema et al., 2012).

1.3.3 Vorkommen von TOX3 in der sich entwickelnden Maus

In bisherigen Publikationen wurde beschrieben, dass TOX3 in neuronalen Zellen eine wichtige Rolle spielt und mit einer Reihe verschiedener neuronaler Proteine interagieren kann (Yuan et al., 2009; Dittmer et al., 2011). Durch die öffentlich zugängliche Datenbank Allen Brain Atlas (<http://developingmouse.brain-map.org>) wurde TOX3 erstmals in verschiedenen Entwicklungsstadien (E) von Mäusen identifiziert. In dieser Plattform wurden sowohl sagittale Schnitte als auch koronare Schnitte von Mausgehirnen bzw. Embryonen angefertigt und die spezifische RNA wurde mittels einer nicht-radioaktiven Substanz, Digoxigenin markiert. Die *in situ* Hybridisierung von Mausembryonen von verschiedenen Embryostadien zeigt insbesondere nach 13,5 Tagen (E13.5) das Vorkommen von TOX3 im Großhirn, in der Basalplatte und der Wirbelsäule (Abb. 7 A). Nach 11,5 Tagen (E11.5) bzw. nach 15,5 Tagen (E15.5) ist hiernach eine reduzierte TOX3-Expression in den genannten Regionen zu sehen. Besonders im adulten Maushirn ist ein hohes Vorkommen von TOX3 in der subventrikulären Zone zu sehen (Abb. 7 B), die wiederum dafür bekannt ist Stammzellen zu beherbergen und daher Gegenstand für weitere Untersuchungen ist.

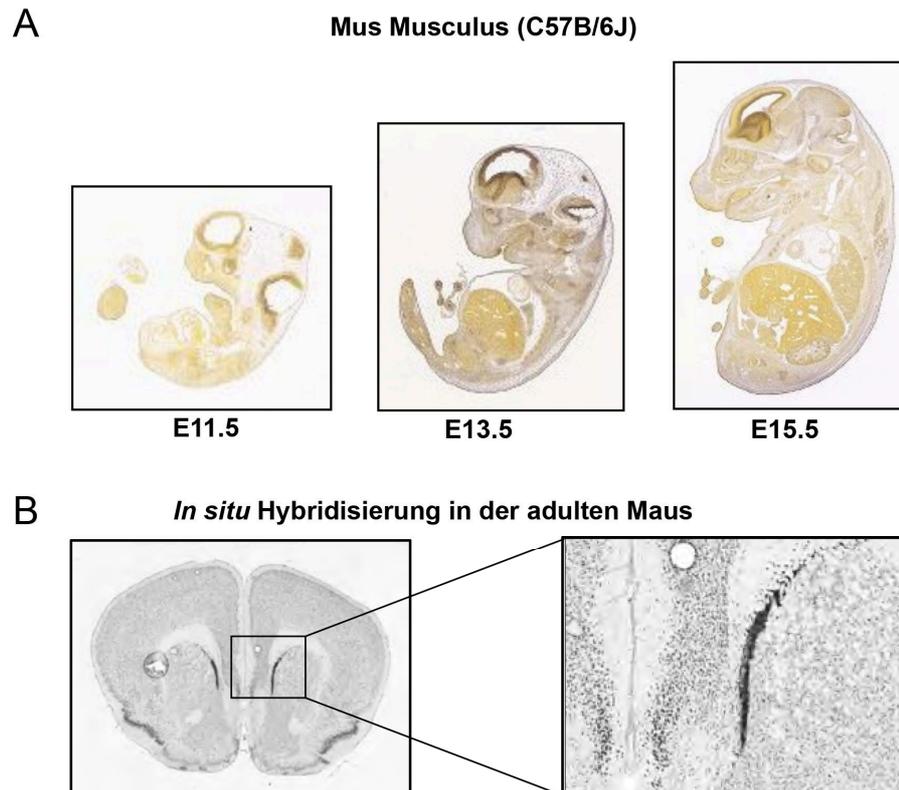


Abbildung 7: TOX3-Expression in der sich entwickelnden Maus aus Allen Brain Atlas. *In situ* Hybridisierung von TOX3 in A) verschiedenen Maus-Entwicklungsstadien und B) einem adulten Maushirn. Die Schichtdicke beträgt 25 μm mithilfe des Kryostats-Geräts (Leica 3050 S). Zunahme der Dunkelfärbung korreliert mit TOX3-Expression (Embryo; subventrikuläre Zone, Basalplatte und Wirbelsäule. Adultes Mausgehirn; subventrikuläre Zone). Modifizierte Abbildungen aus Allen Brain Atlas.

1.3.4 Potentielle Rolle von TOX3 in diversen Krankheitsbildern

Eine Vielzahl neurodegenerativer Krankheiten unter anderem die spinale Muskelatrophie (SBMA, engl. *spinal and bulbar muscular atrophy*), die spinocerebelläre Ataxie (SCA, engl. *spinocerebellar ataxia*) und die Huntington-Krankheit (HD, engl. *huntington's disease*) werden durch Veränderungen von CAG-Wiederholungen und damit einhergehender Polyglutamin-Einheiten verursacht. Dies geht insbesondere auf ihren Einfluss auf die Transkriptionsregulation zurück (Riley und Orr, 2006). TOX3 enthält solch eine glutaminreiche Domäne, welche generell bei einer Vielzahl von Transkriptionsregulatoren als Protein-Protein Interaktionsdomäne fungiert und zusammen mit anderen Faktoren die Genexpression reguliert (Tanese und Tjian, 1993). Je nach instabilen Wiederholungen kann es dabei zu pathogenen Beschwerden kommen, herbeigeführt durch Funktionsverlust oder durch Fehlfunktion dieser Proteine. In Folge dieser kann ein verstärktes Auftreten von polyglutaminreichen Peptiden zu intranukleären Aggregaten bzw. Inklusion führen, die wiederum toxische Eigenschaften mit sich bringen (Ross und Poirier, 2004). Im Fall des Krankheitsbild SBMA zeigte sich, dass durch

Veränderung in der Anzahl an CAG-Wiederholungen der eigentliche Liganden-abhängige Rezeptor unabhängig in den Nukleus wandert und eine konstitutive Genexpression verursacht (Katsuno et al., 2003). Ein weiterer Kandidat konnte im Krankheitsbild SCA ausgemacht werden. Hierbei führt die mutierte Untereinheit Ataxin-7 eines Histonacetyltransferase-Komplexes zu einer verstärkten Rekrutierung an die Promotoren von spezifischen Photorezeptorgenen. Dies wiederum verursacht eine Hyperacetylierung des Histons H3, wodurch diese Gene herunterreguliert werden und einen negativen Einfluss auf die Retina ausüben bzw. gar zum Erblinden führen (Enevoldson et al. 1994). Bei der neurodegenerativen Krankheit HD wurde eine Interaktion des mutierten Huntingtin mit der Acetyltransferase-Domäne von CBP/p300 und weiteren Faktoren gezeigt (Steffan et al., 2001). Hierdurch wird eine Herunterregulierung der CBP-Acetyltransferaseaktivität verursacht, wodurch wiederum die Genexpression negativ beeinflusst wird. Durch Behandlung von Histonacetylierungs-Inhibitoren werden wiederum neurodegenerative und damit einhergehende letale Auswirkungen gestoppt (Steffan et al., 2001). Auch in anderen Fehlordnungen, herbeigeführt durch unterschiedliche Polyglutaminlängen, konnte der Einfluss von Histonacetylierungs-Inhibitoren zu positiven Effekten führen (Hughes, 2002). Letztendlich werden sowohl spezifische DNA-bindende Faktoren, generell DNA-bindende Proteine, Chromatinstrukturen und Ko-Regulatoren, sowie das Ubiquitin-Proteasom-System durch Polyglutaminveränderungen beeinflusst (Riley und Orr, 2006).

Weitere Daten zeigten ebenfalls einen Zusammenhang durch Sequenzvariation einzelner Nukleotidaustausche am 5'-Ende von TOX3 mit dem Krankheitsverlauf von Brustkrebs (Easton et al., 2007; Huijts et al., 2007; Stacey et al., 2007). Unter anderem wurden die in TOX3 vorkommenden Einzelnukleotidaustausche rs12443621, rs8051542 und rs3803662 als mögliche Risikofaktoren für Brustkrebs identifiziert (Easton et al., 2007; Fanale et al., 2012). Dem Einzelnukleotidaustausch rs3803662 wurde dabei die stärkste Korrelation zu Brustkrebs nachgewiesen, in Folge einer Korrelation zu Knochenmetastasen und dem Östrogenrezeptor (Easton et al., 2007; Fanale et al., 2012). Durch die Interaktion von TOX3 mit CITED1 (Dittmer et al., 2011) wurde eine weitere Parallele zu dem Krankheitsbild gezogen. CITED1 wird ebenfalls eine aktive Rolle in der Östrogenrezeptor-vermittelten Transkription zugesprochen (Yahata et al., 2001), welche in Brustkrebs hochreguliert vorkommt. Gleichzeitig ist bekannt, dass CITED1 die Aktivität bzw. Signalwege von EGR2/ErbB2 als auch SMAD/TGF β vermittelte Transkription verstärkt. Diese Erkenntnis lässt vermuten, dass TOX3 ebenfalls in diese Signalwege involviert ist, da es durch seine zytoprotektiven Eigenschaften (Dittmer et al., 2011) vermutlich entartete Zellen vor Zelltod schützen könnte.

2. Zielsetzung dieser Arbeit

TOX3 ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der neuronale Zellen vor Zelltod schützen kann. Mittels quantitativer Bestimmung konnte auf mRNA-Ebene eine hohe Expression im Gehirn ermittelt werden (Dittmer et al., 2011). Hinweise der öffentlichen Datenbank von Allen Brain Atlas (<http://developingmouse.brain-map.org>) deuteten daraufhin, dass TOX3 ebenfalls in der frühen Embryonalentwicklung eine Rolle in der Gehirnentwicklung einnimmt (Abb. 7). Gleichermäßen wird vermutet, dass TOX3 durch seine zytoprotektive Eigenschaft eine Rolle in Hirntumoren spielt, da TOX3 zudem mit Proteinen, wie CREB, CBP (Yuan et al., 2009) und CITED1 (Dittmer et al., 2011), interagiert, die wiederum einen Einfluss in Tumorzellen einnehmen (Dittmer et al., 2011; Tan et al., 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression und Funktion von TOX3 im sich entwickelnden Maushirn, in der Primärkultur von neuronalen Progenitor-Zellen (NPCs) sowie an humanen Hirntumoren mit Stammzellcharakter aufgeklärt werden. Hierbei sollten insbesondere die zwei wesentlichen Signalwege Notch- und TGF β -Signalweg die in der Entwicklung des Nervensystems beteiligt sind, untersucht werden. Es sollte überprüft werden, ob TOX3 in die Signalwege Notch, welcher die Stammzellhaftigkeit fördert (Hitoshi et al., 2002; Alexson et al., 2006; Kageyama et al., 2009) bzw. in den TGF β -Signalweg, welcher die Differenzierung in Neurone fördert (Roussa et al., 2006; Vogel et al., 2010; Dobolyi et al., 2012), involviert ist. Eine mögliche Korrelation mit TOX3 sollte in Abhängigkeit von spezifischen Agonisten und Antagonisten der Signalwege überprüft werden. Die über ein Lumineszenz-basierendes Verfahren detektierten potentiellen Interaktionspartner sollten über weitere *in vitro* und *in situ* Immunpräzipitationsexperimente verifiziert werden. Insbesondere in NPCs sollten die vermeintlichen TOX3-Interaktionspartner bestätigt werden. Herunterregulierungsstudien sollten weiteren Aufschluss geben, ob TOX3 auf die Proliferation, Apoptose und/oder Differenzierung von NPCs oder Glioblastom-stammzellähnlichen Zelllinien einwirkt.

Die daraus resultierenden Ergebnisse könnten zur besseren Aufklärung von molekularen Mechanismen in der Stammzellbiologie dienen und ein besseres Verständnis von Hirntumorerkrankungen bedeuten.

3. Materialien

3.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden hauptsächlich von der Firma Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), Fluka Chemie GmbH (Buchs) und Life Technologies (Karlsruhe) bezogen. Falls nicht anders erwähnt, wurden die Lösungen in deionisiertem Wasser (ddH₂O) hergestellt, unter Angaben des Herstellers.

3.2 Enzyme

3.2.1 Restriktionsenzyme

Alle Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt) bezogen und nach Herstellerangaben mit dem dazugehörigen Puffer von NEB verwendet.

3.2.2 Diverse Enzyme

T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt
Reverse Transkriptase	Life Technologies, Karlsruhe
LR Clonase	Life Technologies, Karlsruhe
PreScission	GE Healthcare Life Science, Freiburg

3.3 Kits

Nucleobond Kit PC500	Macherey-Nagel, Düren
RNA Miniprep TM	Zymo Research, Freiburg
Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research, Freiburg
Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Freiburg
BCA Protein Assay Kit	Interchim, Montlucon
Profound c-myc-Tag IP/COIP Kit	Pierce, Bonn
Profound HA-Tag IP/COIP Kit	Pierce, Bonn
Duolink II Detection Reagents	Olink AB, Schweden
Dual-Luciferase Assay Kit	PromoCell, Heidelberg
FAST BLUE qPCR TM Mastermix Plus Kit	Eurogentec, USA

3.4 Antikörper

3.4.1 Primärantikörper

Folgende Primärantikörper wurden in den genannten Applikationen angewendet:

Immunoblot (IB)/ Immunzytochemie (ICC)/ Immunhistochemie (IHC)

Antikörper	Spezie	Epitop	Verdünnung	Hersteller
Anti-Aktin	Maus, monoklonal	Klon C4 (β -Aktin)	1:2000 IB	Millipore, Schwalbach/ Ts.
Anti-FLAG®	Maus, monoklonal	DYKDDDDK	1:1000 IB	Sigma, Steinheim
Anti-HDAC1	Kaninchen, monoklonal	Klon 10E2 (human HDAC1)	1:1000 IB 1:100 ICC	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-MAP-2	Maus, monoklonal		1:100 ICC	Chemicon
Anti-Musashi1	Maus		1:50 IHC	eBioscience
Anti-Myc	Maus, monoklonal	Klon 4A6 (EQKLISEEDL)	1:1000 IB	Millipore, Schwalbach/ Ts.
Anti-Nestin	Maus, monoklonal	Klon rat-401	1:1000 IB 1:100 ICC	Millipore, Schwalbach/ Ts.
Anti-TOX3	Huhn, polyklonal	MDVRFYPAAAGDPASLDFAQCL GYYGYSKFGNNNNYMNMAEA NNAFFAASEQTFHTPSLGDEEFE IPPITPPPESDPALGMPDVLLPFQ ALSDPLPSQGSEFTPQFPPQSLDL PSITISRNLVEQDGVLHSSGLHM DQSHTQVSQYRQD	1:500 IB 1:50 ICC	Davids Bio- technologie, Regensburg
Anti-TOX3	Kaninchen, polyklonal	SQGSEFTPQFPPQSLDLPSITSRN LVEQDGVLHSSGLHMDQSHTQ VSQYRQDPSLIMRSIVHMTDAA RGVMP	1: 2000 IB 1:200 ICC	Sigma, Steinheim

Phalloidin			1:1000 ICC	Life Technologies
Anti-PML	Maus	Klon 36.1-104	1:100 ICC	Millipore, Schwalbach/Ts.
Anti-Prominin (CD133)	Ratte, monoklonal		1:100 ICC	Millipore, Schwalbach/Ts.

Tabelle 1: Primärantikörper

3.4.2 Sekundärantikörper

IRDye-konjugierte Antikörper:

Die aus der Ziege hergestellten anti-Maus (IRDye 680 nm) oder anti-Kaninchen (IRDye 800 nm) IgG Antikörper wurden nach Herstellerangaben der Firma Licor (Königstein) verwendet. Die Antikörper wurden 1:30 000 verdünnt.

FITC/ CY3 konjugierte Antikörper:

Die aus der Ziege hergestellten anti-Maus, anti-Kaninchen oder anti-Huhn Antikörper, welche konjugiert waren mit FITC oder CY3, wurden von der Firma Merck-Millipore (Darmstadt) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet. Die Antikörper wurden 1:500 verdünnt.

3.5 Medien

3.5.1 Medium für Bakterien

S.O.C-Medium

Fertiges Medium besteht aus 2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 20 mM Glucose.

LB-Medium (Luria-Bertani Broth)

In 1 Liter destilliertem Wasser wurden 20 g LB-Medium (Life Technologies, Karlsruhe) gegeben und vor gebrauch autoklaviert.

LB-Agarplatten

In 1 Liter destilliertem Wasser wurden 32 g LB Agar (Life Technologies, Karlsruhe) gegeben, autoklaviert und in 10 cm Zellkulturschalen gegossen. Für LB-^{Amp}-Platten bzw. LB-^{Kan}-Platten wurde autoklaviertes Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 100 µg/ml Kanamycin gegeben

3.5.2 Medium für Zellkultur

CHO-Medium

Chinesische Hamster Ovarien (CHO) Zellen wurden in DMEM/F12-Medium (Gibco, Karlsruhe) mit 10% fetalem Kalbserum (FCS) (Hyclone, Vienna, Österreich) und 1% Penicillin /Streptomycin (100 U/ml /100 µg/ml)(Gibco, Karlsruhe) gehalten.

Medium für N2a- und HEK-293GP-Zelllinie

Die murine N2a-Zelllinien und die humane HEK-Zelllinie wurden in DMEM High Glucose (Dulbeccos modified eagles medium) (PAA, Pasching, Österreich) mit 10% fetalem Kalbserum (FCS) (Hyclone, Vienna, Österreich), 2 mM L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe) und 1% Penicillin /Streptomycin (100 U/ml /100 µg/ml)(Gibco, Karlsruhe) gehalten.

Medium für neurale Progenitor-Zellen (NPCs)

Die neurale Mausprimärkultur wurde in NeurobasalTM Medium (Gibco, Karlsruhe) mit 10% B27 Supplement, GlutaMAX (beides von Life Technologies, Karlsruhe), Fibroblasten und epidermalen Wachstumsfaktoren (FGF-2/EGF) (beides von PeproTech 20 ng/ml) und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Karlsruhe) gehalten.

Medium für Glioblastom-stammzellähnliche Zelllinie

Die humanen Glioblastom-stammzellähnlichen Zelllinien (GS7, GS8 und GS9) wurden in NeurobasalTM Medium (Gibco, Karlsruhe) mit 10% B27 Supplement, GlutaMAX (beides von Life Technologies, Karlsruhe), Fibroblasten und epidermalen Wachstumsfaktoren (FGF-2/EGF) (beides von PeproTech 20 ng/ml), Heparin (Ratiopharm) und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Karlsruhe) gehalten.

3.6 Puffer und Lösungen

PBS (Phosphat-gepufferte Saline) pH 7,4 NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ ddH ₂ O	137 mM 2.7 mM 1.4 mM 100 mM
PBS-T Zugabe von 0,05% Tween®20 (Sigma)	
TBE-Puffer (10x) Tris Borsäure EDTA ddH ₂ O	900 mM 900 mM
RIPA-Puffer (Zellysepuffer) pH 7.5 Tris-HCl NaCl Triton X-100 EDTA Dithiothreitol (DTT)	20 mM 250 mM 1% 10 mM 10 mM

Tabelle 2: Pufferzusammensetzung

Zugabe von Protease-Inhibitor-Cocktail und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (beides von Roche).

3.7 Bakterien

Bakterien wurden hauptsächlich für die Herstellung von großen Plasmid-DNA-Mengen oder für Expressions- und Klonierungszwecke verwendet.

3.7.1 Escherichia Coli (*E.coli*)

DH5α

Dieser allgemein für Transformationen verwendete *E. coli* Stamm (*subcloning efficiency*) trägt folgenden Genotyp: *F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1*

BL21(DE3)

Der BL21(DE3) Stamm ist für seine effiziente Proteinexpression bekannt und trägt folgenden Genotyp: *F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm (DE3)*

3.7.2 One Shot® ccdB Survival™

Der für die Gateway™ Vektoren (*Destination*-Vektoren, Life Technologies, Karlsruhe) geeignete Stamm ist resistent gegenüber dem Genprodukt des toxischen *ccdB* Gens (Bernard und Couturier, 1991).

3.8 Primärkulturen und immortalisierte Zelllinien

3.8.1 Neurale Progenitor-Zellen (NPCs)

Eine aus der ganglionischen Eminenz aus embryonalen Mäusen des Entwicklungsstadiums 13,5 stammende Primärkultur.

3.8.2 Neuro-2a (N2a)

Die Neuro-2a Zelllinie ist eine häufig genutzte Zelllinie, welche sekundär vom Neuroblastom der Maus abstammt.

3.8.3 CHO

Die CHO-Zelllinie stammt aus den Ovarien des chinesischen Hamsters. Hauptsächlich wurde diese für die Expression rekombinanter Proteine verwendet.

3.8.4 HEK-293GP

Die humane embryonale Nierenzelllinie (Graham et al. 1977) wurde durch Kombination von DNA-Teilen des humanen Adenovirus 5 erzeugt. Diese Linie wurde mit den viralen Genen *gag* und *pol* stabil gemacht, um in dieser Arbeit als Verpackungszelllinie verwendet zu werden.

3.8.5 Glioblastom-stammzellähnliche Zelllinien (GS7, GS8 und GS9)

Die aus dem menschlichen Gehirn stammenden Tumore wurden freundlicherweise von Professor Kathrin Lamszus der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf zur weiteren Charakterisierung von TOX3 freigegeben (Günther et al., 2008b).

3.9 Tiere

Für die Primärkulturen wurden ausschließlich Mäuse des Stammes C57BL/6 aus der Tierhaltung der Tierversuchsanlage Heinrich-Heine Universität und von der Firma Janvier (Belgien) verwendet.

3.10 Plasmide

3.10.1 Expressionsplasmide

In dieser Arbeit wurden diverse Expressionsplasmide verwendet, welche nun alphabetisch geordnet, in der darunter liegenden Tabelle aufgeführt werden.

Gen	Spezie	Vektor	Eigenschaft (Mutation, Deletion, Anhang)	Herkunft/Hersteller
Leer-vektor		pEGFP-C1	EGFP	Labor-kollektion
HDAC1	Human	pcDNA3.1 +	Flag-Anhang	Addgene (Nr. 13820)
PARP1	Human	pDEST_LTR_N_FL AG_HA_IRES_ puro	Flag-Anhang	Gao et al., 2009
PIAS1 α / β	Human	pCMV-Flag	Flag-Anhang	Addgene (Nr. 15209/ 152010)
TOX3	Human	pGex-6p-2	GST-Anhang	selbst-hergestellt
Leer-vektor		pTREX-dest30-PrA /pTREX-dest30	N-terminale Protein A / C-terminale Protein A	M. Kögl, Heidelberg
TOX3	Human	pTREX-dest30-ct- PrA	C-terminale Protein A	selbst-hergestellt
TOX3	Human	pTREX-dest30-PrA	N-terminale Protein A	selbst-hergestellt

Leer-vektor		pcDNA3-RL	N-terminale Renilla-Luziferase / C-terminale Renilla-Luziferase	M. Kögl, Heidelberg
TOX3	Human	pcDNA3-RL-GW	C-terminale Renilla-Luziferase	selbst-hergestellt
TOX3	Human	pcDNA3-RL-GW	N-terminale Renilla-Luziferase	selbst-hergestellt
TOX3	Ratte	pbos	Myc-Anhang (1-1734; 1-500; 1-720; 1.870; 721-1734; 871-1734)	Yuan et al., 2009
TOX3-K29A	Human	Myc-Dest	Myc-Anhang, Mutation: K29A (Kap. 3.12)	selbst-hergestellt

Tabelle 3: Expressionsplasmide

3.10.2 Reporter-Plasmide

Um die Promoteraktivität zu messen wurden folgende spezifische Promoter bzw. Antwortelemente verwendet. Die Konstrukte sind in der darunter liegenden Tabelle aufgeführt.

Promoter-Konstrukt	Promoter-Gen	Antwortelement oder Region	Hersteller
pNES-Luc	Luziferase	2te Intron von Nestin (Maus)	Yang et al., 2001
pSBE4-Luc	Luziferase	SMAD-binde Element	Addgene (Nr. 16495)
pSRE-Ren	Renilla	Serum-Antwort-Element	Dittmer et al., 2011

Tabelle 4: Reporter-Plasmide

3.10.3 ENTR™ Plasmide

ENTR[™]-Plasmide sind Bestandteil des Gateway® Systems (Life Technologies, Karlsruhe). Dieses System ermöglicht das Umgehen der konventionellen Klonierung mittels Restriktion und Ligation durch homologe Rekombination. Das gewünschte Gen wird zunächst in einen Eingangsvektor (*ENTR*[™]-Vektor) gebracht. Hierbei unterscheiden sich die Eingangsvektoren 1A, 2B und 3C in ihrem offenen Leseraster durch eine Base. Mittels homologer Rekombination

von dem Eingangsvektor, kann das Gen in den Zielvektor (*DEST*TM-Vektor) über die LR-Reaktion, gebracht werden. Der multiple Klonierungsabschnitt (MCS) enthält das *ccdB*-Gen, welches das Bakterienwachstum verhindert, sofern keine Ligation stattgefunden hat bzw. nur ein Leervektor aufgenommen wurde.

3.10.4 shRNA-Plasmide

Für die spezifische Herunterregulierung von TOX3-Gentranskripten wurde shRNA (pGFP-V-RS) der Firma OriGene (HuSH 29mer/shRNA Konstrukte TG300899) verwendet.

3.11 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Martinsried) bezogen, sowohl für Klonierungsarbeiten, als auch zur quantitativen Polymerasekettenreaktionen wurden sie benötigt. Oligonukleotide sind von 5'-3' orientiert.

3.11.1 Primer für Klonierungen

Primer	Sequenz (F/ R)	Schnittstellen
HsTOX3 pGEX	GGA TCC GAT GTG AGG TTC TAC GTC GAC TCA ATC CTG CCG GTA CTG	BamHI/ Sall
HsTOX3 pGBT9	GAA TTC GAT GTG AGG TTC TAC GTC GAC TCA ATC CTG CCG GTA CTG	EcoRI/ Sall

Tabelle 5: Primer für Klonierungen

3.11.2 RT-PCR Primer und Probes

Oligo-nukleotide	Sequenz (F/R)	Detektionssequenz (Probe)
msHDAC1	TGG TCT CTA CCG AAA AAT GGA G TCA TCA CTG TGG TAC TTG GTC A	73
msHDAC3	TCC TTC CAC AAA TAC GGA AAT TA GCC ACT CTC TGC TCC AAC TT	1
msHPRT	GTT GCA AGC TTG CTG GTG AA GAT TCA AAT CCC TGA AGT ACT CA	Fam-Tamra-Probe

msHOXA1	AAA AGA AAC CCT CCC AAA ACA TGA AGT GGA ACT CCT TCT CCA G	100
msMZF1	CCT AGG GAC GGG AAG AAG G TTT TCT GGG GTG CAC AG	107
msNESTIN	CCC TTA GTC TGG AAG TGG CTA CA CCC AAG GAA ATG CAG CTT CA	67
msNR0B1	ACC GTG CTC TTT AAC CCA GA CCG GAT GTG CTC AGT AAG G	3
msPARP1	AGG CCG CCT ACT CTA TCC TC GAT TCA CTG CTG CCT TGA GA	40
msPIAS2	TGG GAA ACT CTT TCC TTT GC CGC TTC TGT TCA ATC CCA TT 77	40
msTOX3	CGG AGA AGT CTC GAA AAT CG TTG GCA GCT TCT GTT TTC CT	52
msTSC22D3	GCC GGT TTA CCT GAA GTG G CCT GCG GAG CTA GCC TTT	1

Tabelle 6: RT-PCR Primer und Probes

3.12 Generierung der TOX3-K29A-Mutante

Für die Generierung der TOX3-K29A-Mutante wurde eine Mutation an der Stelle der Aminosäuresequenz 29 von Lysin (K) zu Alanin (A) in das humane TOX3 eingebaut. Die Synthese wurde über GeneArt in Auftrag gegeben. Mit Hilfe der Schnittstellen KpnI/ SphI erfolgte die Ausschneidung aus dem humanen TOX3 in pENTR3C und dem von GeneArt synthetisiertem Genabschnitt mit der Mutation, anschließende Ligation und Verifizierung über den Sequenzanalysenanbieter GATC, wurde die erfolgreiche Umklonierung von TOX3 in die Mutante TOX3-K29A bestätigt.

GeneArt-Sequenz von TOX3(K29A)-Mutante:

**GGTACCATGGATGTGAGGTTCTACCCCGCGGCGGCCGGGGACCCTGCCAGCCTG
GACTTCGCGCAGTGCCTGGGGTACTACGGCTACAGCAAGTTTGGAATAATAAT
AACTATATGAATATGGCTGAGGCGAACAATGCGTTCTTCGCTGCCAGTGAGCAG
ACATTCCACACACCAAGCCTTGGGGACGAGGAATTCGAAATTCACCAATCACG
CCTCCTCCAGAGTCAGACCCTGCCCTAGGCATGC**

3.13 Geräte

Gerät	Hersteller
7500 Real Time PC System	Applied Biosystems, Darmstadt
Biofuge Strato	Heraeus, Osterode
Captair Bio PCR Hood	Erlab, Köln
FluoroGenios Pro	Tecan, Männedorf
GDS-Gel Imaging System	Intas, Göttingen
Heracell 150 Inkubator	Kendro, Schwerte
Herasafe Sterilbank	Kendro, Schwerte
iBlot Dry Blotting Device	Invitrogen, Karlsruhe
IX81-Fluoreszenz Mikroskop	Olympus, Hamburg
Odyssey Infrarotscanner	Licor, Bad Homburg
P25 Powerpack	Biometra, Göttingen
Subcell GT Powerpack	Biorad, München
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer kompakt	Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer FACS Calibur	Beckton Dickinson, Heidelberg
Gradient Thermozykler	Biometra, Göttingen
Xcell Sure Lock System	Invitrogen, Karlsruhe
S2100DiodeArray Spektrophotometer	WPA Biowave, Cambridge
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Grobwaage	Kern EW
Mikrowelle	Sharp, Hamburg
Wasserbad	Memmert, Schwabach
CLSM 510 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss MicroImaging, Köln
Leica CM 1900 UV	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
BD Pathway 855 (Hochdurchsatz-Mikroskop)	BD Biosciences, Heidelberg
Hochgeschwindigkeitssorter MoFlo XDP	Beckman-Coulte, Krefeld
TC10 System Zählkammer	Bio-Rad, München

Tabelle 7: Geräte

3.14 Computerprogramme

3.14.1 NEBCutter

Für die Klonierungsstrategien, als auch für die Kontrollverdaue wurde die Software NEBCutter von New England Biolabs verwendet.

3.14.2 Graph Pad Prism 0.5

Zur statistischen Auswertung und Diagrammdarstellung wurde die Software Graph Pad Prism 0.5 eingesetzt. Durch eine One-Way-Analyse mit Tukey Posthoc-Test wurde ein Signifikanzwert von $P < 0.5$ ermittelt.

3.14.3 ImageJ

Die frei im Internet erhältliche Version ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) wurde zur Proteinquantifizierung von Immunoblots und zur Bestimmung der Anzahl von Fluorophoren in der *in situ* Ko-Immunpräzipitation (InCell-Ko-IP) verwendet.

Quantifizierung von Proteinmengen (Immunoblot)

Nach Markierung der Proteinbanden mit dem Rechteck-Werkzeug, wurde die Intensität der verschiedenen Banden innerhalb des Rechtecks graphisch als Verteilungskurve dargestellt. Mit Hilfe der Eingrenzung des Areals unterhalb der Maxima wurde ein Wert ermittelt, der das Verhältnis der Signalintensität zum Proteingehalt widerspiegelt. Die Proben wurden jeweils auf den erhaltenen Wert der endogenen Ladekontrolle (β -Aktin) normalisiert. Entsprechend konnten Signalintensitätswerte im Vergleich von nicht stimulierten Proben zu stimulierten Proben bzw. undifferenzierten zu differenzierten Proben erhalten werden. Durch Berechnung des Quotienten konnte der relative Anteil an Expression ermittelt und graphisch dargestellt werden.

Quantifizierung von Fluorophorpunkten (InCell-Ko-IP)

Die Fluorophoranzahl wurde unter Berücksichtigung unspezifischer Fluoreszenzpunkte, die unterhalb einer bestimmten Pixelgröße (< 10) lagen, automatisch errechnet. Zunächst wurde die Datei (.tif) über ImageJ geöffnet. Über die Schwellenwert-Einstellung (Image \rightarrow Adjust \rightarrow Threshold Tool) wurde der Fluoreszenzhintergrund der autofluoreszierenden Zellen

heruntergedreht. Zur Berechnung der Partikel (Analyze Particles) wurden folgende Einstellungen verwendet. Größe (pixel²) 10-100/ Kreisform 0.00-1.00

3.14.4 BD AttoVision Version 1.7/855

Daten des Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskops wurden mittels der BD AttoVision Version 1.7/855 ausgewertet. Durch Zellkernfärbung mittels DAPI konnten Ringe um die zu untersuchenden Regionen (ROIs; *engl. regions of interest*) gelegt werden, um den fluoreszierenden Sekundärantikörper CY3 (532 nm) und FITC (488 nm) zu messen. Der Schwellenwert, welches als positives Signal bewertet werden sollte, wurde durch einsetzen von Negativ-Kontrollen (Sekundärantikörper) ermittelt.

3.14.5 Photoshop und MS Office Programme

Für die digitale Bildbearbeitung wurde das Programm Adobe Photoshop CS5 verwendet. Hierbei wurden die Bilder mit den hier dargestellten Farben eingefärbt. Die gängigen Microsoft Büro-Programme, wie MS Word, MS Excel und MS Powerpoint wurden zur Protokollierung und Auswertung der Daten verwendet.

4. Methoden

4.1 Zellkulturtechniken

4.1.1 Primärkultur

Isolierung und Kultivierung von NPCs

Für diese Arbeit wurden tragende Mäuse im Embryonalstadium E13.5 verwendet. In der Tierversuchsanstalt an der Heinrich-Heine Universität in Düsseldorf wurden die Tiere fachgerecht durch Genickbruch getötet. Die Embryonen wurden entnommen und dekapitiert. Unter einer Sterilbank mit binokularem Mikroskop wurde mittels mikrochirurgischem Besteck die mediale und laterale ganglionische Eminenz aus den embryonalen Mäusen herauspräpariert. Das Gewebe wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit kaltem PBS gesammelt und auf Eis gelagert, um die Zellen vor dem Absterben zu bewahren. Anschließend wurden die Zellen teils mechanisch durch resuspendieren und durch Zugabe von Trypsin/EDTA (Gibco), drei Minuten bei 37°C vereinzelt. Das Trypsin wurde mit Sojabohnen-Trypsininhibitor (Sigma) inaktiviert, die Zellen in PBS gewaschen und in 1 ml Proliferationsmedium (FGF-2 und EGF (20 ng/ml) aufgenommen. 200.000 Zellen/ml wurden in frischem Medium aufgenommen und auf die gewünschte Menge an Zellkulturschalen verteilt. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit und Zelldichte wurden sie nach zwei bis drei Tagen passagiert. Die Kultivierung der Primärkultur erfolgte in Proliferationsmedium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die Lösungen, falls nicht anders erwähnt, wurden auf 37°C erwärmt.

Differenzierung von NPCs

Um die Primärkultur adhärent wachsen zu lassen, wurden Zellkulturschalen und 10 cm Platten mit Poly-L-Ornithin (1:10 verd. in PBS) beschichtet. Es wurden 200.000 Z/ml in Proliferationsmedium ausplattiert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit und gewünschter Dichte wurde nach ein bis zwei Tagen das Medium abgenommen und durch Differenzierungsmedium (ohne Wachstumsfaktoren) ersetzt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die Lösungen, falls nicht anders erwähnt, wurden auf 37°C erwärmt.

Herunterregulierung von endogenem TOX3 in NPCs

Zellen wurden auf beschichtete Platten zu 200.000 Z/ml ausplattiert. Durch das Transfektionsagens Attractene wurden die shRNA-Konstrukte (HuSH 29mer; TG300899) von OriGene in die Zellen gebracht.

4.1.2 Glioblastom-stammzellähnliche-Zelllinien

Zellen wurden mechanisch durch resuspendieren vereinzelt. Je nach Versuch wurden sie als Neurosphären (Ausnahme GS7 adhären) gehalten bzw. durch Beschichtung mit Laminin (1:100 verdünnt in PBS, Life Technologies) adhären wachsen gelassen.

4.1.2.1 Generierung von stabilen Glioblastomen

GS7 Glioblastome wurden mit der PiggyBac-Methode stabil gemacht. PiggyBac ist eine Transposon-vermittelte Langzeit-Genexpressionsmethode, die darauf beruht, dass die Transposase, das auf dem Transposon liegende Zielgen aus der flankierenden Erkennungssequenzen ausschneidet. Dieses wird wiederum nach der „*Cut & Paste*“-Methode in das Genom integriert, flankiert von TTAA-Elementen, die zufällig im Genom vorkommen (Fraser et al., 1996, Kettlun et al., 2011). GS8 Glioblastome wurden mit Hilfe der Virustransduktion in ihrer TOX3-Expression herunterreguliert. Hierbei wurde die Eigenschaft von RNA-haltigen Viren, sogenannten Retroviren, genutzt. Diese dringen in die Wirtszelle ein und schreiben durch selbstmitgebrachte reverse Transkriptase ihre RNA in DNA um, um diese ins Genom zu integrieren. Folglich ist die übertragene Sequenz stabil im Wirtsgenom integriert.

Überexpression von TOX3 in GS7

Um die GS7 Glioblastome stabil zu machen wurde das PiggyBac-System genutzt. Für die Klonierung wurde TOX3 in den pB CAG HA-IRES-Venus Zielvektor kloniert. Zusammen mit der Transposase HS-Hy-pBase-Vektor erfolgte die Integration von TOX3 in die genomische DNA. Durch den Hochgeschwindigkeitssorter (MoFlo XDP; Beckman-Coulter) konnten GFP-positiv leuchtende Zellen sortiert und expandiert werden.

Herunterregulierung von TOX3 in GS8

Durch die Verpackungszelllinie HEK-293GP wurde der Virus produziert. In von HEK-Zellen abgeleiteten 293GP Zellen wurde der Virus hergestellt. Hierfür wurden in einem Ansatz von

800 µl serum-freies Medium (OptiMem, Life Technologies) 7,5 µg retroviraler Shuttle Plasmid (shRNA) und 7,5 µg pVSV-G Plasmid mit GeneJuice (Novagen) Reagenz eingesetzt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und für weitere 48 Std wurde das Virus im Überstand gesammelt. Der retrovirale Überstand wurde über einen 0,45 µm Filter gefiltert und zusammen mit Polybrene (Stocklsg. 5 mg/ml) auf die Glioblastom GS8 für 24 Stunden gegeben. Über den Selektionsmarker Puromycin (Sigma) konnten transduzierte Zellen selektioniert werden. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nach bis zu vier Wochen waren stabile Klone erfolgreich hoch gezüchtet. Als Kontrolle wurden unbehandelte GS8 mit Puromycin behandelt, die ohne Virustransduktion starben.

4.1.3 Immortalisierte Zelllinien

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die adhärenenten Zelllinien wurden in 10 cm Platten oder Zellkulturflaschen verschiedener Größe mit jeweils für sie notwendigem Medium (Kap. 3.5.2) kultiviert. Nach drei bis vier Tagen wurden sie passagiert. Bei einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für fünf Minuten bei 37°C mit Trypsin abgelöst und durch das 10-fache Volumen an Kulturmedium, wurde Trypsin inaktiviert. Eine genau definierte Zellmenge wurde in frischem Medium aufgenommen und auf Zellkulturschalen verteilt.

4.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um eine genau definierte Lebendzellzahl zu erhalten wurde die Neubauer-Zählkammer bzw. die duale Zählkammer (TC10 System Counting Slides Dual Chamber) der Firma Bio-Rad verwendet. Trypanblauzugabe ermöglichte dabei die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Der Farbstoff dringt in tote Zellen ein, wodurch diese blau gekennzeichnet sind. Zunächst wurde die Zellsuspension abhängig von der zu erwartenden Zellzahl 1:1 bis 1:4 mit Trypanblau verdünnt und 10 µl aufgetragen. Unter dem Mikroskop oder durch das TC10 Gerät wurden die ungefärbten Zellen in den kleinen Quadraten gezählt und durch folgende Formel wurde die Anzahl vitaler Zellen bestimmt.

Berechnung: $c = \text{Anzahl gezählter Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ Zellen/ml}$

4.1.5 Transiente Transfektion

Für die transiente Transfektion von Plasmid-DNA wurden die Reagenzien Attractene und Lipofectamin™ 2000 nach Angaben des Herstellers Qiagen verwendet. Die Methode beruht darauf, dass durch die Bildung eines kationischen Lipidkomplexes um die negativ geladenen DNA-Moleküle, eine Aufnahme in die Zelle erfolgt. Bei einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen transfiziert. Für die Transfektion mit Lipofectamin™ 2000, wurde die DNA und das Reagenz zunächst separat in Antibiotika-freiem Medium (Opti-Mem®1, Life Technologies) für fünf Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden sie zusammengegeben und erneut für 20 Minuten inkubieren gelassen, wodurch sich der DNA-Lipid-Komplex bilden konnte. Dieser wurde auf die zu transfizierenden Zellen gegeben, welche zuvor mit PBS gewaschen und mit Antibiotika-freiem Wachstumsmedium versetzt waren. Für die Transfektion mit Attractene wurden DNA und Reagenz sofort zusammengeführt in Antibiotika-freiem Medium (Opti-Mem®1, Life Technologies) und gut durchmischt. Nach 15 Minuten wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Transfektionen wurden für Dual-Luziferase Versuche in 12-Lochnapfschalen mit je 6 µg DNA durchgeführt. Für immunologische Analysen in 10 cm Platten mit je 20 µg DNA. Nach 24 Stunden wurde das Transfektionsmedium gegen Kulturmedium ausgetauscht.

4.1.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Damit Zellen über mehrere Monate erhalten bleiben, wurden sie in Einfriermedium bei -80°C und anschließend in Flüssigstickstoff gelagert. Die intrazelluläre Eisbildung wurde durch Zugabe von DMSO im Einfriermedium verhindert. DMSO wirkt toxisch, sodass die Kontaktzeit mit den Zellen bei Raumtemperatur kurzgehalten werden sollte. Konfluent gewachsene Zellen wurden trypsinisiert und für 5 Minuten bei 900 Umdrehung pro Minute pelletiert, nach waschen mit PBS wurden die Zellen in Einfriermedium (90% FCS/ 10% DMSO) resuspendiert. Mit einer Dichte von ca. 3×10^6 Zellen/ml wurde die Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt und zunächst für 24-48 Stunden bei -80°C gelagert.

4.1.7 Proliferationsassay (Celltiterblue® -Test)

Der Celltiterblue® Test dient dazu die Proliferation zu bestimmen. Das Celltiterblue® Reagenz enthält den blauen Redoxfarbstoff Resazurin, welches in metabolisch aktiven Zellen in den pink-farbenen Farbstoff Resorufin reduziert wird. Das erhaltene Signal entspricht der Menge

von gebildetem Resorufin und ist proportional zur Anzahl lebender Zellen. Zellen wurden in eine 96-Lochnapfschale zu 5000 Zellen pro Lochnapfschale ausgesät und nach 20, 44, 68 und 92 Stunden Inkubationszeit wurde in einem Verhältnis von 1:5 das CTB-Reagenz hinzugegeben und für 4 Stunden inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte durch das Mikrotiterplatten-Lesegerät (FluoroGenios, Tecan) bei einer Wellenlänge von 562 nm und eines Referenzwertes bei 612 nm. Der Referenzwert dient hierbei zur Ermittlung der Differenz des hinzugegebenen blauen Farbstoffes zu dem umgesetzten roten Farbstoff, welche die metabolische Aktivität vitaler Zellen widerspiegelt.

4.2 Molekularbiologische Techniken

4.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

DH5 α Bakterien wurden über Nacht in 3 ml LB-Medium angezogen und bei 37°C geschüttelt. Am Tag darauf wurde 1 ml dieser Kultur in einen Kolben mit 300 ml LB-Medium überführt und bei 37°C angezogen bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,5, welche der exponentiellen Wachstumsphase von Bakterien entspricht. Die Kultur wurde auf sterile 50 ml Röhren verteilt, kurz auf Eis gelegt und bei 4000 Umdrehung pro Minute für fünf Minuten und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 ml $MgCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert bevor erneut bei 4000 Umdrehung pro Minute für fünf Minuten und 4°C zentrifugiert wurde. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand erneut verworfen, das Pellet in 20 ml $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert bevor diese Bakteriensuspension zu je 100 μ l in 1,5 ml Reaktionsgefäß aliquotiert wurde.

4.2.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation kompetenter *E. coli* (Kap. 3.7) wurde durch eine sogenannte „Ein-Minuten-Hitzeschock-Transformation“ durchgeführt. Es wurden 50 μ l kompetente $CaCl_2$ -Zellen mit 1 μ l DNA (1-100 ng) bzw. 5 μ l Ligationsansatz versetzt und auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für eine Minute bei 42°C. Nach Zugabe von 250 μ l SOC-Medium wurden die Bakterien für 45 Minuten bei 37°C geschüttelt. 20% bzw. 80% des Transformationsansatzes wurden auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.3 DNA-Isolierung

Die DNA-Präparation in kleinem, wie auch im großen Maßstab, wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt. Hierbei denaturiert die DNA durch ein stark alkalisches Milieu. Nach Neutralisierung hybridisieren die Plasmid-Stränge miteinander, während die chromosomale DNA als Einzelstrang verbleibt und ausfällt. Die Firma Zymo Research nutzte dieses Verfahren und entwickelte ein Säulensystem zur DNA-Aufreinigung (Plasmid Miniprep Kit). Die Präparation von geringen Plasmid-DNA Mengen erfolgte durch Animpfung von Kleinkulturen in einem Volumen von 2 ml. Diese wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank angezogen. 600 µl der Kultur wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, 100 µl Lyse-Puffer dazugegeben, durch vier bis sechsmaliges invertieren wurden die Zellen komplett lysiert. Zugabe von 350 µl kaltem Neutralisierungspuffer neutralisierte die alkalische Lösung, so dass durch Zentrifugation für vier Minuten bei 13000 Umdrehung pro Minute die Zelltrümmer, genomische DNA und denaturierte Proteine abzentrifugiert werden konnten. Der Überstand wurde auf eine Zymo-Spin™ IIN Säule überführt und für 15 Sekunden bei 13000 Umdrehung pro Minute herabzentrifugiert. Zugabe von 200 µl Endo Waschpuffer, sowie 400 µl Zyppy™ Waschpuffer führten zur Entfernung von restlichen Salzen und anderen Metaboliten. Die an der Säule gebundene DNA wurde mit 50 µl ddH₂O von der Säule eluiert und in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Die Zusammensetzung der hierbei verwendeten Puffer-Lösungen sind dem Protokoll des Aufreinigungssatzes (Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit, Zymo Research) zu entnehmen. Für die Gewinnung größerer DNA Mengen wurden 150 ml Kolben angeimpft. Die Aufreinigung erfolgte durch den Isoliersatz Nucleobond Kit PC500 (Macherey-Nagel) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Überprüfung der aufgereinigten Plasmid-DNA wurde nachfolgend eine Restriktionsanalyse (Kap. 4.2.8) angesetzt.

4.2.4 RNA-Isolierung

Für die Gewinnung von Gesamt-RNA wurde das ZR RNA Miniprep™ Kit (Zymo Research) verwendet. Die Isolierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden abgeerntete und pelletierte N2a bzw. NPC Zellen verwendet. Zur Homogenisierung der Proben wurden Zymo-Spin™ IIIC Säulen (Zymo Research) eingesetzt. Die gewonnene RNA wurde bei -80°C schockgefroren und aufbewahrt. Die adhärennten Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 400 µl RNA Lyse-Puffer lysiert, in die Zymo-Spin™ IIIC Säule überführt und für 30 Sekunden bei 10000 Umdrehung pro Minute abzentrifugiert. Die Suspension wurde mit 320 µl 100%igem EtOH versetzt, resuspendiert und anschließend auf die Zymo-Spin™ IIC Säule

überführt, welche die DNA bindet. Durch weitere Waschschrte mit 400 µl RNA Prep Puffer, 800 µl RNA Waschpuffer, sowie erneuten 400 µl RNA Waschpuffer wurden letzte Salzreste entfernt. In einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die RNA in 40 µl RNase freiem Wasser eluiert.

4.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösung erfolgte photometrisch. Hierbei wurde sie in einem Verhältnis von 1:100 mit H₂O verdünnt und die Extinktion bei einer OD_{260nm} gemessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht dies bei einer Extinktion von OD_{260nm} = 1 einer Konzentration von 50 µg/µl. Daraus ergibt sich folgende Berechnung:

$$\text{Konz. } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260\text{nm}} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Um eine Verunreinigung durch Proteine auszuschließen wurde ebenfalls bei OD_{280nm} gemessen. Nach einer optimalen Aufreinigung sollte der Quotient von OD_{260nm} / OD_{280nm} einem Wert von 1,8 – 2,0 entsprechen.

4.2.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten über Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Molekülen für analytische oder präparative Zwecke wurden Agarosegele verwendet. Aufgrund ihres Phosphatrückgrates ist die DNA proportional zu ihrer Größe negativ geladen. Durch Anlegen einer Spannung wandern die DNA-Moleküle zum Pluspol (Anode), wobei die Geschwindigkeit abhängig von der Porengröße des Gels ist und mit dem jeweiligen Zustand des DNA-Moleküls korreliert. Je nach Größe des aufzutrennenden Fragments wurden unterschiedliche Konzentrationen von Agarose gewählt, welche letztendlich die Porengröße bestimmen. In den meisten Fällen wurde ein 1%iges Gel verwendet [1 g Agarose auf 100 ml 1 x TBE + 6 µl Ethidiumbromid (60 µg)]. Das ausgehärtete Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gelegt, welche mit 1 x TBE gefüllt war. In die einzelnen Taschen des Agarose-TBE-Gels wurden die Proben mit einschließlich 10 x Ladepuffer (BlueJuice™ Invitrogen) und einem DNA Standardmarker (1kb Plus™Ladder, Invitrogen) aufgetragen. Nach Befüllung der Taschen wurde das elektrische Feld (100 V) angelegt. Durch den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff (Ethidiumbromid) wurden die DNA-Banden unter UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht und gleichzeitig im GDS Bildbearbeitungsprogramm (Intas) visualisiert.

4.2.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion erfolgte mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit der Firma Zymo Research. Mit einem Skalpell wurden die gewünschten Fragmente herausgeschnitten und für die Volumenbestimmung abgewogen. Pro 100 mg Agarosegel wurde das drei-fache Volumen des ADB Puffers eingesetzt, um das Gel durch die Inkubation bei 55°C für 5-10 Minuten und ständiger Durchmischung aufzulösen. Die erhaltene gelblich gefärbte Probe wurde in eine Zymo-Spin™ Säule überführt. Nach kurzem abzentrifugieren, wurden 200 µl Wasch-Puffer hinzugegeben. Dieser Schritt wurde wiederholt um anschließend die Säule trocken zu zentrifugieren und in ein neues Reaktionsgefäß zu überführen. Mit 40 µl ddH₂O erfolgte die Elution der DNA.

4.2.8 DNA-Restriktionsanalysen

Für Klonierungszwecke wurden Restriktionsendonukleasen verwendet. Mit Hilfe dieser Enzyme wurden Zielgene in Vektoren eingebracht bzw. dienten sie zur Verifizierung von Vektoren bzw. deren Linearisierung. Die Enzyme schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzmotiven und bewirken je nach Charakter stumpfe (*blunt*) bzw. klebrige (*sticky*) Enden. Aus folgenden Komponenten setzte sich hierbei der Reaktionsansatz zusammen:

Restriktionspuffer [10x] (spez. für gewähltes Enzym)	3 µl
BSA (wenn notwendig)	0,3 µl
Enzym (5 Units/µl)	1 µl
Plasmid DNA (5 µg)	x µl
ddH ₂ O	ad 30 µl

Der Restriktionsverdau erfolgte für eine Stunde bei 37°C.

4.2.9 Ligation

Die, durch Restriktionsanalyse geschaffenen, kompatiblen Enden wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase zu einem Strang verbunden, indem die Ligase eine kovalente Phosphodiesterbindung zwischen einer 3' Hydroxylgruppe eines Nukleotides und einer 5' Phosphatgruppe eines Anderen bewerkstelligt. Für diese Reaktion ist ATP notwendig, welche im 10 x Ligase Puffer vorliegt. Anhand der elektrophoretischen Auftrennung wurde die Konzentration des linearisierten Vektors und des Zielgens ermittelt, welche in einem Verhältnis

von 3:1 (Insert:Vektor) eingesetzt wurden. Der 1 x Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

T4-Ligationspuffer [10x]	1 µl
Vektor linearisiert (10-50 ng)	1 µl
PCR-Produkt linearisiert	3 µl
T4 DNA Ligase (3 Units/µl)	1 µl
ddH ₂ O	4 µl

Die Inkubation für die Ligation erfolgte für eine Stunde bei RT.

4.2.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei dieser Methode handelt es sich um eine gezielte Vervielfältigung von DNA (Mullis et al., 1986). Dabei läuft die Reaktion zyklisch ab, so dass es zu einer exponentiellen Vermehrung der Ziel-DNA kommt. Für die exponentielle Amplifikation wurde ein Thermozykler (T Gradient, Biometra) verwendet. Hierbei wurde zunächst ein Anfangsschritt eingelegt, der den DNA-Doppelstrang unter Erhitzen bei 94°C für zwei Minuten voneinander trennt (Schmelzschrift). In den nachfolgenden 30 Zyklen erfolgte der Schmelzschrift bei 95°C für eine Minute, die Primerhybridisierung, deren Temperaturoptimum je nach Basenpaar-Zusammensetzung abhängig ist (ca. 50°C-68°C) und der Verlängerungsschrift, dessen Temperaturoptimum abhängig von der eingesetzten Polymerase (72°C, 1 min/kb) ist. Anhand gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Verifizierung der PCR-Produkte.

Der PCR - Ansatz wurde aus folgenden Komponenten zusammengesetzt:

Master Mix (Enzym [1U/µl], PCR-Puffer Pfx [10x], dNTPs [4mM], MgSO ₄ [50mM])	22 µl
Primer 1 [10 pmol/µl]	1 µl
Primer 2 [10 pmol/µl]	1 µl
DNA [> 10 ng]	x µl
ddH ₂ O	ad 30 µl

Die Amplifikation wurde in einem automatischen Thermozykler (T Gradient, Biometra) mit folgendem Programm durchgeführt:

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	
Denaturierung	94°C	2 Minuten	1
Denaturierung	95°C	1 Minute	
Primerhybridisierung	58°C	30 Sekunden	30x

Polymerisation	72°C	25 Sekunden/1 kb	
Polymerisation	72°C	10 Minuten	1

4.2.11 Klonierung

TA-Klonierung mittels pGEM®-T Easy Vektor System

Um PCR Produkte erfolgreich zu klonieren wurde das pGEM®-T Easy Vektor System von Promega genutzt. Hierbei handelt es sich um einen Vektor, welcher am 3'-Ende zusätzliche Thymidin d(T)-Überhänge aufweist. Durch die Eigenschaft der Platinum® Pfx DNA Polymerase d(A)-Überhänge dem PCR-Produkt beizufügen, wird die Ligation zu dem pGEM®-T Easy Vektor begünstigt. Über die Blau-Weiß-Selektion ist erkennbar, ob die Ligation in die multiple Klonierungsstelle erfolgreich ist. Hierbei wird das Leseraster des *lacZ*-Gens und demzufolge die Umsetzung des zugegebenen Substrates x-Gal nicht möglich ist, so dass weiße Kolonien das Insert tragen.

Gateway® Klonierung

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Plasmide genutzt, die durch die Gateway™ Technologie (Life Technologies) hergestellt wurden. Die Methode ermöglicht eine gerichtete Klonierung unabhängig von Restriktionsschnittstellen. Zur Grundlage des Systems dient das natürlich vorkommende Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ . Die dafür notwendigen „attachment“ (*att*)-Bereiche sind modifiziert und in die verschiedenen Vektoren integriert. Die daraus entstandenen Zielvektoren („*Destination*“-Vektoren) enthalten attR1- und attR2-Sequenzen. Die für die Rekombination notwendigen homologen Sequenzen (attL1- und attL2-Sequenzen) befinden sich ebenfalls in den Eingangsvektoren („*ENTR*™-Vektor). Das zu untersuchende Gen wird zunächst in den Eingangsvektor kloniert. Über die LR-Rekombinationsreaktion mit dem Zielvektor, welcher einen Promotor enthält, erfolgt die Generierung eines Expressionsplasmids. In dem Zielvektor ist ebenfalls ein *ccdB*-Gen integriert, welches zu einer Hemmung der Gyrase in *E. coli* führt (Bernard und Couturier, 1992), jedoch wird dieses bei einer LR-Rekombinationsreaktion mit dem zu untersuchenden Gen ausgetauscht. In der nachfolgend durchgeführten Transformation wachsen daher nur Bakterien, die ein Expressionsplasmid enthalten. Für die weitere Selektion enthalten Eingangsvektoren eine Kanamycin-Resistenz, während Zielvektoren eine Ampicillin-Resistenz aufweisen.

Um dieses System zu nutzen wurde das zu untersuchende Gen mittels Restriktionsverdau (Kap. 4.2.8) und Ligation (Kap. 4.2.9) in den passenden Eingangsvektor (*pENTR*TM 1A, 2B und 3C, Life Technologies) gebracht. Diese unterscheiden sich in ihrem Leseraster durch eine Base. Zur Überprüfung positiver Klone auf die Richtigkeit des Leserasters und der Sequenzabfolge wurden sie zum Sequenzieren eingeschickt (GATC, Konstanz). Nach der Verifizierung erfolgte die LR-Rekombinationsreaktion, wodurch das zu untersuchende Gen vom Eingangsvektor in den gewünschten Zielvektor gebracht wurde. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

TE Puffer	2,5 µl
Zielvektor (300 ng)	1,5 µl
Eingangsvektor mit Zielgen (100-300 ng)	1 µl
LR Clonase TM Reaktionspuffer [5x]	2 µl
LR Clonase TM Mix	2 µl

Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 25°C bevor die Reaktion durch 1 µl Proteinase K (4 µg) für 10 Minuten bei 37°C abgestoppt wurde. Die Produkte wurden mittels Transformation in kompetente *E. coli* gebracht und auf Selektionsplatten mit Ampicillin, ausplattiert. Über Restriktionsanalyse und DNA-Auftrennung durch die Gelelektrophorese wurden positive Klone ermittelt.

4.2.12 Reverse Transkription (komplementäre DNA)

Zum Umschreiben einer RNA-Probe (Kap. 4.2.4) wurde SuperScript II Reverse TranskriptaseTM (Life Technologies) genutzt. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die von einer einzelsträngigen RNA einen komplementären DNA-Strang synthetisiert. Für den Ansatz wurden 5 µg Gesamt-RNA, 1 µl 10 mM dNTP Mix und 1 µl 0,5 µg/µl oligo(dT) Primer zusammengefügt und mit RNase freiem Wasser bis auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 65°C inkubiert, dann mit 4 µl 5 x „*first-strand*“ Einzelstrangpuffer und 2 µl 0,1 M DTT für zwei Minuten bei 42°C. Schließlich wurden 200 U SuperScript II Raumtemperatur (RT) hinzugegeben und für 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Durch einen Hitzeschock von 15 Minuten bei 70°C wurde die Reaktion inaktiviert.

4.2.13 Quantitative PCR (RT-PCR)

Bei der quantitativen bzw. Echtzeit-PCR (Real Time PCR oder RT-PCR) handelt es sich um eine Polymerase-Kettenreaktion, die spezifische Nukleotidsequenzen *in vitro* vervielfältigt und deren Verlauf gleichzeitig zu verfolgen ist. Die Messung der Produktzunahme erfolgt durch Fluoreszenzlicht, welches in Abhängigkeit zur Produktzunahme proportional steigt. Dies ermöglicht die exponentielle Phase der Reaktion zu identifizieren und für eine Quantifizierung der Matrizenmenge zu nutzen. In dieser Methode werden PCR-Produkte sequenzspezifisch detektiert, indem fluorophormarkierte Oligonukleotide an die Zielsequenz binden. Der Zyklus, bei dem ein exponentieller Anstieg erfolgt ist, ist dabei der CT-Wert (*engl. cycle threshold*). Für eine quantitative Aussage wurde der Δ CT-Wert ermittelt, der sich aus der Differenz zu einem Haushaltsgen mit dem zu untersuchenden Gen bildet und letztendlich eine Aussage über die relative Menge an Transkript eines zu untersuchenden Gens gibt.

In eine 96-optische Reaktionsplatte (Applied Systems) wurden je 20 μ l pro Lochschale des folgenden Ansatzes gegeben und mit je 2 μ l DNA versetzt.

Ansatz mit fluorophoren Gensonden

2 x Universal PCR Mastermix TaqMan™ (Roche)	10 μ l
Oligonukleotid 1 (20 μ M)	0,2 μ l
Oligonukleotid 2 (20 μ M)	0,2 μ l
Gensonde („probe“) (2 μ M)	0,2 μ l
ddH ₂ O	7,4 μ l

Die Reaktion erfolgte im Gerät 7500 Real Time System (Applied Biosystems). Dem Aktivierungsschritt für 10 Minuten bei 95°C folgten 40 Zyklen mit je einem Denaturierungsschritt für 15 Sekunden bei 95°C, einem Anlagerungsschritt und einem Verlängerungsschritt für je eine Minute bei 60°C.

4.2.14 *In situ* Hybridisierung gegen TOX3

Diese Methode wurde basierend auf Dr. Gregor Eichele's Protokoll (Max-Planck-Institut und Baylor College Medicine) durch das Institut von Allen Brain Atlas durchgeführt. Hierfür wurde eine nicht-radioaktive Digoxigenin-basierende Technik angewendet, die die exprimierenden Zellen mit dem spezifischen Transkript kennzeichnen. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde mit H₂O₂ im Gewebe geblockt und unter Einsetzung von Proteinase K wurde die Erhöhung der Permeabilität für die Hybridisierung an die komplementäre Ziel-mRNA in die Wege geleitet.

Die mit Digoxigenin-gekennzeichnete Probe wurde auf das Gewebe gegeben und für 5,5 Stunden bei 63,5°C inkubiert. Mit Hilfe des anti-Digoxigenin Antikörpers mit konjugierter Meerrettichperoxidase (HRP), der Zugabe von Biotin-gekoppeltem Tyramid-Substrat und anschließende Neutravidin-Alkalische Phosphatase-Behandlung wurde eine Spaltung des Substrats verursacht, die zu einem kolorimetrischem Signal führte. Die in dieser Arbeit gezeigten *in situ* Mausembryo-Daten stammen daher aus der Datenbank von Allen Brain Atlas (<http://developingmouse.brain-map.org>).

4.3 Proteinbiochemische Techniken

4.3.1 Herstellung und Aufreinigung eines rekombinanten Fusionsprotein mit GST-Anhang

Zur Herstellung des rekombinanten Proteins wurde das induzierbare pGex-Vektor-System eingesetzt. Hierbei wurde durch Zugabe von IPTG (IPTG-Dioxanfrei, Fermentas), der tac-Promoter und demzufolge die Genexpression positiv reguliert. Dem Promoter ist die Glutathion-S-transferase (GST) nachgeschaltet, sodass es bei einer Klonierung in die dafür vorgesehene multiple Klonierungsstelle zu einem rekombinanten Fusionsprotein mit GST-Anhang kommt. Über eine Affinitätschromatographie mittels Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare), welche die Fusionsproteine aus dem Gesamt-Lysat herausfischen, mit anschließender Trennung des GST-Proteins vom eigentlichen Zielprotein durch die PreScission™ Protease (GE Healthcare), wurde aufgereinigtes Zielprotein erhalten.

Klonierung des N-terminalen TOX3-Fragments in den pGex-6p-2 Vektor

Über Primer, die mit einer Restriktionsschnittstelle (Kap. 3.11.1) am jeweiligen 5'-Ende generiert wurden, wurde aus dem humanen Volllänge TOX3 die N-terminale Sequenz mit den jeweiligen Restriktionsschnittstellen amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese und anschließender DNA-Agarose-Extraktion aufgereinigt und in den pGEM®-T Easy Vektor ligiert. Der Ligationsansatz wurde über ein Hitzeschockverfahren in kompetente *E. coli* Bakterien gebracht, zur Vermehrung des DNA-Vektors. Nach Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte die Restriktion. Nach DNA-Agarose-Extraktion konnte das N-terminale TOX3-Fragment in den pGEX-6P-2 Vektor erfolgreich ligiert werden.

Expression des rekombinanten Proteins durch IPTG

Das N-terminale TOX3-Fragment in dem pGEX-6P-2 Vektor wurde mittels Hitzeschockverfahren in den Bakterienstamm BL21(DE3) transformiert. Diese Bakterien wurden über Nacht bei 37°C im Schüttler hochgeschüttelt. Von der Übernachtskultur wurde in einem Verhältnis 1:100 ein vier Liter LB-Medium^{Amp} -Kolben angeimpft. Die OD der wachsenden Bakterien wurde photometrisch gemessen. Nach Erreichen des exponentiellen Wachstums der Bakterien (OD_{600nm} von 0,6-0,9) wurde zur Induktion des Fusionsproteins IPTG in einer finalen Konzentration von 1 mM hinzugegeben. Nach vier Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Bakterien bei 3000 Umdrehung pro Minute für 10 Minuten herunter zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet wurde bei -80°C gelagert.

Native Proteinaufreinigung

Lysepuffer:	Waschpuffer 1:	Waschpuffer 2:	PreScission™
1x PBS pH 7,4	1x PBS	50 mM Tris-HCl	Spaltungspuffer:
20 mM MgCl ₂	0,5% TritonX-100	0,5% TritonX-100	50 mM Tris-HCl pH 7.00
0,5% TritonX-100 (Sigma Ultra)	5 mM DTT	150 mM DTT	50 mM NaCl
5mM DTT (Duchefa Biochemie)			1 mM EDTA
1 Protease-Cocktail-Inhibitor Tablette (Roche)			1 mM DTT
20 µg/ml Lysozym (Sigma)			
20 µg/ml DNase			

Tabelle 8: Chemikalien für native Proteinaufreinigung

Zur Aufreinigung des Fusionsproteins GST-NtermTOX3 wurde das Pellet zunächst lysiert (1 g = 5 ml Lysepuffer) und anschließend sonifiziert (1 x 10-fach). Zugabe von DNase 20 µg/ml für 15 Minuten bei RT verhinderte dabei, dass die Zellsuspension zu zähflüssig wurde. Anschließend wurde bei 6000 Umdrehung pro Minute bei 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Säule (Superdex G75 FPLC, GE Healthcare) gegeben, welche zuvor mit Glutathion Sepharose 4B und Waschpuffer äquilibriert wurde. Die Säule wurde mit Parafilm abgedichtet und für 1,5 Stunden auf einem Rotiergerät bei RT geschwenkt. Nach mehreren Waschschritten mit Waschpuffer 1 (10-faches Säulenvolumen (SV)) und Waschpuffer 2 (dreifaches SV), wurde die PreScission™ Protease im Spaltungspuffer (dreifaches SV) über Nacht bei 4°C hinzugegeben. Der erhaltene Durchfluss wurde nochmals auf eine Säule mit Glutathion Sepharose 4B gegeben um Reste der GST-PreScission™ Protease herauszufischen.

4.3.2 Extraktion von Proteinlysaten

Für die Extraktion von Gesamt-Protein aus adhärennten Zellkulturen wurden Zellrasen mit einer Konfluenz von bis zu 90% verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit dem Zellysepuffer RIPA (Life Technologies) für fünf Minuten bei 4°C inkubiert. Dieser Puffer eignet sich dafür zytosolische Proteine unter physiologischen Bedingungen zu erhalten, welches durch die Zugabe von Protease-Inhibitoren (CompleteMini, Roche) unterstützt wird. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 20 Minuten bei 13.000 Umdrehung pro Minute und 4°C zentrifugiert um Zelltrümmer zu pelletieren. Für weitere Anwendungen wurde der Überstand aufgehoben oder Schock gefroren und bei -80°C gelagert.

4.3.3 Quantitative Proteinbestimmung

Die quantitative Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte photometrisch. Hierzu wurde das BCA Protein Assay Kit (Pierce) nach Herstellerangaben verwendet. Das Prinzip beruht auf der Biuretreaktion, in der zweiwertiges Kupfer (Cu^{2+}) in einer alkalischen Lösung zu einwertigem Kupfer (Cu^{1+}) reduziert wird. BCA (Bicinchoninsäure) reagiert mit einwertigem Kupfer zu einem violett-blaufarbenen Komplex, der sein Absorptionsmaximum bei 562 nm hat. Die somit erhaltene Blaufärbung korreliert mit der Menge an Protein pro Probe, woraus sich letztendlich die Konzentration anhand der Standardreihe, ermitteln lässt. Um die Proteinkonzentration in der Probe zu bestimmen, wurde eine BSA-Proteinstandardreihe mit verschiedenen BSA-Konzentrationen (0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) hergestellt. In eine transparente 96-Lochnapfschale wurde die Proteinstandardreihe zu je 3 x 20 μl pipettiert. Die eigentlichen Proben wurden im Verhältnis 1:10 bzw. 1:50 verdünnt und ebenfalls als Triplikate in die 96-Lochnapfschale pipettiert. Nach Zugabe der BCA-Lösung wurde für 30 Minuten bei 60°C inkubiert und anschließend die Absorption bei 560 nm mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Lesegeräts (Tecan) gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte durch die Magellan Software.

4.3.4 SDS-Polyacrilamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Gesamt-Proteinlysate wurde mittels SDS-PAGE durchgeführt. Das Prinzip beruht darauf, dass die Proteine, welche durch SDS-Maskierung entsprechend ihres Massenverhältnisses negativ geladen sind, anhand ihres unterschiedlichen Reibungskoeffizienten durch das engporige Acrylamidgel aufgetrennt werden. Zu diesem

Zweck wurden Proteinlysate mit 10 x Reduzierungsagenz (Life Technologies) und 4 x LDS Ladepuffer (Life Technologies) für fünf Minuten bei 99°C erhitzt. Gleiche Mengen an Protein, sowie einem Molekulargewichtsstandard (MagicMark™XP Western Protein Standard, Life Technologies) wurde in die einzelnen Taschen des denaturierenden 8-16% Bis-Tris Gradientengels (Thermo Scientific) geladen. Die Laufzeit in 1 x Laufpuffer (MOPS Buffer, Life Technologies) betrug bei 120 V 45 Minuten.

4.3.5 Immunoblot (IB)

Diese Nachweismethode erlaubt die Ermittlung von spezifischen Proteinen bzw. der relativen Menge eines bestimmten Proteins. Nach Auftrennung der Proben auf einem SDS-Gel wurde der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran durch das iblot™ Gerät (Life Technologies) durchgeführt. In dieses Gerät wurde das Gel auf dem unterem Aufsatz, welches eine Kupferanode enthält, mit Transfermembran, aufgelagert und mit dem oberen Aufsatz, welches eine Kupferkathode trägt, bedeckt. Der Stromfluss erfolgte über die beiden Elektroden durch hohen Ionengehalt in der Gelmatrix. Durch die Distanzminimierung der Elektroden und gleichzeitigen hohen Stromfluss wurde die Transferzeit auf nur sieben Minuten reduziert. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau S Lösung behandelt. Diese Farbreaktion dient als Nachweis für die Übertragung von Protein auf die Membran, indem es reversibel an positiv geladene Aminogruppen bindet. Durch mehrmaliges Waschen mit PBS-T (Kap. 3.6) wurden die Bindungen wieder entfernt. Anschließend wurde die Membran in einer Lösung aus PBS und 3% Magermilchpulver für eine Stunde behandelt, um unspezifische Proteinbindungen zu blocken und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler mit dem Primärantikörper inkubiert, welcher spezifisch an das gesuchte Protein bindet. Nach dreimaligen Waschen mit PBS-T wurde die Membran mit einem Zweitantikörper, welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff (IRDye 680 oder IRDye 800, Licor) konjugiert ist, für eine Stunde bei RT inkubiert. Mit Hilfe des Odyssey Lesegeräts wurden die Banden im Nah-Infrarotbereich sichtbar gemacht.

4.3.6 Immunpräzipitation (IP)

Für den Nachweis von Protein-Protein Interaktionen wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierfür wurden Materialien der Firma Pierce verwendet. Zwei potentielle Interaktionsproteine wurden zunächst ko-transfiziert, wobei ein Protein mit einem Myc-

Anhang (EQKLISEEDL) versehen war. Nach der Zellyse, welche unter physiologischen Bedingungen gehandhabt wurde, und einer Verifizierung der beiden Proteine anhand eines Immunoblots, wurden 500 µg Proteinmenge über Nacht mit Agarosekügelchen inkubiert. Diese sind auf ihrer Oberfläche mit immobilisierten Myc-Antikörpern gekoppelt. Nach der Inkubation wurde das Gemisch auf die sogenannte Handee™ Spin Säule (Pierce) gegeben. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde die Säule dreimal mit kaltem TBS gewaschen. Zum Eluieren der gebundenen Proteine wurden 25 µl des 2 x nicht-reduzierenden Probenpuffer (Pierce) hinzugegeben, für fünf Minuten bei 99°C erhitzt und abzentrifugiert. Für die SDS-Gelelektrophorese wurde das eluierte Protein mit 2 µl 10 x Reduzierungspuffer (Life Technologies) versehen und nochmals für fünf Minuten bei 99°C erhitzt, bevor es auf ein 8-16%iges Bis-Tris Gradientengel (Thermo Scientific) geladen wurde.

4.3.7 *In situ* Ko-Immünpräzipitation (InCell-Ko-IP)

Die sogenannte InCell-Ko-IP Methode erlaubt die Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen in der Zelle unter physiologischen Bedingungen (Söderberg et al., 2006; Leuchowius et al., 2010). Das Prinzip beruht darauf, dass zwei spezifische Primäntikörper an ihre jeweiligen Zielproteine binden, die wiederum von Sekundäntikörpern mit kurzer, unikater DNA-Sequenz gebunden werden. Im Fall einer räumlichen Nähe der DNA-Sequenzen der Sekundäntikörper wegen einer Protein-Proteinkomplexbildung, kommt es zur Ligation und schließlich zu einer Amplifikation von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden, die wiederum als Fluorophorpunkte im Fluoreszenzmikroskop sichtbar sind. Hierfür wurden Materialien (Duolink® II) der Firma Olink® Bioscience verwendet. Für die Durchführung wurden zunächst 200.000 Zellen in eine 16-Lochnapfschale (Lab-Tek) mit Glasboden gesät. Zellen wurden für 48 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert und anschließend mit 4% PFA für 10 Minuten bei RT fixiert. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden in einer Feuchtkammer (Abdeckbare Plastikbox mit ddH₂O benetztem Zellstoff) durchgeführt. Fixierte Zellen wurden unter Schwenken bei RT mit 0,5% TritonX-100 für 10 Minuten permeabilisiert. Nach Waschschrinen mit 0,005% Tween®20 in TBS, wurde für eine Stunde mit Duolink II Blockierlösung geblockt. Die beiden Primäntikörper TOX3 (Sigma) und HDAC1 (Cell Signaling) wurden zusammen bzw. jeweils einzeln als Kontrolle über Nacht bei 4°C auf die Zellen gegeben. Tags darauf wurden die Zellen mit Duolink II PLA probe Lösungen anti-Maus Minus und anti-Kaninchen Plus inkubiert für eine Stunde bei 37°C. Nach Zugabe einer Ligation-Ligase Lösung für 30 Minuten bei 37°C wurde die Polymerase Lösung für 100

Minuten bei 37°C hinzugegeben. Um die Anzahl der Fluorophorpunkte quantifizieren zu können wurden die Zellkerne durch 100 ng/ml DAPI-Lösung (4',6'-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) angefärbt. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde nochmals mit PBS gewaschen, anschließend die Zellen auf dem Glasdeckel auf einem Objektträger mit Medium eingebettet (Mounting Medium, Dako) und nach Erhärtung wurden die Ränder des Glasdeckels mit Nagellack luftdicht verschlossen. Die Aufnahmen der Proben erfolgten durch das Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51. Die Auswertung erfolgte durch die Software ImageJ (Kap. 3.14.3).

4.3.8 Immunhistochemie/ Immunzytochemie

Diese Methode beruht darauf molekulare Strukturen sowie Proteine in einem spezifischen Gewebe bzw. Kompartiment von Zellen, mit Hilfe fluoreszierender Antikörper, nachzuweisen.

Vorbereitung von Präparationsmaterial

Fixierlösung:	Blockierlösung:	Färbelösung:
4% PFA (Histofix, Roti®)	1% Roti®-ImmunoBlock (Roth) 5% Normal Goat Serum (Life Technologies, Karlsruhe) 0,5% TritonX-100 (Fluka, Buchs) 1x PBS	1:1 (Blockierlösung : 1x PBS)

Tabelle 9: Chemikalien für Immunhistochemie

In dieser Arbeit wurden Embryonen (E13.5) aus dem Muttertier entnommen und zwei Stunden mit 4% PFA fixiert. Durch Übernachtslagerung in einer 25%igen Sukrose-Lösung wurde dem Gewebe Wasser entzogen. In dem Fixiergel Tissue-Tek (Sakura) mit anschließender Schockfrierung in Stickstoff wurde das Gewebe fixiert. Mit Hilfe des Schnellschnitt-Kryostats (Leica CM 1900 UV, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) wurden histologische Embryo-Schnitte angefertigt. Eine Schichtbreite von 5-8 µm konnte dabei erzielt werden. Nach erneutem inkubieren mit 4% PFA für 10 Minuten bei RT der geschnittenen Präparate, wurde eine Blockierlösung mit 0,5% Triton-X aufgetragen für eine Stunde bei RT um Hintergrundleuchten zu reduzieren und zu permeabilisieren. Bei allen Inkubationsschritten wurden die Präparate in einer Feuchtkammer (Abdeckbare Plastikbox mit ddH₂O benetztem Zellstoff) gehalten.

Vorbereitung von Zellpräparaten

Fixierlösung: 4% PFA (Histofix, Roti®)	Permeabilisierungslösung: 1x PBS, 0,25% Triton X-100 (Fluka, Buchs)	Blockierlösung/Färbelösung: 1% Roti®-ImmunoBlock (Roth), 0,1% Tween®-20 (Sigma), 1x PBS
--	--	---

Tabelle 10: Chemikalien für Immunzytochemie

Zellen wurden zu einer bestimmten Zellzahl auf mit Poly-L-Ornithin (PLO, Sigma-Aldrich) beschichteten Deckgläschen ausplattiert. Nach 24 Stunden oder erforderlichen Expressionszeit wurden die Zellen mit 4% PFA für 15 Minuten bei RT fixiert. Anschließend wurden sie mit 0,25% Triton-X permeabilisiert und durch Inkubation von einer Stunde bei RT mit Blockierlösung wurde das Hintergrundleuchten reduziert.

Detektion mittels Fluoreszenzantikörper- indirekte Methode

Nach erfolgreicher Blockierung freier Bindestellen wurden die Primäantikörper in der Färbelösung entsprechend verdünnt und über Nacht auf die Präparate gegeben. Tags darauf wurde nach mehrmaligem Waschen in 1% PBS der Zweitantikörper, welcher mit einem fluoreszierenden Protein gekoppelt ist, aufgetragen und für eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Um Zellkerne sichtbar zu machen wurde DAPI 1:10.000 (100 ng/μl) für fünf Minuten bei RT im Dunkeln dazugegeben. Abschließend wurden die Präparate in ddH₂O gewaschen und mit Eindeckmedium (Dako-Fluorescent Mounting Medium) unter einem Deckglas eingedeckelt. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Olympus BX51 aufgenommen.

4.3.9 Stimulationsagenzien

Agenzien	Verdünnung	Zeit	Lösungsmittel	Hersteller
Rekombinantes humanes TGFβ1	Stocklsg. 5 μg/ml →1:1000 (5 ng/ml)	2-24 Stunden	Zitronen- säure	PeptoTech (Kat.-Nr. 100-21)
Inhibitor von TGFβ1 - SB 431542	10 μM	Über- nacht	DMSO	TOCRIS (Kat.-Nr. 1614)

Rekombinante Jagged 1 Fc Chimäre (Ratte)	Stocklsg.: 100 µg/ml → 1:100 (1 µg/ml)	2-24 Stunden	PBS	R&D Systems (Kat.- Nr. 599-JG-100)
Inhibitor γ-Sekretase DAPT	Stocklsg.: 100 µM → 1:100 (1 µM)	2-24 Stunden	DMSO	Sigma-Aldrich (Kat.-Nr. S2188- 1MG)

Tabelle 11: Stimulationsagenzien

4.3.10 Luminometrie

4.3.10.1 Dual-Luziferase Verfahren

In diesem Verfahren wird sowohl Luziferin durch die Luziferase des Leuchtkäfers, als auch Coelenterazin durch Renilla, die Seefeder, unter Freisetzung von Licht umgesetzt. Die Aktivität eines beliebigen Promotorfragments oder Antwort-Elements lässt sich daher durch messbare Lichtemission bestimmen. Je stärker die Promotoraktivität, desto mehr Luziferase-/Renilla-Protein wird gebildet, welches mit der Lichtemission korreliert. Die Renillaaktivität dient hierbei zur Messung der tatsächlichen Transfektionseffizienz der Konstrukte, so dass nach der Messung auf die Aktivität des Renillawertes normalisiert werden muss. Um die Lumineszenz zu messen, wurden Zellen in einer 12-Lochnapfschale mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die transfizierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 200 µl Zellkultur-Lysepuffer (PromoKine) lysiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zwei weiße 96-Mikrotiterplatten (Nunc) wurden mit je 3 x 20 µl Zelllysat pipettiert. Die erste Platte wurde durch Zugabe von je 80 µl Luziferin, gelöst in Luziferase-Puffer, zu den einzelnen Proben auf Luziferase-Aktivität gemessen. Anschließend wurde die zweite Platte, welche ebenfalls mit Triplikaten beladen wurde, zusätzlich mit 40 µl Enhancer-Substrat versetzt und anschließend mit 50 µl Coelenterazin, gelöst in Puffer (1:50) auf Renilla-Aktivität gemessen. Die Substrate wurden injiziert und konnten direkt gemessen werden (Tecan Messgerät).

4.3.10.2 LUMIER (Luminescence-based mammalian interactome mapping technology)-Screen

Lysepuffer:	Waschpuffer:
20 mM TRIS/HCl pH 7,5 250 mM NaCl 10 mM EDTA 10 mM DTT 0,0125 U/μl Benzonase-Nuklease 0,0125 U/μl Protease-Inhibitor 0,0125 U/μl Phosphotase-Inhibitor	1x PBS 1 mM DTT

Tabelle 12: Chemikalien für LUMIER-Screen

Zur Identifizierung von Protein-Protein Interaktionen wurde ein sog. LUMIER (*engl. Luminescence-based mammalian interactome mapping technology*)-Screen in Kooperation durch Dr. Manfred Kögl am DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum) in Heidelberg durchgeführt.

Der LUMIER-Screen ist eine hoch sensitive Methode, die zur Validierung und Detektion von Protein-Protein Interaktionen genutzt werden kann (Barrios-Rodiles et al., 2005; Braun et al., 2009). Hierfür wurden Proteine entweder N-terminal oder C-terminal mit *Staphylococcus aureus* Protein A-Anhang oder mit *Renilla reniformis* Luziferase fusioniert und in HEK-293GP-Zellen transient exprimiert. 1×10^4 HEK-293GP-Zellen pro 96-Lochnapfschale wurden mit 20 ng Expressionsplasmid-DNA mit 0,05 μl Lipofectamin™ 2000 transfiziert (Abb. 8). Nach 40 Stunden Expression wurde das Medium abgenommen, die Zellen auf Eis mit 10 μl kaltem Lyse-Puffer lysiert, der wiederum mit magnetischen Schaf-anti-Kaninchen IgG-Kügelchen (Endkonz. 2 mg/ml) versetzt war. Nach 15 Minuten Inkubation wurde 100 μl Waschpuffer hinzugegeben. Davon wurden 10% als *input*-Probe abgenommen. Mit Hilfe des *Hydroflex™ microplate washer* (Tecan) wurde das Lysat sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Die Luziferase-Aktivität wurde sowohl von der *input*-Probe (Normalisierung auf Transfektionseffizienz) als auch von den gewaschenen Kügelchen (*bound*-Probe) gemessen. Anhand der Luziferase-Aktivität konnte Rückschluss auf eine potentielle Protein-Protein Interaktion gemacht werden. Als Negativkontrolle (*engl. negative control, nc*) wurde jedes Luziferase-Fusionsprotein auf eine Interaktion mit einem A-Dimer-Fusionsprotein gemessen, um unspezifische Bindung an den A-Anhang auszuschließen. Folgende Berechnung diente zur Normalisierung:

$$\log(\textit{bound})/\log(\textit{input}) - \log(\textit{bound nc}) / \log(\textit{input nc})$$

Zur Verifizierung wurde jede potentielle Interaktion dreimal individuell wiederholt.

Normalisierte und korrigierte Interaktionssignaldaten wurden als z-Faktor deklariert. Eine positiv spezifische Interaktion wurde erst ab einem z-Faktor größer oder gleich 1,0 bewertet. Um keine falsch positiven Interaktionspartner zu bekommen, wurde der z-Faktor auf den ursprünglichen Datensatz (n=1000) berechnet, indem der Mittelwert durch die Standardabweichung geteilt wurde.

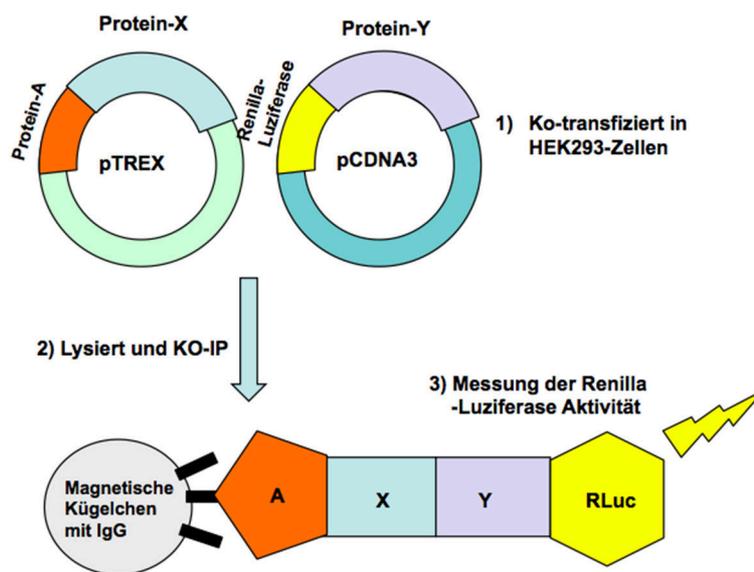


Abbildung 8: Schematische Darstellung der LUMIER-Methode. Kodierende Sequenzabschnitte werden mittels des Gateway®Systems in das jeweilige Expressionsplasmid (pTREX bzw. pCDNA3) kloniert und in HEK-293GP-Zellen transfiziert. Nach 40 Stunden werden die Zellen lysiert. Die im Lysepuffer enthaltenen IgG-gekoppelten magnetischen Kügelchen binden das Fusionsprotein mit A-Anhang, durch stabile Bindung zu einem weiteren Fusionsprotein mit *Renilla reniformis* Luziferase wird diese ebenfalls aus dem Lysat präzipitiert. Die gemessene Luziferase-Aktivität lässt darauf schließen, dass eine Protein-Protein Interaktion stattgefunden hat.

5. Ergebnisse

5.1 Generierung und Charakterisierung TOX3-spezifischer Antikörper

Um die *in situ* Hybridisierungsergebnisse der öffentlich zugänglichen Datenbank Allen Brain Atlas (<http://developingmouse.brain-map.org>) (Abb. 7) zu verifizieren, wurde für diese Arbeit ein eigener TOX3-Antikörper generiert, da zu dem Zeitpunkt kein kommerzieller TOX3-Antikörper auf dem Markt war. Nach erfolgreicher Klonierung des N-terminalen Teils von TOX3 in das induzierbare pGEX-6p-2-Vektorsystem, wurde es in BL21 *E. coli* Bakterien transformiert und exprimiert (Kap. 4.3.1). Um mögliche Fehler auszuschließen wurde das erhaltene Konstrukt, während der Klonierung mittels Restriktionsanalyse kontrolliert und mit vektorspezifischen Primern sequenziert. Eine anschließende Aminosäurenanalyse (Daten nicht gezeigt) in Kooperation mit Frau Dr. Sabine Metzger (BMFZ, Düsseldorf) verifizierte das erhaltene und gereinigte N-terminale TOX3-Fragment (Abb. 9 A).

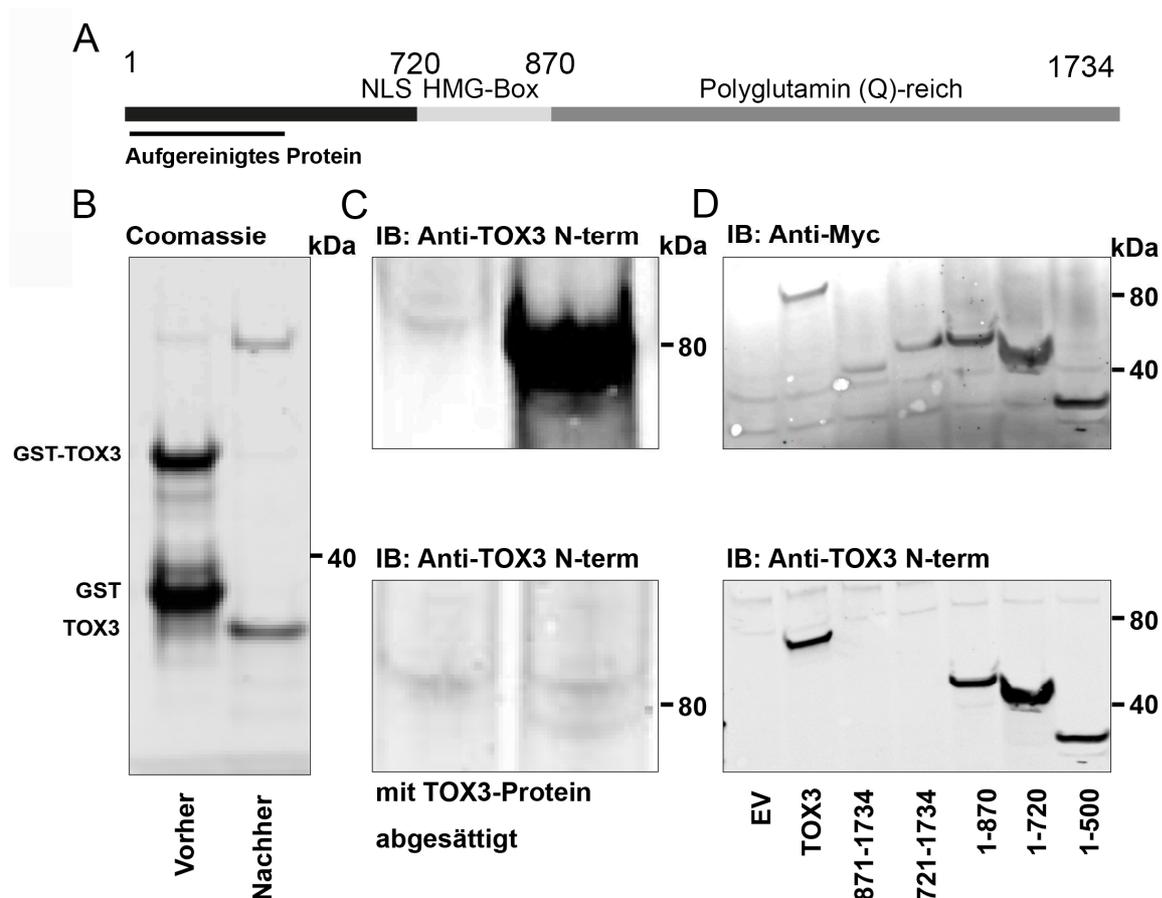


Abbildung 9: Nachweis des N-terminalen TOX3-Proteins über Coomassie-Blaufärbung und Validierung des Antikörpers über Immunoblot. A) Schematische Darstellung von TOX3 und aufgereinigtem N-terminalen TOX3. B) Coomassie-Färbung von Fusionsprotein GST-TOX3Nterm gebunden an Sepharose (Vorher) und nach Zugabe von PreScission gespaltenes TOX3Nterm ohne GST-Anhang (Nachher). C) CHO-Zellen wurden mit Leervektor und Myc-TOX3 transfiziert. Detektion der Myc-TOX3-Bande bei 80 kDa durch TOX3Nterm-Antikörper (oberer Blot). Durch Absättigung mit aufgereinigtem TOX3Nterm-Protein zu dem Antikörper, konnte die TOX3-Bande nicht detektiert werden. D) Folgende Myc-Konstrukte Leervektor, Volllänge-TOX3, 871-1734, 721-1734, 1-870, 1-720 und 1-500 wurden in CHO-Zellen transfiziert und durch anti-Myc-Antikörperfärbung detektiert (oberer Blot), durch anti-TOX3Nterm-Antikörper wurden N-terminale TOX3-Konstrukte (Volllänge-TOX3, 1-870, 1-720 und 1-500) detektiert.

Das Fusionsprotein GST-TOX3Nterm konnte anhand des GST-Anhangs, an Sepharose gebunden (Abb. 9 B Vorher) und durch Zugabe der PreScission-Protease, abgespalten werden (Abb. 9 B Nachher). Durch Ultrafiltration wurde das N-terminale TOX3-Protein von restlichen Proteinen separiert und aufkonzentriert. Insgesamt wurde 1 mg gereinigtes Protein für die Immunisierung eines Huhns an die Firma Davids Biotechnologie verschickt. Nach Erhalt des TOX3-Antikörpers konnte seine Spezifität nachgewiesen werden. Hierfür wurde ein Myc-TOX3-Konstrukt in CHO-Zellen transfiziert. Die TOX3-Überexpression konnte durch den N-terminalen TOX3-Antikörper verifiziert werden, die eine Bande bei 80 kDa detektierte (Abb. 9 C oberer Blot). Durch Zugabe von gereinigtem N-terminalen TOX3-Protein zu dem Antikörper, wurde dieser abgesättigt und detektierte keine TOX3-Bande (Abb. 9 C unterer Blot). Anhand

von unterschiedlichen Myc-TOX3-Konstrukten, welche sich in ihrer Sequenzlänge unterscheiden, konnte gezeigt werden, dass nur Konstrukte mit der N-terminalen Sequenz detektiert werden konnten (Abb. 9 D). Folglich konnte der TOX3Nterm-Antikörper für immunologische Verfahren eingesetzt werden.

5.2 TOX3 ist im Mausembryo am Entwicklungstag 13.5 (E13.5) am stärksten exprimiert

Die *in situ* Hybridisierungsdaten gaben einen Hinweis darauf, dass TOX3 in verschiedenen Embryoentwicklungsstadien unterschiedlich exprimiert wird. Über quantitative PCR und anschließendem Immunoblot mittels TOX3Nterm-Antikörper konnte diese Erkenntnis verifiziert werden.

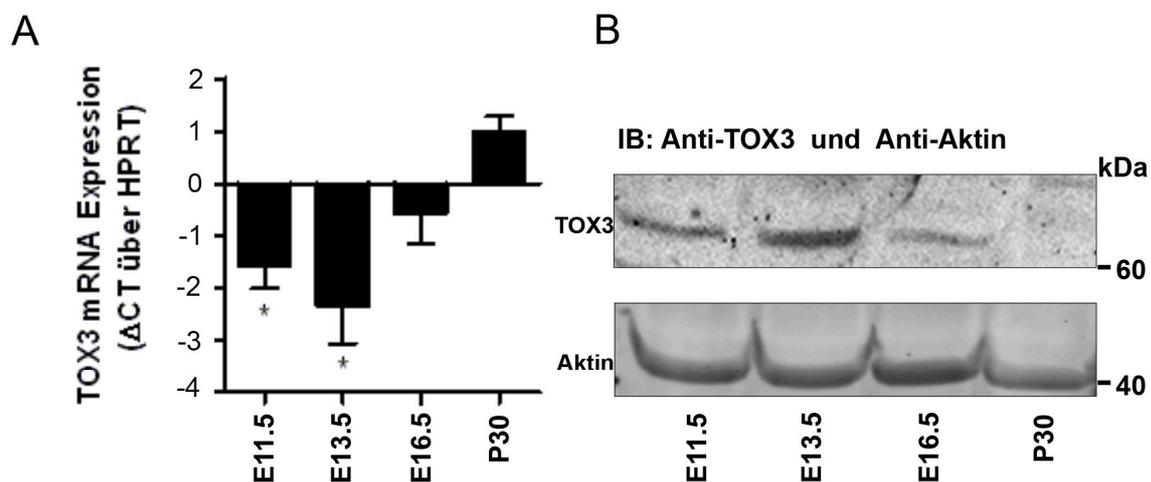


Abbildung 10: Quantitativer und immunologischer Nachweis der TOX3-Expression in sich entwickelnden Mäusen. A) Quantitative PCR zur Ermittlung der TOX3-Expression auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Embryostadien 11.5, 13.5 und 16.5 im Vergleich zu dem adulten Mausgehirn P30. *Der Vergleich der mRNA-Werte von drei unabhängigen Versuchen, zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0.05$ bei einer One-Way-Analyse (ANOVA) mit Tukey Posthoc-Test an. B) Immunoblot zum Nachweis von TOX3-Expression in Gehirnllysate von Mäusen im Embryostadium 11.5, 13.5, 16.5 und adulten Maus P30. TOX3Nterm-Antikörper erkennt in allen Embryostadien die endogene TOX3-Bande bei 63 kDa. Aktin-Bande bei 39 kDa dient als Ladekontrolle

Über quantitative PCR zeigte sich, dass TOX3 auf mRNA-Ebene, im Gehirn des Embryos, in den frühen Entwicklungsstadien 11.5, 13.5 und 16.5 deutlich stärker als im adulten Mausgehirn P30 exprimiert wird (Abb. 10 A). Dieses konnte ebenfalls durch den TOX3Nterm-Antikörper auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 10 B). Es ist deutlich sichtbar, dass in dem Embryostadium 13,5 TOX3 am stärksten exprimiert wird. Dies könnte darauf hinweisen, dass TOX3 in diesem Entwicklungsstadium eine Rolle spielt.

5.2.1 Ähnliches Expressionsprofil zwischen TOX3 und Musashi1 in der subventrikulären Zone detektiert

TOX3 wurde durch *in situ* Hybridisierung hauptsächlich in der subventrikulären Zone detektiert. Um zu bestimmen in welchem Zelltyp TOX3 vorkommt, wurden charakteristische (Stammzell-) Marker eingesetzt. Hierfür wurden histologische Schnitte von Embryonen des Stadiums E13.5 angefertigt. Zur Visualisierung wurden Sekundärantikörper mit konjugiertem CY3 und FITC verwendet, welche durch ein Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung von 532 nm und 488 nm sichtbar gemacht werden konnten.

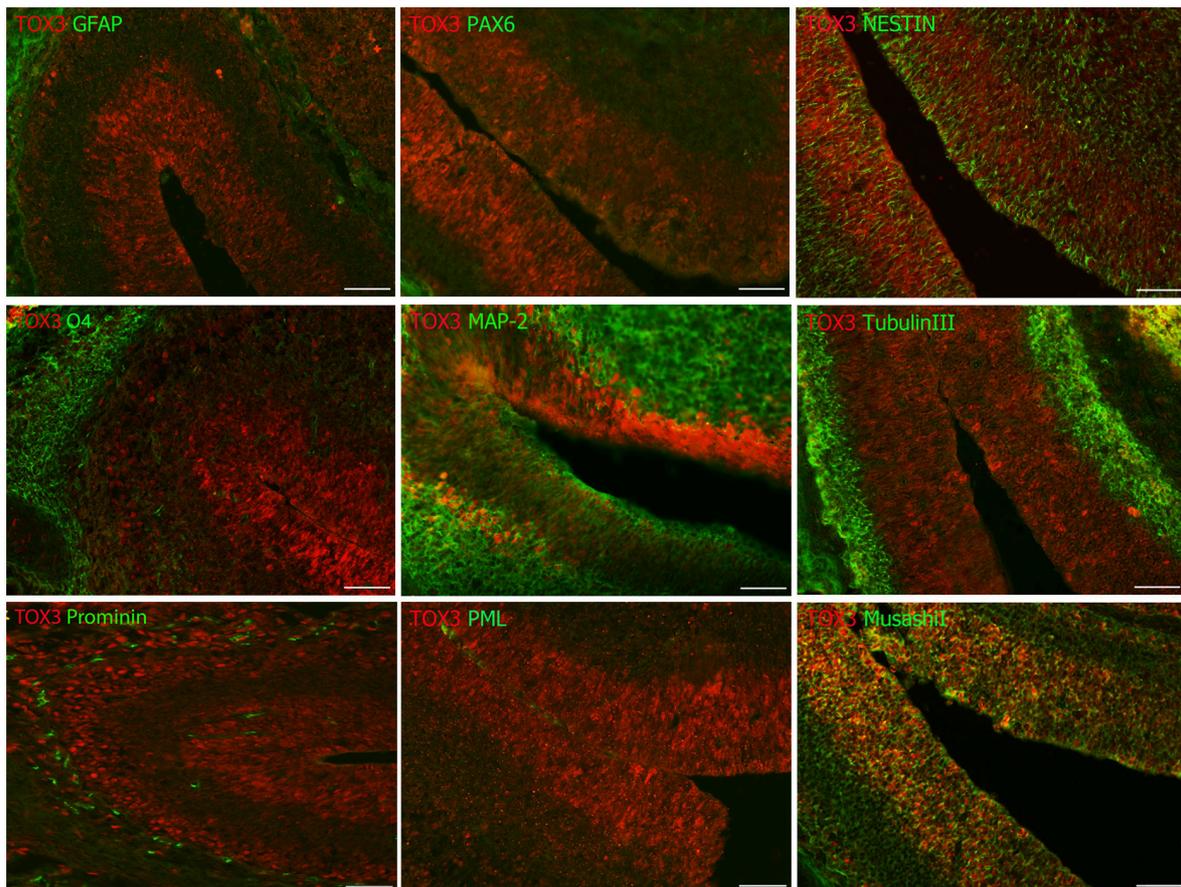


Abbildung 11: Immunhistologischer Nachweis von TOX3 in Embryomäusen (13.5) und Koexpression mit Stammzellmarkerproteinen. Embryoschnitte von E13.5 wurden durch ein Kryostat-Gerät in 5-8 μ M Dicke hergestellt. Es wurden folgende Antikörper verwendet anti-GFAP, anti-PAX6, anti-Nestin, anti-O4, anti-MAP-2, anti- β -TubulinIII, anti-Prominin/CD133, anti-PML, anti-Musashi1 zusammen mit TOX3Nterm-Antikörper bzw. mit dem kommerziellen TOX3-Antikörper von Sigma. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden durch das Mikroskop festgehalten. Die Markierungslinie entspricht 50 μ m.

Anhand der gefärbten histologischen Embryoschnitte konnte gezeigt werden, dass TOX3 in der subventrikulären Zone exprimiert wird (Abb. 11). Das gleichbleibende Expressionsmuster verdeutlicht, dass TOX3 im Nukleus, zum großen Teil innerhalb der subventrikulären Zone, exprimiert wird. In unserem Fall zeigte der Astrozyten-Zelltypmarker GFAP kein Signal. Auch die gegen PML und PAX6 gerichteten Antikörper zeigten kein spezifisches Signal. Der Nestin-

Antikörper, welcher dafür bekannt ist, Stammzellen bzw. NPCs zu detektieren (Park et al., 2010), färbte die Intermediärfilamente von Zellen mit TOX3-Zellkernfärbung an. Die Zelltypmarker für junge Oligodendrozyten (O4), sowie für junge bzw. ausgereifte Neurone (MAP-2 und β -TubulinIII) wiederum zeigten keine Korrelation zu dem Expressionsmuster von TOX3. Der ebenfalls bekannte Stammzellmarker Prominin (CD133) detektierte vereinzelte Zellen innerhalb der Hirnregion, ohne mit dem TOX3-Expressionsmuster zu korrelieren. Indessen zeigte der gegen Musashi1 gerichtete Antikörper ein ähnliches Expressionsmuster wie TOX3 auf. Die dadurch eintretende gelbliche Färbung spricht für eine gleich auftretende Expression beider Proteine. Anhand dieser Ergebnisse ließ sich vermuten, dass TOX3 eine besondere Rolle in neuralen Stammzellen einnimmt, da es in Nestin-positiven Zellen zusammen mit dem Stammzellmarker Musashi1 (Siddall et al., 2006) innerhalb der subventrikulären Zone vorkommt.

5.3 TOX3-Vorkommen in dem Tiermodell „*Danio rerio*“

In Kooperation mit Frau Professor Catherina Becker (Zentrum für Neuroregeneration, Edinburgh) konnte neben dem Mausmodell „*Mus Musculus*“, ebenfalls der Zebrafisch „*Danio rerio*“ auf TOX3-Expression untersucht werden.

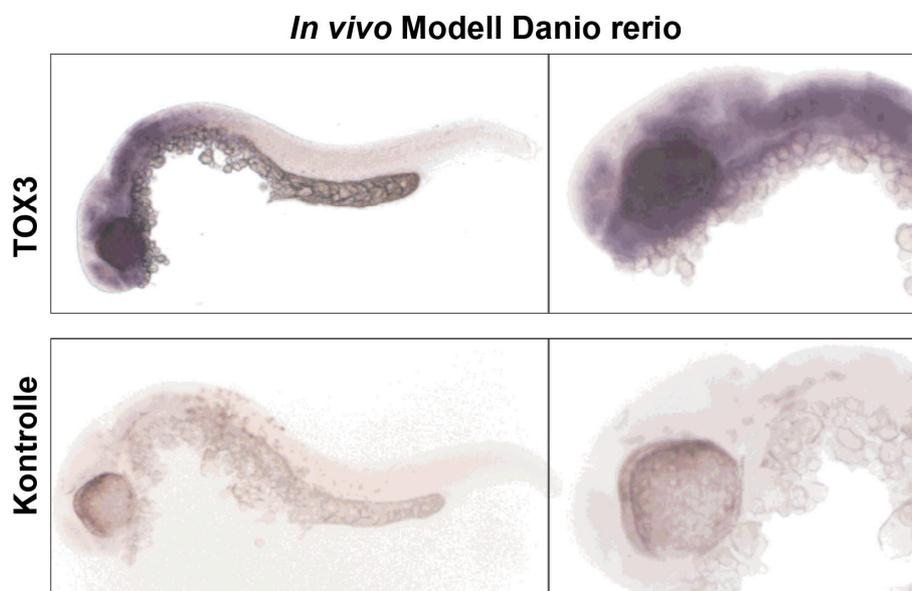


Abbildung 12: TOX3-Expression in der Hirnregion des Tiermodells „*Danio rerio*“. A) *In situ* Hybridisierung mit TOX3 im Zebrafisch „*Danio rerio*“ nach 24 Stunden Befruchtung. Diese Experimente wurden durchgeführt von Frau Zhen Zhong (Zentrum für Neuroregeneration, Edinburgh).

Durch *in situ* Hybridisierung ließ sich nachweisen, dass TOX3 im sich entwickelnden Zebrafisch (24 Stunden nach Befruchtung) hauptsächlich in der Hirnregion exprimiert wird

(Abb. 12), welche ein hohes Stammzellpotential aufweist. Dies bestätigte wiederum, dass TOX3 eine (konservierte) spezie-sübergreifende Rolle in Stammzellen einnimmt, welches es aufzuklären gilt.

5.4 TOX3 wird in NPCs exprimiert

Da allgemein bekannt ist, dass die subventrikuläre Zone eine Nische für NPCs ist und diese Zellen isoliert werden können (Morshead et al., 1994), wurden sie für diese Arbeit aus der ganglionischen Eminenz von E13.5 Mäusen herauspräpariert und *in vitro* kultiviert. *In vitro* wachsen sie als Neurosphären (Reynolds und Weiss, 1992) durch Zugabe von Wachstumshormonen (FGF-2 und EGF), welche die Fähigkeit der Selbsterneuerung und Proliferation in NPCs erhält (Abb. 13 A WF). Durch Abwesenheit dieser Faktoren, kommt es zur Differenzierung (Abb. 13 A ohne WF) in die drei Zelltypen Astrozyt, Oligodendrozyt oder Neuron (Reynolds und Weiss, 1992). Um zu überprüfen, ob die TOX3-Expression durch Wachstumsfaktoren bzw. deren Entzug beeinflussbar ist, wurde eine quantitative Bestimmung über mRNA- und Proteinexpression durchgeführt.

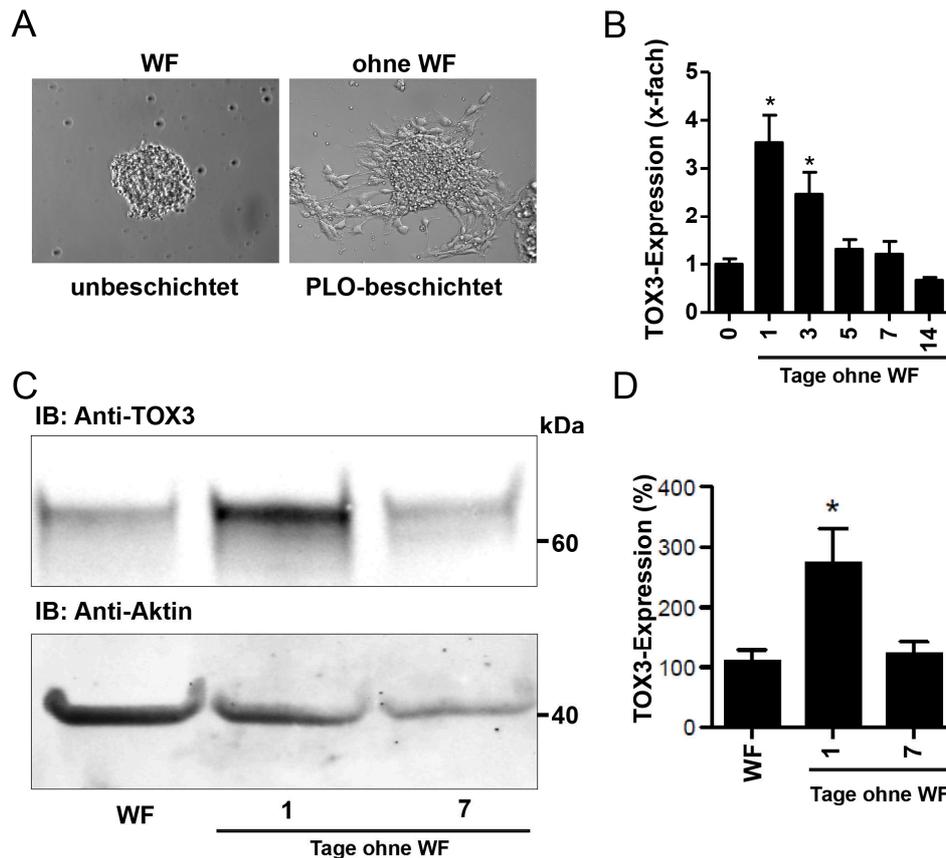


Abbildung 13: TOX3-Expression wird hochreguliert durch Entzug der Wachstumsfaktoren. A) zeigt den Vergleich zwischen schwimmender Neurosphäre in Medium mit Wachstumsfaktoren (WF) und eine, auf PLO-beschichteter Platte, adhären wachsenden Neurosphäre (ohne WF) nach einem Tag Differenzierung. B) Nachweis relativer TOX3-Expression in NPCs in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und Entzugsdauer angegeben als Δ CT-Wert über das Haushaltsgen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT). C) Immunoblot zur Überprüfung der TOX3-Expression in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und Entzugsdauer, auch dargestellt als Balkendiagramm (D). Die Balken zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und geben den Standardfehler SEM \pm an. *Der Vergleich der Säulen zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einer One-Way-Analyse (ANOVA) mit Tukey Posthoc-Test an.

Zunächst wurde auf Transkriptionsebene über quantitative PCR die TOX3-Expression in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und Differenzierungsdauer untersucht. Nach nur einem Tag ohne Wachstumsfaktoren konnte eine Zunahme von 2,5-fach der TOX3-Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zu NPCs mit Wachstumsfaktoren und fortlaufender Differenzierung (Dif3 = 1,50-fach; Dif5 = 0,3-fach; Dif7 = 0,2-fach; Dif14 = -0,4-fach) ermittelt werden (Abb. 13 B). Über das immunologische Verfahren konnte dies auf Proteinebene verifiziert (Abb. 13 C) und mittels ImageJ quantifiziert (Abb. 13 D) werden. Hierbei wurde der Vergleich auf NPCs mit Wachstumsfaktoren (D0 = 100%), ein Tag ohne (D1 = 272%) oder nach sieben Tagen Wachstumsfaktorentzug (D7 = 121%) beschränkt. Anhand der signifikanten Ergebnisse stellte sich die Frage, ob TOX3 durch seine hohe Expression zu Beginn der Ausdifferenzierung einen Einfluss auf einen speziellen Zelltyp einnimmt.

5.4.1 TOX3 wird hauptsächlich im Nukleus von Neurosphären exprimiert

Anhand von mikroskopischen Aufnahmen von neurosphärenartigen NPCs in verschiedenen Differenzierungsstadien wurde ebenfalls die TOX3-Expression untersucht. Es wurden Neurosphären auf PLO-beschichteten 12-Lochnapfschalen adhärent wachsen gelassen und gegen TOX3 und Nestin gerichtete Primärantikörper und anschließend Sekundärantikörper mit konjugiertem CY3 bzw. FITC sichtbar gemacht.

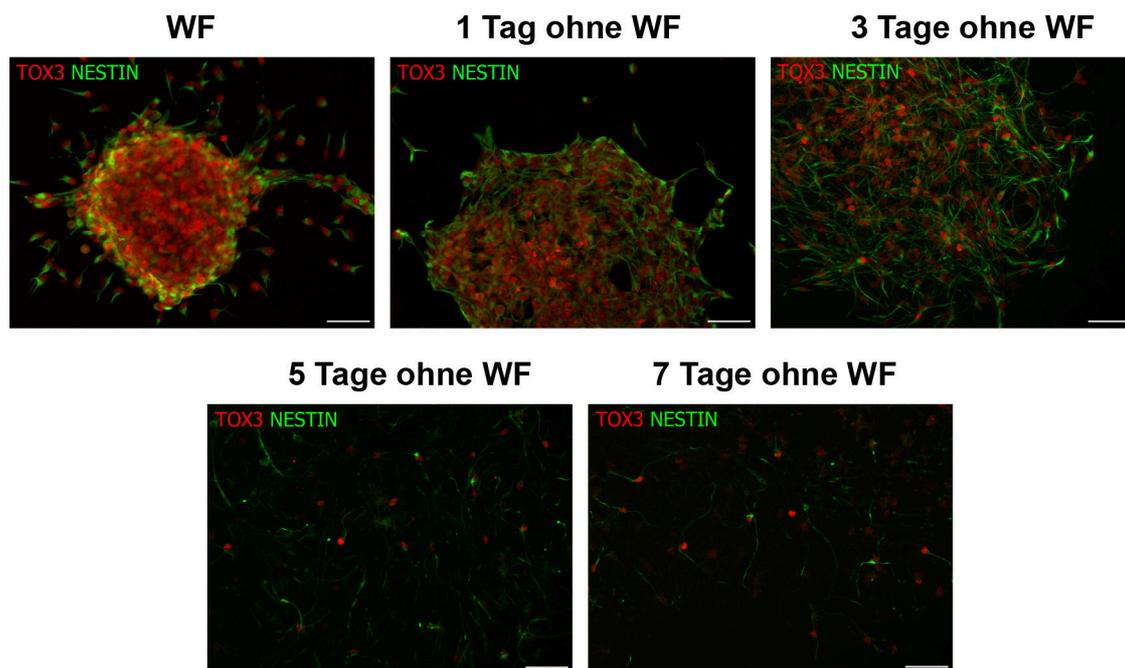


Abbildung 14: TOX3-Expression nimmt im Laufe der Differenzierung ab. Neurosphärenartige NPCs wurden auf PLO-beschichtete Kulturschalen gesetzt und mit Medium mit Wachstumsfaktoren (WF) und ohne Wachstumsfaktoren (ohne WF) bis zu sieben Tage in Kultur genommen. Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskop visualisiert. TOX3 wurde mit CY3 (532 nm) und Nestin mit FITC (488 nm) sichtbar gemacht. Markierungslinie repräsentiert 50 µm.

Anhand der Fluoreszenzaufnahmen (Abb. 14) zeigte sich, dass TOX3 hauptsächlich im Nukleus von NPCs lokalisiert vorkommt. Durch den Filamentmarker Nestin wurde sichtbar gemacht, dass TOX3-positive Zellen auch Nestin exprimieren. Die während der Differenzierung fortschreitende Filamentausbildung wurde ebenfalls durch den Nestin-Marker sichtbar gemacht. Schließlich wurde die Migration der einzelnen Zellen und damit die Ausbreitung der Neurosphäre im Zusammenhang mit der Filamentausbreitung beobachtet. In Abhängigkeit der Differenzierungsdauer wurde gleichzeitig eine Abnahme von TOX3-exprimierenden Zellen beobachtet. Nach sieben Tagen wurden nur noch vereinzelte TOX3-exprimierende Zellen detektiert, die wiederum lange Ausläuferfilamente aufwiesen (Nestin-

markiert), woraus sich schließen ließ, dass TOX3 in Zellkernen von differenzierten Neuronen weiter exprimiert vorliegt. Dies wurde nochmals durch Färbungen mit dem Neuronenspezifischen β -TubulinIII-Marker verifiziert (Daten nicht gezeigt). Zur besseren Quantifizierung dieser Beobachtung wurden für die weiteren Versuche die Neurosphären vereinzelt in Lochnapfschalen ausgesät und kultiviert.

5.4.2 TOX3 wird in Nestin-positiven Zellen exprimiert

Um festzustellen, ob TOX3 einen Einfluss auf die Expression von Zelltyp- bzw. Stammzellmarker aufweist, wurde ein automatisiertes Fluoreszenzmikroskop zur Quantifizierung eingesetzt. Hierfür wurden NPCs vereinzelt und zu einer bestimmten Zellzahl in PLO-beschichtete 96-Lochnapfschalen gesät. Die Veränderung der Fluoreszenzintensität, sowohl in der TOX3-Intensität, als auch in der Nestin- und GFAP-Intensität, wurde in Abhängigkeit mit und nach einem Tag ohne Wachstumsfaktoren gemessen. Durch Zellkernfärbung mittels DAPI konnten Ringe um die zu untersuchenden Regionen (ROIs; *engl. Regions of Interest*) gelegt werden, um den fluoreszierenden Sekundärantikörper CY3 (532 nm) und FITC (488 nm) zu messen. Für die Fluoreszenzmessungen wurden folgende Primärantikörper/Sekundärantikörper verwendet: TOX3 (Kaninchen)/ CY3; Nestin (Maus)/ FITC.

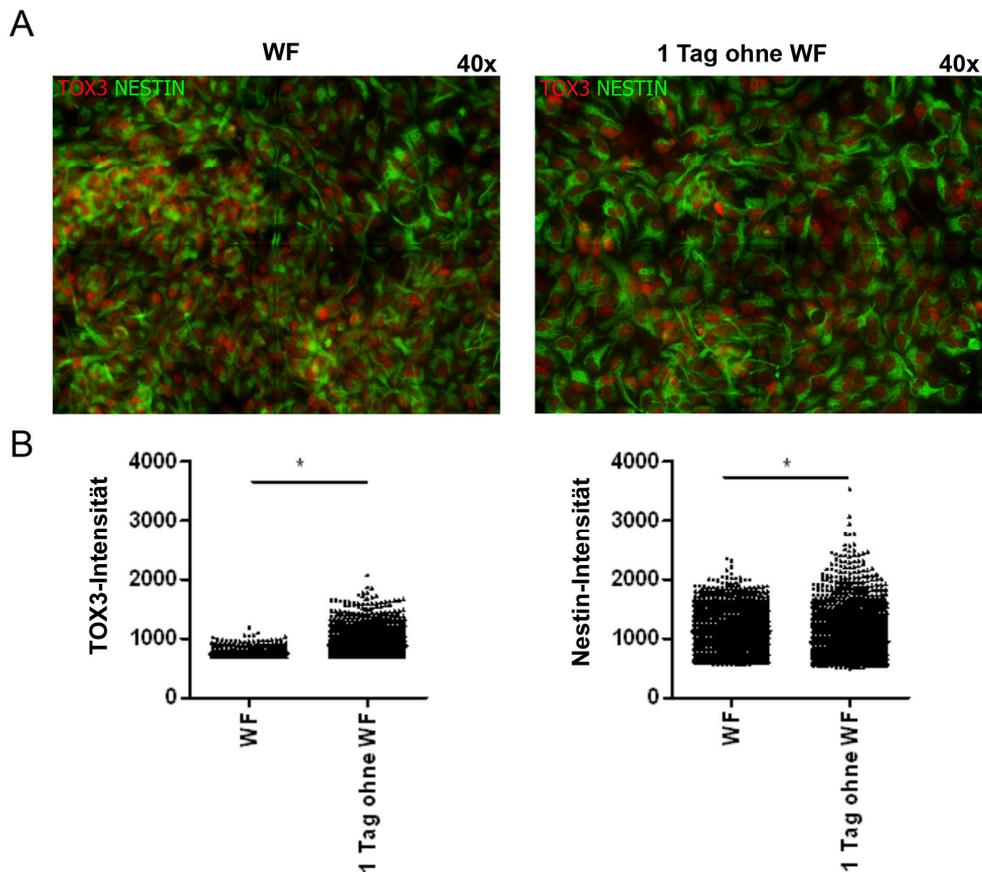


Abbildung 15: Fluoreszenzzunahme von TOX3 durch Wachstumsfaktorentzug. A) Es wurden 2x2 Montageaufnahmen durch das Hochdurchsatz-Mikroskop zur Ermittlung der Intensität und Bestimmung der Anzahl von Zellen aufgenommen. Messung zum Vergleich von TOX3- und Nestin-Intensität zwischen NPCs mit Wachstumsfaktoren (WF) und ein Tag Entzug (ohne WF). NPCs wurden vereinzelt und auf PLO-beschichtete 96-Lochnapfschalen ausgesät. B) Darstellung der Intensitätswerte als Punkte-Balken. Anzahl gemessener TOX3 positive Zellen (n (WF) = 7570 vs. n (-1TagWF) = 5740). Anzahl gemessener Nestin-Zellen, die TOX3 positiv sind (n (WF) = 1595 vs. n (-1TagWF) = 2463).

Die in Abbildung 15 A dargestellte Montageaufnahme von NPCs mit Wachstumsfaktoren und ein Tag ohne Wachstumsfaktoren (40-fache Vergrößerung) verdeutlicht die hohe Anzahl von gemessenen Zellen. Durch Wachstumsfaktorentzug ist schon nach einem Tag erkennbar, dass die Sterberate von NPCs erhöht wurde, welches sich darin widerspiegelt, dass sich die überlebenden Zellen mehr ausbreiten können und an Umfang gewinnen. Die Auswertung der Fluoreszenzintensität zeigt wiederum eine signifikante Zunahme der TOX3-Intensität in NPCs nach nur einem Tag ohne Wachstumsfaktoren, im Vergleich zu NPCs mit Wachstumsfaktoren (Abb. 15 B linker Punkte-Balken). Ebenso konnte dies für Nestin ermittelt werden. Auch hier zeigte sich eine signifikante Intensitätssteigerung nach einem Tag Wachstumsfaktorentzug im Vergleich zu NPCs mit wachstumsfaktorhaltigem Medium (Abb. 15 B rechter Punkte-Balken). Die Expression von TOX3 korreliert daher mit der von Nestin.

5.4.3 TOX3 wird durch Mitglieder des Notch-Signalweges beeinflusst

Es ist bekannt, dass Nestin ein Stammzellmarker für undifferenzierte Zellen bzw. proliferierende Zellen ist (Park et al. 2010), welches durch den Notch-Signalweg in seiner Expression verstärkt werden kann (Shih und Holland, 2006). Hierdurch ergab sich die Frage, ob TOX3 eine Rolle in dem Notch-Signalweg spielt, da TOX3 in Nestin-positiven Zellen vorkommt.

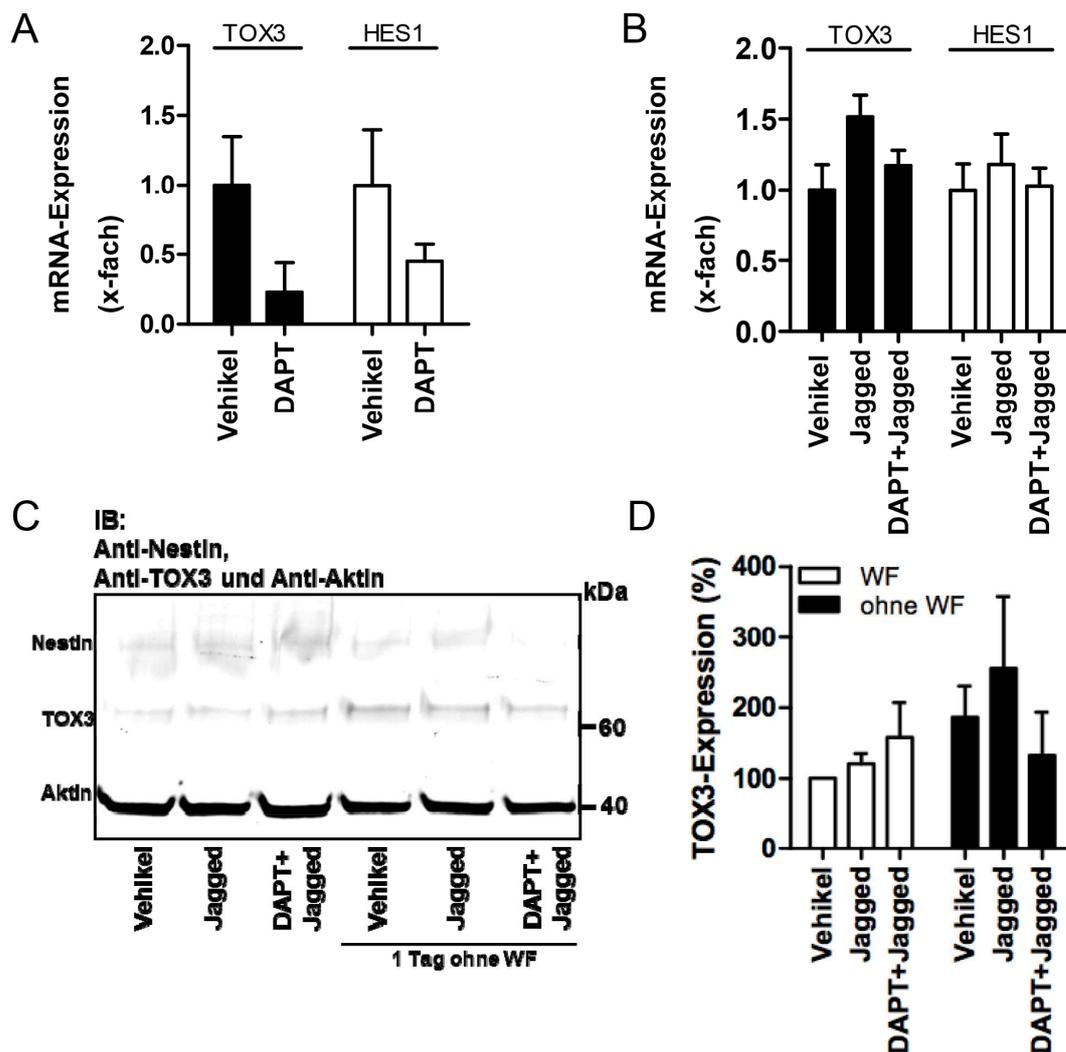


Abbildung 16: Inhibitor und Agonist des Notch-Signalweges beeinflussen die TOX3-Expression. In NPCs gemessene TOX3-mRNA-Expression behandelt mit A) Vehikel oder DAPT (1 μ M) bzw. mit B) Vehikel, Jagged (1 μ g/ μ l) oder DAPT+Jagged für 24 Stunden. Daten wurden als x-faches zu der endogenen Kontrolle HPRT angegeben. C) Immunoblot zeigt endogene TOX3-Expression bei 63 kDa und Nestin-Expression bei ca. 200 kDa in Abhängigkeit von Vehikel, Jagged und Jagged+DAPT. Aktin-Bande bei 39 kDa dient als Ladekontrolle. D) Balkendiagramm zeigt die quantifizierte Expressionsdaten mittels ImageJ an. Die Balken zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und geben den Standardfehler SEM \pm an. *Der Vergleich der Säulen zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einer One-Way-Analyse (ANOVA) mit Tukey Posthoc-Test an.

Der Einfluss des Notch-Inhibitors DAPT (Kanungo et al., 2008; Borghese et al., 2010) wurde auf die Expression von TOX3 und HES1 auf mRNA untersucht. Im Vergleich zu Vehikel mit 100% Expression wurde bei Zugabe von DAPT eine Reduzierung auf 23% auf TOX3-mRNA-Expression festgestellt, während die Kontrolle HES1 zu 45% in ihrer Expression reduziert wurde (Abb. 16 A). Die Zugabe des Agonisten Jagged, welcher den Notch-Signalweg aktiviert (Yeo und Chitnis, 2007), zeigte indessen eine Zunahme von 50% auf die TOX3-mRNA-Expression, während die Kontrolle HES1 eine Zunahme von 20% (Abb. 16 B) zeigte. Der immunologische Nachweis konnte wiederholt zeigen, dass eine TOX3-Zunahme nach einem Tag ohne Wachstumsfaktoren (Abb. 16 C) erfolgte. Jedoch in Abhängigkeit von Jagged bzw. Jagged + DAPT konnte hierbei keine signifikante TOX3-Expression detektiert bzw. quantifiziert werden (Abb. 16 D). Durch die Unschärfe der Nestin-Bande war die Quantifizierung von Nestin mit hohen Fehlerbalken behaftet (Daten nicht gezeigt), die keine Aussage über eine potentielle Induktion zuließ.

5.4.4 TOX3 hat einen positiven Effekt auf die Nestin-Promoteraktivität, welcher durch die Mitglieder des Notch-Signalweges beeinflusst wird

Aufgrund der resultierenden Ergebnisse, dass TOX3 über den Notch-Signalweg beeinflusst wird, wurde die Nestin-Promoteraktivität in Abhängigkeit von TOX3 und den Mitgliedern des Notch-Signalweges überprüft.

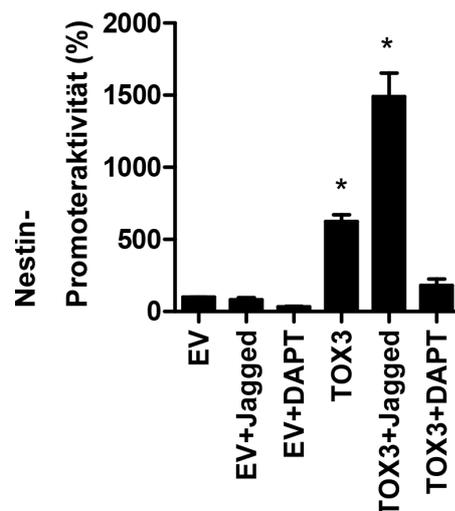


Abbildung 17: TOX3 beeinflusst die Nestin-Promoteraktivität und sein Effekt wird durch Jagged bzw. DAPT stark beeinflusst. N2a-Zellen wurden mit Nestin-Luziferase, SRE-Renilla und Leervektor (LV) bzw. TOX3 transfiziert und nach 24 Stunden für zwei Stunden mit Jagged bzw. DAPT inkubiert. Die Balken zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und geben den Standardfehler SEM+/- an.

Hierbei zeigte sich, dass TOX3 die Nestin-Promoteraktivität ohne bzw. in Abhängigkeit des Agonisten Jagged oder des Inhibitors DAPT stark beeinflusst. Die Nestin-Promoteraktivität wurde in N2a-Zellen durchgeführt. Das Nestin-Luziferase Konstrukt (Jin et al., 2009), zusammen mit Leervektor (LV) bzw. TOX3, sowie die Ladekontrolle SRE-Renilla wurden überexprimiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Vehikel, DAPT (1 μ M) oder Jagged (1 μ g/ μ l) für weitere zwei Stunden inkubiert. Bei der anschließenden Auswertung zeigte sich (Abb. 17), dass die Nestin-Promoteraktivität durch TOX3 mit Vehikel eine Aktivität von 620% erreichte, zusammen mit Jagged wurde die Promoteraktivität auf 1480% erhöht. Hier zeigte sich, dass es sich bei der Zugabe von Jagged (0,8-fach) zu TOX3 (6,2-fach) nicht um einen additiven, sondern um einen kooperativen Effekt mit einer Induktion von 14,8-fach handelte. Wiederum mit DAPT wurde der positive TOX3-Effekt auf den Nestin-Promoter auf eine Aktivität von 181% minimiert und damit um ein dreifaches reprimiert. Hieraus ließ sich vermuten, dass der Notch-Signalweg die Expression von TOX3 beeinflusst.

5.4.5 TGF β reprimiert die TOX3-Expression auf mRNA-Ebene und Proteinebene

Aufgrund der Tatsache, dass die TOX3-Expression durch DAPT negativ beeinträchtigt wurde, wurde die Aufmerksamkeit auf einen weiteren Signalweg, den TGF β -Signalweg gelenkt, der über sog. *Crosstalk* ebenfalls Einfluss auf die Notch-Signalkaskade ausübt (Blokzijl et al., 2003). In Kontrast zu dem Notch-Signalweg fördert es die Verteilung von neuronalen Zytoskelett-Proteinen, die wiederum die neuronale Differenzierung positiv beeinflussen (Roussa et al., 2004; Kanungo et al., 2008, Vogel et al., 2010; Borghese et al., 2010). Demzufolge wurde der Einfluss von TGF β auf die TOX3-Expression auf mRNA und Proteinebene untersucht. Hierfür wurde der Agonist TGF β 1 und der TGF β -Inhibitor SB431542 (Callahan et al., 2002; Laping et al., 2002) verwendet. NPCs wurden auf PLO-beschichtete 6-Lochnapfschalen gesät und bei einer Konfluenz von mehr als 80% mit Vehikel, SB431542 oder TGF β für 24 Stunden inkubiert. Um einen weiteren Effekt auf die TOX3-Expression in Abhängigkeit der Differenzierung zu detektieren, wurde der Versuch parallel mit und ohne Wachstumsfaktorzugabe durchgeführt.

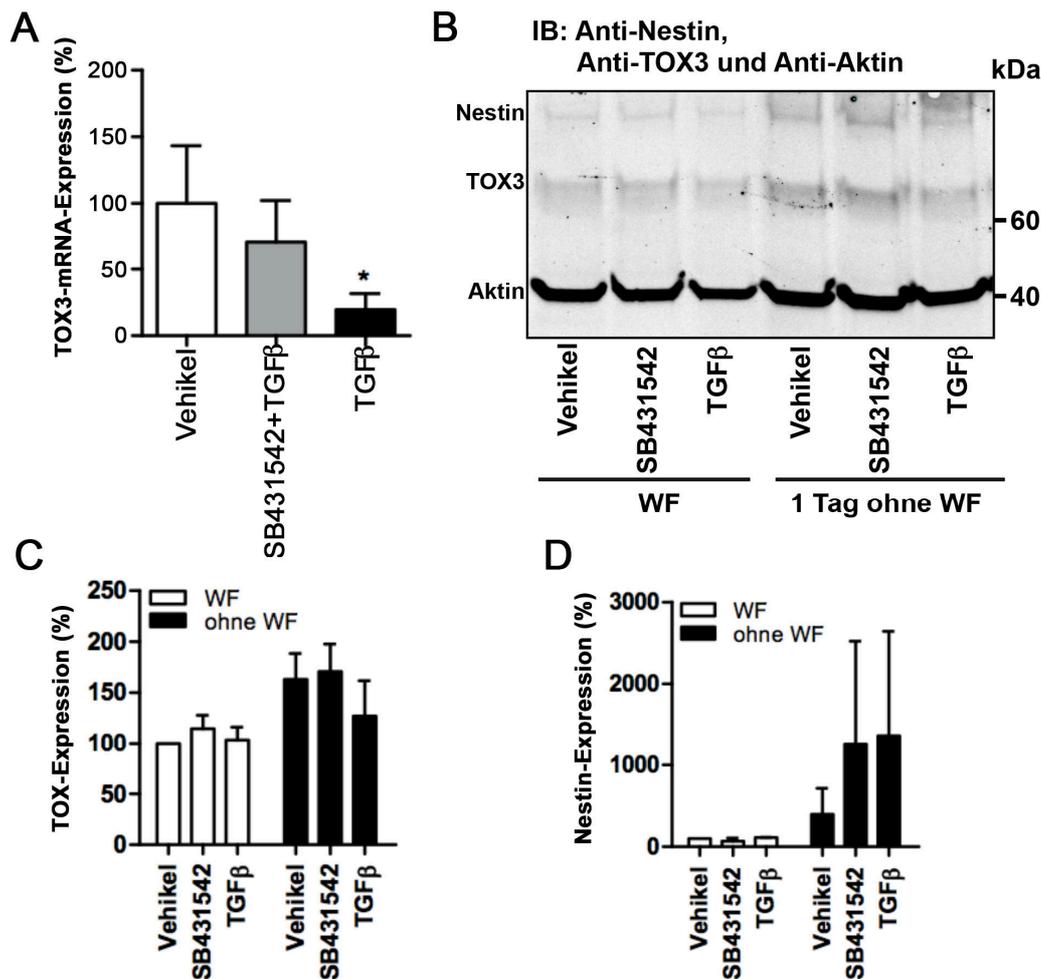


Abbildung 18: TGFβ reprimiert die TOX3-Expression. A) In NPCs gemessene mRNA-TOX3-Expression in Abhängigkeit von Vehikel, TGFβ (5ng/μl) mit und ohne TGFβ-Inhibitor SB431542 (10 μM). Die Balken zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und geben den Standardfehler SEM+/- an. *Der Vergleich der Säulen zeigte einen Signifikanzwert von P<0,05 bei einer One-Way-Analyse (ANOVA) mit Tukey Posthoc-Test an. B) Immunologischer Nachweis der TOX3-Expression in Abhängigkeit von Vehikel, SB431542 und TGFβ. NPCs wurden Übernacht mit TGFβ-Inhibitor SB431542 vorinkubiert, tags darauf nach Medienwechsel (mit und ohne WF), erneut mit Vehikel, SB431542 (10 μM) oder TGFβ (5 ng/μl) für weitere 24 Stunden inkubiert. Immunoblot zeigt die Ladekontrolle Aktin bei 39 kDa, TOX3 bei 63 kDa und Nestin bei ca. 200 kDa. C+D) Balkendiagramme stellen die TOX3-Expression bzw. Nestin-Expression als Mittelwerte von zwei unabhängigen Immunoblots dar und geben den Standardfehler SEM+/- an.

Zunächst wurde auf mRNA-Ebene die endogene TOX3-Expression quantitativ bestimmt. Zugabe von TGFβ (5 ng/μl) führte zu einer 80%igen Reduzierung der TOX3-mRNA-Expression in Kontrast zum Vehikel (Abb. 18 A). Bei gleichzeitiger Zugabe des Inhibitors von TGFβ SB431542 (10 μM) war der Effekt von TGFβ nicht mehr nachweisbar. Zur Verifizierung der mRNA-Daten wurden parallel Immunoblots durchgeführt (Abb. 18 B). Die Expressionsdaten wurden mittels ImageJ berechnet und als Balkendiagramme dargestellt (Abb. 18 C/D). Im Vergleich zu NPCs mit Wachstumsfaktor und Vehikel-Behandlung konnte durch

SB431524-Behandlung eine Induktion von 14% der TOX3-Expression detektiert werden, während durch TGF β kein Einfluss nachgewiesen werden konnte (Abb. 18 C). Im Vergleich zu NPCs mit wachstumsfaktorhaltigem Medium und Vehikel zeigten NPCs mit Wachstumsfaktorentzug für 24 Stunden und Vehikel-Behandlung einen Anstieg von 63%, mit SB431524-Behandlung eine 70%ige Steigerung und mit TGF β -Behandlung eine 26%ige TOX3-Expressionszunahme (Abb. 18 C). Dies wiederum spricht für einen negativen Effekt von TGF β auf TOX3. Gleichzeitig wurde der Einfluss von TGF β auf die Nestin-Expression untersucht. Die im Immunoblot gezeigte reduzierte Bande bei Zugabe des Agonisten TGF β in NPCs mit 24 Stunden Wachstumsfaktorentzug konnte jedoch nicht reproduziert werden bzw. durch die Unschärfe der Banden wurden hohe Fehlerbalken ermittelt, die keine Aussage über eine Induktion bzw. Reduktion in Abhängigkeit von TGF β zuließ.

5.4.6 Herunterregulierung von TOX3 in NPCs mit *small hairpin* RNAs

Um die Funktion von TOX3 aufzuklären, wurden *small hairpin* RNAs (shRNAs) zur Herunterregulierung eingesetzt. NPCs wurden auf PLO-beschichtete 6-Lochnapfschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 80% mit den Konstrukten transfiziert. Die Veränderung der TOX3-Expression sollte sowohl immunologisch, als auch über eine Immunfluoreszenz-basierende Methode untersucht werden. Zur quantitativen Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde das automatisierte Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskop eingesetzt. Hierbei wurde in PLO-beschichtete 96-Lochnapfschalen NPCs ausgesät und bei 80% Konfluenz mit den Konstrukten transfiziert. Anhand des ebenfalls auf dem Vektor liegenden kodierenden Gens für ein grün-fluoreszierendes Protein wurde die Effizienz der Transfektion überprüft und der Einfluss auf die TOX3-Expression quantitativ bestimmt. ROIs wurden um die Zellkerne (DAPI-Färbung) von grün-positiven Zellen gelegt und anhand des fluoreszierenden Sekundärantikörpers CY3 gegen den Primärantikörper TOX3 wurde die Intensität gemessen.

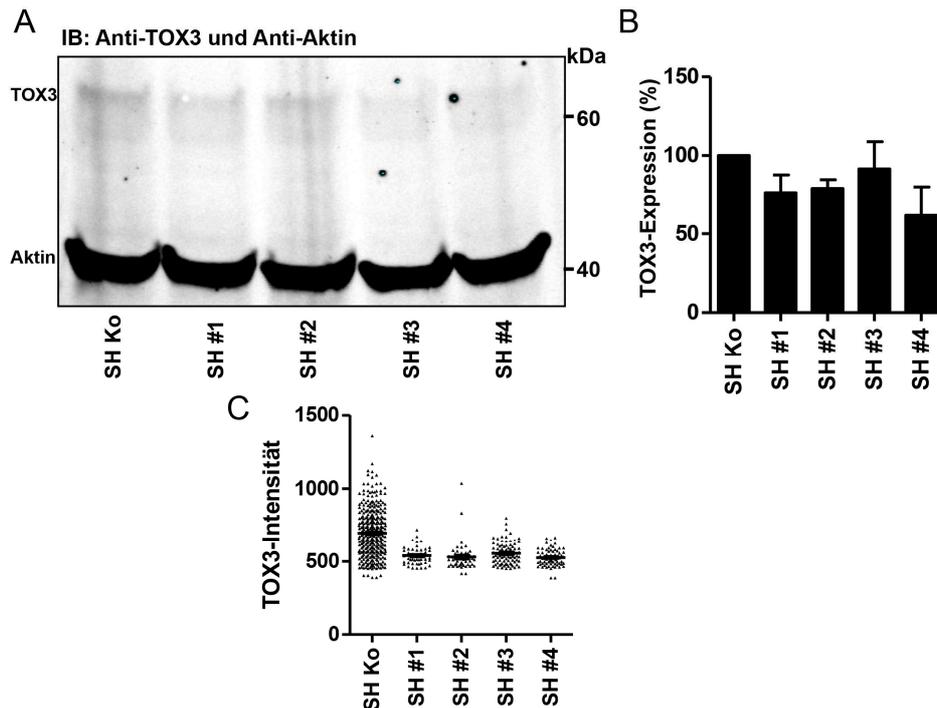


Abbildung 19: Quantifizierung der TOX3-Expression in Abhängigkeit von shRNA. A) Immunoblot zum Nachweis der TOX3-Herunterregulation nach 48 Stunden durch Transfektion mit shRNA. B) Stellt aus drei unabhängigen Immunoblots die TOX3-Expression als Balkendiagramm dar und gibt den Standardfehler als SEM \pm an. C) TOX3-Intensitätsmessung in Grün-positiven NPCs gemessen durch das automatisierte Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskop bei 488 nm. Grün-positiv gefärbte Zellen/Gesamt-Zellzahl (DAPI-Färbung): shRNA (SH); SH Ko n=345/6718; SH #1 n=47/2566; SH #2 n=52/4126; SH #3 n=85/3797; SH #4 n= 69/4112.

Anhand des Immunoblots (Abb. 19 A) ist zu erkennen, dass alle vier shRNAs eine Reduktion der TOX3-Expression verursachen. Die daraus resultierenden quantitativen Expressionsdaten wurden im Balkendiagramm (Abb. 19 B) dargestellt und verdeutlichen die TOX3-Abnahme (SH #1= -14%; SH #2= -12%; SH #3= -9% und SH #4= -39%). Die quantitative Berechnung über das automatisierte Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskop ermittelte eine Transfektionseffizienz von nur 2-5%. Auch Versuche über einen Zeitraum von bis zu sieben Tagen zeigten keinen messbaren Effekt, da ein vermehrtes Zellsterben durch das Transfektionsreagenz, als auch der Verlust des Grün-fluoreszierenden Proteins nach sieben Tagen Kultivierung in Wachstumsfaktor-freiem Medium keine Aussage zu ließ.

5.5 Entdeckung potentieller Interaktionspartner durch den LUMIER-Screen

Um potentielle Interaktionspartner zu ermitteln wurde der sogenannte LUMIER-Screen eingesetzt. Diese Methode beruht auf ein *Bait-Prey*-Prinzip (Abb. 8). Der sogenannte LUMIER-Screen (Kap. 4.3.10.2) wurde in Kooperation mit Herrn Dr. Manfred Kögl als

Dienstleistung am DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum) durchgeführt. Mittels des Gateway® Systems wurde TOX3 in Vektoren, die durch Herrn Dr. Manfred Kögl bereitgestellt wurden, kloniert und zurück zum DKFZ geschickt. Die Fusionsproteine TOX3 mit Protein-A bzw. C-terminaler Renilla-Luziferase führten zu keinem konsistenten Ergebnis. Nur über das Fusionsprotein TOX3 mit N-terminaler Renilla-Luziferase konnten spezifische Bindungen an diverse nukleäre Proteine ermittelt werden (Abb. 20 A). Von 1000 überprüften nukleären Proteinen (n=1) wurden 24 potentielle Interaktionspartner ermittelt und die Interaktion mit diesen reproduziert (n=3). Um falsch-positiv bindende Proteine zu eliminieren wurde auf die Bindung in vorangehenden Screens mit anderen Köderproteinen normalisiert. Nach dieser Normalisierung zeigten sieben Interaktionspartner eine spezifische Bindung mit TOX3 (Abb. 20 A, schwarze Balken).

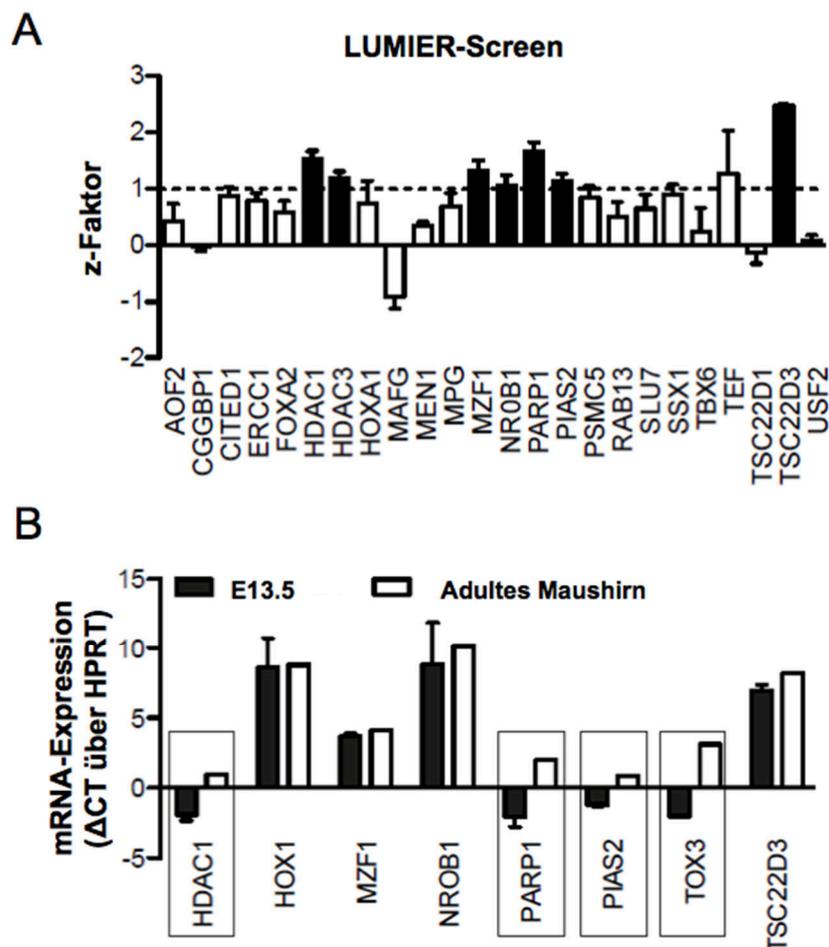


Abbildung 20: Potentielle Interaktionspartner von TOX3 im LUMIER-Screen und deren Expression auf mRNA-Ebene im Gehirn von Embryos des Entwicklungsstadiums 13.5. A) LUMIER-Screen detektierte 24 potentielle Interaktionspartner von TOX3. Anhand von gemessenen Luziferase-Aktivitäten wurde der z-Faktor berechnet (Kap. 4.3.10.2), der bei größer oder gleich 1 eine Interaktion als spezifisch bewertete. B) Auf mRNA-Ebene (Δ CT über HPRT) wurden spezifische Interaktionspartner auf ein ähnliches Expressionsprofil in E13.5 Maushirn und adultem Maushirn im Vergleich zu TOX3 überprüft. Balkendiagramm stellt drei unabhängige Experimente dar und gibt den Standardfehler als SEM \pm wieder.

In dem LUMIER-Screen (Abb. 20 A) wurden folgende potentielle Interaktionspartner gefunden: HDAC1 bzw. 3 (Histondeacetylase 1 bzw. 3), MZF1 (Myeloid-Zinkfinger Protein), NROB1 (nukleärer Rezeptor Subtyp 0, Gruppe1), PARP1 (Poly (ADP-Ribose) Polymerase), PIAS2 (Protein-Inhibitor von aktiviertem STAT) und TSC22D3 (Glucocorticoid-induziertes Leuzin-Zipper Protein). Um im weiteren Verlauf die in HEK-293GP-Zellen ermittelte Interaktion auch in NPCs zu überprüfen, wurde das Expressionsprofil der potentiellen Interaktionspartner in Maushirn des Entwicklungsstadiums 13.5 und adultem Tier im Vergleich zu der TOX3-Expression auf mRNA-Ebene verglichen (Abb. 20 B). Hierbei zeigte sich, dass die potentiellen Interaktionspartner HDAC1, PARP1 und PIAS2 ein gleiches Expressionsprofil zu TOX3 in E13.5 Mausgehirnen aufwiesen, wodurch sie geeignete Kandidaten für eine potentielle endogene Interaktion in NPCs sein könnten.

5.5.1 Endogenes HDAC1 interagiert mit TOX3 in NPCs

Um nachzuweisen, ob TOX3 mit den ermittelten potentiellen Interaktionspartnern aus dem LUMIER-Screen (Abb. 20 A) und gleichem Expressionsprofil in E13.5 Mausgehirn (Abb. 20 B) interagiert, wurden Immunpräzipitationsstudien durchgeführt. Hierfür wurden die Konstrukte Myc-TOX3 mit FLAG-HDAC1, FLAG-PARP1 oder FLAG-PIAS2 in CHO-Zellen ko-transfiziert, über immobilisierte Myc-Antikörper präzipitiert (Kap. 4.3.6) und anhand von Immunoblots analysiert.

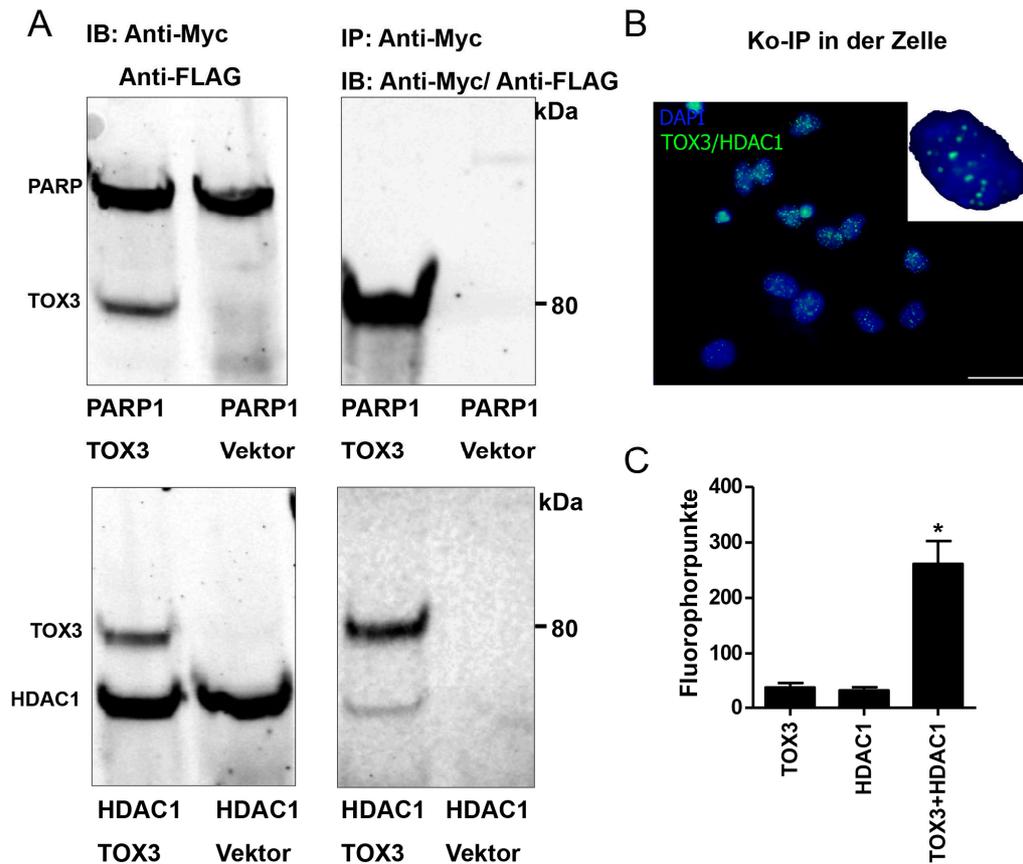


Abbildung 21: Nachweis der Interaktion von TOX3 mit HDAC1 durch Immunpräzipitation *in vitro* und *in situ*. A) CHO-Zellen wurden transient mit den Konstrukten Myc-TOX3 und FLAG-HDAC1 oder FLAG-PARP1 ko-transfiziert. Nachweis der Expression von TOX3, HDAC1 und PARP1 mit anti-Myc und anti-FLAG Antikörperfärbung (linke Blots). Oberer Blot zeigt TOX3 bei ca. 80 kDa mit PARP1 bei ca. 116 kDa. Unterer Blot zeigt TOX3 bei ca. 80 kDa und HDAC1 bei ca. 63 kDa. Rechte Immunoblots mit anti-Myc und anti-FLAG Antikörperfärbung nach Immunpräzipitation (IP) durch einen Myc-Antikörper. FLAG-HDAC1, aber nicht FLAG-PARP1 ist nach der Präzipitation zu erkennen. B) Interaktionsnachweis von endogenem TOX3 mit HDAC1 in NPCs. Über Bindung eines Primär-/ Sekundärantikörperkomplex an den potentiellen Proteinkomplex (HDAC1/TOX3) wurde die Bindung der DNA-Sequenz der jeweiligen Sekundärantikörper miteinander ermöglicht, die durch Amplifizierung entstehenden Fluorophorpunkte wurden wiederum durch ein Fluoreszenz-Mikroskop bei einer Anregung von 488 nm visualisiert. Der Zellkern wurde mit DAPI (5 ng/ml) gefärbt. Maßstabsleiste repräsentiert 25 μ m. C) Im Balkendiagramm dargestellte Anzahl der Fluorophorpunkte wurden mittels ImageJ ermittelt. Die Balken zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und geben den Standardfehler SEM \pm an. *Der Vergleich der Säulen zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einer One-Way-Analyse (ANOVA) mit Tukey Posthoc-Test an.

Die Abbildung 21 A zeigt die erfolgreiche Expression von PARP1 bzw. HDAC1 mit und ohne TOX3 (Abb. 21 A linke Blots). PIAS2 konnte nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt) und wurde daher nicht weiter berücksichtigt. TOX3 konnte bei ca. 80 kDa detektiert werden, PARP1 bei 116 kDa und HDAC1 bei 63 kDa. Diese Ergebnisse zeigten, dass alle Konstrukte transfiziert und exprimiert wurden (Abb. 21 A linker Blot), um für eine potentielle Interaktion zur Verfügung zu stehen, so dass wiederum ein negatives Ergebnis bei folgender Immunpräzipitation nicht auf fehlende Expression zurückzuführen ist (Abb. 21 A rechte Blots).

Nach Durchführung der Immunpräzipitation (Kap. 4.3.7) konnte immunologisch nachgewiesen werden, dass TOX3 mit HDAC1 (Abb. 21 A unterer rechter Blot), jedoch nicht mit PARP1 (Abb. 21 A oberer rechter Blot) interagiert. Um Aufschluss zu bekommen, ob diese Interaktion auch in NPCs unter physiologischen Bedingungen stattfindet wurde die Fluoreszenz-basierende Methode der *in situ* Ko-Immunpräzipitation (InCell-Ko-IP) (Kap.: 4.3.7) durchgeführt. Die in Abbildung 21 B gezeigte Fluoreszenzaufnahme spiegelt durch die grün-fluoreszierenden Fluorophore die lokalen Stellen der Interaktion von TOX3 mit HDAC1 wieder. Durch Färbung der Zellkerne mit DAPI wird deutlich, dass die detektierten Interaktionen hauptsächlich innerhalb des Zellkerns vorliegen. Anhand des Auswertungsprogramms ImageJ (Kap. 3.14.3) wurde die Anzahl der Zellkerne, sowie die Anzahl der Fluorophorpunkte bestimmt, auf die Anzahl der Zellkerne normalisiert und Graphisch dargestellt (Abb. 21 C). Hierdurch zeigte sich ein signifikanter Anstieg (11-fach) in der Anzahl der Fluorophorpunkte unter Verwendung von TOX3- und HDAC1- (5750 Fluorophore) gerichteten Primärantikörper im Vergleich zu den Kontrollen, nur gegen TOX3 (547 gezählte Fluorophore) oder nur HDAC1 (470 gezählte Fluorophore) eingesetzten Primärantikörper (Abb. 21 C). Letztendlich ließ sich eine Interaktion von TOX3 und HDAC1, sowohl *in vitro* als auch *in situ* nachweisen.

5.5.2 Trichostatin A (TSA) reprimiert die TOX3-Expression

Das zu den Histon-Deacetylierungsprotein gehörende HDAC1 zählt zur Klasse I der insgesamt in vier Gruppen klassifizierten HDACs (de Ruijter et al., 2003). Seine hauptsächliche Funktion ist die Deacetylierung von Histonen, die wiederum eine Kondensation der DNA induziert, wodurch die Transkription reprimiert wird (Brehm et al., 1998; Valapour et al., 2002; Nusinzon und Horvath, 2006; Enya et al., 2008). Eine erst kürzlich erschienene Publikation zeigte ebenfalls, dass HDACs auch in der Lage sind an Nicht-Histonproteine zu binden, wie den Nrf2-Transkriptionsfaktor und diesen zu deacetylieren (Lee et al., 2012). Dementsprechend stellte sich die Frage, in wie weit TOX3 durch HDAC1 in seiner Expression und Funktion als Transkriptionsfaktor beeinflusst wird. Zur Überprüfung wurde der Inhibitor Trichostatin A (TSA) verwendet. Dieser gilt als Inhibitor von HDACs der Klasse I und II (Yoshida et al., 1990). NPCs wurden parallel auf PLO-beschichtete 96-, 24- und 6-Lochnapfschalen ausplattiert. Dies diente zur Überprüfung, dass gleiche Präparationen mit gleicher Kultivierungspassagenanzahl von NPCs verwendet wurden, um eine Populationsveränderung unterschiedlicher Primärkulturpräparationen für nachfolgende Experimente auszuschließen.

Nach 48 Stunden bei einer Konfluenz von 80% wurden NPCs mit und ohne Wachstumsfaktoren in Abhängigkeit von Vehikel und verschiedenen TSA-Konzentrationen für weitere 24 Stunden inkubiert. Über ein Fluoreszenz-Mikroskop wurde der gegen TOX3-Primärantikörper gerichtete fluoreszierende Sekundärantikörper CY3 bei 532 nm angeregt und die Aufnahmen festgehalten. Zur Quantifizierung der TOX3-Fluoreszenzintensität wurden weitere Fluoreszenzaufnahmen mittels Hochdurchsatz-Mikroskop durchgeführt. ROIs wurden um die Zellkerne (DAPI-Färbung) gelegt und die Intensität des gegen TOX3-Primärantikörper gerichteten fluoreszierenden Sekundärantikörpers CY3 (532 nm) gemessen. Der Effekt von TSA auf die TOX3-Expression wurde immunologisch verifiziert.

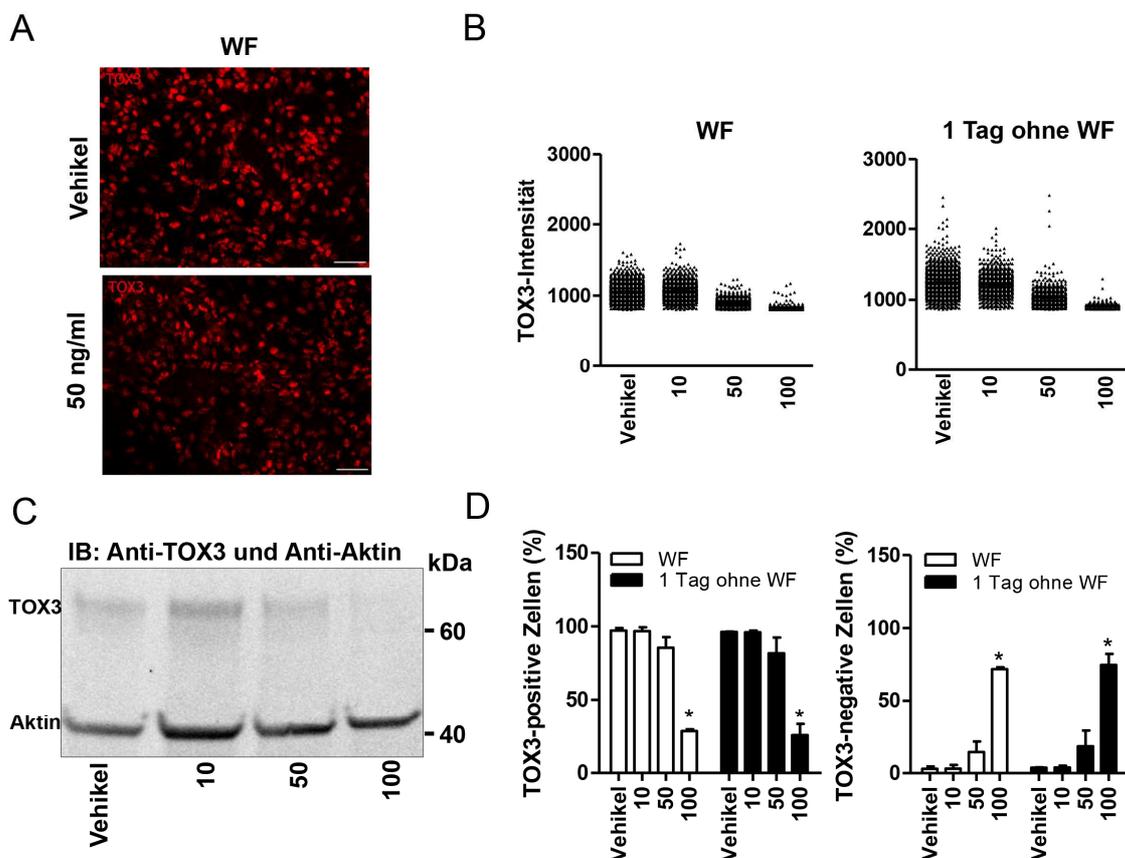


Abbildung 22: Trichostatin A (TSA) reprimiert die TOX3-Expression. A) Fluoreszenzaufnahmen von NPCs auf beschichtete Deckgläschen mit und ohne Wachstumsfaktoren (WF) mit Behandlung von Vehikel und 50 ng/ml TSA-Konzentration für 24 Stunden. TOX3 wurde durch Sekundärantikörper mit konjugiertem CY3 (532 nm) sichtbar gemacht. Die Markierungslinie repräsentiert 50 μ m. B) Darstellung der Intensitätswerte als Punkte-Balken, die durch das Hochdurchsatz-Mikroskop (BD Pathway 855) ermittelt wurden von NPCs mit und ohne WF und Behandlung von Vehikel, 10, 50 und 100 ng/ml TSA-Konzentration. Anzahl gemessener TOX3-positiver Zellen (n (WF- Vehikel, 10, 50, 100) = 1392, 1369, 1096, 286 vs. n(-1TagWF- Vehikel, 10, 50, 100) = 1387, 827, 736, 252. C) Immunologischer Nachweis von TOX3-Reduktion durch TSA-abhängige Konzentration. D) Balkendiagramm gibt die Anzahl der TOX3-positiven (>500 CY3-Intensität) vs. TOX3-negativen Zellen (<500 CY3-Intensität) in Prozent an. Die Werte wurden normalisiert auf die Anzahl der Gesamtzellzahl pro Lochnapfschale. Die Balken zeigen die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten und geben den Standardfehler SEM \pm an. *Der Vergleich der Säulen zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einer One-Way-Analyse (ANOVA) mit Tukey Posthoc-Test an.

Anhand der Fluoreszenzaufnahmen (Abb. 22 A) konnte eine Reduzierung der CY3-Intensität und damit eine Reprimierung der TOX3-Expression beobachtet werden. Durch das Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskop konnte dieser Effekt quantifiziert (Abb. 22 B) und durch immunologischen Nachweis verifiziert werden (Abb. 22 C). Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Einfluss von TSA auf die Anzahl von TOX3-positiven Zellen, die wiederum mit dem Anstieg der TOX3-negativen Zellen korrelierte (Abb. 22 D). Die als TOX3-positiven Zellen wurden hierbei bei einem Wert > 500 und TOX3-negative Zellen bei einem Wert < 500 gemessener CY3-Intensitätswerte festgelegt. Die erhaltene Anzahl TOX3-positiver (1) vs. TOX3-negativer Zellen (2) wurde auf die Gesamtzellzahl (1+2) normalisiert. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme von TOX3-positiven Zellen in Korrelation zu einer signifikante Zunahme von TOX-negativen Zellen (Abb. 22 D). NPCs mit Wachstumsfaktor (WF) bzw. ohne Wachstumsfaktor (1 Tag ohne WF) zeigten bei 50 ng/ml TSA-Behandlung eine Reduktion von -11% (WF) bzw. -15% (1 Tag ohne WF) und bei 100 ng/ml TSA-Behandlung eine Reduktion von -71% (WF) bzw. -74% (1 Tag ohne WF). Dies ließ vermuten, dass TSA die TOX3-Expression inhibiert.

5.5.3 TSA hat toxischen Effekt auf NPCs und inhibiert positiven Effekt von TOX3 auf Nestin-Promoter

In Folge der potentiellen reprimierenden Wirkung von TSA auf die TOX3-Expression, sollte geklärt werden, ob hierdurch eine morphologische Veränderung von NPCs eingetreten ist bzw. ob sie in ihrer Zelldifferenzierung beeinflusst worden sind. Weiter sollte geklärt werden, ob der Effekt nicht allein durch eine toxische Wirkung von TSA auf NPCs verursacht wurde. NPCs wurden in PLO-beschichtete 96- und 24-Lochnapfschalen ausplattiert. Nach 48 Stunden wurden sie für weitere 24 Stunden mit wachstumsfaktorhaltigem bzw. wachstumsfaktor-freiem Medium und verschiedenen TSA-Konzentrationen für weitere 24 Stunden behandelt. Über ein Fluoreszenz-Mikroskop wurde der gegen TOX3-bzw. Nestin- Primärantikörper gerichtete fluoreszierende Sekundärantikörper CY3 (532 nm) bzw. FITC (488 nm) angeregt und die Aufnahmen festgehalten.

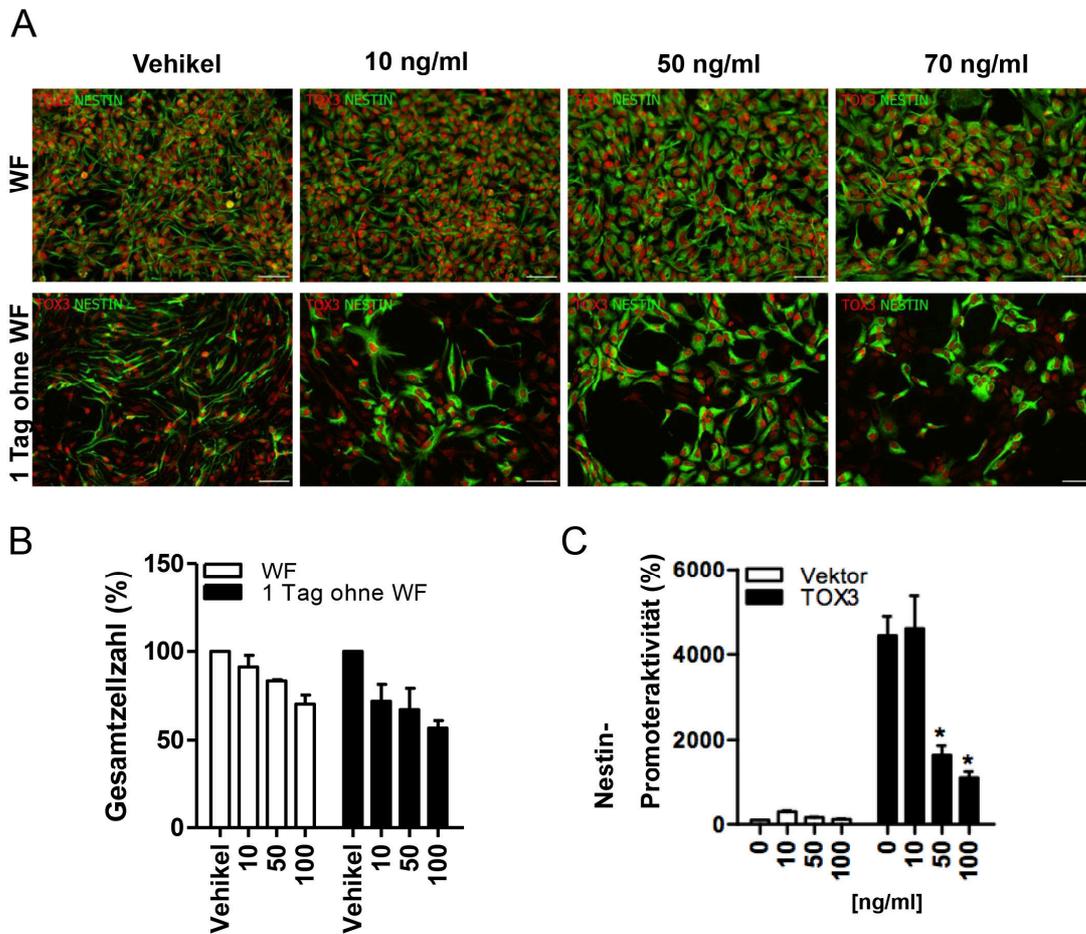


Abbildung 23: TSA wirkt toxisch auf NPCs und inhibiert Effekt von überexprimiertem TOX3 auf den Nestin-Promoter. NPCs wurden in PLO-beschichtete Lochnapfschalen ausplattiert, nach 48 Stunden für weitere 24 Stunden mit Vehikel, 10, 50, 70 bzw. 100 ng/ml TSA-Konzentration inkubiert. A) Immunzytologische Aufnahmen von TOX3 [CY3 (532 nm)] und Nestin [FITC (488 nm)] in Abhängigkeit von den genannten TSA-Konzentrationen. B) Gesamtzellzahl von NPCs mit TSA-Behandlung nach Quantifizierung über das Hochdurchsatz-Mikroskop. Reduzierung der Zellzahl von NPCs nach TSA-Behandlung in Prozent angegeben. Mit WF und TSA-Konzentration von 10 ng/ml = -10%; 50 ng/ml = -17%; 100 ng/ml = -30%; 1 Tag ohne WF mit 10 ng/ml = -28%; 50 ng/ml = -33%; 100 ng/ml = -44%. C) Nestin-Promoteraktivitätsmessung unter Einfluss von TSA. N2a-Zellen wurden mit Nestin-Luziferase und SRE-Renilla, sowie Leervektor oder Myc-TOX3 transfiziert. Nach 24 Stunden wurde für zwei Stunden mit verschiedenen TSA-Konzentrationen inkubiert. Die Balken zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und geben den Standardfehler SEM+/- an. *Der Vergleich der Säulen zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einer One-Way-Analyse (ANOVA) mit Tukey Posthoc-Test an.

Die Fluoreszenzaufnahmen zeigten eine Zellzahl- und Morphologieveränderung der NPCs in Abhängigkeit der TSA-Konzentration (Abb. 23 A). Mit zunehmender Erhöhung der TSA-Konzentration reduzierte sich die Zellzahl, die über das Hochdurchsatz-Mikroskop quantifiziert werden konnte. Es zeigte sich, dass die Zellzahl von NPCs in wachstumsfaktorhaltigem Medium bei einer TSA-Behandlung mit 10 ng/ml um 10% gesenkte wurde, bei 50 ng/ml um 17% und bei 100 ng/ml um 30% (Abb. 23 B). Wiederum wurde durch gleichzeitigen

Wachstumsfaktorentzug und TSA-Behandlung von 10 ng/ml eine Reduzierung von 28%, bei 50 ng/ml von 33% und bei 100 ng/ml von 44% ermittelt (Abb. 23 B). Die toxische Wirkung von TSA und der dadurch eintretende verstärkte Zelltod spiegelten sich wiederum in der Ausbreitung und der Umfangzunahme der überlebenden Zellen wieder. Durch gleichzeitigen Wachstumsfaktorentzug wurde die Sterberate nochmals verstärkt (Abb. 23 A/B). Es zeigte sich deutlich, dass die gestreckten Filamente (Abb. 23 A; 1 Tag ohne WF) mittels Nestin-Marker gefärbt, mit zunehmender TSA-Konzentrationserhöhung sich verkürzten und die damit einhergehende Abrundung auf ein Zellsterben hindeutete. Gleichmaßen konnten Zellen ohne Nestin-Färbung beobachtet werden. Weiter wurde der Einfluss von TOX3 auf den Nestin-Promoter in der N2a-Zelllinie überprüft. Hierbei zeigte sich, dass TOX3 mit Vehikel die Nestin-Promoteraktivität induzierte. In Folge der aufsteigenden TSA-Konzentration wurde diese Aktivität inhibiert (Abb. 23 C). Bei einer Konzentration von 50 ng/ml TSA wurde die Promoteraktivität um 63% gesenkt und durch 100 ng/ml um 76% im Vergleich zur Vehikelkontrolle (Abb. 23 C). Schließlich konnte gezeigt werden, dass TSA sich negativ auf die TOX3-Expression in N2a-Zellen und NPCs auswirkte.

5.5.4 TOX3-Mutante ist instabil

Um zu klären, ob HDAC1 durch seine Deacetylierungseigenschaft einen Einfluss auf TOX3 ausübt, wurde durch die öffentliche Datenbank www.phosida.com, potentielle Deacetylierungsstellen in TOX3 ermittelt. Dabei wurde zu 91% das Lysin (K) an der Aminosäuresequenzstelle 29 als potentielle Deacetylierungsstelle erkannt. Demzufolge wurde eine TOX3-Mutante generiert, welche an dieser Stelle einen Austausch zu Alanin anstelle des Lysins trägt (Kap. 3.12).

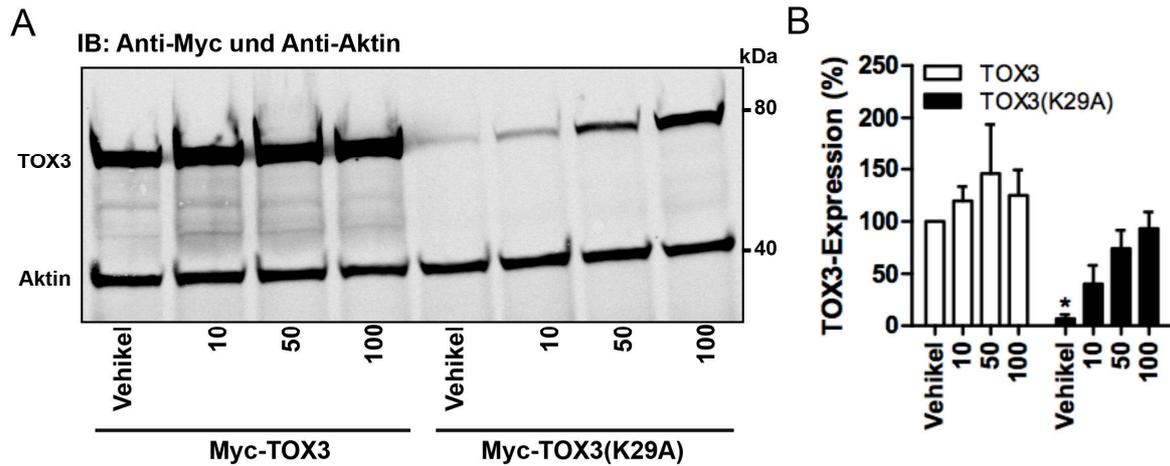


Abbildung 24: Überexprimierte TOX3-Mutante wird durch TSA vermehrt exprimiert. A) N2a-Zellen wurden in 6-Lochnapfschalen mit Myc-TOX3 und Myc-TOX(K29A) Konstrukten transfiziert. Nach 24 Stunden wurde Medium gewechselt und mit verschiedenen TSA-Konzentrationen (Vehikel, 10, 50 und 100 ng/ml) für weitere 24 Stunden inkubiert. Überexprimiertes TOX3 bzw. TOX3(K29A) wurde bei ca. 80 kDa detektiert. Die Aktin-Bande bei 39 kDa dient als Ladekontrolle zur Quantifizierung der Zielbande TOX3 mittels ImageJ. Die Balken zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und geben den Standardfehler SEM \pm an. *Der Vergleich der Säulen zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einer One-Way-Analyse (ANOVA) mit Tukey Posthoc-Test an.

Der immunologische Nachweis (Abb. 24 A) machte deutlich, dass das Myc-TOX3 Konstrukt im Gegensatz zu der Myc-TOX3(K29A) Mutante nicht stark durch die unterschiedlichen TSA-Konzentrationen beeinflusst wird. Die unter Abbildung 24 B quantifizierten Daten von drei unterschiedlichen Immunoblots zeigten folgende Expressionsunterschiede in N2a-Zellen. Im Vergleich zur Wildtyp-TOX3 Kontrolle mit Vehikel konnte bei 10 ng/ml eingesetztem TSA eine Expressionszunahme von 19% gemessen werden, bei 50 ng/ml eine 45%ige und bei 100 ng/ml eine 24%ige TOX3-Expressionszunahme. Für die TOX3(K29A)-Mutante wurden folgende Werte berechnet. Im Vergleich zur Wildtyp-TOX3 Kontrolle mit Vehikel konnte eine reduzierte Expression von -93% ermittelt werden, bei 10 ng/ml TSA -60%, bei 50 ng/ml TSA -26% und durch 100 ng/ml TSA-Behandlung konnte eine reduzierte Expression von -7% detektiert werden. Letztendlich zeigte sich, dass die potentielle Acetylierungsstelle 29 maßgeblich zur Stabilität der TOX3-Expression beiträgt.

5.6 Entdeckung von TOX3 in Glioblastom-stammzellähnlichen Linien über Screen-Verfahren

Durch wissenschaftliche Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe wurde ein Zusammenhang zwischen TOX3 und humanen Glioblastom-stammzellähnlichen Linien gesehen. Die zytoprotektive Eigenschaft von TOX3 gegen diverse zytotoxische Stimuli (Dittmer et al., 2011)

könnte ein Grund sein, warum in diversen humanen Glioblastom-stammzellähnlichen Linien TOX3 hochreguliert vorkommt. Inwiefern ein Zusammenhang zwischen der Hochregulation von TOX3 und der „stemness“ von Glioblastomen besteht, sollte in dieser Arbeit aufgeklärt werden.

5.6.1 Nachweis von TOX3-Expression in Glioblastom-stammzellähnlichen Linien

In Kooperation mit Frau Professor Kathrin Lamszus wurden verschiedene Glioblastom-stammzellähnliche Zelllinien auf TOX3-Expression untersucht. Eine Erhöhung der TOX3-Expression in verschiedenen Glioblastom-stammzellähnliche Zellen wurde zunächst auf mRNA-Ebene in einem Screen-Verfahren aufgedeckt. Dies weckte das Interesse diese Tumorzellen genauer zu untersuchen.

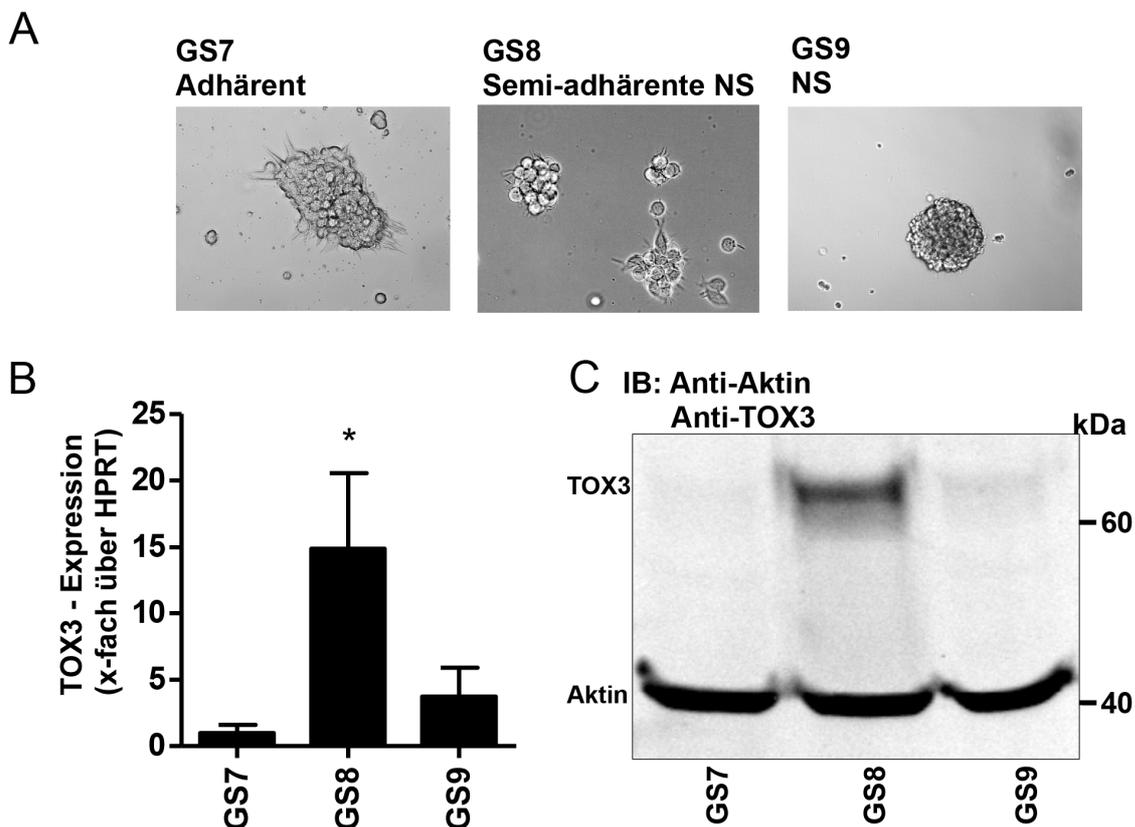


Abbildung 25: TOX3-Expression in GS8-Linie am stärksten. A) Durchlicht-Mikroskopieaufnahmen von GS7, GS8 und GS9-Linie (20-fach). B) Quantitativer Nachweis der TOX3-Expression auf mRNA-Ebene als x-faches über das Haushaltsgen HPRT angegeben. Die Balken zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und geben den Standardfehler SEM \pm an. *Der Vergleich der Säulen zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einer One-Way-Analyse (ANOVA) mit Tukey an. C) Immunologischer Nachweis der TOX3-Expression. Die Aktin-Bande bei 39 kDa dient als Ladekontrolle.

Zunächst wurden die morphologischen Besonderheiten und Unterschiede der Tumorzellen überprüft. Dabei wurde erkennbar (Abb. 25 A), dass die GS7-Linie adhärent vorliegt, die GS8-Linie teils adhärent und teils als Neurosphäre im Medium schwimmend vorkommt, so dass sie als semi-adhärenente GS-Linie bezeichnet wird. Die GS9-Zelllinie wiederum, liegt nur als Neurosphäre im Medium vor. Weiter wurde über quantitative PCR die TOX3-Expression auf mRNA-Ebene ermittelt (Abb. 25 B). Dabei konnte gezeigt werden, dass die GS8-Linie eine erhöhte TOX3-Expression (15-fach) aufzeigte in Kontrast zur GS7-Linie, während die GS9-Linie, eine vier-fache TOX3-Expression im Vergleich zu der GS7-Linie aufzeigte. Demzufolge wurde die GS7-Linie als die TOX3-negative Kontrolllinie mitgeführt. Mittels Immunoblots (Abb. 25 C) konnte dies auf Proteinebene verifiziert werden. Die GS8-Linie zeigte die stärkste TOX3-Expressionsbande bei 63 kDa, die GS9-Linie eine schwache Bande, während die GS7-Linie keine Bande zeigte (Abb. 25 C).

5.6.2 TOX3 beeinflusst die Zellproliferation in Glioblastom-stammzellähnlichen Zellen negativ

Zur Überprüfung, ob TOX3 einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten dieser stammzellähnlichen-Zelllinien aufweist, wurde ein Proliferations-Assay (Kap. 4.1.7) durchgeführt.

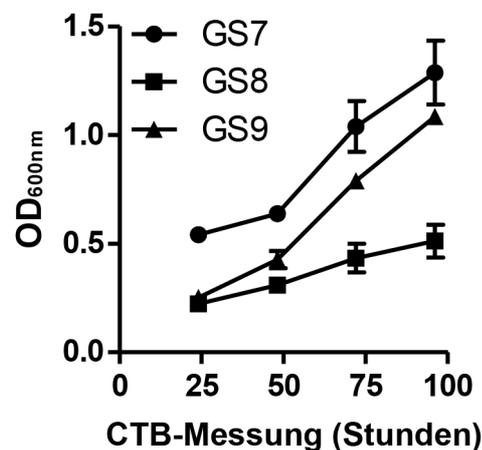


Abbildung 26: TOX3 verringert Zellproliferation. Darstellung der Zellproliferation von GS- (7, 8 und 9) Linien. Die optische Dichte (OD) wurde nach 24, 48 und 72 Stunden mittels CTB bestimmt. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und geben den Standardfehler SEM +/- an.

Die Abbildung 26 verdeutlicht, dass die GS7-Linie am stärksten proliferiert. Ausgehend von einer OD von 0,5 nach 24 Stunden, konnte nach 48 Stunden eine Zunahme auf eine OD von 0,7 ermittelt werden, nach 72 Stunden eine Erhöhung auf eine OD von 1,0 bis hin zu einer OD

von 1,3 nach 96 Stunden. Die GS9-Linie begann bei einer OD von 0,3, nach 48 Stunden konnte eine OD von 0,45 und nach 72 Stunden eine OD von 0,75 bis hin zu einer OD von 1,0 nach 96 Stunden gemessen werden. Die GS8-Linie wiederum zeigte die geringste OD-Veränderung an. Bei einer OD von 0,3 beginnend nach 24 Stunden wurde nach 48 Stunden eine OD von 0,35, nach 72 Stunden eine OD von 0,4 und nach 96 Stunden eine OD von 0,5 gemessen. Dies ließ vermuten, dass TOX3 im Zusammenhang mit Glioblastomen einen negativen Einfluss auf deren Proliferationsverhalten ausübt.

5.6.3 Herunterregulation von TOX3 zeigt keine Veränderung auf die Zellproliferation

Um die Funktion von TOX3 in Glioblastomen zu klären, wurde shRNA zur Herunterregulierung der TOX3-Expression verwendet. Die GS8- und die GS9-Linie wurden viral mit den shRNA-Konstrukten transduziert und mit dem Antibiotikum Puromycin (1 µg/ml) behandelt um stabil die shRNA exprimierenden Klone zu selektionieren (Kap. 4.1.2.1).

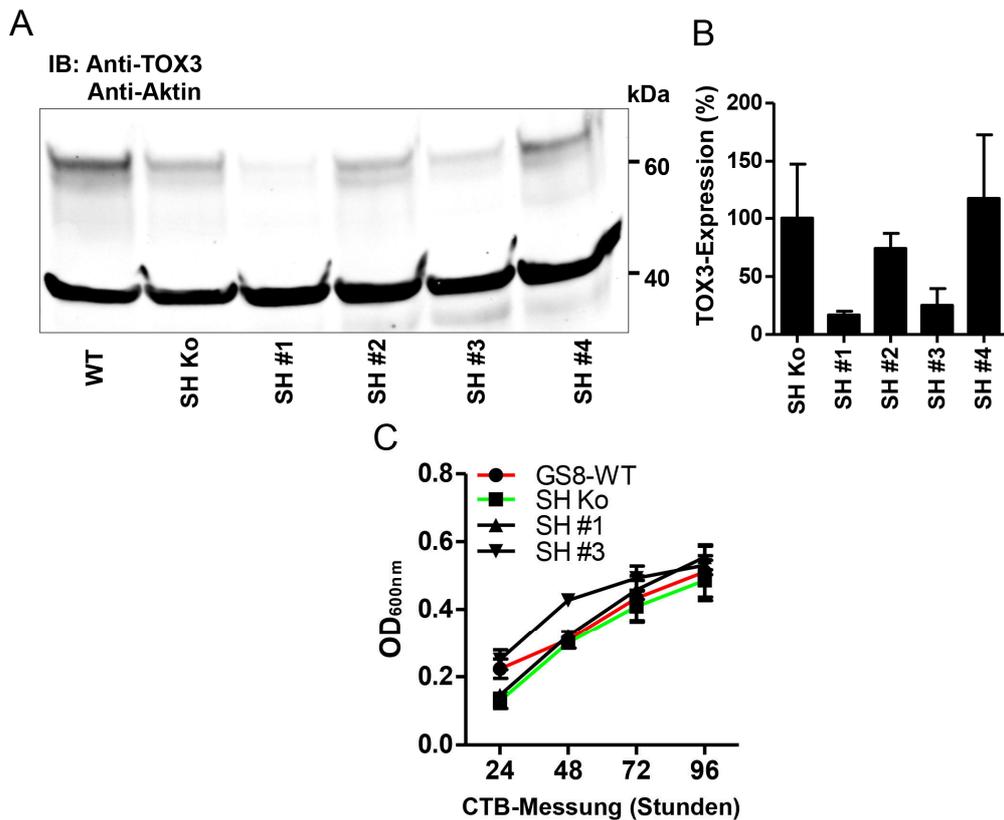


Abbildung 27: Keine signifikante Zellproliferationserhöhung durch TOX3-Herunterregulierung.

A) Immunologischer Nachweis der TOX3-Herunterregulierung durch shRNA über Virustransduktion und B) die graphische Darstellung der Proteinquantifizierung von drei unabhängigen Immunoblots mittels ImageJ. Die Aktin-Bande bei 39 kDa dient als Ladekontrolle zur Normalisierung der TOX3-Expression (63 kDa). C) Darstellung der Zellproliferation von stabilen GS8- Wildtyp (WT), SH Kontrolle (Ko), SH#1 und SH#3. Die optische Dichte (OD) wurde nach 24, 48, 72 und 96 Stunden mittels CTB bestimmt. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und geben den Standardfehler SEM +/- an.

Anhand des Immunoblots (Abb. 27 A) konnte gezeigt werden, dass die shRNA-Konstrukte SH #1 und SH #3 in der GS8-Linie die TOX3-Expression am meisten herunterregulieren, während in der GS9-Linie keine Unterschiede detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 27 B wurde die TOX3-Expression der stabilen GS8-Linie als Balkendiagramm graphisch dargestellt. Dabei zeichnete sich durch SH #1 eine 80%ige Verringerung und durch SH #3 eine ca. 70%ige TOX3-Reduzierung ab. Demzufolge wurden diese stabilen GS8-Linien auf Unterschiede im Proliferationsverhalten untersucht. Anhand der Abbildung 28 C wurde gezeigt, dass sowohl der GS8-Wildtyp (WT) als auch die durch Virustransduktion erzeugte stabile GS8-Kontrolllinie (SH Ko) unterhalb der stabilen GS8 SH #1 und SH #3 lagen. Es zeichnete sich bei SH #1 eine Erhöhung auf eine OD von 0,55 nach 96 Stunden ab, im Vergleich zu den Kontrollen WT mit einer OD von 0,51 und SH Ko mit einer OD von 0,49. Die stabile Linie SH #3 wiederum zeigte nur am Anfang eine Erhöhung der OD nach 48 Stunden auf 0,41,

im Vergleich zu den anderen Linien. Nach 96 Stunden wurde jedoch nur eine OD von 0,53 gemessen. Auch die Berechnung der Fläche unterhalb der Messzeitpunkte (*engl. area under the curve*) gaben keinen Hinweis auf eine Veränderung der Proliferation (Daten nicht gezeigt). Durch den geringen Unterschied ließ sich dementsprechend keine Aussage treffen, ob TOX3 Ursache des Proliferationsunterschiedes von GS8 bzw. GS9 im Vergleich zur GS7-Linie war.

5.6.4 Stabile SH#3-Linie zeigt geringere Zellzahl und spindelförmigere Morphologie

Um zu erkennen, ob die TOX3-Herunterregulierung eine morphologische Veränderung der Zellen nach sich zieht, wurden die Zellen zunächst mit Phalloidin gefärbt. Phalloidin färbt Aktinfilamente an, wodurch das Gesamt-Gerüst der Zelle zu erkennen ist (Dancker et al., 1975). Neurosphären wurden hierfür vereinzelt und in einer definierten Anzahl auf Laminin-beschichtete 24-Lochnapfschalen auf Deckgläschen ausgesät. Des Weiteren wurde gegen die Zelltypmarker GFAP, Nestin und β -TubulinIII zusammen mit TOX3 gefärbt zum Nachweis von Zelltypänderungen. Durch fluoreszierende Sekundärantikörper mit konjugiertem CY3 (532 nm) oder FITC (488 nm) wurden diese visuell sichtbar gemacht.

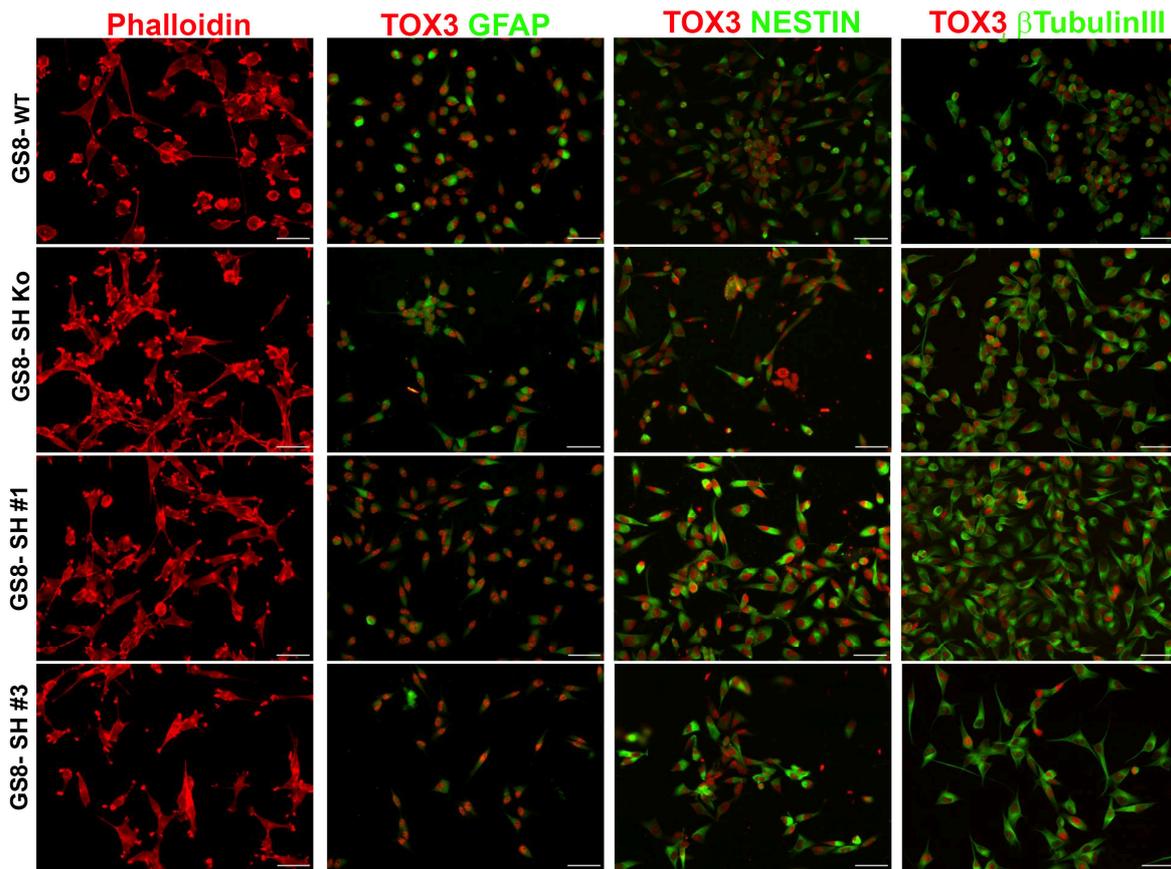


Abbildung 28: TOX3-Herunterregulation beeinflusst Zellzahl und Zellmorphologie. GS8-Wildtyp im Vergleich zu stabilen GS8 (SH Ko; SH #1; SH #3)-Linien wurden mit Phalloidin gefärbt, um Aktin sichtbar zu machen. Der gegen TOX3-Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper mit konjugiertem CY3 (532 nm) und gegen GFAP-, Nestin- oder β -TubulinIII gerichtete Sekundärantikörper mit konjugiertem FITC (488 nm) wurde durch ein Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Markierungslinie repräsentiert 50 μ m.

Durch die Fluoreszenzabbildungen und den eingesetzten zelltypspezifischen Markern, konnte gezeigt werden, dass die GS8 WT und SH-Ko-Linie in einer teils kugeligeren und nur gering langgestreckten Form vorliegen im Vergleich zu den stabilen GS8-SH-Linien (Abb. 28). Die stabile SH#1 und #3-Linie zeigten hierbei teils stark ausgebreitete und spindelförmige Zellformen (Phalloidinfärbung). Die Färbung gegen GFAP zeigte erneut die kugeligere Morphologie in der GS8 Ko-Linie, besonders im Wildtyp. Die hierbei beobachtete verstärkte GFAP-Intensität spricht für eine erhöhte GFAP-Expression. Generell zeigte sich, dass die Zelllinie SH#3 im Vergleich zur SH Ko- und SH#1-Linie trotz gleich eingesetzter Zellzahl eine geringere Proliferationsrate und damit geringere Zellzahl aufzeigte. Dies wurde ebenfalls bei der Kultivierung und Passagierung im Vergleich zu den anderen Linien beobachtet. Weiter konnte in der SH #1 und SH#3-Linie eine erhöhte Nestin-Expression beobachtet werden. Die durch den Neuronenmarker β -TubulinIII detektierten Zellen verdeutlichten wiederum, dass die stabile SH#3-Linien in einer spindelförmigeren Morphologie vorlag.

5.6.5 Stabile GS7-YFP-TOX3 Zelllinie zeigt veränderte Morphologie

Die GS7-Linie exprimiert nicht detektierbare Mengen TOX3 (Abb. 25), demzufolge wurde TOX3 in dieser Zelllinie stabil überexprimiert, um den Einfluss von TOX3 auf die Morphologie und Zellproliferation hin zu untersuchen. Über das PiggyBac-System mittels Transposon-Technologie wurden die Zellen mit TOX3 stabil transfiziert (Kap. 4.1.2.1) und auf Veränderungen der Morphologie untersucht. Zellen wurden vereinzelt und je 5000 Zellen pro 96-Lochnapfschalen ausgesät.

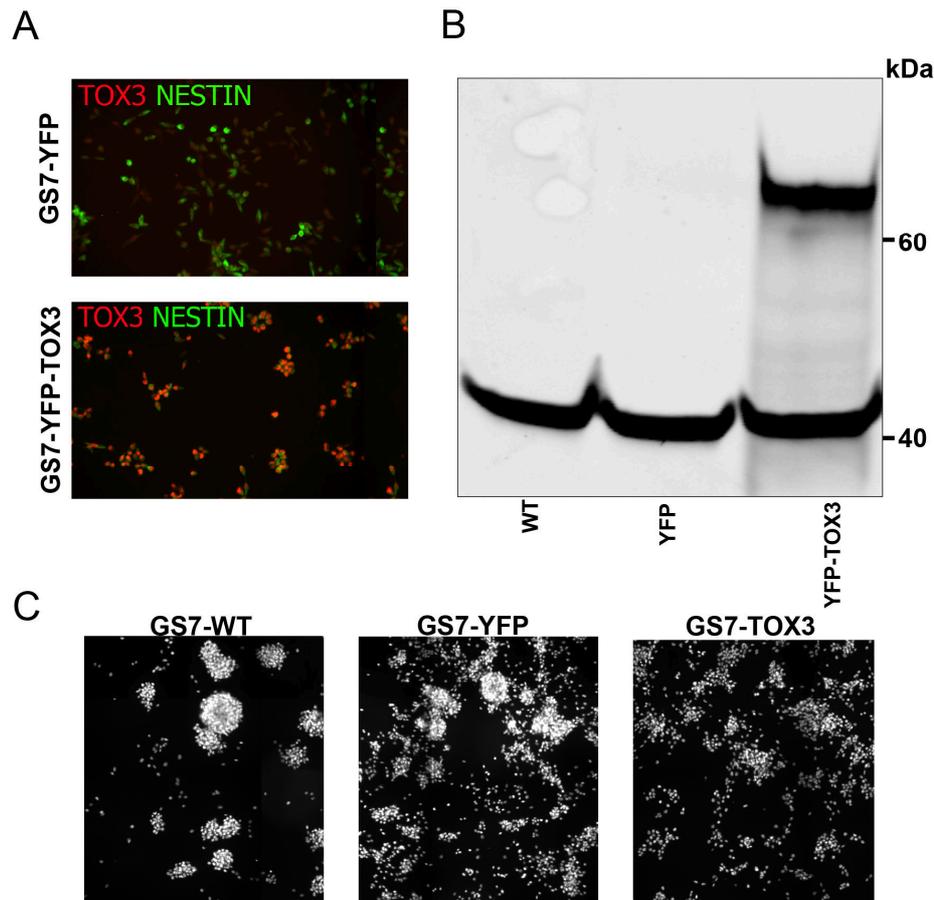


Abbildung 29: TOX3 verändert Morphologie von Glioblastom-stammzellähnlichen Linien. A) Nachweis der TOX3- und Nestin-Expression in stabilen GS7-YFP und GS7-YFP-TOX3 durch Sekundärantikörper mit konjugiertem CY3 (532 nm) und FITC (488 nm). B) Immunologischer Nachweis der stabilen TOX3-Expression in der GS7-Linie bei 63 kDa. Die Aktin-Bande bei 39 kDa dient als Ladekontrolle. C) 2x2 Montageaufnahme von mit DAPI - gefärbten GS7- WT, -YFP und -YFP-TOX3 Linien durch automatisiertes Hochdurchsatz-Mikroskop. Aufnahme wurde mit einer 10-fachen Vergrößerung abgelichtet.

Immunzytologisch (Abb. 29 A) und immunologisch (Abb. 29 B) konnte die stabile TOX3-Expression in der GS7-Linie nachgewiesen und verifiziert werden. Durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI wurden die Zellkerne eingefärbt, um die einzelnen GS7-Linien (GS7-Wildtyp, -YFP, -YFP-TOX3) auf Veränderung in ihrer Zellpopulation voneinander zu unterscheiden (Abb. 29 C). Die GS7-WT Linie zeigte voneinander abgrenzende proliferierende

Zellhaufen. Dies konnte ebenso bei der GS7-YFP Kontrolllinie wahrgenommen werden. In der stabilen GS7-YFP-TOX3 Linie wiederum wurde eine deutlich geringere Aggregatsbildung beobachtet. Schließlich konnte beobachtet werden, dass die stabile TOX3-Expression ein Wachstum als Einzelschicht verursachte, anstelle des mehrschichtigen Wachstums bzw. der Aggregatsbildung in den Kontrolllinien.

5.6.6 TOX3-Expression verringert Proliferationsverhalten

Durch den Einfluss von TOX3 auf die Aggregatsbildung sollten Proliferationsversuche weiteren Aufschluss über mögliche Eigenschaften von TOX3 auf Glioblastom-stammzellähnliche Zelllinien geben. Hierfür wurden die verschiedenen GS7-Linien zu 5000 Zellen pro 96-Lochnapfschale ausgesät und nach 24, 48 und 72 Stunden wurde CTB-Reagenz auf die Zellen gegeben, um die Proliferationsrate bei einer OD von 600 nm zu bestimmen.

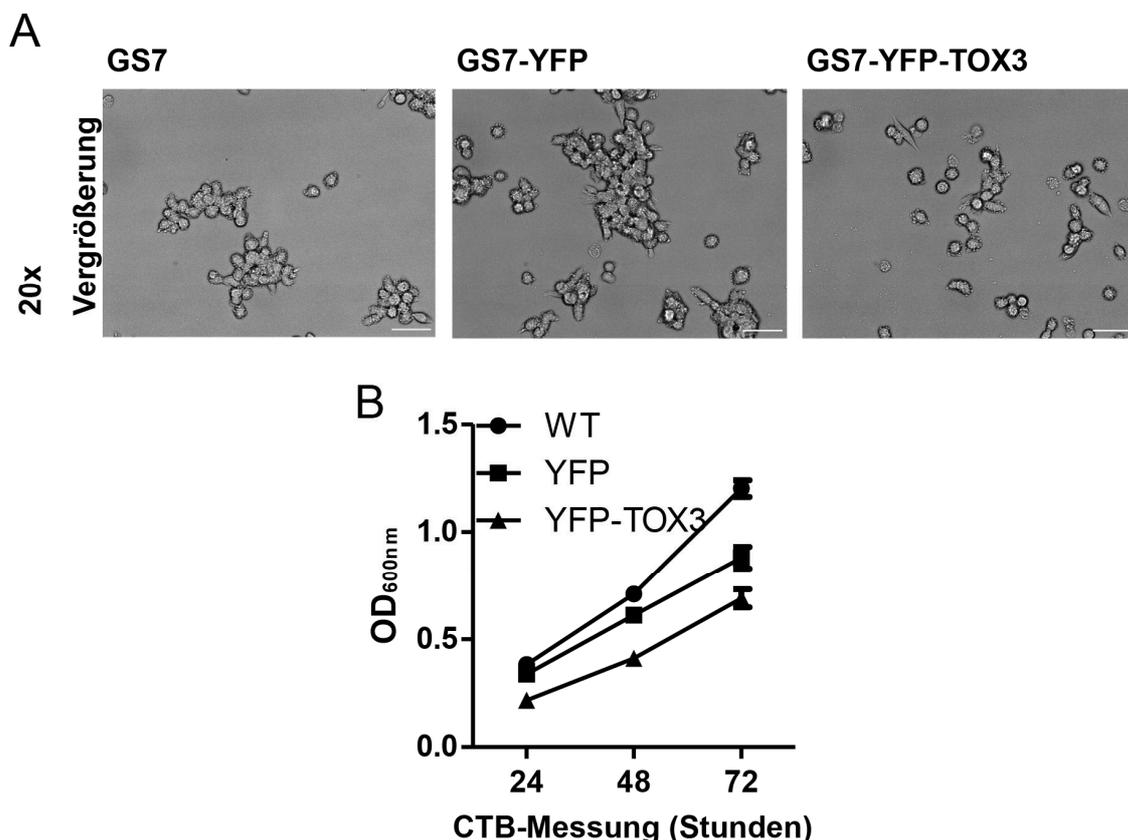


Abbildung 30: TOX3 hemmt Proliferation in Glioblastom-stammzellähnliche Zelllinie. A) Durchlichtaufnahmen von stabilen GS7-Linien in einer 96-Lochnapfschale nach 24 Stunden der Aussaat. Markierungslinie repräsentiert 50 μm . B) Darstellung der Zellproliferation von stabilen GS7 - WT, -YFP und -YFP-TOX3. Die OD wurde nach 24, 48 und 72 Stunden mittels CTB bestimmt. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und geben den Standardfehler SEM +/- an.

Durch die Durchlichtaufnahmen (Abb. 30 A) wurde die veränderte Morphologie bzw. die Aggregatsbildung der stabilen GS7-Linien nochmals verdeutlicht. Hier wurden auch die Unterschiede in der Zellzahl der GS7-Linien deutlich, welcher wiederum durch die Proliferationsmessung (Abb. 30 B) bestätigt wurde. Die GS7-YFP-TOX3 Linie zeigte die geringste Proliferationsrate im Vergleich zum GS7-WT und der GS7-YFP Kontrolle. Diese beiden zeigten nach 24 Stunden eine OD von 0,4, während YFP-TOX3 eine OD von 0,2 aufwies. Nach 48 Stunden zeigte die WT-Linie eine OD von 0,7, YFP von 0,6 und YFP-TOX3 eine OD von 0,4 auf. Nach 72 Stunden wurde eine Verdopplung auf eine OD von 1,2 der WT-Linie gemessen, YFP zeigte eine OD von 0,9 und YFP-TOX3 zeigte eine OD von 0,7. Die Ergebnisse ließen erkennen, dass TOX3 die ursprünglich TOX3-freie GS-Linie sowohl morphologisch als auch im Proliferationsverhalten stark beeinflusst.

6. Diskussion

Die Zusammenfassung der Ergebnisse lassen vermuten, dass TOX3 an der Entwicklung des Gehirns beteiligt ist, da es in proliferierenden Regionen, wie der subventrikulären Zone vorkommt und besonders in NPCs nachgewiesen werden konnte. Weiter scheint TOX3 bevorzugt in undifferenzierten Zellen exprimiert zu werden. Besonders war eine Korrelation mit der Nestin-Expression zu beobachten, während das Zytokin TGF β sich negativ auf die TOX3-Expression auswirkte. Möglicherweise wird TOX3 durch TGF β reprimiert, weil TGF β unter anderem zu Zellarrest von proliferierenden Zellen führt und zugleich die Differenzierung in Richtung Neurogenese fördert. Die bestätigte Interaktion zwischen TOX3 und HDAC1 in NPCs könnte als weiterer Regulierungsmechanismus zwischen dem Erhalt der Stammzellhaftigkeit oder einer möglichen Rolle zwischen Neurogenese und Gliogenese anzusehen sein. In GS-Zelllinien kommt TOX3 besonders in invasiven Populationen vor. Möglicherweise fördert es das neurosphärenartige Wachstum, während es zugleich die Proliferationsrate/Metabolierungsrate zu verringern scheint. Ebenfalls scheint TOX3 in nicht-invasiven GS-Zelllinien eine Veränderung der Aggregats bzw. Sphärenbildung einzuleiten, vermutlich durch veränderte Genregulierung und der damit verursachten Zusammensetzung der extrazellulären Matrix.

6.1 Hohe TOX3-Expression in E13.5 Mäusen

Ein Hinweis der Allen Brain Atlas Datenbank zeigte, dass TOX3 in proliferierenden Regionen, wie die subventrikuläre Zone, vorkommt. Diese Zone dient als Stammzellnische und enthält NPCs die unter bestimmten Kultivierungsmethoden mit Wachstumsfaktoren FGF und EGF (Reynolds und Weiss, 1992) *in vitro* kultivierbar sind und dementsprechend als Stammzell-Modell genutzt werden. Mit Hilfe eines eigens für diese Arbeit generierten Antikörpers konnte gezeigt werden, dass TOX3 im Vergleich mit Mäusen des Entwicklungsstadiums E11.5, E13.5 oder E16.5 am meisten im Stadium E13.5 exprimiert wird. Dies konnte signifikant auf mRNA- und Proteinebene verifiziert werden. Interessanterweise wird in der Literatur beschrieben, dass im Laufe der Embryogenese von Mäusen die neurogene Periode ab dem Embryostadium an Tag 9,5 bis Tag 12,5 stattfindet, während ab dem Embryostadium an Tag 13,5 bis zum postnatalen Stadium die Gliogenese eintritt (Delaunay et al., 2008). Die Mechanismen sind bisher nicht geklärt. Es wird vermutet, dass NPCs zunächst in ihrem neuronalen Schicksal gefördert werden und im Laufe der Entwicklung das gliäre Schicksal bevorzugt eingehen. Die

radiale Glia-Stammzelle, die zur Neurogenese befähigt ist, ist besonders Heterogen in Bezug auf die Anzahl der Neuronen- bzw. Gliazellbildung in Abhängigkeit zur Entwicklungsdauer (Anthony et al., 2004). Die unterschiedlichen TOX3-Expressionsstärken zwischen den verschiedenen Embryostadien könnten daraufhindeuten, dass es an der Regulierung zwischen der embryonalen Neurogenese und Gliogenese beteiligt ist.

6.2 TOX3 zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie Musashi1

Interessanterweise konnte anhand von immunhistologischen Doppelfärbungen von E13.5 Mäusen gezeigt werden, dass das RNA-bindende Protein Musashi1 ein ähnliches Expressionsmuster wie TOX3 aufweist. Bekannt ist, dass Musashi1 in NPCs exprimiert wird (Sakakibara et al., 1996; Kaneko et al., 2000) und an der asymmetrischen Teilung beteiligt ist (Nakamura et al., 1994). Musashi1 wird in mehreren Spezies, wie *C. elegans* (Yoda et al., 2000), *D. melanogaster* (Nakamura et al., 1994), *M. musculus* (Sakakibara et al., 1996) und *H. sapiens* (Pincus et al., 1998; Good et al., 1998) exprimiert und ist gleichzeitig an dem Erhalt der Stammzellhaftigkeit beteiligt. Hierbei aktiviert Musashi1 den Notch-Signalweg, der wiederum die Zelle im unreifen Stammzellcharakter hält (Nakamura et al., 2000; Gaiano et al., 2000). TOX3 konnte ebenfalls in Hirnregionen mit Stammzellpotenzial nachgewiesen werden, wie in der subventrikulären Zone von Mäusen und spezies-übergreifend im Hirn von Zebrafischen. In NPCs konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des Notch-Liganden Jagged einen positiven Einfluss auf die TOX3-Expression auf mRNA-Ebene bewirkt. Gleichzeitig konnte durch den Inhibitor DAPT eine Reprimierung von TOX3 auf mRNA, nicht aber auf Proteinebene detektiert werden. Nichtsdestotrotz scheint TOX3 bevorzugt in proliferierenden Gehirnregionen exprimiert zu werden, wie Musashi1 und könnte daher als potentieller Stammzellmarker angesehen werden.

6.3 TOX3 hauptsächlich in proliferierenden Nestin-positiven Zellen

TOX3 wurde im Nukleus von Nestin-positiven NPCs vorgefunden. Das Intermediärfilament Nestin gilt als Marker für Stammzellen bzw. von proliferierenden Zellen (Lendahl et al., 1990). Seine Expression konnte in den verschiedensten Progenitor-Zellen bzw. Stammzellen aus den unterschiedlichsten Geweben detektiert werden (Wiese et al., 2004), denen wiederum alle

gemein haben, dass es sich um stark proliferierende Zellen handelt. Läsionsversuche zeigten, dass besonders in diesen Regionen ein vermehrtes Auftreten von proliferierenden Zellen und damit Nestin-positiven Zellen zu erkennen ist, welche vermutlich die Regeneration antreibt (Namiki und Tator, 1999). Nestin trägt auch zur morphologischen Veränderungen von Progenitor-Zellen in der Differenzierungsphase bei, indem es an der Modellierung der Morphologie beteiligt ist (Herrmann und Aebi, 2000). Im Laufe der Differenzierung wird es schließlich durch Neurofilamente ersetzt, wodurch seine Expression abnimmt. Anhand von Fluoreszenzaufnahmen mit Doppelfärbungen konnte gezeigt werden, dass TOX3 hauptsächlich in Regionen von proliferierenden Zellen, wie der subventrikulären Zone vorkommt. Über die Differenzierungsdauer von bis zu 14 Tagen Wachstumsfaktorentzug (-FGF/-EGF) konnte zunächst über einen signifikanten Expressionsanstieg von TOX3 nach nur einem Tag ohne Wachstumsfaktoren, eine stetige Abnahme auf mRNA- und Proteinebene ermittelt werden. Die erhöhte TOX3-Zunahme nach einem Tag Wachstumsfaktorentzug wurde quantitativ mittels Hochdurchsatz-Mikroskop bestätigt. Interessanterweise zeigte sich hierbei eine Korrelation zur Nestin-Expression. Fluoreszenzaufnahmen von neurosphärenartigen NPCs bestätigten die Zunahme von Nestin durch die sichtbare Filamentausbreitung in Korrelation zu den TOX3-Expressionsdaten auf mRNA und Proteinebene. Weiter konnte in einzelnen terminierten NPCs, die sieben Tage Wachstumsfaktorentzug ausgesetzt waren, eine TOX3-Expression im Zellkern nachgewiesen werden. Dies bestätigte die publizierten Ergebnisse von Yuan und Dittmer, dass TOX3 auch in differenzierten neuronalen Zellen eine Rolle spielt (Yuan et al. 2009; Dittmer et al., 2011). Shih und Holland (2006) verwiesen darauf, dass die Nestin-Expression durch den Notch-Signalweg beeinflussbar ist. Anhand von immortalisierten N2a-Zellen konnte durch TOX3-Überexpression eine Induktion des Nestin-Promoters ermittelt werden, die durch Zugabe von Jagged verstärkt und durch DAPT reprimiert worden ist. Die Behandlung von NPCs mit Jagged oder DAPT konnte keine Notch-abhängige Nestin-Expression auf Proteinebene bestätigen. Wie auch immer, die hohe Expression von TOX3 in Nestin-positiven NPCs lässt vermuten, dass TOX3 eine Rolle an dem Erhalt von Stammzellen bzw. von proliferierenden Zellen spielt. Vermutlich fördert die TOX3-Expression die Hochregulation von anti-apoptischen Proteinen um zu einem verstärkten Schutz der differenzierenden NPCs beizutragen und weitere Mechanismen in Gang zu setzen die den Differenzierungsprozess zu einem bestimmten Zelltyp unterstützen. Herunterregulierungsversuche von TOX3 in NPCs konnten nicht klären, in wie weit der Zelltyp beeinflusst wird, da diese Zellen eine hohe Sensibilität und damit einhergehende Sterberate durch das Transfektionsagens zeigten. Die Funktion von TOX3 in Stammzellen bleibt demnach unklar und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen

anhand von Knockout-Modellen sein. Weitere in der Literatur angegebene Stammzellmarker, wie PAX6 (Maekawa et al., 2005; Sakurai und Osumi, 2008) und PML (Regad et al., 2009) wurden getestet. Jedoch konnte mit diesen Antikörpern kein spezifisches Signal detektiert werden. Die neuronenspezifischen Marker MAP-2 und β -TubulinIII indessen bestätigten, dass TOX3 bevorzugt in Nestin-exprimierenden Zellen bzw. Regionen vorkommt.

6.4 Die TOX3-Expression wird durch Faktoren, die die Differenzierung induzieren negativ beeinflusst

Sowohl das Zytokin TGF β , als auch der Notch-Inhibitor DAPT beeinflussen die TOX3-Expression negativ. DAPT gilt als Inhibitor des Notch-Signalweges (Kanungo et al., 2008; Borghese et al., 2010), wodurch die Differenzierung von NPCs vorangetrieben wird. TGF β wiederum fördert die Differenzierung in Neurone in dem embryonischen Kortex (Mabie et al., 1999), im Fall von radialen Glia-Zellen fördert es die Astrozyten-Transformation (Stipursky und Gomes, 2007) und gleichzeitig inhibiert es in proliferierenden Zellen das Zellwachstum (Seoane et al., 2004; Wang et al., 2012). Hierdurch verlieren NPCs ihre Stammzellhaftigkeit, welches wiederum mit der Herunterregulierung der TOX3-Expression auf mRNA- und Proteinebene zu korrelieren scheint. Dies wiederum lässt vermuten, dass TOX3 hauptsächlich in undifferenzierten und proliferierenden Zellen vorkommt.

6.4.1 Potentielle TOX3-Reprimierung durch Zellveränderung

In Folge der Differenzierung konnte beobachtet werden, dass ursprünglich kleine, runde Zellen einen langgestreckten Zellkörper annehmen. Auch TGF β führt zu einer Veränderung des Zellkörpers, indem es die langgestreckte, neuronale Zellmorphologie begünstigt (Vogel et al. 2010). Im Vergleich mit undifferenzierten NPCs, Neuronen und gliären Zellen wurde ebenfalls eine Veränderung in der Zellkerngröße beobachtet. Besonders die Zellkerne von Neuronen im Vergleich zu NPCs oder Astrozyten sind kleiner. Die Veränderung der Zellmorphologie und damit einhergehende Zellkerngröße kann ein Grund für die abnehmende TOX3-Expression sein. Gleichmaßen scheint TGF β die zytoprotektiven Eigenschaften von TOX3 zu kompensieren, indem es Neurone vor dem Zelltod schützt (Brionne et al., 2003; Roussa et al., 2004; Vogel et al., 2010). Eine Auszählung über die durch TGF β -Behandlung induzierte potentielle Steigerung der Anzahl von Neuronen und einer potentiellen TOX3-Reprimierung brachte kein Ergebnis. Generell wurden zwischen den verschiedenen Primärkultur-

Präparationen unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeiten in der Zunahme der Neurosphären beobachtet. Vermutlich spielt die Heterogenität der Präparationskulturen eine große Rolle, die sich in der Anzahl von NPCs und terminierten Zellen voneinander unterscheiden. Wichtige Faktoren, wie die Zelldichte und die sezernierten Botenstoffe spielen ebenfalls eine große Rolle (Hitoshi et al., 2002; Alexson et al., 2006) um die Proliferationsgeschwindigkeiten und das Differenzierungsverhalten zu beeinflussen. Demzufolge sollte der Einfluss von TGF β auf die TOX3-Expression ebenfalls unter physiologischen Bedingungen *in vivo* überprüft werden.

6.5 TOX3 interagiert mit HDAC1, ein Ko-Regulator zwischen Neurogenese und Gliogenese

Interaktionsstudien zeigten, dass TOX3 mit Interaktionspartnern, wie CITED1 oder phosphoryliertem CREB, die eine Rolle in neuronalen Zellen spielen, interagiert (Yuan et al., 2009; Dittmer et al., 2011). In dieser Arbeit wurde ein weiterer Interaktionspartner HDAC1 identifiziert, der zur ersten Gruppe von insgesamt in drei Familien (HDAC I-III) klassifizierte Histon-Deacetylierungsproteinen gehört (de Ruijter et al., 2003). HDACs sind an der Umschaltung zwischen der Neurogenese und Gliogenese beteiligt (Shakèd et al., 2008) und können die transkriptionelle Aktivität reprimieren, die zum Erhalt proliferierender Stammzellen dient (Sun et al., 2007). Ein besonderer Mechanismus ist dabei die Entfernung der Acetylgruppe (-CO-CH₃) von der ϵ -Aminosäuregruppe Lysin (K) in Histonen, wodurch diese wieder positiv elektrisch geladen wird und eine hohe Affinität zum negativ geladenen Phosphat-Gerüst der DNA bewirkt. Dies führt zu einer Herunterregulation der DNA-Transkription (Brehm et al., 1998), welche durch die sogenannten Histonacetyltransferasen wieder neutralisiert werden kann, indem diese die Acetylierung wiederherstellen. Weiter ist bekannt, dass HDACs die katalytische Aktivität anderer Proteine, wie α -Tubulin (Matsuyama et al., 2002), p53 und CBP/p300 (McKinsey et al., 2001) modifizieren und rekrutieren können. Die genauen Regulationsmechanismen sind dabei noch unbekannt. Die Interaktion von TOX3 mit HDAC1 gibt die Möglichkeit zur Aufklärung des Mechanismus beizutragen. Sowohl HDAC1 als auch TOX3 liegen hauptsächlich im Nukleus exprimiert vor. Weiter ist bekannt, dass HDAC1, wie TOX3 in NPCs hoch exprimiert vorkommt.

6.5.1 Die potentielle Wechselwirkung zwischen HDAC1 und TOX3

In der Literatur wird weiter beschrieben, dass HDAC1 einen positiven Einfluss auf die Stammzellhaftigkeit aufweist, indem es differenzierungsfördernde Gene reprimiert (Sun et al., 2007; Montgomery et al., 2009). Dies wiederum scheint zunächst widersprüchlich in Bezug darauf zu sein, dass TOX3 als Transkriptionsfaktor die Transkription initiiert. Möglicherweise führt die Interaktion dazu, dass HDAC1 an Promoterregionen von TOX3 rekrutiert wird, die beispielsweise neuronenfördernde Gene anschalten. Literaturrecherchen haben diesbezüglich gezeigt, dass TOX3 an der Synaptogenese und der axonalen Weiterleitung beteiligt ist (Tessema et al., 2012) bzw. in Neuronen vorkommt (Yuan et al., 2009). Möglicherweise verursacht HDAC1 durch seine Interaktion mit TOX3, dass differenzierungsfördernde Gene reprimiert werden. Im Fall des Glucocorticoid Rezeptors mit dem Interleukin (IL)-5 Promoter ist nachgewiesen worden, dass die Rekrutierung von HDAC1 an den IL-5 Promoter eine Deacetylierung hervorruft. Diese wiederum führt zu einer Reprimierung der Gentranskription, indem weitere Transkriptions-Aktivatoren, wie GATA3 durch Veränderung der Ziel-DNA vermutlich nicht mehr binden können (Jee et al., 2005). Möglicherweise werden neuronenfördernde Gene durch die Deacetylierung von HDAC1 reprimiert und andere Gene wiederum hochreguliert, die die Umschaltung zwischen Neurogenese und Gliogenese bewerkstelligen. Folglich scheint TOX3 durch bzw. mit HDAC1 die Nestin-Expression aufrecht zu erhalten. Ein Zusammenspiel zwischen HDAC1 und TOX3 begünstigt die Proliferation von NPCs bzw. Stammzellen.

6.5.2 Einfluss von Trichostatin A auf HDAC1 und TOX3

HDACs können besonders durch die hoch spezifische Streptomyces-abgeleitete Hydroxamsäure TSA inhibiert werden, indem diese mit der katalytischen Einheit von HDACs der Klasse I und II interagiert und reversibel, kompetitiv inhibiert (Yoshida et al., 1990). Dies führt dazu, dass die neuronale Differenzierung in der adulten Neurogenese (Kim et al., 2009) und im embryonalen Kortex eingeleitet wird, während in der ganglionischen Eminenz die Gliogenese bevorzugt eingeleitet wird (Shakèd et al., 2008). Weitere Studien zeigten, dass TSA ebenfalls einige Transkriptionsfaktoren der Gliogenese (Stat1/Stat3) als auch die Expression von Neurogenese-fördernden Transkriptionsfaktoren fördert, wie Ngn1 (Shakèd et al., 2008). Demnach scheint der Einfluss von TSA abhängig von der Region, vom Zelltyp und den vorhandenen Zielproteinen zu sein. Dies lässt vermuten, dass HDACs in den genannten

Regionen unterschiedlich stark vertreten sind und sowohl die Neurogenese als auch die Gliogenese einleiten können.

In dieser Arbeit konnte der negative Einfluss von TSA auf die TOX3-Expression und auf die Anzahl von NPCs anhand von Fluoreszenzaufnahmen beobachtet werden. Mittels Hochdurchsatz-Screens konnte dabei eine Korrelation in der Anzahl von TOX3-positiven zu TOX3-negativen Zellen ermittelt werden, welcher den alleinigen zytotoxischen Effekt ausschließen lässt. Immunologische Analysen zeigten eine TSA-abhängige Reprimierung von TOX3, die anhand von Fluoreszenzaufnahmen im Nukleus sichtbar wurde. In der Literatur ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor Smad7 durch HDAC1 vollständig deacetyliert und hierdurch abgebaut wird (Simonsson et al., 2005). Weiter gilt das Creb-binde Protein p300 als Vermittler der Acetylierung. In Folge von Immunantworten wird der IL-8-Promoter von p300 acetyliert und reduziert dadurch gebundenes HDAC1 bzw. HDAC5, wodurch ein hoher IL-8-Anstieg ermöglicht wird (Schmeck et al., 2008). Die Expression von IL-8 bzw. IL-1 ist dementsprechend in diversen Tumoren einschließlich Brustkrebs (IL-8) hochreguliert (Dinarello, 1996; Freund et al., 2003; Enya et al., 2008). Neben p300 gilt auch CBP als Histon-Acetylierungstransferase, welches nachweislich mit TOX3 interagiert (Dittmer et al., 2011). Die schematische Abbildung 31 verdeutlicht die verschiedenen Hypothesen, inwiefern ein Wechselspiel zwischen HDAC1 und TOX3 im Zusammenhang mit TSA bestehen könnte. Anhand von publizierten Interaktionspartnern von HDAC1 konnten mehrere Hypothesen generiert werden, die das komplexe Zusammenspiel der Regulationsmechanismen verdeutlicht. Beispielsweise kann die epigenetische Modifikationen durch HDACs eine Konformationsänderung der DNA induzieren, durch Rekrutierung mittels Transkriptionsfaktor an eine bestimmte DNA-Region die Transkription reprimieren (Valapour et al., 2002; Nusinzon und Horvath, 2006; Enya et al., 2008), aktivieren (Xu et al., 2003) oder zu verstärkter Phosphorylierung von Zielproteinen führen (Krämer et al., 2009). Der Gegenstand weiterer Untersuchungen sollte daher sein, die grundlegende Wirkung von HDAC1 und TSA auf den Deacetylierungs- bzw. Acetylierungsgrad von TOX3 zu untersuchen.

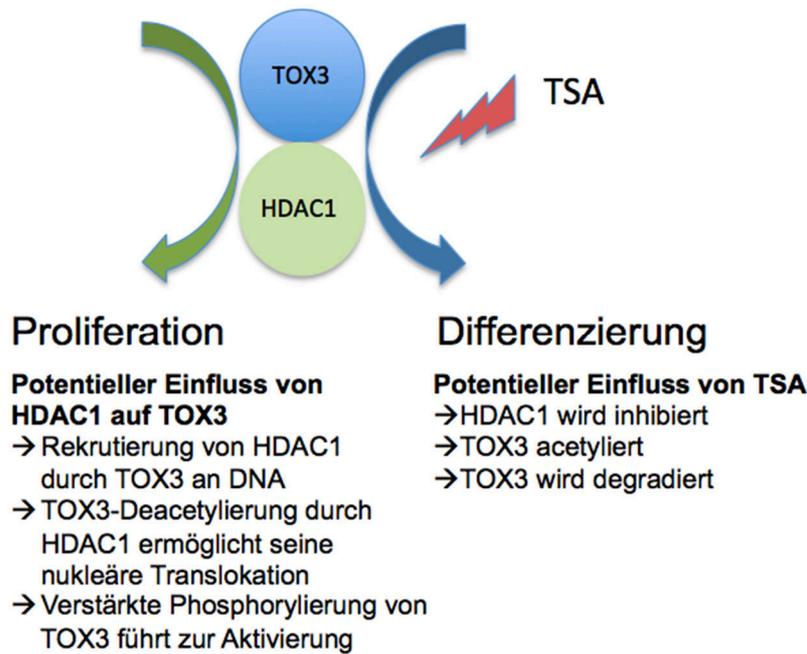


Abbildung 31: Potentielle Regulationsmechanismen zwischen HDAC1 mit TOX3. Verschiedene Hypothesen, wonach TOX3 durch HDAC1 beeinflusst werden könnte.

6.5.3 Potentielle Einfluss von TOX3 auf Zellsterberate

Anhand von Fluoreszenzaufnahmen konnte bei NPCs mit Wachstumsfaktor eine geringe Sterberate (TSA = 10 ng/ml -10%, 50 ng/ml -17% und 100 ng/ml -30%) beobachtet werden, die möglicherweise für die geringe Umfangzunahme der überlebenden Zellen verantwortlich ist. Bei zusätzlichem Wachstumsfaktorentzug wurde ein vermehrtes Zellsterben (TSA = 10 ng/ml -28%, 50 ng/ml -33% und 100 ng/ml -44%) und eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie beobachtet. Obwohl TOX3 nach einem Tag Wachstumsfaktorentzug hochreguliert wird, konnte überraschenderweise kein vermehrter Zellschutz und damit eine verminderte Zellsterberate gemessen werden. In der Literatur ist beschrieben, dass TSA die Deacetylierung von Histonen und Transkriptionsfaktoren hemmt und damit die transkriptionelle Aktivität von Zielgenen beeinflusst (Das und Kundu, 2005). Ebenfalls scheint TSA das Zellwachstum in der G1- und G2-Phase zu inhibieren (Yoshida und Beppu, 1988). Möglicherweise lässt sich der zytotoxische Effekt darauf zurückführen, dass TOX3 in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor inhibiert wird, wodurch die nachgeschalteten anti-apoptischen Gene nicht hochregulieren werden können (Dittmer et al., 2011). Dies wiederum erhöht die Sensitivität der Zellen gegenüber zytotoxischen Reizen und es kommt zu einem

erhöhten Zellsterben. Vermutlich sind die Zellen zu Anfang der Differenzierungsphase besonders sensitiv.

6.5.4 TOX3-Reprimierung durch TSA zeigt Morphologieveränderung

Bei NPCs mit gleichzeitigem Wachstumsfaktorentzug und zusätzlicher TSA-Behandlung wurden die Fluoreszenzaufnahmen so gewählt, dass sie die morphologische Veränderung verdeutlichen. Anhand dieser Aufnahmen lässt sich zum einen erkennen, dass die Zellen abgerundeter vorliegen bzw. kurze gliäre Ausläufer aufweisen. Dies legt nahe, dass sich die Zellen in der Degenerierungsphase befinden, möglicherweise aber auch gliogene Zelltypen hervorbringen. Im Umkehrschluss könnte dies dafür sprechen, dass eine Wechselwirkung zwischen TOX3 und HDAC1 besteht, die einen positiven Einfluss auf Stammzellen bzw. proliferierende Zellen ausübt.

In immortalisierten N2a-Zellen konnte kein vermehrtes Zellsterben beobachtet werden. Jedoch wurde die zuvor gemessene Induktion auf den Nestin-Promoter durch überexprimiertes TOX3 in Abhängigkeit zur TSA-Konzentration stark reprimiert. In Folge einer zweistündigen Inkubationsdauer konnte der positive Effekt von TOX3 auf die Nestin-Promoteraktivität inhibiert werden, welches wiederum vermuten lässt, dass TSA eine potentielle Acetylierung des Transkriptionsfaktors verursacht, welches das Gleichgewicht von TOX3 negativ beeinträchtigt oder aber die Zellen befinden sich hierdurch im Wachstumsarrest (Marks et al., 2001).

6.5.5 Punktmutante von TOX3 ist instabil

Unter der Hypothese, dass TOX3 durch HDAC1 deacetyliert wird und durch die inhibierende Wirkung von TSA auf HDACs acetyliert wird und damit abgebaut wird, wurde eine TOX3-Mutante generiert. Durch bioinformatische Voraussagen der Acetylierungsstelle Lysin 29, erfolgte an dieser Stelle ein Einbau von Alanin. Die Mutante zeigte hierdurch eine starke Reprimierung, die durch aufsteigende TSA-Konzentration abnahm. Wiederum wurde bei der Überexpression von Wildtyp-TOX3 in neuronalen Zellen kein signifikanter Einfluss auf die Expression wahrgenommen. Möglicherweise ist die Konformation durch die Mutation beeinflusst bzw. führt zu einer Fehlfunktion und damit zu einer Degradation des Proteins. Diese Hypothese lässt sich, wie im Falle des nukleären Transkriptionsfaktors NFκB (*engl. nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) stützen, indem gezeigt worden ist,

dass TSA Proteasomen inhibiert und damit den Expressionsanstieg von NF κ B ermöglicht (Place et al., 2005).

Die widersprüchlichen Ergebnisse zwischen endogenem TOX3 in NPCs und überexprimierten TOX3 in N2a lassen keine genaue Aussage zu. Weitere Untersuchungen zum Acetylierungs- bzw. Deacetylierungsgleichgewicht, welcher durch die Interaktion von TOX3 und HDAC1 potenziell herbeigeführt ist, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

6.6 TOX3 verringert Proliferationsrate in Glioblastom-Linien

Zur Charakterisierung von Glioblastom-Subpopulationen wurden die Linien GS7, GS8 und GS9 verwendet. Diese wurden anhand einer genetischen Expressionsanalyse und den daraus resultierenden Ergebnissen in zwei Cluster eingeteilt. Die Linien GS8 und GS9 wurden dabei in das erste Cluster eingeteilt, welches durch die Expression von neuronalen Entwicklungsgenen auffiel, während die GS7-Linie hauptsächlich EZM-ähnliche Gene aufwies und somit ins zweite Cluster eingeteilt worden ist (Günther et al., 2008b). Interessanterweise wurde in den neurosphärenartigen Glioblastom-Linien GS8 und GS9 verstärkt TOX3 nachgewiesen. Diese beiden Linien wurden als invasive Tumore eingestuft, während die nicht TOX3-exprimierende adhärente GS7-Linie als nicht-invasiv eingestuft worden ist (Günther et al., 2008b). Die GS8- und GS9-Linie zeigten gleichermaßen schwimmende Aggregate, während der Kultivierung, wie die NPCs. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die Expression von TOX3 potentielle Stammzeleigenschaften mit sich bringt, wodurch der Sphärencharakter begünstigt wird. TOX3 fördert den Zellschutz (Dittmer et al., 2011) und könnte damit womöglich als Protoonkogen angesehen werden. Erstaunlicherweise konnte in einem Proliferationsassay gezeigt werden, dass die beiden GS-Linien GS8 und GS9 im Vergleich zur nicht TOX3-exprimierenden GS7-Linie die geringste Proliferationsrate aufwiesen. Möglicherweise könnte durch die Neurosphärenbildung ein verändertes Stoffwechselverhalten Ursache für die Diskrepanz sein. Der Vergleich zwischen der GS8- mit GS9-Linie wiederum zeigte, dass bei höherer TOX3-Expression geringere Proliferation bzw. Metabolierung gemessen werden konnte. Dies könnte für eine potentielle Inhibierung durch Mechanismen in die TOX3 involviert ist, sprechen. Dieser Effekt konnte durch stabile Herunterregulierung von TOX3 mittels shRNA nicht reprimiert werden. Gründe könnten sein, dass die Zellen durch die Virustransduktion und anschließende Puromycin-Behandlung verändert wurden. Dies spiegelte sich in den immunzytologischen Abbildungen wieder. Im Vergleich zum GS8-Wildtyp mit seiner abgerundeten Morphologie, zeigten die stabilen GS8-Linien vermehrt Ausläufer und eine

geringere Expression des Astrozytenmarkers GFAP. Ursache für diese Unterschiede könnte in der Heterogenität der Neurosphäre selbst zu sehen sein. Möglicherweise wurden gleiche Zellen unterschiedlich stark genetisch verändert (Beier et al., 2007). Zur Klärung, ob die stabilen Linien in ihrem invasiven Charakter durch Herunterregulierung von TOX3 beeinflusst wurden, müssten demnach Transplantationsversuche durchgeführt werden, die durch Bildung von Xenografttumoren weiteren Aufschluss über den invasiven Charakter geben könnten.

6.7 Stabile TOX3 Glioblastom-Linie zeigt reduzierte Neurosphärenbildung

In Folge der stabilen TOX3-Expression in der GS7-Linie wurde eine Veränderung des Proliferationsverhaltens und der Morphologie beobachtet. Die stabile YFP-TOX3 GS7-Linie zeigte im Gegensatz zur Wildtyp-Linie (WT-GS7) bzw. Kontroll-Linie (YFP-GS7) eine niedrigere Proliferationsrate und kleinere Neurosphären bzw. Aggregatsbildungen. Dies lässt vermuten, dass TOX3 nicht nur die Proliferationsrate, sondern auch Gene der EZM negativ beeinflusst, da diese Gene besonders in der GS7-Linie exprimiert vorkommen (Günther et al., 2008b). Hierbei scheint es, dass die als Bindekomponente anzusehende Substanz verändert vorliegt, so dass die Zellen in ihrer Aggregatsbildung eingeschränkt sind.

Die EZM ist eine sehr heterogene Substanz, die unter anderem aus Glykoproteinen, Kollagenen, Glykosaminoglykane und Proteoglykane besteht. Zu der größten Proteingruppe zählen dabei die Kollagene (Hulmes, 2002), folgend von der Gruppe der Elastine (Kielty et al., 2002) die ebenfalls zu den strukturellen Proteinen zählt. Die EZM dient dazu Zellen sowohl mechanisch als auch strukturell zu unterstützen und ist an der Migration beteiligt. Die in der EZM enthaltenen Komponenten, können unter anderem als Liganden durch ihre intrinsische Domäne fungieren, wie z.B. die epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Domänen von Laminin, Tenascin oder Thrombospondin die an den EGF-Rezeptor binden und so den Signalweg anschalten (Schenk et al., 2003). Durch veränderte Zusammensetzung der EZM können Signal- und Botenstoffe in ihrer Präsenz, Bindung und Sensibilisierung verändert werden (de Almeida Sassi et al., 2012), wodurch der neurogene Haushalt als auch der nicht-invasive Charakter verändert sein könnte. Ziel weiterer Untersuchungen sollte demnach sein, die stabilen GS-Linien (GS8 SH#1, GS8 SH#3, GS7 YFP-TOX3) anhand von Transplantationsversuchen und die dadurch potenziell entstandenen Xenografttumoren auf ihren invasiven Charakter zu klassifizieren. Weiter sollten Interaktionspartner und ihre Signalwege

identifiziert werden um eine pharmakologische Variabilität auf die Signalkaskade zu ermöglichen.

7. Zusammenfassung

TOX3 ist ein chromatin-assoziiierendes Protein mit einer hoch mobilen Gruppen (HMG)-Box Domäne, bestehend aus 576 Aminosäuren, welches stromabwärts in einer zytoprotektiven Signalkaskade vorkommt, die Zellen gegen diverse Arten von Zelltod-Stimuli schützt. Der neuronale Transkriptionsfaktor wird im Gehirn, besonders in der subventrikularen Zone exprimiert, wo sich Stammzellen befinden. Ziel dieser Doktorarbeit war die Charakterisierung von TOX3 in Stammzellen und die Analyse seines Einflusses auf die Stammzellhaftigkeit. Mit Hilfe des eigens für diese Arbeit generierten N-terminalen TOX3-Antikörpers konnte gezeigt werden, dass TOX3, zusammen mit weiteren stammzellspezifischen Markern wie Nestin und Musashi1, hauptsächlich in der ganglionischen Eminenz von E13.5 Mausembryonen und daraus isolierten neuronalen Progenitor Zellen (NPCs) exprimiert wird. Diese NPCs dienen als *in vitro* Stammzell-Modell-System, und können durch Wachstumsfaktorentzug in die Zelltypen Neuron, Astrozyt und Oligodendrozyt differenziert werden. TOX3 wurde hauptsächlich im Zellkern von undifferenzierten NPCs exprimiert, wobei nach einem Tag Wachstumsfaktorentzug eine deutliche Expressionssteigerung detektiert wurde, die mit der voranschreitenden Differenzierungsdauer wieder abnahm.

Da der Notch-Signalweg als Förderer des Stammzellerhalts gilt, wurde der Einfluss von Notch-Aktivität auf TOX3-Expression untersucht. Sowohl Aktivierung des Notch-Signalweges mithilfe des Notch Liganden-Jagged als auch Inhibition durch DAPT beeinflussten die TOX3-Expression auf mRNA-Ebene, nicht jedoch auf Proteinebene. Weiter ist bekannt, dass der Notch-Signalweg die Nestin-Expression fördert. Interessanterweise führte die Überexpression von TOX3 in der neuronalen Zelllinie N2a zu einer Förderung der Nestin-Promoteraktivität, die durch Zugabe des Liganden Jagged kooperativ verstärkt und durch den Inhibitor DAPT reprimiert wurde. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass TOX3 für den Erhalt der Stammzellhaftigkeit eine Rolle spielt.

Im Gegensatz zu Notch fördert das Zytokin TGF β die Differenzierung in Neurone. Durch Zugabe von TGF β , wurde die TOX3-Expression auf mRNA- und Proteinebene reprimiert, was ebenfalls eine potentielle Rolle von TOX3 im Stammzellerhalt vermuten lässt.

In einem Screen nach Interaktionspartnern von TOX3 wurde HDAC1 als möglicher Interaktionspartner identifiziert und eine endogene Interaktion zwischen HDAC1 und TOX3 konnte verifiziert werden. HDAC1 gehört zur Klasse I der Histondeacetylierungsproteine und bewirkt durch potentielle Deacetylierung von Zielgenen/Faktoren die Reprimierung der Transkription. Die Zugabe des HDAC-Inhibitors Trichostatin A (TSA) führte in einer

konzentrationsabhängigen Weise zu einer Reduktion von endogenem TOX3, zu einem geringen Zellsterben, sowie zu einer Reduktion der Nestin-Promoteraktivität in N2a-Zellen, möglicherweise verursacht durch seine zytotoxische bzw. wachstumsinhibierende Eigenschaft auf Zellen.

Des Weiteren wurde die Rolle von TOX3 auf die Tumorigenität von Krebs-Stammzellen untersucht. Hierfür wurden Glioblastom-stammzellähnliche Zelllinien auf ihre TOX3-Expression untersucht. Dabei konnte ein hohes Vorkommen in den invasiven Glioblastom-Zelllinien GS8 und GS9 detektiert werden, im Gegensatz zur nicht-invasiven GS7-Linie. Stabile TOX3-Expression in der GS7-Linie führte zu einer Reduktion der Proliferation bzw. der metabolischen Aktivität, vergleichbar zu den endogen TOX3-exprimierenden GS8 und GS9 Linien. Durch TOX3-Herunterregulierung in der GS8-Linie konnte dieser Effekt allerdings nicht aufgehoben werden. Der Einfluss von TOX3 in der nicht invasiven Glioblastom-Linie GS7 führte indessen zu einer reduzierten Neurosphären- bzw. Aggregatsbildung, was vermutlich durch veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix zustande kommt. Zusammenfassend konnten wichtige Einblicke in die Funktion von TOX3 in Zelltypen mit Stammzellcharakter gewonnen werden. In der frühen Embryogenese ist TOX3 am Erhalt von Stammzellen beteiligt, da es hauptsächlich in proliferierenden NPCs vorkommt, mit der Nestin-Expression korreliert und mit HDAC1 interagiert. In Glioblastom-Zelllinien kommt TOX3 in besonders invasiven, stammzellähnlichen Populationen vor, verringert hier die Metabolierungsrate und verändert die Neigung zur Sphärenbildung, was auf einen Einfluss von TOX3 auf die extrazelluläre Matrix schließen lässt.

8. Summary

TOX3 is a chromatin-associated protein with a high-mobility group (HMG)-box domain, consisting of 576 amino acids and is expressed downstream of a cytoprotective signaling cascade, which protects cells against different cell death stimuli. The neuronal transcription factor is expressed in the brain, especially in the subventricular zone where neural stem cells prevail. Aim of this doctoral thesis was the characterization of TOX3 in stem cells and the analysis of its potential influence on the stem-cell-ness.

With an n-terminal TOX3-antibody, generated exclusively for this thesis, TOX3 expression was observed, together with the stem-cell markers Nestin and Musashi1, predominantly in the ganglionic eminence of E13.5 mice embryos and in neural precursor cells (NPCs) isolated from there. These NPCs derived from the ganglionic eminence serve as *in vitro* stem-cell model system and can be differentiated into neurons, astrocytes and oligodendrocytes by growth factor deprivation. TOX3 was mainly expressed in the nucleus of undifferentiated NPCs, showed a significant increase in expression 24h after growth-factor deprivation and a subsequent decrease during further differentiation

Since the notch pathway promotes the maintenance of stem-cell-ness, I next investigated the impact of notch activity on TOX3 expression. Both, activation of notch signaling with the notch ligand jagged as well as inhibition with DAPT influenced TOX3-expression on mRNA, but not on protein level. Further it is known that the notch pathway enhances nestin expression. Interestingly, overexpression of TOX3 in the neuronal N2a cell line led to increased nestin promoter activity, which was cooperatively enhanced through treatment with the ligand jagged and repressed by treatment with the inhibitor DAPT. These results suggest that TOX3 is involved in the maintenance of the stem-cell-ness.

In contrast to notch the cytokine TGF β promotes the differentiation into neurons. By treatment with TGF β TOX3 expression was repressed on mRNA and protein level, which again argues for its role in the maintenance of the stem-cell-ness.

In a screen for interaction partners of TOX3 HDAC1 was identified and the interaction between endogenous HDAC1 and TOX3 could be verified. HDAC1 belongs to the class I of the histone-deacetylase proteins, which deacetylate target genes or factors to repress their transcription. Treatment with Trichostatin A (TSA), an inhibitor of HDACs class I and II, led to a reduction of endogenous TOX3 in a concentration-dependent manner, to a reduction of nestin-promoter activity in N2a cells and to slight cell death, probably caused by cytotoxic and growth inhibitory effects of TSA. In order to examine the role of TOX3 on tumorigenicity of cancer-stem cells,

stem-cell like glioblastoma cell lines were analyzed for their TOX3 expression. TOX3 was highly expressed in the invasive GS8 and GS9 cell lines, in contrast to the non-invasive GS7-line. Stable TOX3-expression in the GS7-line resulted in an inhibition of proliferation or reduced metabolic activity, similar to the endogenously TOX3 expressing GS8 and GS9 cell lines. TOX3 knock down in the GS8 cell line was not able to revert this effect. The influence of TOX3 in the non-invasive GS7 line led to a reduced formation of neurospheres or aggregates and inhibited proliferation, probably caused by an altered composition of the extracellular matrix.

In summary, I could win important insights into the function of TOX3 in different cell types with stem cell character. During early embryogenesis TOX3 is involved in the maintenance of stem-cell-ness, because it is predominantly expressed in proliferating NPCs, correlates with the expression of nestin and interacts with HDAC1. Whereas in stem-cell like glioblastoma cells TOX3 is strongly expressed in invasive populations, reduces the metabolic rate and changes the tendency of the cells to form spheres, what hints to a possible influence of TOX 3 on extracellular matrix composition.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALK	<i>activin receptor-like kinase</i>
BCA	Bicinchoninsäure
bFGF-2	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
bHLH	basischen Helix-Loop-Helix
BMPs	knochenbildende Proteine
Bp	Basenpaar
BP	basalen Progenitor-Zelle
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	Zirka
CAG	Cytosin-Adenin-Guanin
CaLu3	Brustkrebszelle
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CBP	CREB-binde Protein
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO	Chinesische Hamsterovarien
CRE	zyklisches AMP-Antwort-Element
CREB	<i>CREB-binding protein/p300-interacting transactivator with Asp/Glu-rich C-terminal domain</i>
CTB	Celltiterblue-Assay
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DAPT	Inhibitor der α -Sekretase
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Rinderserum
GDFs	Wachstums- und Differenzierungsfaktoren
GE	Ganglionische Eminenz
GFAP	gliäres fibrilläres azides Protein
GS	Glioblastom-stammzellähnliche Zelllinie
GST	Glutathion-S-Transferase
HDAC	Histondeacetylase
HEK-293GP	Humane embryonale Nierenzellen
HES	<i>hairy/enhancer split</i>
HMG	Hoch mobile Gruppe
HRP	Meerrettichperoxidase
(InCell-) Ko-IP	Koimmunpräzipitation (in der Zelle)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
<i>in situ</i>	in der Zelle
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas

<i>in vivo</i>	in der lebenden Zelle
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
KCl	Kalzium-Chlorid
kDa	Kilodalton
KP	kortikale Platte
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LGE	laterale ganglionische Eminenz
MAP-2	mikrotubulär-assoziierte Protein-2
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MCF7	Brustkrebszelle
MGE	mediale ganglionische Eminenz
MH1/MH2	<i>mad homology domains</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MZF1	Myeloid-Zinkfinger Protein
N	Neuron
N2a	Neuroblastom-Zelllinie
NFκB	Nuklearfaktor κB
NIZD	intrazelluläre Domäne von Notch
NLS	Kernlokalisierungssequenz
NPCs	neural progenitor cells
NROB1	nukleärer Rezeptor Subtyp 0, Gruppe1
N-Terminus	Amino-Terminus
OD _{600nm}	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	Offenes Leseraster
PARP1	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PAX6	paired-box gene 6
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3	Phosphat-Inositol-3
PIAS2	Protein-Inhibitor von aktiviertem STAT
PML	promyelozytische Leukämieprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Echtzeit-PCR
SB431542	Inhibitor von TGFβ
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shRNA	<i>small hairpin</i> Ribonukleinsäure
SMAD	<i>sma-mad-homology proteins</i>
SRE	Serum-Antwort-Element
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS gepufferte Salzlösung
TE Puffer	Tris-EDTA Puffer
TGFβ	transformierender Wachstumsfaktor beta
TOX3/TNRC9	Transkriptionsfaktor (<i>Trinucleotid repeat containing 9</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
TSC22D3	Glucocorticoid-induziertes Leuzin-Zipper Protein
Tween	Polyaethylenglycolsorbitanmonolaurat
UPL	Universal Probe Library
v/v	Volumen pro Volumen
WF	Wachstumsfaktoren
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranosid

9.2 Abbildungsverzeichnis

Bezeichnung	Thema	Seite
Abb. 1	Stammzellklassen die zur Nervenzellbildung beitragen	-3-
Abb. 2	Proliferation und Differenzierung von neuralen Progenitor-Zellen	-5-
Abb. 3	<i>In vitro</i> Kultivierung von neuralen Stammzellen	-6-
Abb. 4	Der Notch-Signalweg	-10-
Abb. 5	Wachstumsverhalten der Glioblastom-stammzellähnlichen Zelllinien unter Stammzellbedingungen	-15-
Abb. 6	Domänen von TOX3	-16-
Abb. 7	TOX3-Expression in der sich entwickelnden Maus aus Allen Brain Atlas	-19-
Abb. 8	Schematische Darstellung der LUMIER-Methode	-56-
Abb. 9	Nachweis des N-terminalen TOX3-Proteins über Coomassie-Blaufärbung und Validierung des Antikörpers über Immunoblot	-58-
Abb. 10	Quantitativer und immunologischer Nachweis der TOX3-Expression in sich entwickelnden Mäusen	-59-
Abb. 11	Immunhistologischer Nachweis von TOX3 in Embryomäusen (13.5) und Koexpression mit Stammzellmarkerproteinen	-60-
Abb. 12	TOX3-Expression in der Hirnregion des Tiermodells „ <i>Danio rerio</i> “	-61-
Abb. 13	TOX3-Expression wird hochreguliert durch Entzug der Wachstumsfaktoren	-63-
Abb. 14	TOX3-Expression nimmt im Laufe der Differenzierung ab	-64-
Abb. 15	Fluoreszenzzunahme von TOX3 durch Wachstumsfaktorentzug	-66-
Abb. 16	Inhibitor und Agonist des Notch-Signalweges beeinflussen die TOX3-Expression	-67-
Abb. 17	TOX3 beeinflusst die Nestin-Promoteraktivität und sein Effekt wird durch Jagged bzw. DAPT stark beeinflusst.	-68-
Abb. 18	TGF β reprimiert die TOX3-Expression	-70-
Abb. 19	Quantifizierung der TOX3-Expression in Abhängigkeit von shRNA	-72-
Abb. 20	Potentielle Interaktionspartner von TOX3 im LUMIER-Screen und deren Expression auf mRNA-Ebene im Gehirn von Embryos des Entwicklungsstadiums 13.5.	-73-
Abb. 21	Nachweis der Interaktion von TOX3 mit HDAC1 durch Immunpräzipitation <i>in vitro</i> und <i>in situ</i>	-75-
Abb. 22	Trichostatin A (TSA) reprimiert die TOX3-Expression	-77-
Abb. 23	TSA wirkt toxisch auf NPCs und inhibiert Effekt von überexprimiertem TOX3 auf den Nestin-Promoter	-79-
Abb. 24	Überexprimierte TOX3-Mutante wird durch TSA vermehrt exprimiert	-81-
Abb. 25	TOX3-Expression in GS8-Linie am stärksten	-82-
Abb. 26	TOX3 verringert Zellproliferation	-83-
Abb. 27	Keine signifikante Zellproliferationserhöhung durch TOX3-Herunterregulierung	-85-
Abb. 28	TOX3-Herunterregulation beeinflusst Zellzahl und Zellmorphologie	-87-
Abb. 29	TOX3 verändert Morphologie von Glioblastom-stammzellähnlichen Linien	-88-
Abb. 30	TOX3 hemmt Proliferation in Glioblastom-stammzellähnliche Zelllinie	-89-
Abb. 31	Potentielle Regulierungsmechanismen zwischen HDAC1 und TOX3	-98-

9.3 Tabellenverzeichnis

Bezeichnung	Thema	Seite
Tab. 1	Primärantikörper	-23-
Tab. 2	Pufferzusammensetzung	-26-
Tab. 3	Expressionsplasmide	-28-
Tab. 4	Reporter-Plasmide	-28-
Tab. 5	Primer für Klonierungen	-30-
Tab. 6	RT-PCR Primer und Probes	-30-
Tab. 7	Geräte	-32-
Tab. 8	Chemikalien für native Proteinaufreinigung	-48-
Tab. 9	Chemikalien für Immunhistochemie	-52-
Tab. 10	Chemikalien für Immunzytochemie	-53-
Tab. 11	Stimulationsagenzien	-53-
Tab. 12	Chemikalien für LUMIER-Screen	-55-

9.4 Literaturverzeichnis

Alexson TO, Hitoshi S, Coles BL, Bernstein A, van der Kooy D. **Notch signaling is required to maintain all neural stem cell populations--irrespective of spatial or temporal niche.** *Dev Neurosci.* 2006;28(1-2):34-48. PMID:16508302

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. **Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling.** *Nature.* 2000 Feb 3;403(6769):503-11. PMID: 10676951

Allen Developing Mouse Brain Atlas [Internet]. Website: ©2012 Allen Institute for Brain Science. Available from: <http://developingmouse.brain-map.org>.

Altman J, Das GD. **Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.** *J Comp Neurol.* 1965 Jun;124(3):319-35. PMID: 5861717

Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. **A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells.** *Nat Rev Neurosci.* 2001 Apr;2(4):287-93. PMID: 11283751

Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N. **Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system.** *Neuron.* 2004 Mar 25;41(6):881-90. PMID: 15046721

Anzano MA, Roberts AB, Smith JM, Sporn MB, De Larco JE. **Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type alpha and type beta transforming growth factors.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Oct;80(20):6264-8. PMID: 6604914

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. **Notch signaling: cell fate control and signal integration in development.** *Science.* 1999 Apr 30;284(5415):770-6. Review. PMID: 10221902

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. **Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response.** *Nature.* 2006 Dec 7;444(7120):756-60. Epub 2006 Oct 18. PMID:17051156

Barrios-Rodiles M, Brown KR, Ozdamar B, Bose R, Liu Z, Donovan RS, Shinjo F, Liu Y, Dembowy J, Taylor IW, Luga V, Przulj N, Robinson M, Suzuki H, Hayashizaki Y, Jurisica I, Wrana JL. **High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells.** *Science.* 2005 Mar 11;307(5715):1621-5. PMID: 15761153

Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP. **CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles.** *Cancer Res.* 2007 May 1;67(9):4010-5. PMID: 17483311

Bernard P, Couturier M. **Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes.** *J Mol Biol.* 1992 Aug 5;226(3):735-45. PMID:1324324

Blokzijl A, Dahlqvist C, Reissmann E, Falk A, Moliner A, Lendahl U, Ibáñez CF. **Cross-talk between the Notch and TGF-beta signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3.** *J Cell Biol.* 2003 Nov 24;163(4):723-8. PMID: 14638857

Boche D, Cunningham C, Docagne F, Scott H, Perry VH. **TGFbeta1 regulates the inflammatory response during chronic neurodegeneration.** *Neurobiol Dis.* 2006 Jun;22(3):638-50. Epub 2006 Feb 28. PMID: 16510291

Borghese L, Dolezalova D, Opitz T, Haupt S, Leinhaas A, Steinfarz B, Koch P, Edenhofer F, Hampl A, Brüstle O. **Inhibition of notch signaling in human embryonic stem cell-derived neural stem cells delays G1/S phase transition and accelerates neuronal differentiation in vitro and in vivo.** *Stem Cells.* 2010 May;28(5):955-64. doi: 10.1002/stem.408. PMID: 20235098

- Bottai D, Fiocco R, Gelain F, Defilippis L, Galli R, Gritti A, Vescovi LA. **Neural stem cells in the adult nervous system.** *J Hematother Stem Cell Res.* 2003 Dec;12(6):655-70. PMID: 14977475
- Böttner M, Kriegelstein K, Unsicker K. **The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions.** *J Neurochem.* 2000 Dec;75(6):2227-40. PMID: 11080174
- Braun P, Tasan M, Dreze M, Barrios-Rodiles M, Lemmens I, Yu H, Sahalie JM, Murray RR, Roncari L, de Smet AS, Venkatesan K, Rual JF, Vandenhoute J, Cusick ME, Pawson T, Hill DE, Tavernier J, Wrana JL, Roth FP, Vidal M. **An experimentally derived confidence score for binary protein-protein interactions.** *Nat Methods.* 2009 Jan;6(1):91-7. doi: 10.1038/nmeth.1281. Epub 2008 Dec 7. PMID: 19060903
- Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. **Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription.** *Nature.* 1998 Feb 5;391(6667):597-601. PMID: 9468139
- Brionne TC, Tesseur I, Masliah E, Wyss-Coray T. **Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain.** *Neuron.* 2003 Dec 18;40(6):1133-45. PMID: 14687548
- Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israël A. **A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE.** *Mol Cell.* 2000 Feb;5(2):207-16. PMID: 10882063
- Bustin M. **Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins.** *Mol Cell Biol.* 1999 Aug;19(8):5237-46. PMID: 10409715
- Callahan JF, Burgess JL, Fornwald JA, Gaster LM, Harling JD, Harrington FP, Heer J, Kwon C, Lehr R, Mathur A, Olson BA, Weinstock J, Laping NJ. **Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type 1 receptor (ALK5).** *J Med Chem.* 2002 Feb 28;45(5):999-1001. PMID: 11855979
- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. **Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells.** *Cancer Res.* 2006 Oct 1;66(19):9339-44. Epub 2006 Sep 21. PMID: 16990346
- Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U. **Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system.** *Brain Res Dev Brain Res.* 1995 Jan 14;84(1):109-29. PMID: 7720210
- Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U. **Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments.** *J Cell Sci.* 1992 Oct;103 (Pt 2):589-97. PMID: 1478958
- Dancker P, Löw I, Hasselbach W, Wieland T. **Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin.** *Biochim Biophys Acta.* 1975 Aug 19;400(2):407-14. PMID:126084
- Das C, Kundu TK. **Transcriptional regulation by the acetylation of nonhistone proteins in humans -- a new target for therapeutics.** *IUBMB Life.* 2005 Mar;57(3):137-49. PMID: 16036576
- de Almeida Sassi F, Lunardi Brunetto A, Schwartzmann G, Roesler R, Abujamra AL. **Glioma revisited: from neurogenesis and cancer stem cells to the epigenetic regulation of the niche.** *J Oncol.* 2012;2012:537861. doi: 10.1155/2012/537861. Epub 2012 Jul 8. PMID: 22973309
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. **Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family.** *Biochem J.* 2003 Mar 15;370(Pt 3):737-49. PMID: 12429021
- Derynck R. **TGF-beta-receptor-mediated signaling.** *Trends Biochem Sci.* 1994 Dec;19(12):548-53. Review. PMID: 7846768
- Delaunay D, Heydon K, Cumano A, Schwab MH, Thomas JL, Suter U, Nave KA, Zalc B, Spassky N. **Early neuronal and glial fate restriction of embryonic neural stem cells.** *J Neurosci.* 2008 Mar 5;28(10):2551-62. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5497-07.2008. PMID: 18322099
- Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P. **Transforming growth factor beta signal transduction.** *J Leukoc Biol.* 2002 May;71(5):731-40. PMID: 11994497

- Dinareello CA. **Biologic basis for interleukin-1 in disease.** *Blood*. 1996 Mar 15;87(6):2095-147. PMID: 8630372
- Dittmer S, Kovacs Z, Yuan SH, Siszler G, Kögl M, Summer H, Geerts A, Golz S, Shioda T, Methner A. **TOX3 is a neuronal survival factor that induces transcription depending on the presence of CITED1 or phosphorylated CREB in the transcriptionally active complex.** *J Cell Sci*. 2011 Jan 15;124(Pt 2):252-60. doi: 10.1242/jcs.068759. Epub 2010 Dec 15. PMID: 21172805
- Dittmer S, Sahin M, Pantlen A, Saxena A, Toutzaris D, Pina AL, Geerts A, Golz S, Methner A. **The constitutively active orphan G-protein-coupled receptor GPR39 protects from cell death by increasing secretion of pigment epithelium-derived growth factor.** *J Biol Chem*. 2008 Mar 14;283(11):7074-81. doi: 10.1074/jbc.M704323200. Epub 2008 Jan 7. PMID: 18180304
- Dobolyi A, Vincze C, Pál G, Lovas G. **The neuroprotective functions of transforming growth factor Beta proteins.** *Int J Mol Sci*. 2012;13(7):8219-58. doi: 10.3390/ijms13078219. Epub 2012 Jul 3. PMID: 22942700
- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. **Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain.** *Cell*. 1999 Jun 11;97(6):703-16. PMID: 10380923
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. **Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain.** *J Neurosci*. 1997 Jul 1;17(13):5046-61. PMID: 9185542
- Dragunow M, Faull R. **The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing.** *J Neurosci Methods*. 1989 Sep;29(3):261-5. PMID: 2507830
- Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, Struwing JP, Morrison J, Field H et al. **Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci.** *Nature*. 2007 Jun 28;447(7148):1087-93. PMID: 17529967
- Enevoldson TP, Sanders MD, Harding AE. **Autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy. A clinical and genetic study of eight families.** *Brain*. 1994 Jun;117 (Pt 3):445-60. PMID: 8032856
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. **Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000).** *Neurochem Res*. 2000 Oct;25(9-10):1439-51. PMID: 11059815
- Enya K, Hayashi H, Takii T, Ohoka N, Kanata S, Okamoto T, Onozaki K. **The interaction with Sp1 and reduction in the activity of histone deacetylase 1 are critical for the constitutive gene expression of IL-1 alpha in human melanoma cells.** *J Leukoc Biol*. 2008 Jan;83(1):190-9. Epub 2007 Sep 28. PMID: 17906119
- Ernst C, Christie BR. **The putative neural stem cell marker, nestin, is expressed in heterogeneous cell types in the adult rat neocortex.** *Neuroscience*. 2006;138(1):183-8. Epub 2005 Dec 15. PMID: 16343784
- Falk S, Wurdak H, Ittner LM, Ille F, Sumara G, Schmid MT, Draganova K, Lang KS, Paratore C, Leveen P, Suter U, Karlsson S, Born W, Ricci R, Götz M, Sommer L. **Brain area-specific effect of TGF-beta signaling on Wnt-dependent neural stem cell expansion.** *Cell Stem Cell*. 2008 May 8;2(5):472-83. doi: 10.1016/j.stem.2008.03.006. PMID: 18462697
- Fanale D, Amodeo V, Corsini LR, Rizzo S, Bazan V, Russo A. **Breast cancer genome-wide association studies: there is strength in numbers.** *Oncogene*. 2012 Apr 26;31(17):2121-8. doi: 10.1038/onc.2011.408. Epub 2011 Sep 26. PMID: 21996731
- Farkas LM, Dünker N, Roussa E, Unsicker K, Kriegelstein K. **Transforming growth factor-beta(s) are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo.** *J Neurosci*. 2003 Jun 15;23(12):5178-86. PMID: 12832542
- Flanders KC, Lüdecke G, Engels S, Cissel DS, Roberts AB, Kondaiah P, Lafyatis R, Sporn MB, Unsicker K. **Localization and actions of transforming growth factor-beta s in the embryonic nervous system. Development.** 1991 Sep;113(1):183-91. PMID: 1764993

Florek M, Haase M, Marzesco AM, Freund D, Ehninger G, Huttner WB, Corbeil D. **Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer.** Cell Tissue Res. 2005 Jan;319(1):15-26. Epub 2004 Nov 19. PMID: 15558321

Fortini ME. **Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges.** Curr Opin Cell Biol. 2001 Oct;13(5):627-34. PMID: 11544033

Fraser MJ, Ciszczon T, Elick T, Bauser C. **Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera.** Insect Mol Biol. 1996 May;5(2):141-51. PMID: 8673264

Frederiksen K, McKay RD. **Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo.** J Neurosci. 1988 Apr;8(4):1144-51. PMID: 3357014

Freund A, Chauveau C, Brouillet JP, Lucas A, Lacroix M, Licznar A, Vignon F, Lazennec G. **IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells.** Oncogene. 2003 Jan 16;22(2):256-65. PMID: 12527894

Gage FH. **Mammalian neural stem cells.** Science. 2000 Feb 25;287(5457):1433-8. PMID: 10688783

Gaiano N, Nye JS, Fishell G. **Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain.** Neuron. 2000 May;26(2):395-404. PMID: 10839358

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. **Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma.** Cancer Res. 2004 Oct 1;64(19):7011-21. PMID: 15466194

Gao F, Kwon SW, Zhao Y, Jin Y. **PARP1 poly(ADP-ribosyl)ates Sox2 to control Sox2 protein levels and FGF4 expression during embryonic stem cell differentiation.** J Biol Chem. 2009 Aug 14;284(33):22263-73. doi: 10.1074/jbc.M109.033118. Epub 2009 Jun 16. PMID: 19531481

Good P, Yoda A, Sakakibara S, Yamamoto A, Imai T, Sawa H, Ikeuchi T, Tsuji S, Satoh H, Okano H. **The human Musashi homolog 1 (MSH1) gene encoding the homologue of Musashi/Nrp-1, a neural RNA-binding protein putatively expressed in CNS stem cells and neural progenitor cells.** Genomics. 1998 Sep 15;52(3):382-4. PMID: 9790759

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. **Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.** J Gen Virol. 1977 Jul;36(1):59-74. PMID: 886304

Günther H, Kaiser P, Taupitz J. **Embryonenschutzgesetz. Kommentar zum Embryonenschutzgesetz.** Kohlhammer Verlag, 2008a.

Günther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Modrusan Z, Meissner H, Westphal M, Lamszus K. **Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria.** Oncogene. 2008b May 1;27(20):2897-909. Epub 2007 Nov 26. PMID: 18037961

Hall PA, Watt FM. **Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity.** Development. 1989 Aug;106(4):619-33. PMID: 2562658

Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI. **Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Dec 9;100(25):15178-83. Epub 2003 Nov 26. PMID: 14645703

Herrmann H, Aebi U. **Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics.** Curr Opin Cell Biol. 2000 Feb;12(1):79-90. PMID: 10679360

Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, Conlon RA, Mak TW, Bernstein A, van der Kooy D. **Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells.** Genes Dev. 2002 Apr 1;16(7):846-58. PMID: 11937492

- Hockfield S, McKay RD. **Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system.** *J Neurosci.* 1985 Dec;5(12):3310-28. PMID: 4078630
- Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH. **Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord.** *J Neurosci.* 2000 Mar 15;20(6):2218-28. PMID: 10704497
- Hughes RE. **Polyglutamine disease: acetyltransferases awry.** *Curr Biol.* 2002 Feb 19;12(4):R141-3. PMID: 11864588
- Huijts PE, Vreeswijk MP, Kroeze-Jansema KH, Jacobi CE, Seynaeve C, Krol-Warmerdam EM et al. **Clinical correlates of low-risk variants in FGFR2, TNRC9, MAP3K1, LSP1 and 8q24 in a Dutch cohort of incident breast cancer cases.** *Breast Cancer Res.* 2007;9(6):R78. PMID: 17997823
- Hulmes DJ. **Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures.** *J Struct Biol.* 2002 Jan-Feb;137(1-2):2-10. PMID: 12064927
- Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. **Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro.** *Glia.* 2002 Sep;39(3):193-206. PMID: 12203386
- Jee YK, Gilmour J, Kelly A, Bowen H, Richards D, Soh C, Smith P, Hawrylowicz C, Cousins D, Lee T, Lavender P. **Repression of interleukin-5 transcription by the glucocorticoid receptor targets GATA3 signaling and involves histone deacetylase recruitment.** *J Biol Chem.* 2005 Jun 17;280(24):23243-50. Epub 2005 Apr 11. PMID: 15826950
- Jin Z, Liu L, Bian W, Chen Y, Xu G, Cheng L, Jing N. **Different transcription factors regulate nestin gene expression during P19 cell neural differentiation and central nervous system development.** *J Biol Chem.* 2009 Mar 20;284(12):8160-73. doi: 10.1074/jbc.M805632200. Epub 2009 Jan 15. PMID: 19147497
- Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T. **The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis.** *Development.* 2007 Apr;134(7):1243-51. Epub 2007 Feb 28. PMID: 17329370
- Kageyama R, Ohtsuka T, Shimojo H, Imayoshi I. **Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells.** *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Dec;21(6):733-40. doi: 10.1016/j.ceb.2009.08.009. Epub 2009 Sep 23. PMID:19783418
- Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, Suzuki A, Nakamura Y, Sawamoto K, Ogawa Y, Toyama Y, Miyata T, Okano H. **Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells.** *Dev Neurosci.* 2000;22(1-2):139-53. PMID: 10657706
- Kania G, Corbeil D, Fuchs J, Tarasov KV, Blyszczuk P, Huttner WB, Boheler KR, Wobus AM. **Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors.** *Stem Cells.* 2005 Jun-Jul;23(6):791-804. PMID: 15917475
- Kanungo J, Zheng YL, Amin ND, Pant HC. **The Notch signaling inhibitor DAPT down-regulates cdk5 activity and modulates the distribution of neuronal cytoskeletal proteins.** *J Neurochem.* 2008 Sep;106(5):2236-48. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05551.x. Epub 2008 Jul 4. PMID: 18662245
- Katsuno M, Adachi H, Doyu M, Minamiyama M, Sang C, Kobayashi Y, Inukai A, Sobue G. **Leuprorelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy.** *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):768-73. Epub 2003 May 18. PMID: 12754502
- Kettlun C, Galvan DL, George AL Jr, Kaja A, Wilson MH. **Manipulating piggyBac transposon chromosomal integration site selection in human cells.** *Mol Ther.* 2011 Sep;19(9):1636-44. doi: 10.1038/mt.2011.129. Epub 2011 Jul 5. PMID: 21730970
- Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. **Elastic fibres.** *J Cell Sci.* 2002 Jul 15;115(Pt 14):2817-28. PMID: 12082143

- Kim HJ, Leeds P, Chuang DM. **The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain.** *J Neurochem.* 2009 Aug;110(4):1226-40. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06212.x. Epub 2009 Jun 15. PMID: 19549282
- Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. **The new WHO classification of brain tumours.** *Brain Pathol.* 1993 Jul;3(3):255-68 PMID: 8293185
- Kolios G, Moodley Y. **Introduction to stem cells and regenerative medicine.** *Respiration.* 2013;85(1):3-10. doi: 10.1159/000345615. Epub 2012 Dec 13. PMID: 23257690
- Krämer OH, Knauer SK, Greiner G, Jandt E, Reichardt S, Gührs KH, Stauber RH, Böhmer FD, Heinzel T. **A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling.** *Genes Dev.* 2009 Jan 15;23(2):223-35. doi: 10.1101/gad.479209. PMID: 19171783
- Kriegstein K, Unsicker K. **Transforming growth factor-beta promotes survival of midbrain dopaminergic neurons and protects them against N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity.** *Neuroscience.* 1994 Dec;63(4):1189-96. PMID: 7700516
- Kriegstein AR, Noctor SC. **Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex.** *Trends Neurosci.* 2004 Jul;27(7):392-9. PMID: 15219738
- Lan SY, Yu T, Xia ZS, Yuan YH, Shi L, Lin Y, Huang KH, Chen QK. **Musashi 1-positive cells derived from mouse embryonic stem cells can differentiate into neural and intestinal epithelial-like cells in vivo.** *Cell Biol Int.* 2010 Dec;34(12):1171-80. doi: 10.1042/CBI20100108. PMID: 20670215
- Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, Butter S, Bomberger J, Tweed C, Martin W, Fornwald J, Lehr R, Harling J, Gaster L, Callahan JF, Olson BA. **Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542.** *Mol Pharmacol.* 2002 Jul;62(1):58-64. PMID: 12065755
- Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA. **Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 5;97(25):13883-8. PMID: 11095732
- Lee DY, Lee CI, Lin TE, Lim SH, Zhou J, Tseng YC, Chien S, Chiu JJ. **Role of histone deacetylases in transcription factor regulation and cell cycle modulation in endothelial cells in response to disturbed flow.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Feb 7;109(6):1967-72. doi: 10.1073/pnas.1121214109. Epub 2012 Jan 23. PMID: 22308472
- Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA. **Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines.** *Cancer Cell.* 2006 May;9(5):391-403. PMID: 16697959
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. **CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein.** *Cell.* 1990 Feb 23;60(4):585-95. PMID: 1689217
- Leuchowius KJ, Jarvius M, Wickström M, Rickardson L, Landegren U, Larsson R, Söderberg O, Fryknäs M, Jarvius J. **High content screening for inhibitors of protein interactions and post-translational modifications in primary cells by proximity ligation.** *Mol Cell Proteomics.* 2010 Jan;9(1):178-83. doi: 10.1074/mcp.M900331-MCP200. Epub 2009 Oct 27. PMID: 19864249
- Li W, Rich T, Watson CJ. **PML: a tumor suppressor that regulates cell fate in mammary gland.** *Cell Cycle.* 2009 Sep 1;8(17):2711-7. Epub 2009 Sep 8. PMID: 19652541
- Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. **Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma.** *Mol Cancer.* 2006 Dec 2;5:67. PMID: 17140455

Lobo MV, Alonso FJ, Redondo C, López-Toledano MA, Caso E, Herranz AS, Paíno CL, Reimers D, Bazán E. **Cellular characterization of epidermal growth factor-expanded free-floating neurospheres.** *J Histochem Cytochem.* 2003 Jan;51(1):89-103. PMID: 12502758

Mabie PC, Mehler MF, Kessler JA. **Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype.** *J Neurosci.* 1999 Aug 15;19(16):7077-88. PMID: 10436062

Maekawa M, Takashima N, Arai Y, Nomura T, Inokuchi K, Yuasa S, Osumi N. **Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis.** *Genes Cells.* 2005 Oct;10(10):1001-14. PMID: 16164600

Malatesta P, Hartfuss E, Götz M. **Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage.** *Development.* 2000 Dec;127(24):5253-63. PMID: 11076748

Margolis RL, Abraham MR, Gatchell SB, Li SH, Kidwai AS, Breschel TS, Stine OC, Callahan C, McInnis MG, Ross CA. **cDNAs with long CAG trinucleotide repeats from human brain.** *Hum Genet.* 1997 Jul;100(1):114-22. PMID: 9225980

Marks PA, Richon VM, Breslow R, Rifkind RA. **Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs.** *Curr Opin Oncol.* 2001 Nov;13(6):477-83. PMID: 11673688

Massagué J, Andres J, Attisano L, Cheifetz S, López-Casillas F, Ohtsuki M, Wrana JL. **TGF-beta receptors.** *Mol Reprod Dev.* 1992 Jun;32(2):99-104. PMID: 1322148

Massagué J, Weis-Garcia F. **Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals.** *Cancer Surv.* 1996;27:41-64. PMID: 8909794

Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, Seigneurin-Berny D, Osada H, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Horinouchi S, Yoshida M. **In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation.** *EMBO J.* 2002 Dec 16;21(24):6820-31. PMID: 12486003

McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. **Control of muscle development by dueling HATs and HDACs.** *Curr Opin Genet Dev.* 2001 Oct;11(5):497-504. PMID: 11532390

Mérot Y, Rétaux S, Heng JI. **Molecular mechanisms of projection neuron production and maturation in the developing cerebral cortex.** *Semin Cell Dev Biol.* 2009 Aug;20(6):726-34. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.04.003. Epub 2009 Apr 10. PMID: 19442543

Michalczyk K, Ziman M. **Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation.** *Histol Histopathol.* 2005 Apr;20(2):665-71. PMID: 15736068

Miller MW. **Expression of transforming growth factor-beta in developing rat cerebral cortex: effects of prenatal exposure to ethanol.** *J Comp Neurol.* 2003 Jun 2;460(3):410-24. PMID: 12692858

Montgomery RL, Hsieh J, Barbosa AC, Richardson JA, Olson EN. **Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 May 12;106(19):7876-81. doi: 10.1073/pnas.0902750106. Epub 2009 Apr 20. PMID: 19380719

Moon LD, Fawcett JW. **Reduction in CNS scar formation without concomitant increase in axon regeneration following treatment of adult rat brain with a combination of antibodies to TGFbeta1 and beta2.** *Eur J Neurosci.* 2001 Nov;14(10):1667-77. PMID: 11860461

Morshead CM, Craig CG, van der Kooy D. **In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain.** *Development.* 1998 Jun;125(12):2251-61. PMID: 9584124

Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D. **Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells.** *Neuron.* 1994 Nov;13(5):1071-82. PMID: 7946346

Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R. **A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1.** Mol Cell. 2000 Feb;5(2):197-206. PMID: 10882062

Nakamura M, Okano H, Blendy JA, Montell C. **Musashi, a neural RNA-binding protein required for Drosophila adult external sensory organ development.** Neuron. 1994 Jul;13(1):67-81. PMID: 8043282

Namiki J, Tator CH. **Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury.** J Neuropathol Exp Neurol. 1999 May;58(5):489-98. PMID: 10331437

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. **Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex.** Nature. 2001 Feb 8;409(6821):714-20. PMID: 11217860

Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. **Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases.** Nat Neurosci. 2004 Feb;7(2):136-44. Epub 2004 Jan 4. PMID: 14703572

Nusinzon I, Horvath CM. **Positive and negative regulation of the innate antiviral response and beta interferon gene expression by deacetylation.** Mol Cell Biol. 2006 Apr;26(8):3106-13. PMID: 16581785

O'Flaherty E, Kaye J. **TOX defines a conserved subfamily of HMG-box proteins.** BMC Genomics. 2003 Apr 2;4(1):13. Epub 2003 Apr 2. PMID: 12697058

Ohgaki H, Kleihues P. **Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma.** Am J Pathol. 2007 May;170(5):1445-53. PMID: 17456751

Ohishi K, Varnum-Finney B, Flowers D, Anasetti C, Myerson D, Bernstein ID. **Monocytes express high amounts of Notch and undergo cytokine specific apoptosis following interaction with the Notch ligand, Delta-1.** Blood. 2000 May 1;95(9):2847-54. PMID: 10779430

Okano H. **Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application.** Keio J Med. 2002 Sep;51(3):115-28. PMID: 12371642

Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. **The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells.** Mol Cell Neurosci. 1997;8(6):389-404. PMID: 9143557

Park D, Xiang AP, Mao FF, Zhang L, Di CG, Liu XM, Shao Y, Ma BF, Lee JH, Ha KS, Walton N, Lahn BT. **Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells.** Stem Cells. 2010 Dec;28(12):2162-71. doi: 10.1002/stem.541. PMID: 20963821

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. **Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis.** Cancer Cell. 2006 Mar;9(3):157-73. PMID: 16530701

Pincus DW, Keyoung HM, Harrison-Restelli C, Goodman RR, Fraser RA, Edgar M, Sakakibara S, Okano H, Nedergaard M, Goldman SA. **Fibroblast growth factor-2/brain-derived neurotrophic factor-associated maturation of new neurons generated from adult human subependymal cells.** Ann Neurol. 1998 May;43(5):576-85. PMID: 9585351

Place RF, Noonan EJ, Giardina C. **HDAC inhibition prevents NF-kappa B activation by suppressing proteasome activity: down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I kappa B alpha.** Biochem Pharmacol. 2005 Aug 1;70(3):394-406. PMID: 15950952

Qiu Z, Ghosh A. **A brief history of neuronal gene expression: regulatory mechanisms and cellular consequences.** Neuron. 2008 Nov 6;60(3):449-55. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.039. PMID: 18995819

Regad T, Bellodi C, Nicotera P, Salomoni P. **The tumor suppressor Pml regulates cell fate in the developing neocortex.** Nat Neurosci. 2009 Feb;12(2):132-40. doi: 10.1038/nn.2251. Epub 2009 Jan 11. PMID: 19136970

Reynolds BA, Rietze RL. **Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship.** *Nat Methods.* 2005 May;2(5):333-6. PMID: 15846359

Reynolds BA, Weiss S. **Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system.** *Science.* 1992 Mar 27;255(5052):1707-10. PMID: 1553558

Rieske P, Azizi SA, Augelli B, Gaughan J, Krynska B. **A population of human brain parenchymal cells express markers of glial, neuronal and early neural cells and differentiate into cells of neuronal and glial lineages.** *Eur J Neurosci.* 2007 Jan;25(1):31-7. PMID: 17241264

Riley BE, Orr HT. **Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle.** *Genes Dev.* 2006 Aug 15;20(16):2183-92. PMID: 16912271

Ross CA, Poirier MA. **Protein aggregation and neurodegenerative disease.** *Nat Med.* 2004 Jul;10 Suppl:S10-7. PMID: 15272267

Roussa E, Farkas LM, Krieglstein K. **TGF-beta promotes survival on mesencephalic dopaminergic neurons in cooperation with Shh and FGF-8.** *Neurobiol Dis.* 2004 Jul;16(2):300-10. PMID: 15193287

Roussa E, Wiehle M, Dünker N, Becker-Katins S, Oehlke O, Krieglstein K. **Transforming growth factor beta is required for differentiation of mouse mesencephalic progenitors into dopaminergic neurons in vitro and in vivo: ectopic induction in dorsal mesencephalon.** *Stem Cells.* 2006 Sep;24(9):2120-9. Epub 2006 Jun 1. PMID: 16741229

Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, Yasutomi D, Nagata T, Kurihara Y, Uesugi S, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Okano H. **Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell.** *Dev Biol.* 1996 Jun 15;176(2):230-42. PMID: 8660864

Sakurai K, Osumi N. **The neurogenesis-controlling factor, Pax6, inhibits proliferation and promotes maturation in murine astrocytes.** *J Neurosci.* 2008 Apr 30;28(18):4604-12. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5074-07.2008. PMID: 18448636

Salem HK, Thiemermann C. **Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status.** *Stem Cells.* 2010 Mar 31;28(3):585-96. doi: 10.1002/stem.269. PMID:19967788

Sánchez C, Díaz-Nido J, Avila J. **Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function.** *Prog Neurobiol.* 2000 Jun;61(2):133-68. PMID: 10704996

Schenk S, Hintermann E, Bilban M, Koshikawa N, Hojilla C, Khokha R, Quaranta V. **Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution.** *J Cell Biol.* 2003 Apr 14;161(1):197-209. PMID: 12695504

Schmeck B, Lorenz J, N'guessan PD, Opitz B, van Laak V, Zahlten J, Slevogt H, Witzernath M, Flieger A, Suttorp N, Hippenstiel S. **Histone acetylation and flagellin are essential for Legionella pneumophila-induced cytokine expression.** *J Immunol.* 2008 Jul 15;181(2):940-7. PMID: 18606645

Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massagué J. **Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation.** *Cell.* 2004 Apr 16;117(2):211-23. PMID: 15084259

Shakèd M, Weissmüller K, Svoboda H, Hortschansky P, Nishino N, Wölfl S, Tucker KL. **Histone Deacetylases Control Neurogenesis in Embryonic Brain by Inhibition of BMP2/4 Signaling.** *PLoS One.* 2008 Jul 16;3(7):e2668. doi: 10.1371/journal.pone.0002668. PMID: 18628975

Shi Y, Massagué J. **Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.** *Cell.* 2003 Jun 13;113(6):685-700. PMID: 12809600

Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massagué J, Pavletich NP. **Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling.** *Cell.* 1998 Sep 4;94(5):585-94. PMID: 9741623

Shih AH, Holland EC. **Notch signaling enhances nestin expression in gliomas.** *Neoplasia*. 2006 Dec;8(12):1072-82. PMID: 17217625

Siddall NA, McLaughlin EA, Marriner NL, Hime GR. **The RNA-binding protein Musashi is required intrinsically to maintain stem cell identity.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 30;103(22):8402-7. Epub 2006 May 22. PMID: 16717192

Siegenthaler JA, Miller MW. **Ethanol disrupts cell cycle regulation in developing rat cortex interaction with transforming growth factor beta1.** *J Neurochem*. 2005 Nov;95(3):902-12. Epub 2005 Sep 29. PMID: 16190877

Simonsson M, Heldin CH, Ericsson J, Grönroos E. **The balance between acetylation and deacetylation controls Smad7 stability.** *J Biol Chem*. 2005 Jun 10;280(23):21797-803. Epub 2005 Apr 13. PMID: 15831498

Söderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstråle K, Leuchowius KJ, Jarvius J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson LG, Landegren U. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods*. 2006 Dec;3(12):995-1000. Epub 2006 Oct 29. PMID: 17072308

Sommer I, Schachner M. **Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system.** *Dev Biol*. 1981 Apr 30;83(2):311-27. PMID: 6786942

Stacey SN, Manolescu A, Sulem P, Rafnar T, Gudmundsson J, Gudjonsson SA, Masson G et al. **Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer.** *Nat Genet*. 2007 Jul;39(7):865-9. Epub 2007 May 27. PMID: 17529974

Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL, Thompson LM. **Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in Drosophila.** *Nature*. 2001 Oct 18;413(6857):739-43. PMID: 11607033

Stipursky J, Gomes FC. **TGF-beta1/SMAD signaling induces astrocyte fate commitment in vitro: implications for radial glia development.** *Glia*. 2007 Aug 1;55(10):1023-33. PMID: 17549683

Stros M, Launholt D, Grasser KD. **The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins.** *Cell Mol Life Sci*. 2007 Oct;64(19-20):2590-606. PMID: 17599239

Sun G, Yu RT, Evans RM, Shi Y. **Orphan nuclear receptor TLX recruits histone deacetylases to repress transcription and regulate neural stem cell proliferation.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 25;104(39):15282-7. Epub 2007 Sep 14. PMID: 17873065

Takamori Y, Mori T, Wakabayashi T, Nagasaka Y, Matsuzaki T, Yamada H. **Nestin-positive microglia in adult rat cerebral cortex.** *Brain Res*. 2009 May 13;1270:10-8. doi: 10.1016/j.brainres.2009.03.014. Epub 2009 Mar 21. PMID: 19306852

Tan X, Wang S, Zhu L, Wu C, Yin B, Zhao J, Yuan J, Qiang B, Peng X. **cAMP response element-binding protein promotes gliomagenesis by modulating the expression of oncogenic microRNA-23a.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Sep 25;109(39):15805-10. Epub 2012 Sep 10. PMID: 23019365

Tanese N, Tjian R. **Coactivators and TAFs: a new class of eukaryotic transcription factors that connect activators to the basal machinery.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1993;58:179-85. PMID: 7956028

Tessema M, Yingling CM, Grimes MJ, Thomas CL, Liu Y, Leng S, Joste N, Belinsky SA. **Differential epigenetic regulation of TOX subfamily high mobility group box genes in lung and breast cancers.** *PLoS One*. 2012;7(4):e34850. doi: 10.1371/journal.pone.0034850. Epub 2012 Apr 4. PMID: 22496870

Thomas JO, Travers AA. **HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins.** *Trends Biochem Sci*. 2001 Mar;26(3):167-74. PMID: 11246022

Travers AA. **Priming the nucleosome: a role for HMGB proteins?** *EMBO Rep*. 2003 Feb;4(2):131-6. PMID: 12612600

Ulfig N., **Kurzlehrbuch Embryologie**. Thieme Verlag, Stuttgart 2005, ISBN 3-13-139581-8.

Valapour M, Guo J, Schroeder JT, Keen J, Cianferoni A, Casolaro V, Georas SN. **Histone deacetylation inhibits IL4 gene expression in T cells**. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Feb;109(2):238-45. PMID: 11842291

Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. **Brain tumour stem cells**. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jun;6(6):425-36. PMID: 16723989

Vogel T, Ahrens S, Büttner N, Krieglstein K. **Transforming growth factor beta promotes neuronal cell fate of mouse cortical and hippocampal progenitors in vitro and in vivo: identification of Nedd9 as an essential signaling component**. *Cereb Cortex*. 2010 Mar;20(3):661-71. doi: 10.1093/cercor/bhp134. Epub 2009 Jul 8. PMID: 19587023

Wang MK, Sun HQ, Xiang YC, Jiang F, Su YP, Zou ZM. **Different roles of TGF- β in the multi-lineage differentiation of stem cells**. *World J Stem Cells*. 2012 May 26;4(5):28-34. PMID: 22993659

Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA. **Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis**. *J Neurosci*. 1996 Dec 1;16(23):7599-609. PMID: 8922416

Weissman IL. **Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution**. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):157-68. PMID: 10647940

Westermann S, Weber K. **Post-translational modifications regulate microtubule function**. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Dec;4(12):938-47. PMID: 14685172

Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM. **Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells?** *Cell Mol Life Sci*. 2004 Oct;61(19-20):2510-22. PMID: 15526158

Wilkinson B, Chen JY, Han P, Rufner KM, Goularte OD, Kaye J. **TOX: an HMG box protein implicated in the regulation of thymocyte selection**. *Nat Immunol*. 2002 Mar;3(3):272-80. Epub 2002 Feb 19. PMID: 11850626

Xu M, Nie L, Kim SH, Sun XH. **STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta**. *EMBO J*. 2003 Feb 17;22(4):893-904. PMID: 12574125

Yahata T, Shao W, Endoh H, Hur J, Coser KR, Sun H, Ueda Y, Kato S, Isselbacher KJ, Brown M, Shioda T. **Selective coactivation of estrogen-dependent transcription by CITED1 CBP/p300-binding protein**. *Genes Dev*. 2001 Oct 1;15(19):2598-612. PMID: 11581164

Yang J, Cheng L, Yan Y, Bian W, Tomooka Y, Shiurba R, Jing N. **Mouse nestin cDNA cloning and protein expression in the cytoskeleton of transfected cells**. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Sep 21;1520(3):251-4. PMID: 11566362

Yeo SY, Chitnis AB. **Jagged-mediated Notch signaling maintains proliferating neural progenitors and regulates cell diversity in the ventral spinal cord**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 3;104(14):5913-8. Epub 2007 Mar 26. PMID: 17389390

Yoda A, Sawa H, Okano H. **MSI-1, a neural RNA-binding protein, is involved in male mating behaviour in *Caenorhabditis elegans***. *Genes Cells*. 2000 Nov;5(11):885-895. PMID: 11122376

Yoshida M, Beppu T. **Reversible arrest of proliferation of rat 3Y1 fibroblasts in both the G1 and G2 phases by trichostatin A**. *Exp Cell Res*. 1988 Jul;177(1):122-31. PMID: 3134246

Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. **Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A**. *J Biol Chem*. 1990 Oct 5;265(28):17174-9. PMID: 2211619

Yuan SH, Qiu Z, Ghosh A. **TOX3 regulates calcium-dependent transcription in neurons**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 24;106(8):2909-14. doi: 10.1073/pnas.0805555106. Epub 2009 Feb 5. PMID: 19196971

9.5 Lebenslauf

Zsuzsa Kaiser geb. Kovács	geboren am 10.10.1984 in Dresden
Aug. 1991- Jun. 2001	Grundschule Friedrich – von Bodelschwingh, Neuss Städtische Realschule Südstadt, Neuss Fachoberschulreife
Sept. 2001 – Sept. 2004	Städtisches Lessing-Gymnasium und Berufskolleg, Düsseldorf Dualer Abschluss: Abitur mit Schwerpunkt Biologie & Chemie und staatlich geprüfte Biologisch-technische Assistentin (BTA)
Okt. 2004 – Mär. 2009	Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf Abschluss: Diplom-Biologin mit Schwerpunkt Molekularbiologie Diplomarbeit in der Abteilung Neurologie, Universitätsklinik Düsseldorf Titel: „Rolle der Proteine PKIB2 und NECAB2 in der GPR39-vermittelten Signaltransduktionskaskade“
Jun. 2009 – Jul. 2013	Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf Doktorarbeit in der Abteilung Neurologie, Universitätsklinik Düsseldorf Titel: „Die Rolle des Homeobox-Transkriptionsfaktors TOX3 in neuronalen Progenitor-Zellen und Stammzellen“

Publikationen

S. Dittmer, **Z. Kovacs**, S. H. Yuan, G. Siszler, M. Kögl, H. Summer, A. Geerts, S. Golz, T. Shioda and A. Methner (2011) TOX3 is a neuronal survival factor that induces transcription depending on the presence of CITED1 or phosphorylated CREB in the transcriptionally active complex. *Journal of Cell Science* 124, 252-260

P. Albrecht, I. Bouchachia, C. Zimmermann, H. Hofstetter, **Z. Kovacs**, N. Henke, D. Lisak, A. Issberner, J. Lewerenz, P. Maher, H.P. Hartung, and A. Methner (2012) Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation. *Journal of Neuroinflammation* 9:163

9.6 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Axel Methner für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seinem Labor anzufertigen, für seine stete Diskussionsbereitschaft und die vielseitigen Ideen.

Bei Herrn Prof. Dr. Hermann Aberle bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats als stellvertretendes Mitglied der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Manfred Kögl vom DKFZ in Heidelberg für den LUMIER-Screen, bei Frau Dr. Sabine Metzger vom BMFZ in Düsseldorf für die Protein-Analyse, bei Herrn Dr. Michael Davids (Davids Biotechnologie GmbH) für die Generierung des Antikörpers und bei Frau Dr. Kathrin Lamszus am UKE aus Hamburg für die Bereitstellung der GS-Linien.

Bei Frau Dr. Catherina G. Becker und PhD Zhen Zhong vom Zentrum für Neuroregeneration in Edinburgh möchte ich mich herzlich bedanken für die Analyse von TOX3 in Zebrafischen und die Möglichkeit einen persönlichen Einblick im Umgang mit Zebrafischen zu bekommen. Vielen Dank!

Mein Dank gilt weiter Frau Dr. Nadine Henke, die mich durch ihre konstruktive Anregung und stete Gesprächsbereitschaft in meiner wissenschaftlichen Arbeit unterstützt hat.

Neben Frau Dr. Sonja Dittmer möchte ich mich auch bei Frau Dr. Jennifer Wellen bedanken. Mein Dank an euch Beide für die gute Einarbeitung und Hilfsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen hat.

Bei unserer technischen Assistentin Andrea Issberner möchte ich mich für die Unterstützung in der Organisation des Labors und ihrer steten Hilfsbereitschaft bedanken.

Bei Annika Pfeiffer, Dmitrij Lisak, Dr. Janine Walter, Lars Schneider, Dr. Rebecca Noack und Teresa Schacht bedanke ich mich für deren Unterstützung, den praktischen Tipps, Hilfen und vielen lustigen Gesprächen, die mir die endlosen Stunden im Labor erleichtert haben. Teresa, danke für deine Spritzigkeit, gute Laune die du verbreitest und privaten Ratschläge. Lars, danke

für deine unerschöpfliche Kreativität. Dima, danke für deine Geduld und Rat bei der statistischen Auswertung. Janine, Rebecca und Annika, danke für eure Unterstützung im Labor.

Danke an unsere tollen Hiwis, Astrid, Caroline und Sven für eure Hilfe.

Danke auch an meine Tanzsport-Kollegen des Unitanz-Gesellschaftstanzkreises HHU, die mich so manche Sorgen vergessen lassen haben.

Besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, insbesondere meinen Eltern, die mich uneingeschränkt unterstützt haben. Meiner Schwester Sabrina danke ich für ihre Spontanität, ihren unerschöpflichen (Weisheits-) Sprüchen und Aufmunterungen.

Mein größter Dank jedoch gilt meinem Ehemann Michael, der mich durch die Höhen und Tiefen meiner Doktorarbeit begleitet hat und durch seine aufbauenden Worte und Liebe eine große Stütze für mich war. Ich danke Dir vom tiefsten Herzen!

9.7 Erklärung

Eidesstattliche Versicherung:

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 Düsseldorf“ erstellt worden ist.

-Zsuzsa Kaiser-

Düsseldorf, 27.05.2013