

Zac1 kontrolliert die astrogliale Differenzierung durch Socs3

Dissertation

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität

München

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften:

Dr. rerum naturalium

vorgelegt von

Udo Schmidt-Edelkraut

München, 12.04.2012

Erstgutachter: Prof. Dr. Rainer Landgraf

Zweitgutachter: Prof. Dr. Elisabeth Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2012

Für Romy
und
meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	
1.1	Genomische Prägung	1
1.1.1	Elterliche Konflikthypothese	2
1.2	<i>Zac1 (Zinc finger protein regulator of Apoptosis and cell Cycle arrest)</i>	3
1.2.1	Mütterliche Prägung von <i>Zac1/ZAC1</i>	3
1.2.2	Proteinstruktur und Funktion	4
1.2.3	Expression	6
1.3	Neurogenese	8
1.3.1	Bedeutung des Jak/Stat3-Signalweges	10
1.3.2	Regulation des Stat3-Signalweges	12
1.4	<i>Socs3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3)</i>	13
1.5	Zielstellung	15
2	MATERIALIEN und METHODEN	
2.1	Materialien	
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	16
2.1.2	Chemikalien	17
2.1.3	Antikörper	18
2.1.4	Enzyme	19
2.1.5	Plasmide	20
2.1.6	Primer	21
2.1.7	Puffer und Reagenzien	22
2.1.8	Zelllinien und Gewebe	23
2.1.9	Sonstiges	25
2.2	Methoden	
2.2.1	Zellkultur	26
2.2.1.1	Tetrazyklin-regulierte <i>Zac1</i> -Expression in C17.2 Zellen	26
2.2.1.2	Stabile Expressionsklone in O4ANS Zellen	27
2.2.1.3	Primärzellen	28
2.2.1.4	Zelldifferenzierung	29

Inhaltsverzeichnis

2.2.2	Socs3-Promotorplasmid	29
2.2.2.1	Plasmidpräparation	30
2.2.3	Transfektion	31
2.2.4	Reporter-Assay	31
2.2.5	RNA-Extraktion und quantitative RT-PCR	31
2.2.6	Protein-Extraktion und Proteinbestimmung nach Bradford	32
2.2.7	Immunoblot	33
2.2.8	Immunofluoreszenzfärbung	34
2.2.9	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	34
3	ERGEBNISSE	
3.1	Induzierbare <i>Zac1</i> -Genexpression in C17.2 Zellen	36
3.1.1	Expression von <i>Socs3</i> nach <i>Zac1</i> -Induktion	37
3.2	Potentielle <i>Zac1</i> -Bindungsstellen im <i>Socs3</i> -Promotor der Maus	38
3.2.1	<i>Zac1</i> -Transaktivierung des <i>Socs3</i> -Promotors	38
3.2.2	Überexpression von <i>Zac1</i>	40
3.2.3	<i>Zac1</i> -Bindung am murinen <i>Socs3</i> -Promotor (ChIP-Assay)	42
3.3	ZAC1 reguliert humanes <i>SOCS3</i> in SK-N-MC Zellen	44
3.4	Differenzierung von Stammzellen als biologisches Modell	47
3.4.1	Charakterisierung der Stammzelllinien NS-5 und O4ANS	47
3.4.2	Embryonale neurale Stammzelllinie NS-5	50
3.4.2.1	Expressionsanalyse während der Differenzierung	50
3.4.2.2	ChIP-Assays in NS-5 Zellen	51
3.4.2.3	Immunozytochemische Färbung in NS-5 Zellen	52
3.4.3	Adulte neurale Stammzelllinie O4ANS	57
3.4.3.1	Expressionsanalyse während der Differenzierung	57
3.4.3.2	ChIP-Assays in O4ANS Zellen	58
3.4.3.3	Immunozytochemische Färbung in O4ANS Zellen	59
3.4.3.4	Transiente Transfektion von <i>Zac1</i> -GFP während der Differenzierung	64
3.4.3.5	Stabile <i>Zac1</i> -Überexpression und <i>Zac1</i> shRNA	65
3.5	Neuronale Primärkultur der Maus (E18)	69

Inhaltsverzeichnis

4	DISKUSSION	74
5	ZUSAMMENFASSUNG	79
	SUMMARY	80
6	LITERATUR	81
7	Abkürzungsverzeichnis	89
8	Danksagung	91
9	Curriculum Vitae	92

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.1	Zac1-Proteinstruktur und DNA-Bindung	5
Abb.2	Embryonale Neurogenese	9
Abb.3	Jak/Stat3-Signalweg während der Neurogenese	11
Abb.4	Regulation des Jak/Stat3-Signalweges	13
Abb.5	Socs-Proteinfamilie und Socs3-Regulation des Jak/Stat3-Signalweges	14
Abb.6	Tetrazyklin-induzierbare Zac1-Expression in C17.2 Zellen	26
Abb.7	Induzierbare Zac1-Expression in der murinen NSC-Zelllinie C17.2	36
Abb.8	Zeitliche Expressionsanalyse des Zac1-induzierbaren C17.2 Zellklones	37
Abb.9	Immunoblot der Tetrazyklin (Tc)-induzierten Expression von Zac1 und Socs3	37
Abb.10	Muriner Socs3-Promotor mit potentiellen Zac1-Bindungsstellen	38
Abb.11	Reporter-Assays mit Socs3-Promotorplasmid in C17.2 Zellen	39
Abb.12	Zac1-Transaktivierung ist notwendig für Regulation des Socs3-Gens	40
Abb.13	Regulation der Stat3-Phosphorylierung (Tyr-705) nach Zac1-Überexpression	41
Abb.14	ChIP von endogenen Zac1 in C17.2 Zellen	42
Abb.15	ChIP nach Überexpression von Zac1 in C17.2 Zellen	43
Abb.16	Deletionsanalyse von Socs3-Promotorplasmiden in C17.2 Zellen	44
Abb.17	Überexpression von ZAC1 in SK-N-MC Zellen	45
Abb.18	Reporter-Assays mit humanen SOCS3-Promotorplasmid in SK-N-MC Zellen	45
Abb.19	Humaner SOCS3-Promotor mit potentiellen ZAC1-Bindungsstellen	46
Abb.20	ChIP von endogenen und transfizierten ZAC1 in SK-N-MC Zellen	46
Abb.21	Durchlichtmikroskopie von differenzierten NSC-Zelllinien NS-5 und O4ANS	48
Abb.22	Charakterisierung der differenzierten NSC-Zelllinien NS-5 und O4ANS	49
Abb.23	Reporter-Assays mit murinen Socs3-Promotor in NS-5 und O4ANS Zellen	49
Abb.24	Expressionsanalyse von Zac1 und Socs3 während der neuronalen und astroglialen Differenzierung der NSC-Zelllinie NS-5	50
Abb.25	Immunoblot von Zac1 und Socs3 während der neuronalen und astroglialen Differenzierung der NSC-Zelllinie NS-5	51
Abb.26	ChIP von Zac1 in neuronal und astroglial differenzierten NS-5 Zellen	51
Abb.27	Immunofluoreszenzfärbung glialer Marker in differenzierten NS-5 Zellen	52
Abb.28	Immunofluoreszenz von Zac1 und Socs3 während astroglialer Differenzierung	53
Abb.29	Quantifizierung der Immunofluoreszenz während astroglialer Differenzierung	54
Abb.30	Immunofluoreszenz von Zac1 und Socs3 mit astroglialen Markern in NS-5 Zellen	55
Abb.31	Expressionsanalyse der astroglialen Marker der differenzierten NSC-Zelllinie NS-5	56
Abb.32	Expression von Zac1 und Socs3 in der differenzierten adulten NSC-Zelllinie O4ANS	57

Inhaltsverzeichnis

Abb.33	Immunoblots der neuronal und astroglial differenzierten O4ANS Zellen	58
Abb.34	ChIP von Zac1 in neuronalen und astroglialen differenzierten O4ANS Zellen	58
Abb.35	Immunofluoreszenz von astroglial differenzierter adulten NSC-Zelllinie O4ANS	59
Abb.36	Immunofluoreszenz von Zac1 und Socs3 während astroglialer Differenzierung der O4ANS Zellen	60
Abb.37	Quantifizierung der Immunofluoreszenz während astroglialer Differenzierung von O4ANS Zellen	61
Abb.38	Immunofluoreszenz von Zac1 und Socs3 mit astroglialen Markern in differenzierten O4ANS Zellen	62
Abb.39	Expression der astroglialen Marker von differenzierter NSC-Zelllinie O4ANS	63
Abb.40	Transiente Transfektion von Zac1-GFP während der astroglialen Differenzierung von O4ANS Zellen	64
Abb.41	Quantifizierung der Kolo-kalisation von GFP-positiven Zellen mit dem glialen Marker GFAP am Tag 2 der astroglialen Differenzierung	64
Abb.42	Stabile Überexpression und Knock-down von Zac1 in O4ANS Zellen	65
Abb.43	Expressionsanalyse stabiler Zac1 und shRNA Überexpression während der glialen Differenzierung	66
Abb.44	Immunofluoreszenzfärbung astroglialer Marker in differenzierten O4ANS Zellklonen	66
Abb.45	Immunofluoreszenz des Proliferationsmarkers Ki-67 während der glialen Differenzierung von O4ANS	67
Abb.46	Quantifizierung der Proliferation anhand Immunofluoreszenzfärbung des Antikörpers Ki-67	68
Abb.47	Expressionsanalyse während der astroglialen Differenzierung am Tag 4 mit FCS, CNTF oder BMP-4	68
Abb.48	Immunofluoreszenz von CNTF oder BMP-4 induzierter astroglialer Differenzierung in O4ANS Zellen	69
Abb.49	Charakterisierung von Primärzellen des embryonalen Gehirns (E18) während der Differenzierung	70
Abb.50	Reporter-Assays mit murinen Socs3-Promotorplasmid in neuronalen embryonalen Primärzellen	70
Abb.51	Expressionsanalyse von Zac1 und Socs3 während der neuronalen und astroglialen Differenzierung in Primärzellen	71
Abb.52	Immunoblot von Zac1 und Socs3 während der neuronalen und astroglialen Differenzierung in Primärzellen	71
Abb.53	ChIP von Zac1 in neuronalen und astroglialen differenzierten Primärzellen	72
Abb.54	Re-ChIP von Zac1 mit aktivierenden und reprimierenden Histonmarkern in Primärzellen	72
Abb.55	Immunofluoreszenz von Zac1 und Socs3 mit astroglialen Markern in differenzierten Primärzellen	73
Abb.56	Model der Zac1-induzierten Socs3-Regulation des Jak/Stat3-Signalweges während der Gliogenese	78
Tab.1	Primäre Antikörper	18
Tab.2	Sekundäre Antikörper	19
Tab.3	Immunchemikalien	19
Tab.4	Enzyme	19
Tab.5	Plasmide	20
Tab.6	Sequenzen der murinen pLKO.1-Zac1-shRNA-Plasmide	20
Tab.7	Sequenzen der verwendeten Primer	21
Tab.8	Primer für Chromatin-Immunopräzipitation	21
Tab.9	Primer für Klonierung des 0,7 kb Socs3-Promotors	21
Tab.10	Zellkulturbedingungen der murinen NSC-Zelllinie C17.2	23
Tab.11	Zellkulturbedingungen der murinen NSC-Zelllinien NS-5 und O4ANS	24
Tab.12	Primärzellkulturbedingungen	25
Tab.13	Reaktionsansatz für qRT-PCR	32
Tab.14	Zusammensetzung der Trenngele und des Sammelgels für SDS-PAGE	33

1 Einleitung

1.1 Genomische Prägung

Geprägte Gene sind durch Stilllegung eines Alleles infolge von DNA-Methylierung gekennzeichnet (Barlow, 2011; Monk, 1987). Dieses epigenetische Phänomen der monoallelischen Genexpression wird als genomische Prägung (engl.: *genomic imprinting*) bezeichnet. Nach der jeweiligen elterlichen Herkunft der Prägung wird in mütterlich oder väterlich geprägte Gene unterschieden. Das *Zac1*-Gen ist mütterlich geprägt, d.h. nur das väterliche Allel wird exprimiert (Piras et al., 2000). Elternspezifische Prägung trifft auf weniger als 1 % aller Gene des Genoms zu (Luedi et al., 2005; Wang et al., 2008). Die geprägten Gene besitzen eine fundamentale Bedeutung für die Entwicklung des Embryos und der Plazenta, sind darüber hinaus wichtig für die Gehirnentwicklung, die Kognition und das Verhalten und spielen zudem für die Prozesse des Glukose- und Fettstoffwechsels eine tragende Rolle (Davies et al., 2005; Ivanova und Kelsey, 2011; Varrault et al., 2006; Wilkinson et al., 2007). Evolutionäre Theorien legen eine antagonistische Rolle der geprägten Gene zugrunde. Erste Hinweise dazu wurden mit dem experimentellen Nachweis der fehlenden Gleichwertigkeit mütterlicher und väterlicher Genome von Solter und Surani erbracht (Barton et al., 1984; McGrath und Solter, 1984). Die Transplantation von zwei mütterlichen Vorkernen in eine befruchtete Eizelle führte zur Bildung einer unterentwickelten Plazenta und dementsprechend zum Tod des Embryos. Im Gegensatz dazu zeigte der nukleäre Transfer von zwei väterlichen Vorkernen eine reduzierte Entwicklung des Embryos aufgrund eines Überwuchses der Plazenta. Mit dieser eleganten Kerntransferstudie konnte erstmals die Notwendigkeit der elterlichen Asymmetrie für die normale Entwicklung der Plazenta und des Embryos veranschaulicht werden. Jedoch verhinderte der frühe Tod des jeweiligen Embryos, den unterschiedlichen Beitrag elterlicher Genome auf die weitere Entwicklung, einschließlich des Gehirns zu untersuchen. Dieses Hindernis konnte durch Erzeugung von chimären Mäusen überwunden werden (Allen et al., 1995). Hierzu wurden markierte partho- oder androgenetische Embryos mit normalen Embryos verschmolzen. Histologische Analysen konnten anschließend die Strukturierung und räumliche Beschränkung der markierten Zellen mit isoparentalen Genomen während der frühen Entwicklung des Gehirns

aufzeigen. Die weiblichen, parthenogenetischen Zellen wanderten vorzugsweise in den Hippokampus, Striatum und frontalen Kortex ein und verursachten eine Vergrößerung des Gehirns. Im Gegensatz dazu akkumulierten die männlichen, androgenetischen Zellen bevorzugt im Hypothalamus. Diese beiden Beispiele zeigen, dass mütterliche und väterliche Genome nicht gleichwertig sind, sondern abhängig von ihrer Herkunft geprägt sind. Die besondere Bedeutung der genomischen Prägung während der embryonalen Entwicklung führte zu Hypothesen über die zugrunde liegenden Ursachen.

1.1.1 Elterliche Konflikthypothese

Um die evolutionäre Grundlage der genomischen Prägung nur weniger bestimmter Gene zu verstehen, wurde die Hypothese des elterlichen Konflikts in der Kontrolle des embryonalen Wachstums aufgestellt (Hitchins und Moore, 2002; Moore und Haig, 1991). Diese Hypothese besagt, dass die Ausrichtung des väterlichen Genoms auf das Wachstum seiner Nachkommen abzielt, während das Genom der Mutter auf die Erhaltung ihrer eigenen Ressourcen zielt. Allgemein haben geprägte Gene eine entscheidende Bedeutung beim Wachstum, dem Verhalten und der Regulierung von Stoffwechsel-Funktionen (Cattanach und Kirk, 1985; Frontera et al., 2008). So zeigt sich am Beispiel für die pränatale Kommunikation zwischen dem Embryo und der Plazenta der Mutter, dass der vom väterlichen Genom exprimierte Insulin-Wachstumsfaktor IGF2 eine unterstützende Funktion für die Nährstoffzufuhr aus der Plazenta besitzt, während das mütterliche exprimierte Gen des IGF2-Rezeptors dazu antagonistisch wirkt (Constancia et al., 2004). Auch in der postnatalen Entwicklung spielen geprägte Gene eine wichtige Rolle für die Kommunikation über die Nährstoffzufuhr zwischen Mutter und Kind. So wird das mütterliche Pflegeverhalten durch Stillen des Säuglings vom väterlich exprimierten Gen *Peg3* gesteuert (Murphy et al., 2001; Li et al., 1999). In Versuchen mit Mäusen führte der Knock-out des geprägten Gens *Zac1* zu einer intrauterinen Wachstumsbeschränkung der Embryonen, die mit Veränderungen im Knochenaufbau und erhöhter neonatalen Sterblichkeit einherging. Eine anschließende Metaanalyse von über 100 Mikroarray-Datensätzen der Maus identifizierte *Zac1* als Knotenpunkt eines Imprinting-Gen-Netzwerkes (IGN) von koregulierten geprägten Genen, die bei der Entwicklung der Plazenta und der Kontrolle des fetalen Wachstums eine Rolle spielen (Varrault et al., 2006).

1.2 Zac1 (Zinc finger protein regulator of Apoptosis and cell Cycle arrest)

Zac1 ist ein nukleäres Zinkfingerprotein und wurde erstmals als Apoptose und Zellzyklusarrest fördernder Faktor in endokrinen Zellen und dem Gehirn der Maus beschrieben (Spengler et al., 1997). Die Identifizierung von Zac1 erfolgte bei der Suche nach Bindungspartnern von Adenylylzyklase gekoppelten Rezeptoren (HOFFMANN et al., 1998; Spengler et al., 1993). Zeitgleich wurde Zac1 von zwei weiteren Arbeitsgruppen identifiziert. Bei der Analyse von differentiell exprimierten Genen maligner Tumore der Eierstöcke konnte *Lot1 (Lost in transformation)* als orthologes Gen der Ratte isoliert werden (Abdollahi et al., 1997). Die Suche nach Proteinen mit Homologien zu *Plag1 (Pleiomorphic adenoma gene 1)* führte zur Isolierung von *Plagl1* und zur Entdeckung der *Plag*-Familie von Zinkfingerproteinen (Kas et al., 1998). Diese umfasst neben Zac1 (*Lot1*, *Plagl1*) die Proteine *Plag1* und *Plagl2*. Während Zac1 als Tumorsuppressor gilt, werden den anderen beiden Proteinen der *Plag*-Familie onkogene Eigenschaften zugeschrieben (Abdollahi, 2007). Die Eigenschaft von Zac1 als potentieller Tumorsuppressor wurde durch die Analyse von Tumoren des Menschen bekräftigt, die gehäuft eine Deletion der chromosomalen Region des humanen *ZAC1*-Gens aufwiesen (Varrault et al., 1998).

1.2.1 Mütterliche Prägung von Zac1/ZAC1

Im Menschen ist das *ZAC1*-Gen auf dem Chromosomenabschnitt 6q24 lokalisiert. Es wird monoallelisch vom väterlichen Allel exprimiert, während das mütterliche Allel durch DNA-Methylierung stillgelegt ist (Piras et al., 2000). Das *ZAC1*-Gen umfasst rund 125 kb DNA und unterteilt sich in 9 Exone, wobei die letzten beiden Exone die proteinkodierende Sequenz enthalten. In der Maus ist das *Zac1*-Gen auf Chromosom 10 lokalisiert und weist bis auf ein zusätzliches Exon eine ansonsten zum Menschen konservierte genomische Organisation auf (Smith et al., 2002). Die elternspezifische epigenetische Regulierung der Transkription von *Zac1* wird durch eine differentiell methylierte Region von CpG-Inseln (DMR = *differentially methylated CpG island region*) in Exon 1 kontrolliert. Darüber hinaus wurde in humanen Leukozyten (PBL = *periphäre blood leucocytes*) eine gewebsspezifische biallelische Expression

von ZAC1 nachgewiesen, welche durch einen Promotor 55 kb oberhalb der DMR gesteuert wird (Valleley et al., 2007).

Ein Verlust des geprägten Status des ZAC1-Gens ist vermutlich die Ursache des transienten neonatalen Diabetes Mellitus vom Typ 1 (TNDM; *OMIM 601410*) (Temple und Shield, 2010). TNDM ist assoziiert mit einer vorübergehenden Insulininsuffizienz und einem erhöhten Risiko Typ 2 Diabetes (T2D) im Jugendalter zu entwickeln. Als Ursache wird eine biallelische Expression von ZAC1 infolge der Aufhebung des geprägten Methylierungsmusters der DMR, die Verdoppelung der Gen-Dosis durch eine paternale Isodisomie des Chromosoms 6 oder eine paternale Duplikation der Region 6q24 angesehen.

1.2.2 Proteinstruktur und Funktion

Zac1 ist ein multifunktionaler Regulator der Transkription. Das Zac1-Protein enthält sieben aminoterminalen C_2H_2 -Zinkfinger. Die Proteinfamilie der C_2H_2 -Zinkfingerproteine ist durch ein 30 Aminosäuren (AS) umfassendes Motiv gekennzeichnet, das eine fingerförmige Struktur um ein von Cystein (C) und Histidin (H) gebundenes Zink-Ion ausbildet. Das Zac1-Protein der Maus besteht aus 667 AS (Spengler et al., 1997). Die sieben aminoterminalen Zinkfinger motive (ZF) bilden die DNA-Bindungsdomäne (DBD) (**Abb. 1**). Daran schließt sich die Transaktivierungsdomäne (TAD) bestehend aus der Linker (L) und der prolinreichen Region (PR) an. Der C-terminale Anteil (C) ist reich an Glutamin- und Glutaminsäureresten. Das humane ZAC1-Protein weist zur Maus einen hohen Konservierungsgrad auf (Varrault et al., 1998). Im Menschen ist das ZAC1-Protein um die prolinreiche Region verkürzt und umfasst 463 AS. Die DNA-bindenden Motive von Zac1 wurden mit der Konsensussequenz GC-reicher Palindrome $[G_4C_4]$ und G-reicher direkter oder umgekehrter Wiederholungen $[G_4N_6G_4]$ oder $(G_4N_6G_4)_2$ identifiziert (Hoffmann et al., 2003). Die Bindung von Zac1 an die DNA erfolgt durch seine Zinkfinger. Abhängig von der DNA-Sequenz kann Zac1 sowohl als Transaktivator als auch Repressor fungieren. Für die Transaktivierung GC-reicher Palindrome $[G_4C_4]$ sind die ZF 6 und ZF 7 notwendig. An der Bindung von G-reichen Motiven $[G_4N_6G_4]$ oder $(G_4N_6G_4)_2$ sind zudem ZF 1-5 beteiligt. Die Funktion von Zac1 als Repressor oder Transaktivator G-reicher Motive ist dabei abhängig von der Bindung als Monomer oder Dimer, wobei eine Dimerisierung des Zac1-Proteins über ZF 2 erfolgt (Hoffmann et al., 2003). Darüber hinaus wurde für ZF 6 und ZF 7 auch eine Stimulation der intrinsischen

Histonacetyltransferase (HAT) des transkriptionellen Koaktivators p300/CBP nachgewiesen (Hoffmann et al., 2006). Durch die Regulation der enzymatischen Aktivität des Koaktivators kann Zac1 Chromatinmodifizierungen vermitteln und damit die Transkription seiner Zielgene erleichtern.

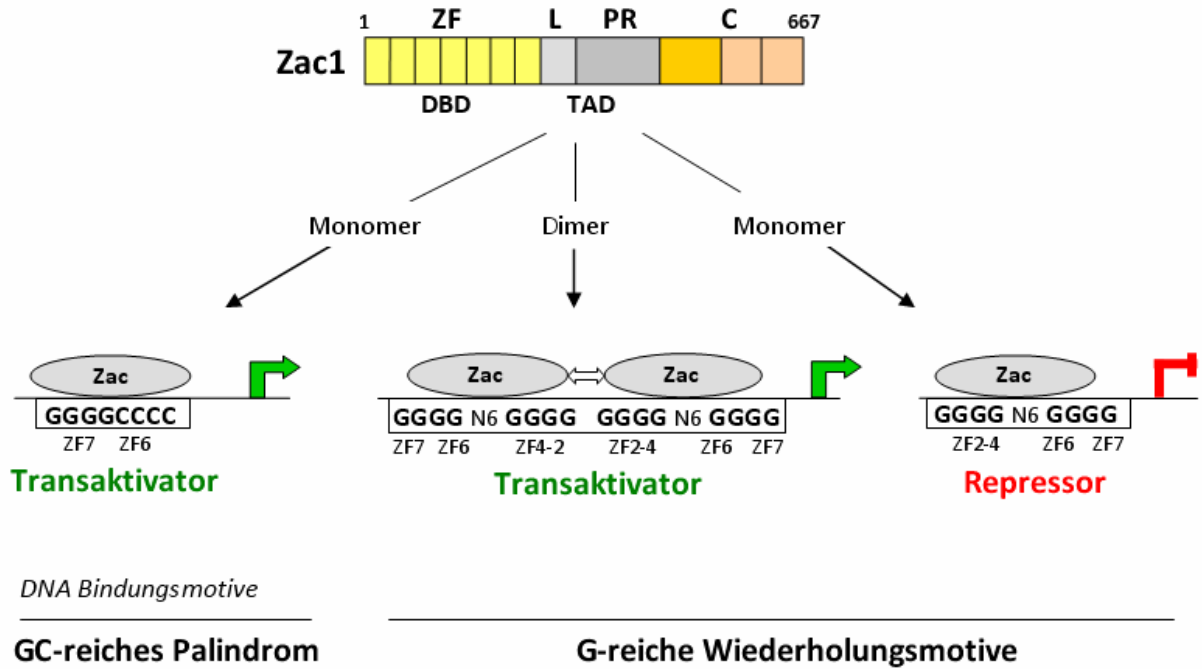


Abb. 1: Zac1-Proteinstruktur und DNA-Bindung

Das murine Zac1-Protein setzt sich aus den N-terminalen Zinkfingermotiven (ZF), der Linker Region (L), der prolinreichen Region (PR) und dem C-terminalen Bereich zusammen. Die sieben ZF bilden die DNA-Bindungsdomäne (DBD). Die LPR-Region bildet die Transaktivierungsdomäne (TAD). Zac1 fungiert als Transaktivator oder Repressor durch Bindung als Monomer oder Dimer an GC-reiche DNA-Motive. Die jeweils beteiligten ZF sind aufgezeigt.

Bisher sind nur wenige direkte Zielgene von Zac1 bekannt. Die Ergebnisse der bisherigen Arbeiten zeigen eine transkriptionelle Aktivierung der Expression der Gene *PAC1-R* (engl.: *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type1-receptor*) (Ciani et al., 1999; HOFFMANN et al., 1998; Rodriguez-Henche et al., 2002), Zytokeratin *CK14* (Hoffmann et al., 2003), *PPARgamma* (engl.: *peroxisome proliferator activating receptor*) (Barz et al., 2006), *Glut4* (engl.: *glucose transporter*) (Czubryt et al., 2010), Cyclinkinase Inhibitor *p21^{Cip1/Waf1}* (Liu et al., 2011) und das mütterlich geprägte Gen *Lit1* (engl.: *long QT intronic transcript 1*)

(Arima et al., 2005). Im Gegensatz hierzu reprimiert Zac1 die Expression des mütterlich geprägten Gens *RasGRF1* (Hoffmann und Spengler, 2012).

Neben seiner Rolle als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor fungiert Zac1 zudem als Koaktivator oder Korepressor von nukleären Rezeptoren (Huang und Stallcup, 2000), der Tumorsuppressoren p53 und p73 (Hoffmann und Spengler, 2008; Huang et al., 2001), den Cyclin-abhängigen Kinase (CDK2) Inhibitoren p21^{Cip1/Waf1} und p57^{Kip2}, sowie der Histondeacetylase (HDAC1) (Arima et al., 2005; Hoffmann und Spengler, 2008; Liu et al., 2008). Die Funktion als Koregulator ist unabhängig von der Zac1-Transaktivierungsdomäne (TAD) (Hoffmann et al., 2003).

1.2.3 Expression

In Übereinstimmung mit der besonderen Rolle geprägter Gene während der fötalen Entwicklung weist Zac1 eine hohe pränatale Expression mit einer schrittweisen Abnahme im postnatalen Gewebe auf (Valente und Auladell, 2001; Valente et al., 2005). Expressionsstudien in der Maus wiesen Zac1 ab dem embryonalen Tag E9.5 im Neuralrohr und dem Myokardium nach. Ab Tag E13.5 ist die Expression von Zac1 vorwiegend in mesenchymalen Stammzellen des Skelettmuskel- und Knorpelgewebes zu finden, während sie im ZNS auf die Bereiche des Neuroepithels und der sich daraus entwickelnden ventrikulären (VZ) und subventrikulären Zone (SVZ) begrenzt ist (Alam et al., 2005). Darüber hinaus wird Zac1 auch in Epithelien der inneren Organe, wie Lunge, Leber, Pankreas, Magen und Darm exprimiert. Im postnatalen und adulten Organismus der Maus ist Zac1 weitestgehend schwach in peripheren Geweben exprimiert, wohingegen die Hypophyse und bestimmte Bereiche des Gehirns eine erhöhte Zac1-Expression aufweisen. So wurde zum Beispiel eine hohe Expression im adulten Hippokampus, in der äußeren Körnerzellschicht (engl.: *external granule cell layer* = EGL) des Kleinhirns, in den hormonproduzierenden Kerngebieten des Hypothalamus und entlang des rostralen migratorischen Stroms (engl.: *rostral migratory stream* = RMS) zum Bulbus olfactorius gefunden (Ciani et al., 2003; Spengler et al., 1997; Valente und Auladell, 2001). Die ZAC1-Expression im Menschen zeigt im Wesentlichen ähnliche Muster wie in der Maus und weist zudem im adulten Gewebe eine zusätzliche Expression in den Nieren und Nebennieren auf (Varrault et al., 1998).

Das dynamische Expressionsprofil von *Zac1* während der Embryonalentwicklung in Bereichen mit Stamm- und Vorläuferzellaktivität deutet auf eine potentielle Rolle in Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen hin. Bisherige Arbeiten wiesen eine transiente Expression von *Zac1* während der Chondrogenese und Myogenese nach (Tsuda et al., 2004; Valente et al., 2005). Darüber hinaus stellt *Zac1* einen wichtigen Transkriptionsfaktor in der Morphogenese des Herzens (Yuasa et al., 2010) und der Differenzierung von Keratinozyten dar (Basyuk et al., 2005). Mehrere Beobachtungen stützen zudem die Annahme, dass *Zac1* eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung neuraler Stamm- und Vorläuferzellen erfüllt. Während der Gehirnentwicklung der Maus wurde durch immunhistologische Studien eine *Zac1*-Expression in Neuroepithelzellen gezeigt, die Funktionen in der Kontrolle von Zellproliferation und Differenzierung nahe legen (Alam et al., 2005; Valente und Auladell, 2001; Valente et al., 2005). *Zac1* homozygote null-mutante Mäuse wiesen eine Veränderung in der Zusammensetzung der verschiedenen Zelltypen des zentralen Nervensystems (ZNS) auf. Diese war durch eine verminderte Anzahl von Neuronen und Oligodendrozyten, jedoch einer Zunahme von GFAP (engl.: *glial fibrillary acidic protein*) positiven Astrozyten gekennzeichnet. Darüber hinaus wurde eine verstärkte Zellproliferation in der subventrikulären Zone (SVZ) festgestellt (Valente, PhD thesis, 2005). Zudem zeigten Studien in *Zac1*-Null-Mutanten, dass *Zac1* an Zelllinienentscheidungen bei der Entwicklung der Netzhaut und des Kleinhirns beteiligt ist (Chung et al., 2011; Ciani et al., 2003).

Im Rahmen experimenteller Epilepsie, ausgelöst durch Injektion von Kainsäure, wurde *Zac1* in Glia- und Nervenzellen des limbischen Systems induziert (Valente et al., 2004). Untersuchungen zu neuronalen Differenzierungsgenen in Neurogenin 2 (*Ngn2*)-Null-Mutanten führten zur Identifizierung von *Zac1* infolge eines erniedrigten Expressionsprofils in der ventrikulären Zone (VZ) (Mattar et al., 2004). Darüber hinaus wurde *Zac1* während der neuronalen Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen exprimiert (Hoffmann und Spengler, 2008). Zudem war eine verstärkte *ZAC1*-Expression in den am frühesten auftretenden NSC, den Neural-Rosetten, während der Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen nachweisbar (Elkabatz et al., 2008).

Insgesamt unterstützen diese Beobachtungen eine potentielle Rolle von *Zac1* in der Regulation und Kontrolle von Zellproliferation und Differenzierung in neuralen Stamm- und Vorläuferzellen. Allerdings ist mit den bisher identifizierten Zielgenen die Bedeutung von *Zac1* in diesen Prozessen nur unzureichend verstanden. So unterstützen PPARgamma und

Glut4 eher die Funktionen von Zac1 im Metabolismus bei der Regulation des Glukose- und Fettstoffwechsels (Barz et al., 2006; Czubryt et al., 2010). Die Koaktivierung von p53 und die nachfolgende Induktion von Apaf-1 sowie die p53 unabhängige Aktivierung der Caspase 8 und Daxx durch den Todesrezeptor-Signalweg reflektieren Funktionen in der Zac1 vermittelten Apoptose (Ho et al., 2010; Kamikihara et al., 2005; Rozenfeld-Granot et al., 2002; Spengler et al., 1997). Die Regulation des Zellzykluses durch p21^{Cip1/Waf1}, p57^{Kip2}, p53 und p73 (Arima et al., 2005; Hoffmann und Spengler, 2008; Huang et al., 2001; Liu et al., 2011) lassen ebenfalls nur bedingt Schlussfolgerungen zur Rolle von Zac1 in der Neurogenese zu. Lediglich die transkriptionelle Regulation des G-Protein-gekoppelten PAC1-Rezeptors, der durch das Neuropeptid PACAP (engl.: *pituitary adenylyl cyclase activating peptid*) stimuliert wird, legt eine Funktion des Transkriptionsfaktors Zac1 in der Differenzierung neuronaler Zellen nahe (Fila et al., 2009; HOFFMANN et al., 1998; Spengler et al., 1997). PACAP stellt einen wichtigen Differenzierungs- und Überlebensfaktor für neuronale Zellen dar (Contestabile et al., 2005).

1.3 Neurogenese

Neurogenese beschreibt die Entwicklung der verschiedenen neuronalen und glialen Zelltypen des Nervensystems aus neuralen multipotenten Stamm- und Vorläuferzellen. Dabei wird abhängig vom ontogenetischen Alter der Zellen embryonale Neurogenese von der adulten unterschieden (**Abb. 2**). Während der frühen neuralen Entwicklung bilden primitive neurale Stammzellen des Neuroepithels durch symmetrische und asymmetrische Zellteilungen ein mehrschichtiges Gewebe aus neuralen Stamm- und Vorläuferzellen, das die Gehirnv ventrikel auskleidet. Zu Beginn der Neurogenese in der Maus am Embryonaltag E9-10 entsteht daraus in der Keimzone des Neuroepithels die ventrikuläre Zone (VZ). Hier bilden neuroepitheliale Zellen durch asymmetrische Zellteilung zuerst die Radialgliazellen, die als Vorläuferzellen der Neurone fungieren (Finlay und Darlington, 1995; Malatesta et al., 2000; Noctor et al., 2001). Darauf folgt ab Tag E16 bis einige Tage nach der Geburt die vermehrte Bildung von glialen Vorläuferzellen, aus denen die Astrozyten und die sich postnatal entwickelnden Oligodendrozyten entstehen (Choi, 1988; Lee et al., 2000). Die Entwicklung von neuralen Stammzellen über linienspezifische Vorläuferzellen bis hin zu den ausgereiften Zelltypen ist von einer sukzessiven Verlängerung des Zellzykluses begleitet.

Dieser geht letztlich mit der terminalen Differenzierung der Zellen in den postmitotischen Zustand der G₀-Phase über (Gotz und Huttner, 2005).

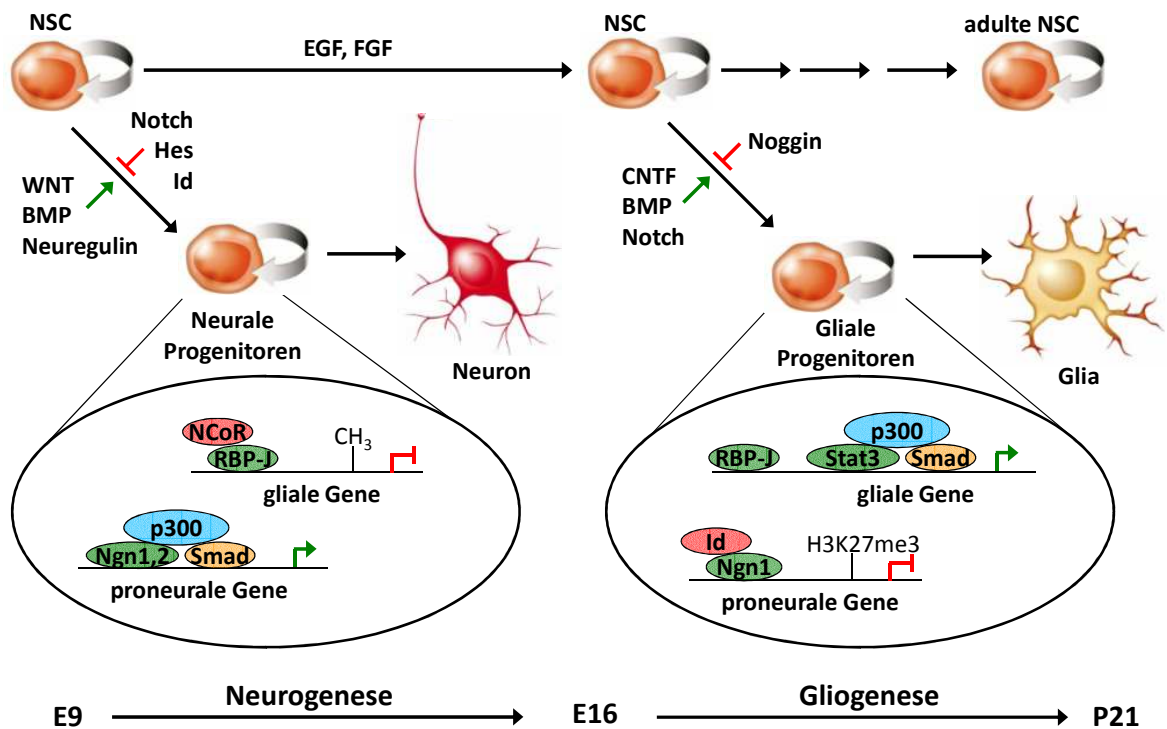


Abb. 2: Embryonale Neurogenese (ausführliche Erläuterungen siehe im Text)

Der Übergang von der neurogenen zur überwiegend gliogenen Phase der Differenzierung wird durch extrinsische und intrinsische Faktoren gesteuert (Freeman, 2010; Miller und Gauthier, 2007; Qian et al., 2000; Temple, 2001). Als bestimmende Faktoren der Neurogenese zwischen Tag E9-16 induzieren die WNT (engl.: *Wingless-Int1*) und BMP (engl.: *bone morphogenetic pathway*) vermittelten Signalwege die Transkriptionsfaktoren Neurogenin (Ngn) und Smad. Diese aktivieren zusammen mit dem Kofaktor p300 weitere proneurale Gene, wie *NeuroD*, *Mash1* und andere bHLH-Proteine (engl.: *basic helix loop helix*) (Bertrand et al., 2002). Der Notch-Signalweg verhindert durch den Prozess der lateralen Inhibition die Expression proneuraler Gene in Nachbarzellen, wodurch undifferenzierte, proliferierende Vorläuferzellen erhalten bleiben (Kageyama et al., 2008). Zu diesem Zeitpunkt wird die gliale Differenzierung durch DNA-Methylierung und Bindung von Repressor-Proteinen an den glialen Promotoren inhibiert. So wird zum Beispiel der am GFAP-Promotor gebundene Notch-abhängige Transkriptionsfaktor RBP-Jk durch den vom neurogenen Differenzierungsfaktor Neuregulin (Nrg) induzierten Repressor NCoR reguliert (Borggreve und Liefke, 2012; Hermanson et al., 2002; Schmid et al., 2003). Damit stellt die

Aktivierung der proneuralen Gene den Schlüsselmechanismus während der neurogenen Phase dar.

Ab Tag E16 erfolgt die verstärkte Bildung von glialen Vorläuferzellen durch epigenetische Veränderungen des Genoms (Freeman, 2010; Hirabayashi und Gotoh, 2010). Dies führt zur Inhibition der proneuralen Gene einerseits durch reprimierende Histonmodifikationen (H3K27me3) oder andererseits durch Bindung von Repressoren, wie der Id-Proteine am Promotor des Neurogenin (*Ngn*)-Gens (Nakashima et al., 2001). Zum anderen werden die gliogenen Promotoren demethyliert (Hatada et al., 2008; Sanosaka et al., 2009). Als extrinsische Faktoren der glialen Differenzierung besitzen der Notch- und BMP-Signalweg, sowie die durch Jak/Stat3-Signaltransduktion vermittelten Zytokine CNTF (engl.: *ciliary neurotrophic factor*), CT-1 (*Cardiotrophin-1*) und LIF (engl.: *leukemia inhibitory factor*) eine entscheidende Funktion (Miller und Gauthier, 2007). Insbesondere das von Neuronen freigesetzte gliogene Zytokin CT-1 reguliert die Translokation des Repressors NCoR vom GFAP-Promotor (Barnabe-Heider et al., 2005; Hermanson et al., 2002; Ochiai et al., 2001).

Während der Embryonalentwicklung werden große Mengen an Nerven-Vorläuferzellen gebildet, wohingegen im adulten Gehirn die Fähigkeit zur Neubildung von Nervenzellen deutlich eingeschränkt ist (Eriksson et al., 1998). Erste Hinweise auf eine adulte Neurogenese wurden Anfang der 60er Jahre durch Altman erbracht (Altman und Das, 1965). Sie ist auf eng umgrenzte Gebiete der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus Dentatus im Hippokampus und der subventrikulären Zone (SVZ) der Seitenventrikel reduziert (Doetsch et al., 1997; Kempermann, 2002; Morrens et al., 2012).

1.3.1 Bedeutung des Jak/Stat3-Signalweges

Zytokine haben während der Gliogenese eine Schlüsselrolle. Die Signalübertragung von CNTF, CT-1 und LIF beruhen auf dem Jak/Stat3-Signalweg. Die Janus Kinase (Jak)-vermittelte Regulation des Transkriptionsfaktors Stat3 ist deshalb von zentraler Bedeutung (**Abb. 3**). Stat3 ist ein wichtiges Signalmolekül von Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität verschiedenster Zytokine und Wachstumsfaktoren (Heim, 1999). Stat3 wird an der intrazellulären Domäne des Rezeptors durch Jak-vermittelte Phosphorylierung von Tyr-705 aktiviert. Dies führt zur Bildung von Stat3-Dimeren und Translokation in den Zellkern (Ihle, 1995). Stat3 ist ein Protoonkogen und besitzt Schlüsselfunktionen in der Zellproliferation

und Tumorgenese (Bromberg et al., 1999; Levy und Lee, 2002). Während der Embryonalentwicklung ist Stat3 essentiell, wie die embryonale Letalität null-mutanter Mäuse zeigt (Akira, 1999). Stat3 wird im Rahmen der lateralen Inhibition für die neurogene-gliogene Transformation benötigt (Deverman und Patterson, 2009). Hierbei ist Stat3 wesentlich am dynamischen Wechselspiel der interzellulären Kommunikation zwischen den Delta- und Notch-Signalwegen über die Regulation von Hes (*Hairless*)-Proteinen und der damit verbundenen Aufrechterhaltung des proliferativen Zustandes von Vorläuferzellen beteiligt (Kageyama et al., 2008; Kamakura et al., 2004).

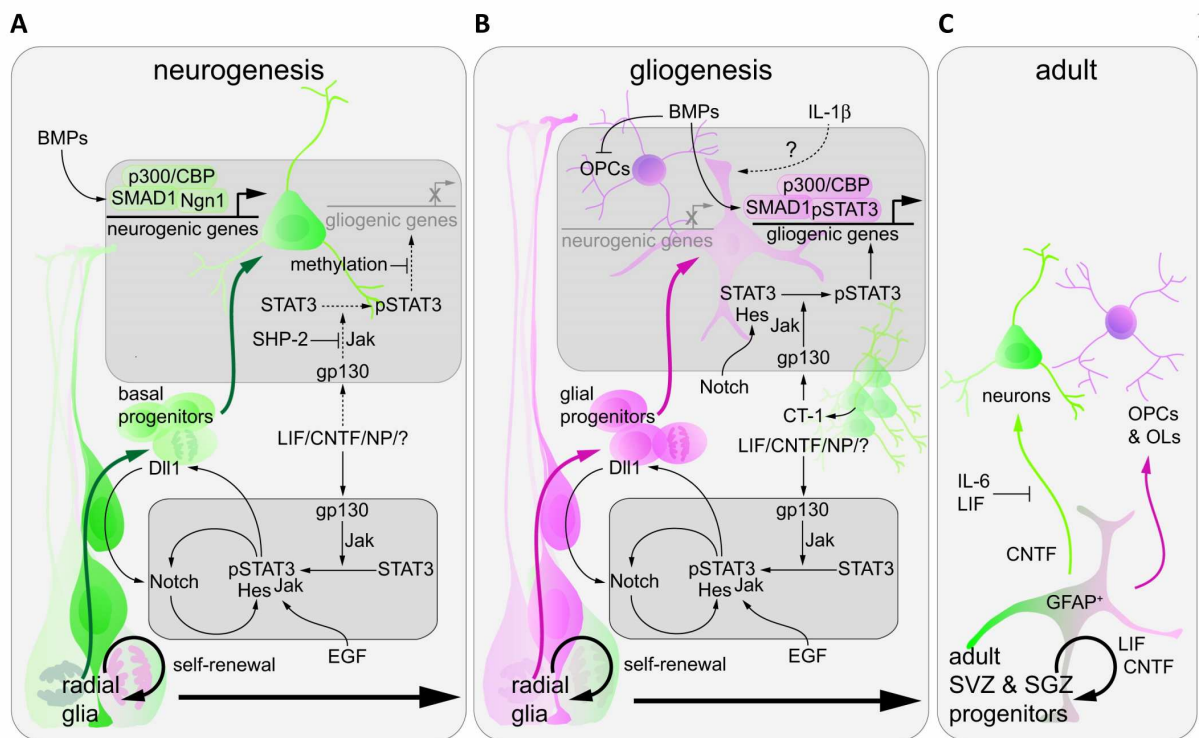


Abb. 3: Jak/Stat3-Signalweg während der Neurogenese (nach (Deverman und Patterson, 2009)) Regulation der Delta/Notch-Signalweg induzierten Hes-Proteine durch Jak/Stat3-Signalweg führt zur proliferativen Selbsterhaltung von Radialgliazellen. (A) Während der embryonalen Neurogenese ist Stat3 durch SHP-2 gehemmt. (B) Gliogene Zytokine werden durch Jak/Stat3-Signalweg vermittelt. (C) Stat3 ist beteiligt an Selbsterneuerung und Zelllinienentscheidungen während der adulten Neurogenese.

In neuronalen Vorläuferzellen wird die Aktivierung von Stat3 durch die Phosphatase SHP-2 gehemmt (Coskun et al., 2007). Dahingegen konnten Studien von Null-Mutanten der Komponenten des Jak/Stat3-Signalweges, wie der Rezeptordomäne gp130 und LIF, sowie Aminosäureaustausch-Mutanten des Stat3 Tyr-705, eine nachhaltige Störung der Gliogenese nachweisen (Akira, 1999; Bonni et al., 1997; Bugga et al., 1998; Nakashima et al., 1999). Die Initiation der glialen Differenzierung wird von Stat3-regulierten Signalwegen gesteuert und

führt zur Bildung von proliferativen glialen Vorläuferzellen (Bonni et al., 1997; Fukada et al., 1998; He et al., 2005; Nakashima und Taga, 2002). Der progressive Reifungsprozess zu postmitotischen Astrozyten wird vor allem durch den BMP-Signalweg bestimmt und führt zur Smad-abhängigen Aktivierung von $p21^{Cip1/Waf1}$ und $p27^{Kip1}$ (Bonaguidi et al., 2005; Fukuda et al., 2007; Mabie et al., 1997). Vergleichende *in vitro* Studien von LIF oder BMP4 differenzierten Astrozyten zeigten einen proliferativen GFAP-positiven Phänotyp durch zytokininduzierte Signalwege, während BMP4 zum Zellzyklusarrest und zur Reifung der glialen Vorläuferzellen führte (Bonaguidi et al., 2005).

Zusammenfassend zeigt sich während der embryonalen Neurogenese eine wechselseitige Feedback-Regulation von neuronaler und glialer Differenzierung. Die zytokinvermittelte Aktivierung des Jak/Stat3-Signalweges trägt zur Inhibition der Neurogenese bei, während die Signalwege der neuronalen Differenzierung mit der Aktivierung von proneuralen bHLH-Proteinen zur Inhibition der Gliogenese führen.

1.3.2 Regulation des Stat3-Signalweges

Der Jak/Stat3-Signalweg kann auf mehreren Ebenen reguliert werden (**Abb. 4**). Die Aktivierung durch Bindung eines Liganden am Rezeptor bewirkt die Autophosphorylierung von Jak. Daraufhin werden durch die Kinaseaktivität von Jak Tyrosine in der intrazellulären Domäne des gp130-Rezeptors phosphoryliert. Hierbei führt die Socs (engl.: *Suppressor of Cytokine Signaling*)-Proteinfamilie zur Konkurrenz um die Stat3-Bindungsstelle am Rezeptor und Hemmung der Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität von Jak (Boyle et al., 2009). Zudem werden die phosphorylierten Tyrosine durch die Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) SHP-2 dephosphoryliert, wodurch Stat3 nicht an dem Rezeptor binden kann (Coskun et al., 2007; Symes et al., 1997). Neben der Regulation auf Rezeptorebene wird aktiviertes Stat3-Tyr-705 im Zytoplasma durch die Aktivität von PTP und PIAS3 (*Protein inhibitor of activated Stat3*) reguliert. Das Enzym PIAS3 ist eine E3-SUMO-Protein-Ligase, welche die DNA-Bindung von Stat3 durch Sumoylierung des Proteins blockt (Chung et al., 1997; Dabir et al., 2009). Darüber hinaus trägt die Regulierung der Serin/Threonin-Kinase-abhängigen Stat3-Phosphorylierung am Ser-727 zur transkriptionellen Aktivität der Stat3-Dimere bei (Rajan et al., 2003; Yokogami et al., 2000).

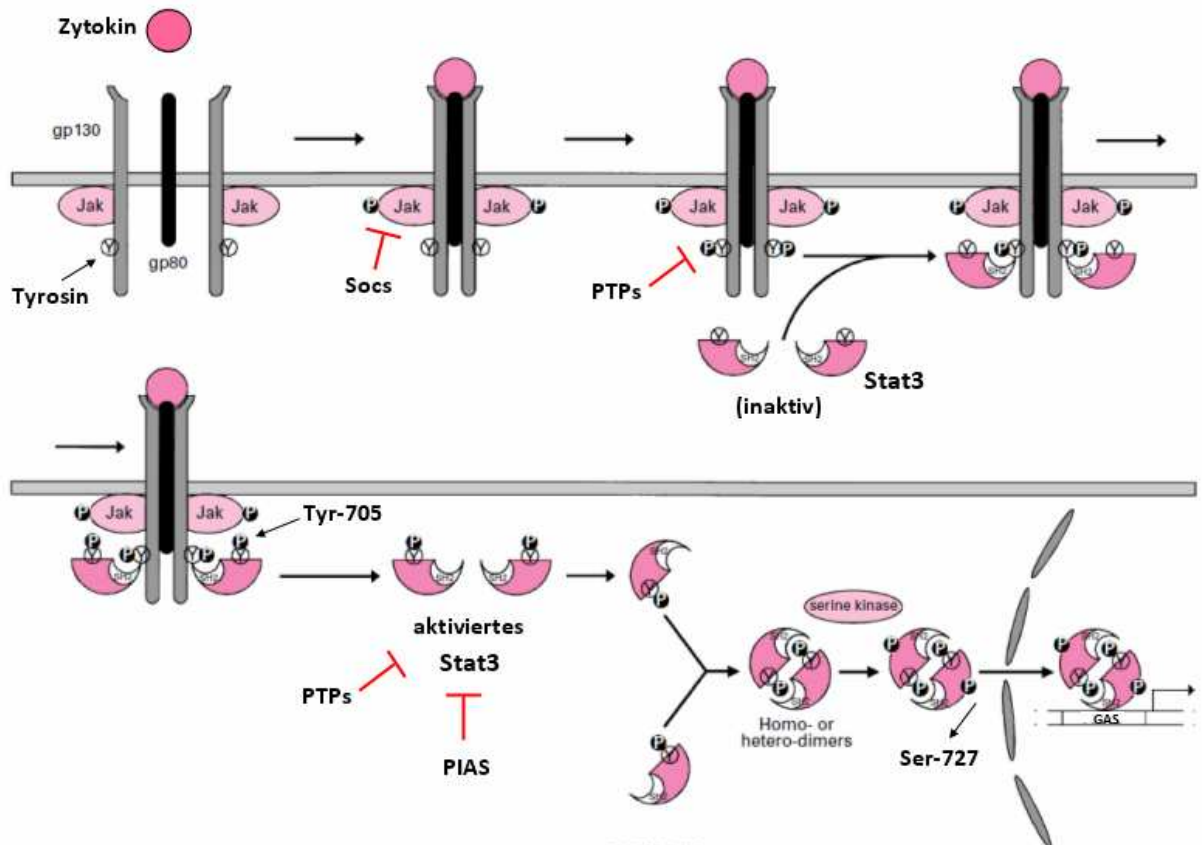


Abb. 4: Regulation des Jak/Stat3-Signalweges (modifiziert nach (Heinrich et al., 1998))

Stat3 wird an der intrazellulären Domäne des Rezeptors durch Jak-abhängige Phosphorylierung am Tyr-705 aktiviert. Phosphoryliertes Stat3-Tyr-705 bildet im Zytoplasma Dimere und translokalisiert in den Zellkern. Die Serin/Threonin-Kinase-abhängige Phosphorylierung am Stat3-Ser-727 erhöht die Transaktivierung von Stat3 an GAS-Bindungsmotiven (γ -Interferon Aktivierungssequenz) der DNA.

1.4 Socs3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3)

Socs3 gehört zu einer Proteinfamilie von zytokininduzierbaren Inhibitoren von Signalwegen (Starr et al., 1997). Diese umfasst acht Proteine, die strukturelle Ähnlichkeit in ihrer SH2-Domäne (*src-homology*) und SOCS-Box aufweisen (Abb. 5 A) (Crocker et al., 2008). Socs3 wirkt als potenter Rückkopplungsinhibitor der Jak/Stat-Signalwege von Typ I und II Zytokinrezeptoren (Auernhammer et al., 1999).

Die Regulation des Jak/Stat3-Signalweges erfolgt durch die Bindung der SH2-Domäne des Socs3-Proteins an phosphorylierte Tyrosine in der intrazellulären Domäne des Rezeptors (Abb. 5 B). Gleichzeitig bewirkt die KIR-Domäne (*Kinase Inhibiting Region*) eine kompetitive Hemmung der Enzymaktivität von Jak (Boyle et al., 2009). Letztlich wird das Socs3-

gebundene Jak-Protein dem proteasomalen Abbau durch SOCS-Box-abhängige Fusion mit dem E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex zugeführt (Babon et al., 2008). Socs3 weist eine geringe Halbwertszeit auf und wird rasch proteasomal abgebaut. Die Induktion durch LIF zeigte eine Proteinstabilität < 90 min und der mRNA-Stabilität > 8 h (Bousquet et al., 1999).

Die Expression von Socs3 ist zelltyp- und stimulusspezifisch und ist vorwiegend in Immunzellen und Zellen des ZNS zu finden. Während der embryonalen Neurogenese ist Socs3 transient zwischen Tag E14 und P8 exprimiert (Polizzotto et al., 2000). Darüber hinaus zeigte die embryonale Letalität von *Socs3*-Null-Mutanten eine kritische Funktion bei der Entwicklung von Trophoblast-Zellen, die als äußere Zellschicht der Blastozyste zur Einnistung des Embryos in die Gebärmutterschleimhaut der Plazenta beitragen (Fitzgerald et al., 2009; Takahashi et al., 2003).

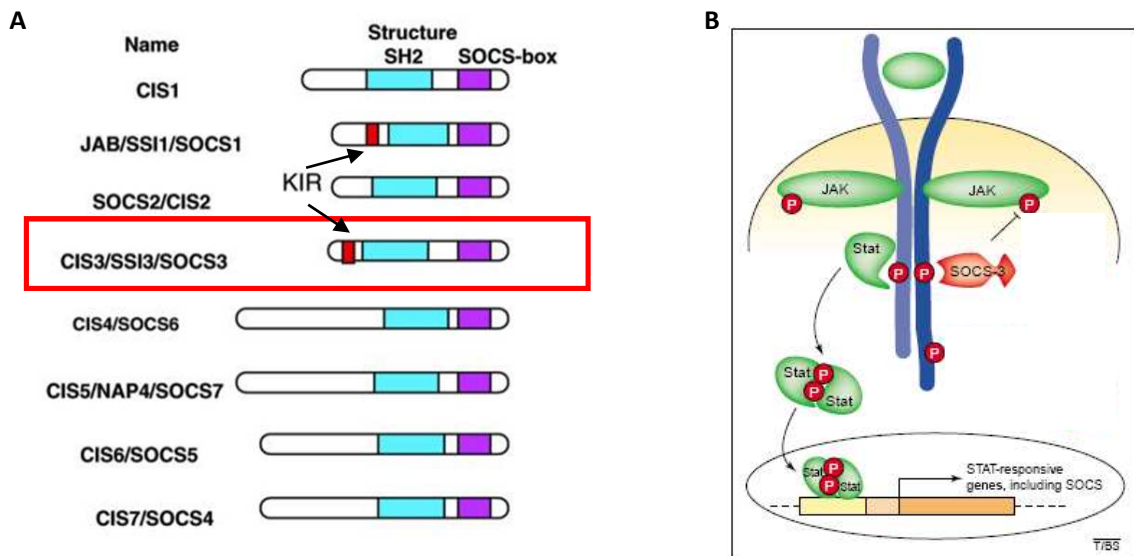


Abb. 5: (A) Socs-Proteinfamilie (modifiziert nach (Yoshimura et al., 2005))

Strukturelle Homologien der SH2-Domäne (Bindung an phosphorylierte Tyrosine) und SOCS-Box (für proteasomalen Abbau der Bindungspartner). Die Kinase-Inhibitor-Region (KIR)-Domäne von Socs1 und Socs3 erfüllt Funktionen in der Hemmung der Kinaseaktivität von Jak (rote Kästchen).

(B) Socs3-Regulation des Jak/Stat3-Signalweges nach (Kile et al., 2002). Erläuterungen siehe Text.

1.5 Zielstellung

Für die Analyse von Zac1-Zielgenen während der Embryonalentwicklung wurden in Vorarbeiten Mikroarray-Studien in neuronalen Stammzellen (NSC) der Maus durchgeführt. Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit war die Validierung und Aufklärung der biologischen Bedeutung einer durch Zac1-vermittelten *Socs3*-Expression in neuronalen Vorläuferzellen. Dazu waren in der murinen NSC-Zelllinie C17.2 und einem davon abgeleiteten Klon mit Tetrazyklin-induzierbarer Zac1-Expression RNA- und Protein-Expressionsanalysen, Reporter-Assays, Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) des *Socs3*-Promotors, sowie Transfektionsexperimente vorgesehen. Dabei sollte überprüft werden, ob die Regulation von *Socs3* auf die Funktion von Zac1 als Transaktivator zurückzuführen ist. Zudem sollte die Untersuchung der humanen neuroektodermalen Zelllinie SK-N-MC Aufschluss darüber geben, ob die Ergebnisse aus den Zellmodellen der Maus auf den Menschen übertragbar sein könnten. Zur Analyse der biologischen Funktion der durch Zac1-vermittelten *Socs3*-Expression waren Versuche im Zusammenhang mit Zelllinienentscheidungen geplant. Dabei sollte die Regulation von *Socs3* am biologischen Model der Stammzelldifferenzierung in den NSC-Zelllinien NS-5 und O4ANS untersucht werden. Für die Analyse der zeitabhängigen RNA- und Protein-Expression während des neuronalen und astroglialen Zellschicksals sollten ChIP-Experimente zum Nachweis der Zac1-Bindung am *Socs3*-Promotor dienen. Zudem sollten Immunfluoreszenzfärbungen die zellspezifische Expression anhand geeigneter Marker bestimmen. Für weitere Analysen der biologischen Bedeutung der Regulation des *Socs3*-Gens wurde die Zac1-Expression während der Zelldifferenzierung in der NSC-Zelllinie O4ANS manipuliert. Hierbei sollte die Auswirkung der Zac1-Überexpression oder seiner Repression durch shRNA auf den Jak/Stat3-Signalweg analysiert werden. Abschließend waren Versuche in Primärzellen des Gehirns vom Embryonaltag E18 geplant. Diese sollten zur Überprüfung der in NSC-Zelllinien erhaltenen Ergebnisse in einem relevanten Zellkulturmodell *ex vivo* dienen.

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bioruptor	UCD 200; Diagenode; Liege (B)
Brutschrank (Bakterien)	G25 Inkubator; New Brunswick; Nürtingen
Brutschrank (Zellkultur)	Heraeus 6000; Thermo-Scientific; München
Deckgläschen (24 x 40)	Menzel-Gläser; Braunschweig
Elektrophoresekammer	Dual Vertical Mini Gel Kit; CBS; Del Mar (USA)
Elektroporator	Gene Pulser II; Bio-Rad; Ismaning
Filme für Western Blot	Kodak BioMax; Sigma; Taufkirchen
Fließpapier für Western Blot	Machery Nagel; Düren
Fluoreszenz-Mikroskop	BX61; Olympus; Hamburg
Heizplatte	RET; IKA Labortechnik; Staufen
Luminometer	Berthold; München
Magnetrührgerät	RET; IKA Labortechnik; Staufen
Mikrotiterplatten (96-Well)	Greiner bio-one; Frickenhausen
Mikrotiterplatten-Photometer	MR5000; Dynex Technologies; Denkendorf
Mikrowellengerät	HF24M-241; Siemens; München
Mikroskop	LH50A; Olympus; Hamburg
Mikroskopkamera	E-620 SRL; Olympus; Hamburg
MiniOpticon Real-Time PCR system	Bio-Rad; Ismaning
Nitrocellulose-Membran	Whatman; Dassel
Objektträger (26 x 76)	Menzel-Gläser; Braunschweig
pH-Meter	WTW pH720; Inolab; Weilheim
Pipetten	Reference; Eppendorf; Hamburg
Pipettenspitzen	Greiner bio-one; Frickenhausen
Scanner (Weisslicht Imager)	Intas; Göttingen
Schüttler	Thermomixer 5436; Eppendorf; Hamburg
Spannungsquelle	200/2.0 Power Supply; Bio-Rad; Ismaning
Spektrophotometer	SmartSpecPlus; Bio-Rad; Ismaning
Spritzen	UV-40 Insulin (0,33-0,12 mm); BD; Heidelberg
Tank-Western-Blotter	CBS Scientific; Del Mar (USA)
UV-Tisch (302nm)	UVT2035; Herolab; Wiesloch
Vortexer (Mixer)	VG2; Scientific Industries; New York (USA)
Waage	AT261; Mettler; Giessen
Werkbank Zellkultur	Heraeus HA2472 GS; Thermo Scientific; München
Zentrifugen	5415 R; Eppendorf; Hamburg J2-21M/E; Beckman Coulter; Krefeld

2.1.2 Chemikalien

Acrylamid (30% + 0,8% Bisacrylamid)	Rotiphorese Gel 30, Roth; Karlsruhe
Agar	Roth; Karlsruhe
Agarose	Peqlab; Erlangen
Albumin (aus Rinderserum)	Roth; Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Pierce; Bonn
Ampicillin	Roth; Karlsruhe
ATP (Adenosintriphosphat)	Sigma; Taufkirchen
Bradford-Protein Assay Reagenz	Bio-Rad; Ismaning
Bromphenolblau	Roth; Karlsruhe
Chloroform	Roth; Karlsruhe
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Merck; Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck; Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth; Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Roth; Karlsruhe
ECL Plus WB Detection	Amersham; GE Healthcare; Braunschweig
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck; Darmstadt
Entellan	Merck; Darmstadt
Essigsäure, Eisessig (96%)	Roth; Karlsruhe
Ethanol (96%)	Roth; Karlsruhe
Formaldehyd (37%)	Roth; Karlsruhe
Glyzerol (87%)	Roth; Karlsruhe
Glyzin	Riedel de Haen; Hannover
HEPES (Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure)	Roth; Karlsruhe
Igepal (NP-40)	Fluka; Buchs
Isoamylalkohol	Merck; Darmstadt
Isopropanol	Merck; Darmstadt
Kaliumazetat (CH ₃ COOK)	Roth; Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth; Karlsruhe
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck; Darmstadt
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma; Taufkirchen
Luciferin	P.J.K.; Kleinblittersdorf
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck; Darmstadt
Mercaptoethanol	Sigma; Taufkirchen
Methanol	Roth; Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Merck; Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck; Darmstadt

Natriumdodezylsulfat (SDS)	Biomol; Hamburg
Natriumhydrogencarbonat	Merck; Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck; Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck; Darmstadt
ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-galactosid)	Sigma; Taufkirchen
PBS (Phosphat buffered saline)	Invitrogen; Karlsruhe
Poly-D-Lysin	Sigma; Taufkirchen
Ponceau S	Roth; Karlsruhe
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma; Taufkirchen
Proteinstandard (10-170 kDa) vorgefärbt	SM 0671; Fermentas; St. Leon-Rot
Proteinstandard (11-250 kDa) vorgefärbt	SM 1811; Fermentas; St. Leon-Rot
Salzsäure (32 %)	Roth; Karlsruhe
Saponin	Sigma; Taufkirchen
SOD (Sodium-Deoxcholate)	Sigma; Taufkirchen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka; Buchs
Tetrazyklin	Fluka; Buchs
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth; Karlsruhe
Triton X-100	Roth; Karlsruhe
Tween 20	Roth; Karlsruhe

2.1.3 Antikörper

Tab. 1: Primäre Antikörper

Primärantikörper	Wirtsspezies	Quelle
anti-acH3	Kaninchen	Millipore; Billerica (USA)
anti-A2B5	Maus (IgM)	Abcam; Cambridge (GB)
anti-Aktin	Maus	Sigma; Taufkirchen
anti-Flag	Maus	Sigma; Taufkirchen
anti-GFAP	Kaninchen	Dakocytomation; Hamburg
anti-GFAP	Maus	Sigma; Taufkirchen
anti-H3K9me2	Kaninchen	Diagenode; Liege (B)
anti-Ki-67	Kaninchen	Novocastra; Newcastle (GB)
anti-Socs3	Kaninchen	Abcam; Cambridge (GB)
anti-Stat3	Kaninchen	SantaCruz; Heidelberg
anti-pStat3-Tyr-705	Kaninchen	SantaCruz; Heidelberg
anti-Zac1	Meerschwein	hergestellt in AG Spengler
anti-Zac1	Kaninchen	hergestellt in AG Spengler

Tab. 2: Sekundäre Antikörper

Sekundärantikörper	Quelle
Dylight 488 – Esel-anti-Maus	Dianova; Hamburg
Dylight 488 – Esel-anti-Maus (IgM)	Dianova; Hamburg
Dylight 488 – Esel-anti-Kaninchen	Dianova; Hamburg
Dylight 488 – Esel-anti-Meerschwein	Dianova; Hamburg
Dylight 594 – Esel-anti-Maus	Dianova; Hamburg
Dylight 594 – Esel-anti-Maus (IgM)	Dianova; Hamburg
Dylight 594 – Esel-anti-Kaninchen	Dianova; Hamburg
Dylight 594 – Esel-anti-Meerschwein	Dianova; Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen (HRP–Konjugat)	Pierce; Bonn
Ziege-anti-Maus (HRP–Konjugat)	Pierce; Bonn
Ziege-anti-Meerschwein (HRP–Konjugat)	Pierce; Bonn

Tab. 3: Immunchemikalien

Reagenzien	Quelle
DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma; Taufkirchen
Esel-Normal-Serum (ENS)	Dianova; Hamburg
Milchtrockenpulver - fettarm	Slim-Fast; Wiesbaden
Rinderserumalbumin (RSA)	Dianova; Hamburg

2.1.4 Enzyme

Tab. 4: Enzyme

Enzyme	Quelle
Accutase	Invitrogen; Karlsruhe
Alkalische Phosphatase	Fermentas; St. Leon-Rot
DNase I	Machery Nagel; Düren
Ligase T4	Fermentas; St. Leon-Rot
Polymerase Pfu und Taq	Fermentas; St. Leon-Rot
Proteinkinase K	Sigma; Taufkirchen
Restriktionsenzyme Eam1105I; MluI; NcoI; SacII; StuI; XhoI	Fermentas; St. Leon-Rot
RNase A	Sigma; Taufkirchen
RT-Transkriptase	Fermentas; St. Leon-Rot
Trypsin/EDTA	Gibco ; Eggenstein

2.1.5 Plasmide

Tab. 5: Plasmide

Konstrukt	Vektor	Spezies	Ref.
Flag-Zac1	pRK7	m (murin)	(Hoffmann et al., 2003)
Zac1-GFP	pRK7	m	-
Zac1-Flag	pRK5	m	(Barz et al., 2006)
Zac1-ΔLPR	pRK7	m	(Hoffmann et al., 2003)
Zac1-Δ1-5	pRK7	m	(Hoffmann et al., 2003)
Zac1-ZF2mt	pRK7	m	(Hoffmann et al., 2003)
Zac1-ZF6mt	pRK7	m	(Hoffmann et al., 2003)
Zac1-ZF7mt	pRK7	m	(Hoffmann et al., 2003)
ZAC1	pRK5	h (human)	(Bilanges et al., 2001)
1,7 kb SOCS3 Promotor	pGL3	h	(Matthews et al., 2005)
2,9 kb Socs3 Promotor	pGL3	m	(Auernhammer et al., 1999)
2 kb Socs3 Promotor	pGL3	m	-
1,5 kb Socs3 Promotor	pGL3	m	-
0,7 kb Socs3 Promotor	pGL3	m	-
Socs3-Flag	pEF	m	(Starr et al., 1997)
GFP	pRK7	m	-
β-Galactosidase	pRK7	m	(Hoffmann et al., 2003)
Träger DNA	pAM	m	-
Puromycin	pRK5	m	(Hoffmann et al., 2003)
shRNA von Zac1	pLKO.1	m	Mission; Sigma; Taufkirchen

Die Sequenzen der validierten shRNA-Expressionsplasmide von Zac1 wurden von Sigma-Aldrich aus der vom RNAi Konsortium (TRC) des Broad Institutes (Cambridge; USA) entwickelten Mission shRNA Bibliothek für Mensch und Maus bereitgestellt.

Tab. 6: Sequenzen der murinen pLKO.1-Zac1-shRNA-Plasmide

Plasmid	Sequenz	TRC Nr.
1.	GACGCTATTGATGTCTCCATTCTCGAGAATGGAGACATCAATAGCGTC	0000125619
2.	CCACTGTGATAGATGCTTCTACTCGAGTAGAAGCATCTATCACAGTGG	0000125620
3.	CCAGAGCAATTTCCAACCTCATCTCGAGATGAGTTGGAAATTGCTCTGG	0000125621
4.	CCAATTATTCTTCAGGAGCATCTCGAGATGCTCCTGAAGAATAATTGG	0000125623
5.	CAGAGCAATTTCCAACCTCATTCTCGAGAATGAGTTGGAAATTGCTCTG	0000125622

2.1.6 Primer

Die Primersequenzen wurden von Metabion synthetisiert und als Lyophilisat geliefert.

Tab. 7: Sequenzen der verwendeten Primer (m=murine; h= humane)

Primer	sense	anti-sense	Spez.
Gapdh	5'- ccatcaccatcttccaggagcgag - 3'	5'- gatggcatggactgtggatcatgag - 3'	m
GAPDH	5'- cctgcaccaccaactgcttagc - 3'	5'- caggtccaccactgacacgttgg - 3'	h
GFAP	5'- tggagggcgaagaaa - 3'	5'- cggtggaggttgagaa - 3'	m
Mas	5'- tattggcccagagtatcagca - 3'	5'- ggggtttgtc gatgacttcaa - 3'	m
Nestin	5'- aggaacaaaagagacaggtg - 3'	5'- ttcctcagatgagaggtcaga - 3'	m
Puromycin	5'- gtcaccgagctgcaagaact - 3'	5'- caggaggccttccatctgt - 3'	m
Socs3	5'- cctttgtagacttcacggctgc - 3'	5'- aacttgctgtgggtgacat - 3'	m
SOCS3	5'- gacttcacggccgccaacatctg - 3'	5'- gcggcggctgcagctgcttcg - 3'	h
Tuj1	5'- tagtggagaacacagacgaga - 3'	5'- ctgctgttcttactctggatg - 3'	m
Zac1	5'- gccttctgtctcaagtataagctg - 3'	5'- atcgccattgctcgcgag - 3'	m
Zac1-Flag	5'- ccagaggaagaacaggaaga - 3'	5'- tgtcatcgtcgtcctttag - 3'	m
Flag-Zac1	5'- gacgatgacgataaggat - 3'	5'- atcttctgtggcgagtgt - 3'	m
ZAC1	5'- tggcacagcatttggta - 3'	5'- gttggggtcgtgggtctgga - 3'	h

Tab. 8: Primer für Chromatin-Immunopräzipitation

Primer	sense	anti-sense	Spez.
Distal	5'- acgtttgtgttcaggac - 3'	5'- gatgttctcagcttgggtact - 3'	m
Proximal	5'- caagactccagcgcgcctc - 3'	5'- cagacgtgggtgctgatgtcc - 3'	m
Exon 1	5'- caagaagaccggccggcgag - 3'	5'- gttggcagccgtgaagtctac - 3'	m
Intron	5'- cttccacgcgagttttc - 3'	5'- gagctgcagagagcaaagcg - 3'	m
Distal	5'- ttagaatgccaaaggaag - 3'	5'- ggtttaagtattctcttgcc - 3'	h
Proximal	5'- ctgaccgcagttgggc - 3'	5'- cccaacttctcattcacac - 3'	h
Exon 1	5'- caagaaggccggccgcgag - 3'	5'- gttggcggccgtgaagtccac - 3'	h
Intron	5'- cttccgcgagttttc - 3'	5'- ggctcggagaggaagcg - 3'	h

Tab. 9: Primer für Klonierung des 0,7 kb Socs3 Promotors (Intron)

Primer	sense	anti-sense	Spez.
Mlu I	5'- aat acgcgt gcttcgggactagta - 3'	-	m
Xho I	-	5'- aa ctcgagg tggctgcagctgctt - 3'	m

2.1.7 Puffer und Reagenzien

Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

Sammelgel – Puffer: 0,5 M Tris/HCl-Puffer (pH 6,8); pH-Wert mit 6 N HCl eingestellt

Trenngel – Puffer: 1,5 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,8); pH-Wert mit 6 N HCl eingestellt

APS-Lösung (10 %): 10% APS in Aqua dest. [v/w]; Lagerung bei -20 °C

SDS-Lösung (10 %): 10% SDS in Aqua dest. [v/w]; Lagerung bei Raumtemperatur

Elektrophoresepuffer (für 2 l): 25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 0,1% SDS; in Aqua dest.

SDS-PAGE – Probenpuffer nach Laemmli (4x):

1,4 ml	Aqua dest.;
1,0 ml	1 M Tris/HCl – Puffer (pH 6,8);
1,6 ml	Glyzerol (87 %);
3,2 ml	10 %-ige SDS-Lösung;
0,8 ml	β-Mercaptoethanol;
1 x	Spatelspitze Bromphenolblau

Puffer und Lösungen für Immunoblot und Immunozytochemie

Block-Puffer (IB): PBS-Puffer (pH 7,4); 5 % Slimfast od. 5 % RSA; 0,25 % Tween 20

Block-Puffer (ICC): PBS-Puffer (pH 7,4); 0,1 % Saponin; 5 % ENS

Blot-Puffer nach Schäfer–Nielsen: 48 mM Tris; 39 mM Glyzin; 0,004 % SDS; 20 % Methanol

Fixierlösung (ICC) für 50 ml: 5,4 ml Formaldehyd (37 %) in PBS-Puffer (pH 7,4)

PBS-Puffer mit pH 7,4 (0,1 M): 72 mg/ml Na₂HPO₄; 13 mg/ml NaH₂PO₄; 0,15 M NaCl-Lsg.

TBS-Azid (zur Lagerung): 0,2% NaN₃ [w/v] in TBS-Puffer (pH 7,4)

TBS-Puffer mit pH 7,4: 100 mM Tris; 0,15 M NaCl-Lsg.; 0,05 % Tween 20

Waschpuffer (IB) mit pH 7,4: 40 mM Tris; 2 M NaCl; pH Wert mit 6 N HCl eingestellt

Waschpuffer (ICC): PBS-Puffer (pH 7,4); 0,1 % Saponin

Puffer und Lösungen für Luziferase-Assay

Lysis-Puffer: 75 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,8); 10 mM MgCl₂; 1 % Triton X-100; Aqua dest.;
vor Gebrauch Zugabe von 4 µl ATP (0,5 M) und 1 µl DTT (1 M) pro 1 ml Lsg.

Assay-Puffer: 75 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,8); 10 mM MgCl₂; Aqua dest.;
vor Gebrauch Zugabe von 4 µl ATP (0,5 M) pro 1 ml Lsg.

β-Galactosidase-Assay-Puffer: 30 ml Na₂HPO₄ (1 M); 40 ml NaH₂PO₄ (0,5 M); 5 ml KCl (1 M);
0,5 ml MgCl₂ (1 M); 1,7 ml β-Mercaptoethanol; 422,8 ml H₂O

ATP-Lösung: 0,1 M ATP (pH 7,0); pH-Wert mit 1 M NaOH eingestellt; Aliquote -20°C

DTT-Lösung: 1 M DTT, Aliquote gelagert bei -20 °C

Luciferin (80x): 10 mg Luciferin; 1 ml Methanol; 2,57 ml Assay-Puffer (ohne ATP)

ONPG-Lösung: 2 mg/ml o-Nitrophenyl-β-D-Galactosid in Aqua dest.

Puffer und Lösungen für Chromatin-Immunopräzipitation

Zell-Lysis-Puffer:	10 mM Hepes (pH 7,9); 1,5 mM MgCl ₂ ; 10 mM KCl; 0,5 % Igepal
Kern-Lysis-Puffer:	50 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,1); 1 % SDS; 10 mM EDTA
Lösungs-Puffer:	16,7 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,1); 0,01 % SDS; 1,1 % Triton-X100; 1,2 mM EDTA; 167 mM NaCl
Niedrig-Salz-Waschpuffer:	20 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,1); 0,1 % SDS; 1 % Triton-X100; 2 mM EDTA; 0,15 M NaCl
Hoch-Salz-Waschpuffer:	20 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,1); 0,1 % SDS; 1 % Triton-X100; 2 mM EDTA; 0,5 M NaCl
LiCl-Waschpuffer:	10 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,1); 0,25 M LiCl; 1 % Igepal; 1 % SOD; 1 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,0) ; 1 mM EDTA
Eluierungspuffer:	50 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,0); 1 % SDS; 50 mM NaHCO ₃ ; 1 mM EDTA

2.1.8 Zelllinien und Gewebe

Zelllinie C17.2

Zur Herstellung der murinen NSC-Zelllinie C17.2 wurden neuronale Vorläuferzellen des neonatalen Kleinhirns der Maus aus der äußeren Keimschicht kultiviert und durch retrovirale Transduktion des v-myc Onkogens vom Avian Myelocytomatosis Virus (MC29) immortalisiert (Ryder et al., 1990). Neben der stabilen, klonalen Selbsterneuerung weisen die C17.2 Zellen typische Eigenschaften von neuronalen Stammzellen auf, wie dem Merkmal zur multipotenten *in vitro* Differenzierung in alle drei grundlegenden neuronalen Linien - Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten (Parker et al., 2005). Zudem zeigten Transplantationsexperimente die Fähigkeit zur *in vivo* Differenzierung und Integration in die Zytoarchitektur des Gehirns (Snyder et al., 1992).

Tab. 10: Zellkulturbedingungen der murinen NSC-Zelllinie C17.2

Reagenzien	Quelle
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) + 4,5 g/l Glukose; + L-Gln; + Phenolrot (pH-Wert Indikator)	Invitrogen; Karlsruhe
10 % FCS (fetales Kälber-Serum)	Invitrogen; Karlsruhe
1 % Penicillin-Streptomycin	Invitrogen; Karlsruhe

Zelllinie C17.2 mit Tet-induzierbarer Zac1-Expression

Der Zellklon wurde wie die C17.2 Zellen kultiviert. Zusätzlich erfolgte zur Repression der induzierbaren Zac1-Expression die Zugabe von 100 ng/ml Tetrazyklin (Fluka; Buchs).

Zelllinie SK-N-MC

Die humane neuroektodermale Tumorzelllinie SK-N-MC (Biedler et al., 1973) wurde in DMEM-Medium ergänzt mit 4,5 g/l Glukose und 0,5 % L-Glutamin, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Zelllinien NS-5 und O4ANS

Die NS-5 Zellen wurden aus dem fötalen Gehirn der Maus (E15) gewonnen, während hingegen die O4ANS Zellen aus der SVZ des Gehirns adulter Mäuse isoliert wurden. Diese als homogene Reinkultur etablierten murinen neuralen Stammzelllinien weisen neben den Hauptkriterien, der stabilen Selbsterneuerung und Multipotenz nach neuronaler Differenzierung auch elektrophysiologische Aktivität auf (Conti et al., 2005; Pollard et al., 2006). Zudem konnte nach Transplantation in fötale und adulte Mausgehirne Überleben und Differenzierung der Zellen ohne Tumorbildung nachgewiesen werden (Glaser et al., 2007).

Tab. 11: Zellkulturbedingungen der murinen NSC-Zelllinien NS-5 und O4ANS

Reagenzien	Quelle
NSA - Medium (Euromed-N)	EuroClone; Pero (I)
1 % N2 - Supplement (Zusammensetzung: 100 µg/ml Apo-Transferrin 25 µg/ml Insulin 6 ng/ml Progesteron 16 mg/ml Putrescin 3 nM Selenit)	Invitrogen; Karlsruhe
0,5 % L-Glutamax	Invitrogen; Karlsruhe
1 % Penicillin-Streptomycin	Invitrogen; Karlsruhe
67 µl BSA-Lösung (7,5 %) pro 100 ml Medium	Invitrogen; Karlsruhe
10 ng/ml FGF	PeptoTech; Hamburg
10 ng/ml EGF	PeptoTech; Hamburg

Gewebe für die Primärzellen

Zum Anlegen von Primärzellkulturen wurden CD1 Maus-Embryonen vom Tag E18 verwendet. Die entnommenen Gehirne wurden dissoziiert und als Neurosphären kultiviert.

Tab. 12: Primärzellkulturbedingungen

Reagenzien	Anteil / Konz.	Quelle
DMEM/F12 - Medium	50 %	Invitrogen; Karlsruhe
Neurobasal - Medium	50 %	Invitrogen; Karlsruhe
N2 - Supplement	0,5 %	Invitrogen; Karlsruhe
B27 - Supplement	1 %	Invitrogen; Karlsruhe
L-Glutamax	0,5 %	Invitrogen; Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	1 %	Invitrogen; Karlsruhe
BSA-Lösung (7,5 %)	0,067 %	Invitrogen; Karlsruhe
FGF	10 ng/ml	PeptoTech; Hamburg
EGF	10 ng/ml	PeptoTech; Hamburg

2.1.9 Sonstiges

Zelldifferenzierung:	CNTF	PeptoTech; Hamburg
	BMP-4	R & D Systems; Wiesbaden
	Matrigel	BD Bioscience; Heidelberg
Selektion:	Puromycin	Merck; Darmstadt
Transfektion:	Lipofectamine	Invitrogen; Hamburg
	Turbofect	Fermentas; St. Leon-Rot
ChIP-Assay:	Dynabeads Protein G	Invitrogen; Hamburg
qRT-PCR:	qPCR SYBR green	Thermo Scientific; München

verwendete Kits

RNA- Extraktion:	Nucleo Spin RNA II	Machery-Nagel; Düren
DNA-Purifikation:	Nucleo Spin Gel und PCR Clean-up	Machery-Nagel; Düren
	UltraClean DNA Extraction Kit	Mo-Bio; Carlsbad (USA)
Plasmid-Präparation:	NucleoBond	Machery-Nagel; Düren

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die adhärenenten C17.2 und SK-N-MC Zellen wurden abhängig von der Zelldichte mit Trypsin abgelöst (1 min bei 37 °C), zentrifugiert (300 g für 3 min) und verdünnt wieder ausgesät im entsprechenden Zellkulturmedium (**Tab. 10**). Für die Umsetzung der neuronalen Stammzellen NS-5 und O4ANS wurde Accutase (1 min bei 37 °C) verwendet, zentrifugiert (200 g für 3 min) und 1:4 verdünnt unter den Zellkulturbedingungen (**Tab. 11**) ausgesät. Primärzellen wurden gleichfalls mit Accutase behandelt und in entsprechendem Expansionsmedium (**Tab. 12**) kultiviert. Die Langzeitlagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff erfolgte in entsprechendem Medium mit 10 % DMSO versetzt.

2.2.1.1 Tetrazyklin-regulierte Zac1-Expression in C17.2 Zellen

In Vorarbeiten zum Mikroarray (Barz et al., 2006) wurde für die Analyse von Zac1-Zielgenen ein induzierbarer Zac1-Expressionsklon in der NSC-Zelllinie C17.2 durch Thomas Barz etabliert. Dies erfolgte in zwei Schritten (**Abb. 6**). Zuerst wurde ein Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator (tTA) durch Selektion mit Hygromycin (200 µg/ml) stabil ins Genom der Zellen integriert. Danach wurde das Transgen Zac1-Flag durch Selektion mit Puromycin (1 µg/ml) integriert. Hierbei war die Transaktivierung von Zac1 unter Kontrolle eines modifizierten

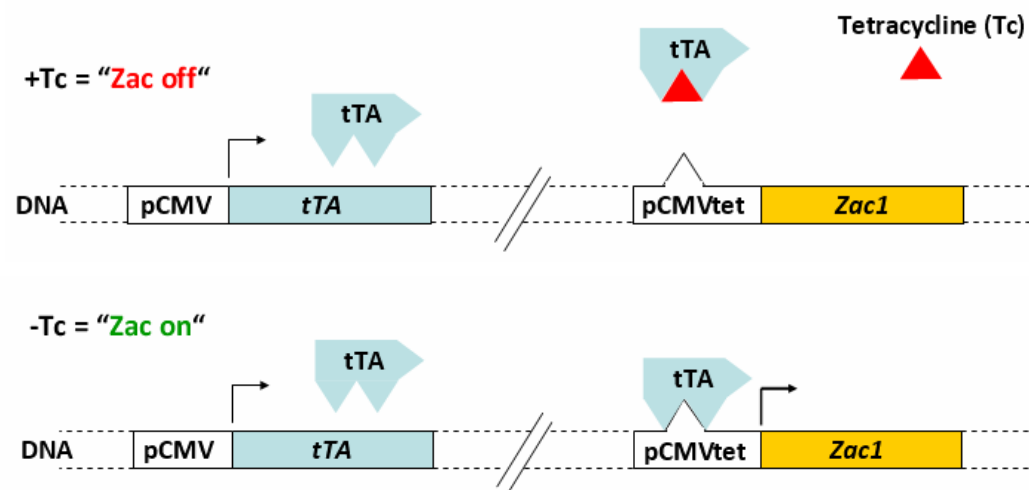


Abb. 6: Tetrazyklin induzierbare Zac1-Expression in C17.2 Zellen (Erläuterungen siehe Text)

CMV-Promotors in Verbindung mit dem Tet-Operator, welcher durch den Tetrazyklin-abhängigen tTA-Transaktivator reguliert wurde. In Abwesenheit von Tetrazyklin im Medium kann der Transaktivator am Tet-Operator binden und führt zur Expression von Zac1. Hingegen ist die Expression des Transgens in Anwesenheit von Tetrazyklin im Medium (100 ng/ml) reprimiert. Dieses als TetOff bezeichnete induzierbare Genexpressionssystem wurde von Gossen und Bujard entwickelt (Gossen und Bujard, 1992). Die Zellzahlen für Wachstumskurven wurden anhand der Neugebauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.1.2 Stabile Expressionsklone in O4ANS Zellen

Für den Zac1-Überexpressionsklon wurde zuerst das pRK7-Flag-Zac1-Expressionsplasmid mit dem Restriktionsenzym Eam1105I (AhdI) linearisiert, um eine effektive Integration in die genomische DNA der O4ANS Zellen zu erzielen. Parallel hierzu wurden die gepoolten pLKO.1-shRNA-Expressionsplasmide von Zac1 mit NcoI geschnitten und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dann erfolgte die Aufreinigung der Plasmid-DNA mit dem Nucleo Spin Gel und PCR Clean-up-Kit von Machery-Nagel entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Hierbei wurde die DNA auf Silica-Membran Säulen geladen, mit 96 %-igen ethanolischen NT3-Puffer gewaschen und mit NE-Puffer (5 mM Tris/HCl; pH 8,5) eluiert. Anschließend wurde in 12-Well Zellkulturplatten die Transfektion der DNA in O4ANS Zellen mit Turbofect durchgeführt, wobei 2 µg DNA der gepoolten shRNA-Plasmide bzw. Flag-Zac1 eingesetzt wurden. Beide Expressionsplasmide enthielten ein Puromycin-Resistenzgen. Als Kontrollen für die spätere Selektion wurden zum einen Zellen mit pAM-Plasmid, welches kein Puromycin-Resistenzgen enthielt und als Negativ-Kontrolle fungierte, oder dem pRK5-Puromycine-Expressionsplasmid transfiziert.

Zwei Tage nach der erfolgten Transfektion wurde mit der Selektion positiver Klone begonnen. Dazu wurde die in Vorversuchen ermittelte letale Konzentration von Puromycin (250 ng/ml) in O4ANS Zellen verwendet. Die Selektion wurde für mindestens 10 Tage durchgeführt, wobei keine Zellen der negativen Kontrolle überlebten. In diesem Zeitraum erfolgte die etwaige Umsetzung der Zellen abhängig von ihrer Wachstumsdichte. Einzelne Zellkolonien wurden gepickt und jeweils isoliert in Medium mit Puromycin (100 ng/ml) weiter kultiviert. Positive Klone wurden anhand der Expression des Transgens mittels qRT-PCR oder Immunoblot getestet.

2.2.1.3 Primärzellen

Zum Anlegen einer embryonalen Primärzellkultur des neuronalen Hirngewebes wurden trächtige Muttertiere der CD1 Maus von der Tierhaltung Martinsried bereitgestellt. Der Tag der Kopulation wurde durch vaginale Plaques festgestellt. Am Embryonaltag E18 wurden die Mäuse nach geltenden veterinärmedizinischen Bestimmungen zur Organentnahme durch Dekapitieren getötet, das Abdomen eröffnet und der Uterus mit den Embryonen präpariert. Dieser wurde in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Unter einer sterilen Werkbank wurden die Embryonen aus dem Uterus mit einer Schere präpariert und die Schädelkalotte eröffnet, um das Gehirn an der Basis des Rückenmarks zu entnehmen. Die Gehirne wurden in pH-Wert stabilen Leibovitz Medium L-15 (Sigma; Taufkirchen) gesammelt. Anschließend wurden die Gehirne mechanisch mit der Schere im Deckel eines Eppendorf Reaktionsgefäßes zerkleinert und durch Verschließen des Reaktionsgefäßes mit einer enzymatischen Lösung aus 1 % Trypsin/EDTA und 1 % DNase I (nach Herstellerangaben verdünnt 1:10 in rDNase Puffer) für 5 min bei 37 °C behandelt. Der Verdau wurde in DMEM/F12 Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin abgestoppt. Danach erfolgte die weitere mechanische Zerkleinerung durch wiederholtes Auf- und Abziehen der Pipette. Im nächsten Schritt wurde die Suspension für 1 min bei 200 g zentrifugiert. Das Pellet wurde im Zellkulturmedium (**Tab. 12**) resuspendiert und als Suspensionskultur weiter kultiviert.

Dabei bildeten sich frei schwimmende Neurosphären, die aus Stamm- und Vorläuferzellen bestanden. Diese wurden zur Generierung von sekundären Neurosphären zuerst auf Poly-D-Lysin (PDL) beschichteten Zellkulturgefäß-Oberflächen umgesetzt, bevor die adhären wachsenden Zellen erneut umgesetzt wurden für die Kultivierung unter nicht adhären Bedingungen. Damit wurden einerseits neuronale Stammzellen, durch die Eigenschaft Neurosphären zu bilden, selektiert und angereichert, sowie die Zellkultur von der Zellpopulation der Mikrogliazellen separiert. Die sekundären Neurosphären wurden für die weiteren Experimente als adhären Zellen auf PDL (50 µg/ml) beschichteten Zellkulturgefäß-Oberflächen kultiviert. Die gewonnenen Primärzellen hatten aufgrund der fehlenden Immortalisierung eine Lebensdauer von 4–6 Wochen in Zellkultur. Das zu Grunde liegende Protokoll zur Primärzellkultur wurde modifiziert nach (Fath et al., 2008).

2.2.1.4 Zelldifferenzierung

Die undifferenzierten Zellen der NSC-Zelllinien NS-5 und O4ANS, sowie der Primärzellen wurden in entsprechendem Zellkulturmedium (**Tab. 11; 12**), ergänzt mit den Wachstumsfaktoren EGF und FGF, expandiert. Es wurden standardisierte Protokolle der neuronalen Differenzierung eingesetzt (Conti et al., 2005; Glaser et al., 2007; Pollard et al., 2006). Die Zellen wurden mit FGF (10 ng/ml) und Matrigel (0,4 µl/ml) neuronal ausdifferenziert. Matrigel ist ein gelatinöses Protein-Gemisch, das von Sarkomazellen sekretiert wird und der extrazellulären Matrix (ECM) ähnelt (Hughes et al., 2010). Für die astrogliale Differenzierung wurde 1 % FCS ohne die Wachstumsfaktoren EGF und FGF verwendet. Alternativ wurde die astrogliale Differenzierung durch BMP-4 (10 ng/ml) oder CNTF (100 ng/ml) eingeleitet (Bonaguidi et al., 2005; Li und Grumet, 2007; Rajan und McKay, 1998).

2.2.2 Socs3-Promotorplasmid

Als Ausgangspunkt für die verkürzten Promotorkonstrukte diente ein murines pGL3-Socs3-Promotoplasmid mit 3,8 kb genomischer 5'-Sequenz oberhalb der Translationsstartseite (Auernhammer et al., 1999). Damit sollte eine potentielle Zac1-Bindung an GC-reichen Motiven des Socs3-Promotors untersucht werden. Im ersten Schritt wurde die Sequenz mit dem Software Programm *Vector NTI Advance 11* nach einmaligen Restriktionsschnittstellen untersucht. Zur Einengung der Analyse des Socs3-Promotors auf den GC-reichen Teil der Sequenz wurde an der SacI und StuI (-1267/+929) bzw. der SacI und SacII (-451/+929) Restriktionsseite geschnitten. Der Verdau (über Nacht bei 37 °C) wurde auf ein 1 %-iges Agarosegel, welches Ethidiumbromid zur Färbung der DNA enthielt, aufgetragen und die entsprechende Bande nach dem Gellauf (1 h bei 80 V) mit dem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Danach wurde die DNA aus dem Agarose-Gel mit dem Nucleo Spin Gel und PCR Clean-up-Kit extrahiert. Anschließend wurden die geschnittenen Plasmide mit T4-DNA-Polymerase unter Zugabe von dNTPs (2 mM) geglättet (5 min bei RT und 20 min bei 70 °C) und mit Ligase-T4 religiert (2 h bei RT), um das 2 kb bzw. 1,5 kb umfassende pGL3-Socs3-Promotorplasmid zu erhalten. Für das 0,7 kb Socs3-Promotorkonstrukt wurde eine andere Strategie der Klonierung verwendet. Hierbei wurde mittels PCR der gewünschte Abschnitt durch Pfu-Polymerase mit Primern amplifiziert, die Restriktionssequenzen von MluI und XhoI

enthielten (**Tab. 9**). Diese dienten zur anschließenden Ligation in einen mit MluI und XhoI geschnittenen und mit alkalischer Phosphatase dephosphorylierten pGL3-Basisvektor. Alle Konstrukte wurden zur Kontrolle sequenziert.

2.2.2.1 Plasmidpräparation

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden elektrokompente Bakterien des Stammes *Escherichia coli* DH5 α verwendet. Die Transformation der Bakterien mit einer DNA-Menge von 10–100 ng wurde mittels Elektroporation in einer Küvette (Weite 0,1 cm; GenePulser; Biorad) bei Werten von 1,5 kV und 129 Ohm durchgeführt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C in 1 ml SOB-Medium wurde die Suspension auf einer Ampicillin-Agarplatte ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden gepickt und in 2 ml SOB Medium mit 70 μ g/ml Ampicillin bei 37 °C über Nacht im Horizontalschüttler vermehrt. Anschließend wurde die Vorkultur für die Maxipräparation in 250 ml TB-Medium mit Ampicillin über Nacht weiter kultiviert. Dann wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert (7000 g für 5 min bei 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit dem Nucleo Bond Plasmid Purification Kit von Machery-Nagel lysiert und anschließend zentrifugiert (19000 g für 20 min bei 4 °C). Der Überstand wurde mit einem Falcon-Filter auf eine äquilibrierte Nucleo Bond AX 100 Säule geladen. Die Säule wurde anschließend gewaschen und die DNA eluiert. Das in Glasröhrchen aufgefangene Eluat (5 ml) wurde mit 3,5 ml Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (9000 g für 30 min bei 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit dem Fön getrocknet. Danach wurde das Pellet in 200 μ l TE-Puffer resuspendiert und eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Dazu wurden 200 μ l Phenol-Chloroform (1:1) zugegeben, gemischt und danach zentrifugiert (12000 g für 5 min bei RT) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, welches mit 200 μ l Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Schritt wiederholt. Dann wurde die Präzipitation der gewonnenen DNA-Lösung mit dem doppelten Volumen 99 %-igen Ethanol und 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M) durchgeführt. Nach kurzem Vortexen (10 s) wurde das Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff gekühlt und zentrifugiert (14000 g für 20 min bei 4 °C). Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 70 %-igen Ethanol. Das gereinigte Pellet wurde bei 65 °C getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

2.2.3 Transfektion

Die Transfektion der Zellen wurde mit Lipofectamine (Invitrogen; Hamburg) oder Turbofect (Fermentas; St. Leon-Rot) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Das optimale Verhältnis zur transfizierenden DNA wurde in Vorversuchen bestimmt und betrug 2 µg DNA mit dem 2-3 fachen Betrag an Transfektionsreagenz für ein 3,5 cm²/Zellkulturschale (12-Well Zellkulturplatte).

2.2.4 Reporter-Assay

Die Zellen wurden mit dem induzierbaren Luziferase-Reportergen des pGL3-Socs3-Promotorplasmides und Zac1-Expressionsplasmiden kotransfiziert. Ein β-Galactosidase-Reportergen diente als Transfektionskontrolle. Daraufhin wurde 24h-48h später die Zellmembran mit 100 µl Lysis-Puffer permeabilisiert. Von den lysierten Zellen wurden 70 µl Extrakt mit 50 µl Assay-Puffer vermischt und im Luminometer mit 250 µM Luziferin-Lösung bei 562 nm gemessen. Zur Kontrolle der Effizienz der Transfektion wurde die β-Galactosidase-Aktivität bestimmt. Dazu wurden 20 µl der lysierten Zellen in einer 96-Wellplatte mit 100 µl β-Galactosidase-Puffer und 20 µl ONPG-Substrat für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die entstandene Gelbfärbung mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen und mit der Luziferaseaktivität-Aktivität normalisiert.

2.2.5 RNA-Extraktion und qRT-PCR

Die RNA-Präparation wurde mit dem Nucleo Spin RNA II – Kit (Machery-Nagel) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Für die anschließende Transkription in cDNA erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit mit dem Spektrophotometer. Dabei wurde die Extinktion einer 1:100 Verdünnung bei 260 und 280 nm gemessen. Die optische Dichte bei 260 nm wurde mit einer Konzentration von 40 µg/ml RNA bei einer Extinktion von 1 ins Verhältnis gesetzt. Die Reinheit wurde durch den Quotienten aus 260/280 nm bestimmt und wies für Protein und Phenol freie RNA-Lösungen einen Wert zwischen 1.9 und 2.2 auf. Für die Vervielfältigung der RNA wurde die reverse Transkription

durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt oligo-dT-Primer, welche sich an das 5'-Ende des Poly-A-Schwanzes der RNA anlagerten (5 min bei 65 °C). Danach wurden das Enzym Reverse Transkriptase und 10 µM dNTP zugegeben (45 min bei 42 °C). Die Amplifizierung der cDNA mit entsprechenden Primern (100 pM) erfolgte durch qRT-PCR mit dem MiniOpticon-Real-Time-PCR-System von Bio-Rad. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert (**Tab. 13**). Die Expression der untersuchten Gene wurde mindestens auf eins der konstitutiv exprimierten Gene *Gapdh*, *β-Aktin* und *Mas* normalisiert.

Tab. 13: Reaktionsansatz für qRT-PCR

Reagenz	Volumen
Absolute blue qPCR SYBR green	10 µl
Primer (Endkonz.: 1 pM)	je 0,2 µl
cDNA Probe	1 µl
Aqua dest. zugeben auf	20 µl

2.2.6 Protein-Extraktion und Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Extraktion der Proteine wurden die Zellen in PBS gewaschen und in 1 ml PBS mit einem Schaber abgelöst und zentrifugiert (5000 g für 5 min bei RT). Das Pellet wurde in TE-Puffer resuspendiert und die Zellen mit einer Insulinspritze (0,33-0,12 mm) geschert. Mit dem erhaltenen Homogenat wurde die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Dazu wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin (RSA) angefertigt. Ausgehend von einer Stammlösung von 0,1 mg/ml RSA in Aqua dest. wurden verschiedene Verdünnungen der Eichlösung mit Aqua dest. hergestellt. Zur Bestimmung der Eichwerte wurde jeweils Bradford-Reagenz zugegeben, gevortext und für 5 min inkubiert. Dann wurden je 200 µl der entsprechenden Eichlösung in eine Mikrotiterplatte pipettiert und eine Vierfach-Bestimmung der Werte bei 620 nm und 490 nm durchgeführt. Für die Bestimmung des Proteingehaltes der Proben wurde in analoger Weise vorgegangen. Die Proben wurden mit einer Vorverdünnung von 1:100 eingesetzt. Die Proben wurden anschließend mit SDS-Probenpuffer nach Laemmli behandelt und 5 min bei 95 °C denaturiert (Laemmli, 1970).

2.2.7 Immunoblot

Die Proteine wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) unter denaturierenden Bedingungen mit Natriumdodezylsulfat (SDS = sodium dodecylsulphate) aufgetrennt. Dabei neutralisiert das an die Polypeptidketten gebundene SDS die vorhandenen Ladungen und erlaubt somit die Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Die Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE-Elektrophorese variierte je nach Molekulargewicht des aufzutrennenden Proteins (**Tab. 14**). Die Polymerisation von Trenn- und Sammelgel erfolgte durch die Zugabe von 10%-igen APS und TEMED. Nach erfolgter Polymerisation wurde das SDS-Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit SDS-Elektrophoresepuffer überschichtet. Der Gellauf wurde bei 120 V für 90 min durchgeführt.

Tab. 14: Zusammensetzung der Trenngele und des Sammelgels für SDS-PAGE

Lösungen	8%	10%	12%	15%	Sammelgel 4.3 %	
Aqua dest.	5,68 ml	4,85 ml	4,08 ml	2,88 ml	3,05 ml	
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	0.5 M Tris/HCl (pH 6,8)	1,25 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	3,2 ml	4 ml	4,8 ml	6 ml	650 µl	
10%-iges SDS	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl	50 µl	
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	
10%-iges APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl	

Nach Beendigung der SDS-PAGE-Elektrophorese wurden die im Gel getrennten Proteine mittels Tank-Blotter für 2 h bei 50 V auf eine Nitrozellulose-Membran nach der Methode von Towbin transferiert (Towbin et al., 1979). Anschließend wurde die Membran geblockt und dann mit den entsprechenden Antikörpern über Nacht inkubiert. Mit Hilfe von indirekten Färbemethoden wurden die gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe durch Sekundärantikörper-HRP-Konjugate detektiert. Die Darstellung der Peroxidase-Aktivität erfolgte durch Chemolumineszenz mit ECL-Reagenz. Zudem wurden die Untersuchungsergebnisse teilweise quantitativ durch Vermessung der Helligkeitsintensitäten der Banden mit Hilfe des Computerprogramms TINA ausgewertet.

2.2.8 Immunofluoreszenzfärbung

Immunzytochemische Verfahren ermöglichen es, Antigene bestimmten morphologischen Strukturen zuzuordnen. Die Darstellung der mit Antikörpern markierten Epitope erfolgte mit Hilfe von Fluoreszenzfärbungen. Neben morphologischen Befunden wurden quantitative Aussagen durch Auszählung mehrerer unter dem Mikroskop fotografierter Bildausschnitte von Antigen positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzahl DAPI gefärbter Zellen erhalten. Fluoreszenz-Mehrfachmarkierungen ermöglichen zudem Aussagen zur Kollokalisierung von Proteinen. Die Zellen wurden auf PDL beschichteten Deckgläschen kultiviert und mit 5%-igen Formaldehyd in PBS fixiert (5 min bei RT). Zur Permeabilisation der Zellmembranen wurde als Detergenz 0,1 % Saponin in PBS (w/v) verwendet (1 h bei RT). Danach wurde mit Blockpuffer aus 0,1 % Saponin und 5 % des Serums der Wirtsspezies vom Sekundärantikörper inkubiert (1h bei RT), um unerwünschte Kreuzreaktivitäten und unspezifische Färbungen zu reduzieren. Daraufhin wurden für Fluoreszenzmarkierungen die in **Tab. 1** aufgelisteten Antikörper nach Empfehlung des Herstellers in Blockpuffer verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde dreimal mit Waschpuffer bestehend aus 0,1 % Saponin in PBS gewaschen. Zur Markierung wurden fluorochromierte sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von generell 20 µg/ml in Blockpuffer eingesetzt (1 h bei RT). Danach wurde nochmals dreimal gewaschen und mit DAPI die Zellkerne in einer Verdünnung von 1:5000 für 5 min bei RT gefärbt. Abschließend wurden die Deckgläschen auf den Objektträgern in Toluol gelösten Entellan eingebettet und an der Luft getrocknet. Zur Kontrolle der unspezifischen Färbung wurden Zellen ohne Primärantikörper inkubiert. Aufnahmen der gefärbten Zellen erfolgten mit Laser-Scanning-Modul gekoppelten Fluoreszenzmikroskop (BX61, Olympus).

2.2.9 Chromatin-Immunopräzipitation

Die Chromatin-Immunopräzipitation ist ein Verfahren, um *in vivo* die Interaktion von Proteinen an bestimmten Bereichen des Chromatins zu analysieren (Orlando, 2000). Dazu wurde im ersten Schritt die Protein-DNA Bindung durch Behandlung der Zellen mit 1 %-igen Formaldehyd fixiert (10 min bei RT). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 M Glyzin gestoppt. Nach 5 min wurden die fixierten Zellen zweimal in eiskalten PBS gewaschen und in 1 ml PBS mit 5 µl Proteinase Inhibitor von der Petrischale abgeschabt, zentrifugiert (800 g für

5 min bei 4 °C) und das Pellet in Zell-Lysis-Puffer mit Proteinase-Inhibitor durch Vortexen resuspendiert (15 min bei 4 °C). Danach wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert (800 g für 5 min bei 4 °C) und das Pellet in Kern-Lysis-Puffer resuspendiert. Die durch Aufbrechen der Kernmembran gelösten Protein-Chromatin-Komplexe wurden durch Ultraschall in einem Wasserbad-Sonikator (Bioruptor; Diagenode) in Fragmente von 200 bp gespalten (10 min in 30 s Intervallen). Die unlöslichen Zellreste wurden durch Zentrifugation (15000 g für 10 min bei 4 °C) abgetrennt und die optische Dichte des Überstandes bestimmt und aliquotiert. Für die Immunopräzipitation wurde ein 50 µl Aliquot mit Lösungs-Puffer 1:10 verdünnt und davon 1 % als „Input“ entnommen. Der „Input“ diente als Bezugswert für die Analyse der Anreicherung von Protein gebundenen DNA-Abschnitten durch den für die Präzipitation eingesetzten Antikörper. Die Bindungsreaktion erfolgte durch die Zugabe eines Antikörpers (1:50 verdünnt), welcher gegen DNA gebundenes Zac1 Protein gerichtet ist, über Nacht auf einem Dreh-Rotator bei 4 °C. Anschließend wurde die Immunopräzipitation durch Zugabe von 20 µl Protein G gebundenen Magnetpartikeln (Dynabeads; Invitrogen) auf dem Dreh-Rotator für 1 h bei RT durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle für die unspezifische Bindung an den magnetischen Kügelchen wurde eine Probe ohne Antikörper mitgeführt. Anschließend wurden mehrere Waschschrte mit Niedrigsalz-, Hochsalz-, Lithiumchlorid- und TE-Puffer durchgeführt und die gebundenen Protein-DNA-Komplexe im Elutionspuffer mit Proteinase K (10 µg/ml) bei 62 °C für 2 h inkubiert. Hierbei wurde die DNA durch Abdampfen des Formaldehyds und Verdau der Proteine freigesetzt (reverse crosslink). Die Proteinase K wurde anschließend durch Inkubation bei 95 °C für 10 min denaturiert. Zur Aufreinigung der DNA wurde das UltraClean DNA Extraction Kit (Mo-Bio) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Als Grundlage der selbst hergestellten Puffer und Lösungen für die Chromatin-Immunopräzipitation diente das Protokoll des Magna-ChIP-Kits von Millipore. Das Verfahren des Re-ChIP diente dazu die angereicherten Protein-DNA-Komplexe mittels einer zweiten Immunopräzipitation mit anderen Antikörpern auf bestimmte Merkmale hin zu untersuchen, wie z.B. Protein-Protein-Wechselwirkungen bei Koaktivator-Funktionen oder zur Charakterisierung von Histonmodifikationen. Die freigesetzten Protein-DNA-Komplexe der ersten Immunopräzipitation wurden dazu in Elutionspuffer mit Proteinase-Inhibitor und 10 mM DTT ohne Zugabe von Proteinase K bei 37 °C für 30 min eluiert. Das Eluat wurde verdünnt und wie beschrieben mit Antikörpern für aktivierende (acH3) und reprimierende (H3K9me2) Histonmarker erneut präzipitiert.

3 Ergebnisse

In den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde eine genomweite Expressionsprofilierung von verschiedenen neuronalen Stamm- und Vorläuferzelllinien der Maus mittels Mikroarray-Analysen durchgeführt. Diese dienten zur Identifizierung von Zac1-regulierten Genen und davon abhängigen Signalwegen. Dazu wurde für Zac1 ein stabiles, regulierbares tetrazyklin-abhängiges Genexpressionssystem (Gossen und Bujard, 1992; Hoffmann et al., 1997) in der murinen zerebellaren Stammzelllinie C17.2 (Ryder et al., 1990) und der hippokampalen Vorläuferzelllinie HW3-5 (Kuwahara et al., 1999) integriert. Nachfolgende biostatistische Auswertungen führten zur Identifizierung von *Socs3* als potentiell Zielgen von Zac1. Die anschließende Verifizierung des Mikroarray-Ergebnisses erfolgte im Rahmen dieser Arbeit anhand des C17.2 Zellklones mit induzierbarer Zac1-Expression.

3.1 Induzierbare Zac1-Genexpression in C17.2 Zellen

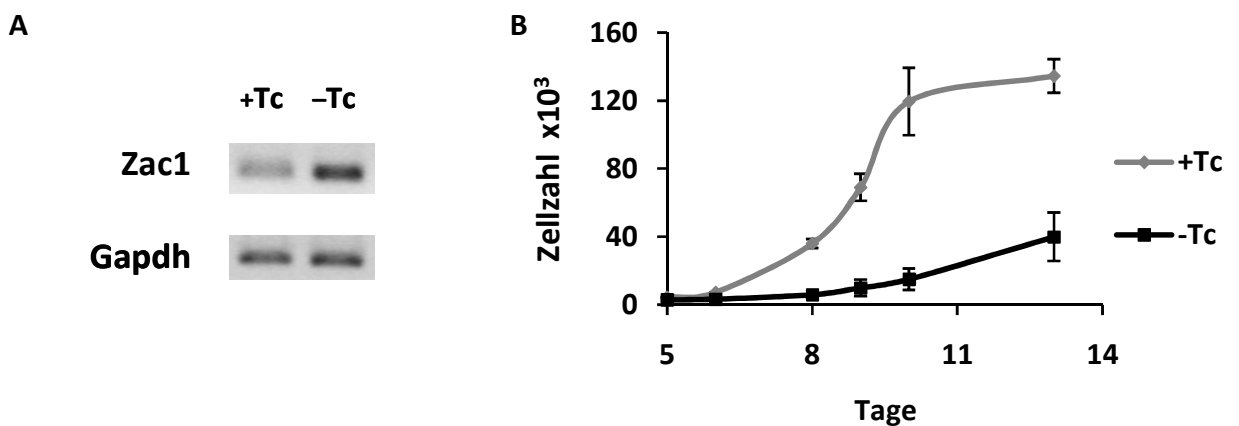


Abb. 7: Klon mit induzierbarer Zac1-Expression in der murinen NSC Zelllinie C17.2

- (A) RT-PCR zeigte erhöhte Zac1-Expression in Abwesenheit von Tetrazyklin (Tc) im Zellkulturmedium
 (B) Wachstumskurven in An- oder Abwesenheit von Tetrazyklin (Tc) wiesen geringere Zellzahl infolge induzierter Zac1-Expression auf. Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Balken, SA.

In Anwesenheit von Tetrazyklin (Tc) zeigte der C17.2 Zellklon geringe Zac1-Expression, die nach Induktion der ektopischen Expression durch Entfernung von Tetrazyklin aus dem Zellkulturmedium anstieg (**Abb. 7 A**). Die Auswirkung der Zac1-Überexpression auf die Zellproliferation wurde in An- oder Abwesenheit von Tetrazyklin bestimmt. Dabei führte die

ektopische Zac1-Expression zu einer Abnahme der Zellzahlen, die am Tag 10 einen 7-fachen Unterschied gegenüber tetrazyklinbehandelten Zellen aufwies (**Abb. 7 B**).

3.1.1 Expression von Socs3 nach Zac1-Induktion

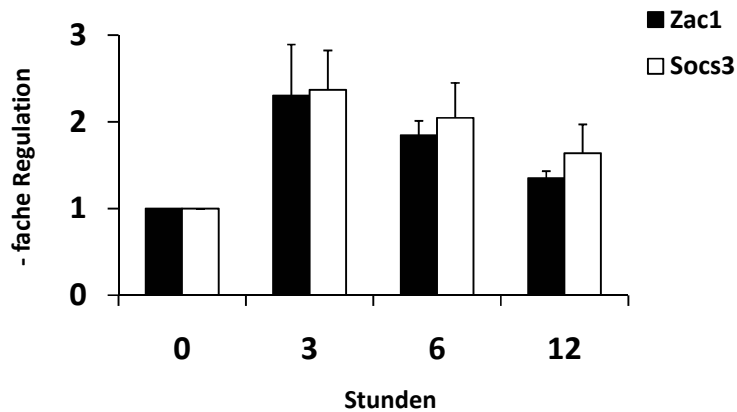


Abb. 8: Zeitliche Expressionsanalyse des Zac1-induzierbaren C17.2 Zellklones

Induktion von Zac1 zu verschiedenen Zeitpunkten erhöht Socs3-Expression. Werte der qRT-PCR normalisiert auf β -Aktin-Expression. Regulation bezogen auf tetrazyklinbehandelte Zellen. Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt als Duplikat. Balken, SA.

Die Expressionsanalyse des C17.2 Zellklones erfolgte mit Methoden der quantitativen PCR (**Abb. 8**) und Immunoblot (**Abb. 9**) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion von Zac1. Dabei zeigte sich, dass bereits nach 3 Stunden eine 2-fach erhöhte Zac1-Expression induziert wurde, die gleichzeitig zu Änderungen in der Socs3-mRNA und auf Ebene der Proteinexpression führten.

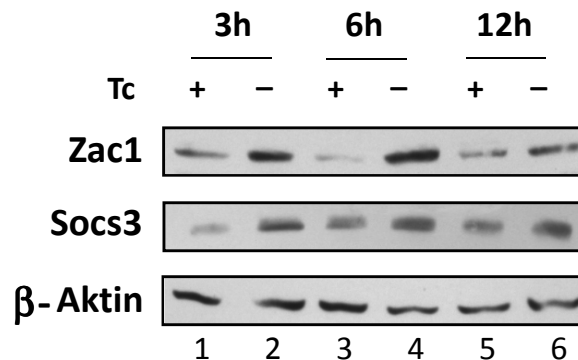


Abb. 9: Immunoblot der Tetrazyklin (Tc) induzierten Expression von Zac1 und Socs3

Zac1 Induktion erhöht Socs3-Expression. Auftragung von 70 μ g Gesamtzellextrakt (GZE) des Zac1 induzierbaren C17.2 Zellklones. Primäre Antikörper Zac1, Socs3 und β -Aktin.

Um eine mögliche transkriptionelle Aktivierung des *Socs3*-Gens durch Zac1 zu untersuchen, wurde der murine *Socs3*-Promotor auf potentielle Zac1-Bindungsstellen überprüft.

3.2 Potentielle Zac1-Bindungsstellen im *Socs3*-Promotor der Maus

Der Transkriptionsfaktor Zac1 bindet an GC-reiche Palindrome (G_4C_4) oder an direkte und reverse wiederholende ($G_4N_6G_4$)₂ Elemente (Hoffmann et al., 2003). Beide Klassen von DNA-bindenden Motiven konnten mehrfach in der 5'-regulatorischen Region des murinen *Socs3*-Gens identifiziert werden (**Abb. 10**).

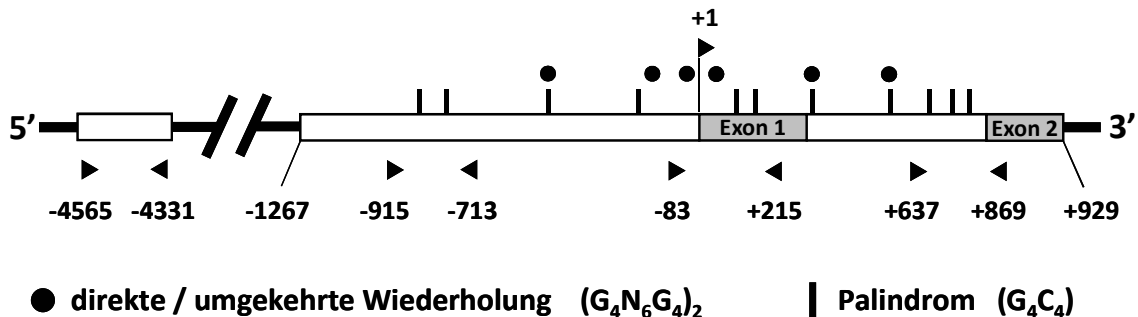


Abb. 10: Muriner *Socs3*-Promotor mit potentiellen Zac1-Bindungsstellen

Schema der 5'-regulatorischen Region des *Socs3*-Gens 2 kb oberhalb der Translationsstartseite im Exon 2. Potentielle DNA-Bindungsstellen von Zac1 an GC-reiche Palindrome (G_4C_4) oder direkte und umgekehrte Wiederholungen ($G_4N_6G_4$)₂ sind markiert. Primer flankierte Regionen im distalen (-4565/-4331), proximalen (-915/-713), Exon 1 (-83/+215) und Intron (+637/+869) Bereich wurden für Analysen durch Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) verwendet. Transkriptionsstartseite ist markiert mit +1.

3.2.1 Zac1-Transaktivierung des *Socs3*-Promotors

Zum Nachweis der Transaktivierung des *Socs3*-Promotors durch Zac1 wurden Luciferase-Reporter-Assays in C17.2 Zellen durchgeführt (**Abb. 11 A**). Dazu wurde ein Reporter-Plasmid mit 2 kb (-1267/+929) der 5'-regulatorischen Region oberhalb der Translationsstartseite des *Socs3*-Gens (+946) verwendet (Auernhammer et al., 1999). Neben der Kotransfektion von Expressions-plasmiden, die Wildtyp-Zac1 kodieren, wurden verschiedene Zac1-Mutanten zur Aufklärung der zugrunde liegenden regulatorischen Mechanismen eingesetzt. Die Expression der verschiedenen Zac1-Expressionsplasmide wurde in Kontrollexperimenten durch

Immunoblot überprüft und anschließend durch densitometrische Auswertung der Banden angepasst (**Abb. 11 B**).

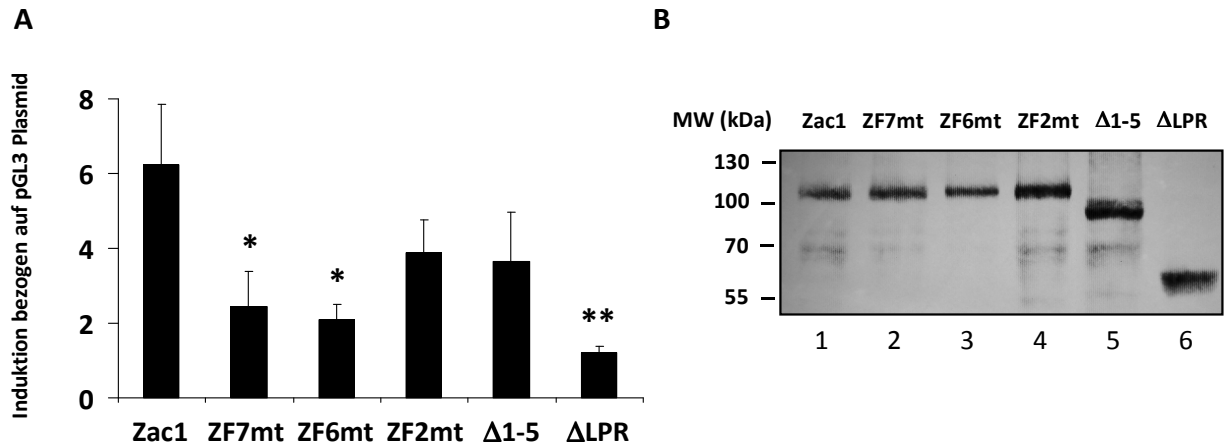


Abb. 11: Reporter-Assays mit *Socs3*-Promotor-Plasmid in C17.2 Zellen

- (A) Wildtyp oder mutierte Zac1-Expressionsplasmide (100 ng) wurden mit 2 kb *Socs3*-Promotor-Plasmid (200 ng) kotransfiziert. Luciferaseaktivität normalisiert auf β -Galactosidase-Aktivität. Cystein-Alanin Aminosäureaustauschmutanten der Zinkfinger (ZF); Deletion der ZF 1 bis 5 (Δ 1-5) sowie der Transaktivierungsdomäne (Δ LPR). Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten. Student-t-Test; n=4; * $P > 0.05$; ** $P > 0.01$; Balken, SA.
- (B) Immunoblot (70 μ g GZE) der verschiedenen Expression der Zac1-Plasmide (je 100 ng). Polyklonaler Zac1-Antikörper detektiert durch HRP-Konjugate und Chemolumineszenz.

Die Luciferaseaktivität des *Socs3*-Promotorplasmides ergab nach Kotransfektion von Zac1 eine 6-fache Induktion, was eine Transaktivierung durch Zac1 nahelegte. Der Transkriptionsfaktor Zac1 fungiert einerseits als sequenzspezifischer DNA-bindender Faktor und andererseits als Koregulator durch Interaktion mit verschiedenen sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren (Hoffmann und Spengler, 2008). Um zwischen diesen Funktionen zu unterscheiden, wurde eine Zac1-Mutante mit fehlender Transaktivierungsdomäne (Δ LPR) verwendet. Aufgrund des kompletten Verlustes der Reporteraktivität zeigte sich, dass die Transaktivierungsdomäne für die Regulation des *Socs3*-Promotors notwendig ist. Damit konnte eine indirekte Regulierung des *Socs3*-Promotors durch eine mögliche Funktion von Zac1 als Koaktivator ausgeschlossen werden.

Für die Rolle als Transaktivator mit einhergehender DNA-Bindung sind darüber hinaus die Zinkfinger 6 und 7 (ZF6 und ZF7) notwendig (Hoffmann et al., 2003). Es wurden gebrochene

Zinkfinger-Mutanten verwendet, die durch Austausch des ersten Cysteins mit Alanin zur Zerstörung der zinkabhängigen tetraedrischen Koordination der Zinkfingerstruktur führten (Hoffmann et al., 2003). Die Reporteraktivität der zur DNA-Bindung untauglichen Mutanten ZF6mt oder ZF7mt war im Vergleich zum Wildtyp um zwei Drittel verringert, wobei ZF6mt einen stärkeren Effekt zeigte.

Weiterhin sollte der Einsatz von Expressionsplasmiden mit einer Mutation des zweiten Zinkfingers (ZF2mt) bzw. der Deletion der ersten fünf Zinkfinger ($\Delta 1-5$) Aufschluss über das bevorzugte DNA-Bindungsmotiv von Zac1 am *Socs3*-Promotor geben. Der Zinkfinger 2 besitzt eine kritische Funktion für die Ausbildung von Zac1-Dimeren und die damit verbundene Transaktivierung von direkten und umgekehrt wiederholenden $(G_4N_6G_4)_2$ Elementen (Hoffmann et al., 2003). Die Expressionsplasmide mit gebrochenem Zinkfingermotiv des ZF2mt oder der Deletionsmutante $\Delta 1-5$ zeigten eine um die Hälfte verringerte Reporteraktivität. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass die Transaktivierung des *Socs3*-Promotors durch beide Klassen von Zac1-Bindungsmotiven erfolgt.

3.2.2 Überexpression von Zac1

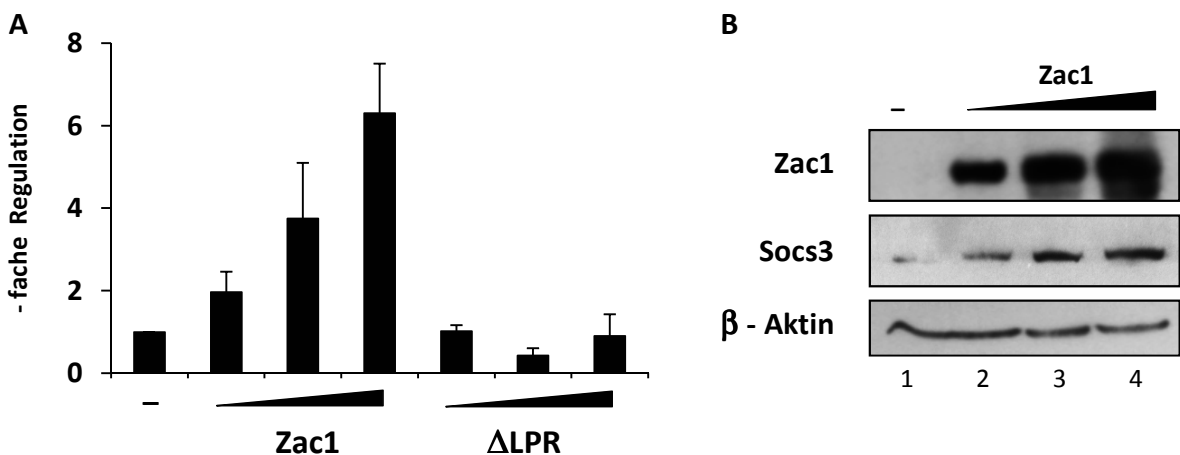


Abb. 12: Zac1-Transaktivierung ist notwendig für Regulation des *Socs3*-Gens

- (A) qRT-PCR nach Transfektion mit Wildtyp- oder mutierten Zac1-Expressionsplasmiden (10 ng, 50 ng und 100 ng) zeigte gegenüber pAM-Plasmid (Träger-DNA) transfizierten Zellen (-) eine von der Transaktivierungsdomäne LPR abhängige Regulation des *Socs3*-Gens. Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Balken, SA.
- (B) Immunoblot (70 μ g GZE) von transfizierten Zac1 (10 ng, 50 ng und 100 ng) zeigt Anstieg der *Socs3*-Expression. Primäre Antikörper Zac1, *Socs3* und β -Aktin detektiert durch HRP-Konjugate und Chemolumineszenz.

Für den Nachweis der transkriptionellen Aktivierung des *Socs3*-Gens durch Zac1 wurden Transfektionsexperimente durchgeführt. Diese zeigten, dass mit ansteigender Menge von transfizierten Zac1 ein Anstieg der *Socs3*-Expression auftrat, während hingegen ansteigende Mengen der transaktivierungsdefizienten Mutante (Δ LPR) keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung von *Socs3* hatten (**Abb. 12 A**). Darüber hinaus zeigten Immunoblots eine Zunahme der *Socs3*-Proteinspiegel mit ansteigender Menge an transfizierten Zac1 (**Abb. 12 B**).

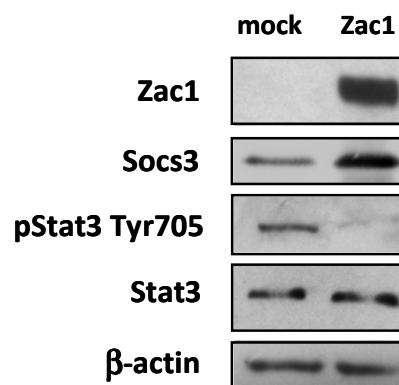


Abb. 13: Regulation der Stat3-Phosphorylierung (Tyr-705) nach Überexpression von Zac1 in C17.2 Zellen

Immunoblot (70 μ g GZE) nach Transfektion von Zac1 (100 ng). Primäre Antikörper Zac1, Socs3, Stat3, pStat3 (Tyr-705) und β -Aktin detektiert durch HRP-Konjugate und Chemolumineszenz.

Um die Auswirkung einer Zac1-abhängigen Induktion von Socs3 zu untersuchen, wurden Immunoblots mit einem Antikörper angefertigt, welcher das phosphorylierte Stat3-Epitop Tyr-705 erkennt. Dieser Aminosäurerest des Stat3-Proteins ist mitentscheidend für die Aktivierung von Stat3 durch bestimmte Rezeptor-Tyrosinkinasen – den Janus Kinasen (Ihle, 1995; Kaptein et al., 1996). Die Kinaseaktivität der Janus-Kinasen wird durch Socs3 inhibiert (Boyle et al., 2009; Starr et al., 1997; Yoshimura, 1998).

Mit einem Zac1-abhängigen Anstieg der Socs3-Expression nahm die Immunoreaktivität für das phosphorylierte Stat3-Epitop Tyr-705 ab (**Abb. 13**). Als Kontrolle diente ein Antikörper gegen das Stat3-Gesamtprotein, der infolge der Zac1-Überexpression keine Veränderung aufzeigte.

3.2.3 Zac1-Bindung am murinen *Socs3*-Promotor

Zur Überprüfung der potentiellen Zac1-Bindungsstellen am *Socs3*-Promotor wurden Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Experimente durchgeführt. Dazu wurden Bereiche im proximalen Promotorabschnitt, Exon 1 und Intron der 5'-regulatorischen Region oberhalb der Translationsstartseite des *Socs3*-Gens untersucht. Als Kontrolle diente ein Primerpaar im distalen Abschnitt des *Socs3*-Promotors, das 4,5 kb oberhalb der Startseite der Translation lokalisiert ist und einen Abschnitt umfasst, der keine Zac1-DNA-Bindungsmotive besitzt (**Abb. 10**).

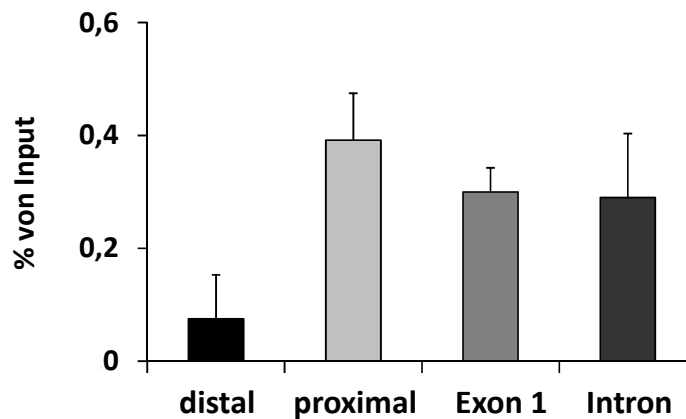


Abb. 14: ChIP von endogenen Zac1 in C17.2 Zellen

Primer flankierte Bereiche im distalen (-4565/-4331), proximalen (-915/-713), Exon 1 (-83/+215) und Intron (+637/+869) der 5'-regulatorischen Region oberhalb der Translationsstartseite des *Socs3* Gens. Berechnung der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) von Zac1 in Prozent relativ zum Wert der eingesetzten DNA-Menge (Input = 1%), korrigiert um die Immunglobulin-Kontrolle (ChIP ohne Antikörper). Das distale Primerpaar diente als Negativ-Kontrolle der Zac1-Bindung. Mittelwert aus drei Experimenten. Balken, SA

ChIP-Experimente für endogenes Zac1 ergaben eine gleichmäßige Bindung an den proximalen, exonischen und intronischen Abschnitt des *Socs3*-Promotors. Der Zac1 Antikörper präzipitierte 0,3-0,4 % der eingesetzten Menge an DNA (Input = 1 %) als *Socs3*-Promotor gebundenes Zac1-Protein (**Abb. 14**). Ein distales Primerpaar diente als Negativ-Kontrolle der Zac1-Bindung und wies weniger als 0,1 % an immunopräzipitierter DNA bezogen auf den Input auf.

In einem zweiten ChIP-Experiment wurden Wildtyp- oder mutiertes Zac1 transfiziert. Es wurden Zac1-DNA-Bindungsmutanten mit einer Deletion der ersten fünf Zinkfinger ($\Delta 1-5$)

bzw. einem gebrochenen Zinkfinger 7 (ZF7mt) eingesetzt (**Abb. 15**). Die Überexpression von Wildtyp-Zac1 zeigte eine bevorzugte Anreicherung in den bindungsaktiven Abschnitten. Die Zac1-Mutante $\Delta 1-5$ wies ein annähernd gleiches Bindungsverhalten wie Wildtyp-Zac1 auf und reflektierte damit im Gegensatz zur Transfektion von ZF7mt eine ungestörte DNA-Bindungsfähigkeit durch die Zinkfinger 6 und 7 (Hoffmann et al., 2003). Im distalen Bereich wurde nach Überexpression von Zac1 erwartungsgemäß keine Anreicherung von immunopräzipitierter DNA festgestellt, was somit die Spezifität der Zac1-Bindung am Socs3-Promotor bestätigt.

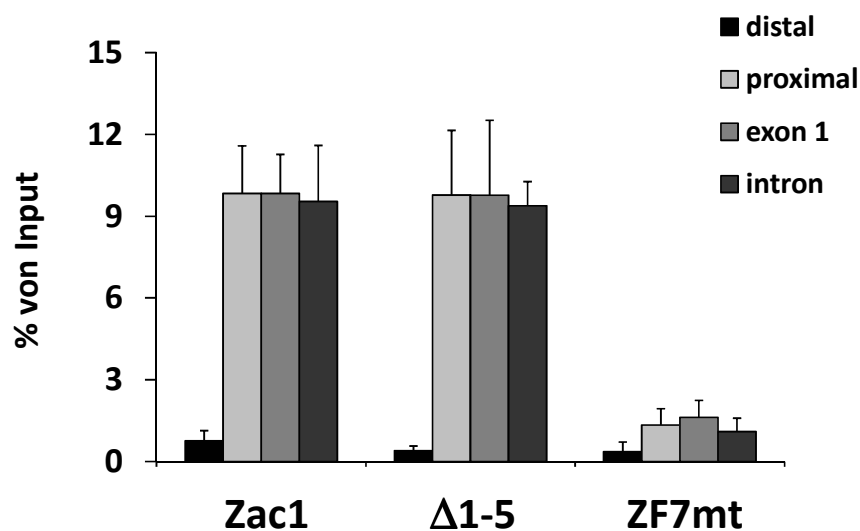


Abb. 15: ChIP nach Überexpression von Zac1 in C17.2 Zellen

Primer flankierte Bereiche im distalen (-4565/-4331), proximalen (-915/-713), Exon 1 (-83/+215) und Intron (+637/+869) der 5'-regulatorischen Region oberhalb der Translationsstartseite des Socs3 Gens. Transfektion von Wildtyp oder mutierten Zac1-Expressionsplasmiden (je 100 ng). Wert von Zac1 in Prozent relativ zum Input (1 %), korrigiert um die Immunglobulin-Kontrolle. Das distale Primerpaar diente als Negativ-Kontrolle der Zac1-Bindung. Mittelwert aus drei Experimenten. Balken, SA

Zur Überprüfung, ob die untersuchten 5'-regulatorischen Regionen *per se* zur transkriptionellen Aktivierung von Socs3 durch Zac1 fähig sind, wurden Reporter-Assays mit verschiedenen Socs3-Promotor-Reporterplasmiden durchgeführt (**Abb. 16**). Hierzu wurden vom 2 kb umfassenden Socs3-Promotor-Reporterplasmid zwei verkürzte Konstrukte hergestellt, welche die Primer flankierten Bereiche des Exon 1 und Intron (1,5 kb) oder nur das Intron (0,7 kb) beinhalteten. Die Reporteraktivität der einzelnen Konstrukte mit kotransfizierten Zac1 ergab eine 6-fache Induktion für das 2 kb umfassende Konstrukt und

eine 5- bzw. 3-fache Induktion für die verkürzten Konstrukte mit einer Länge von 1,5 kb und 0,7 kb. Als Kontrolle diente das pGL3-Plasmid ohne den *Socs3*-Promotor, welches durch Zac1 nicht reguliert wurde.

Somit trägt die Zac1-Bindung an alle drei Bereiche (Promotor, Exon und Intron) zur transkriptionellen Aktivierung des *Socs3*-Promotors bei. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Bindung von Zac1 an mehrere Abschnitte des *Socs3*-Gens zu einer verstärkten Aktivierung des Reporters führte.

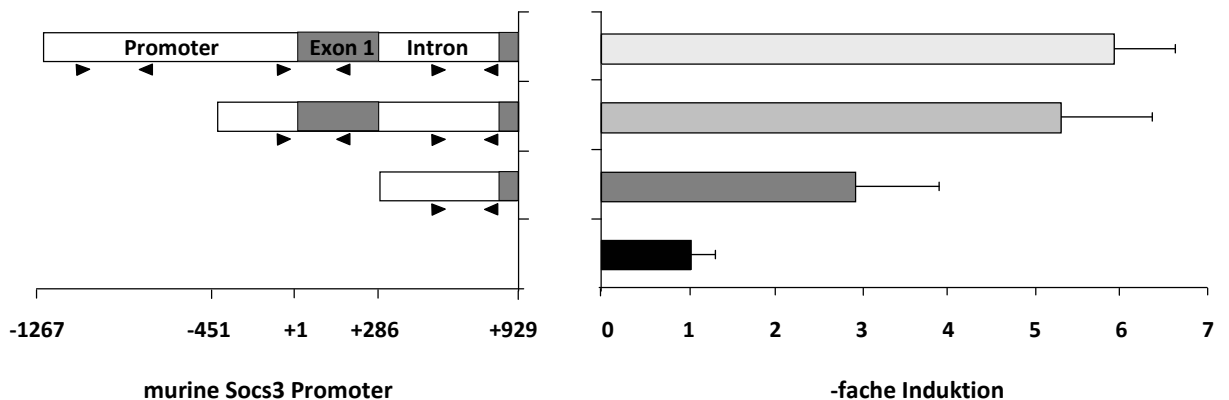


Abb. 16: Deletionsanalyse von *Socs3*-Promotorplasmiden in C17.2 Zellen

Induktion der 2 kb, 1,5 kb und 0,7 kb *Socs3*-Promotorplasmide bzw. dem pGL3-Plasmid (je 200 ng) nach Kotransfektion von Zac1-Expressionsplasmid (100 ng). Luziferaseaktivität normalisiert auf β -Galactosidase-Expression. Mittelwert aus drei Experimenten durchgeführt in Duplikat. Balken, SA.

3.3 ZAC1 reguliert humanes SOCS3

Der humane *SOCS3*-Promotor ist weitgehend zwischen Maus und Mensch konserviert (He et al., 2003). Daher stellte sich die Frage, ob die in der Maus gewonnenen Erkenntnisse einer Zac1 vermittelten Regulation von *Socs3* auch auf das humane *SOCS3*-Gen übertragbar sind. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die humane neuroektodermale Tumorzelllinie SK-N-MC (Biedler et al., 1973) verwendet, die sowohl ZAC1 als auch SOCS3 exprimiert. Eine zusätzliche Transfektion von ZAC1 führte zu einer gesteigerten Expression von SOCS3 auf mRNA- und Proteinebene (**Abb. 17**). Dies spiegelte sich zudem in einer Abnahme der Immunoreaktivität des phosphorylierten Stat3-Epitop Tyr-705 wieder (**Abb. 17 B**).

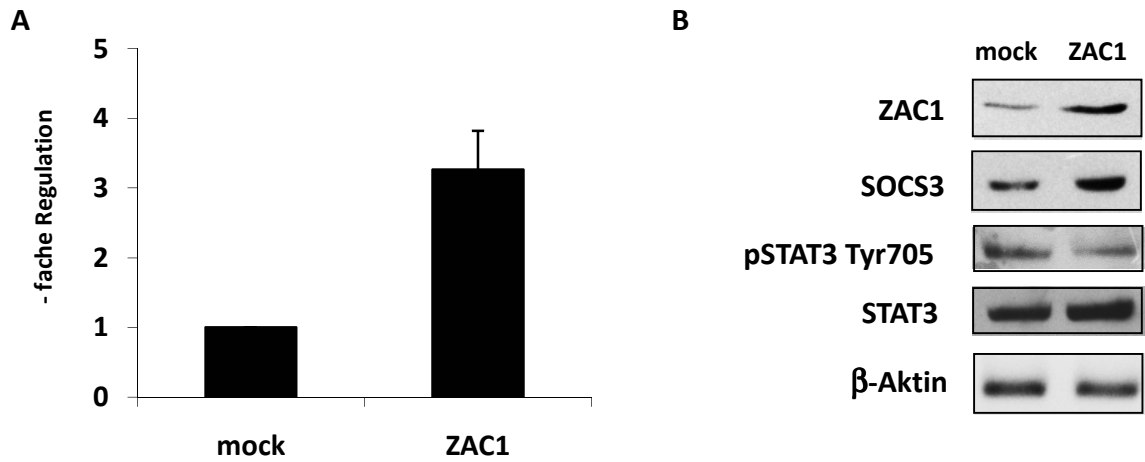


Abb. 17: Überexpression von ZAC1 in SK-N-MC Zellen

- (A) qRT-PCR von transfizierten humanen ZAC1-Expressionsplasmid (100 ng) zeigt 3-fachen Anstieg bezogen auf pAM-Plasmid transfizierte Zellen. Mittelwert aus drei Experimenten. Balken, SA.
- (B) Immunoblot (70 µg GZE) von ZAC1 (100 ng) transfizierten SK-N-MC Zellen. Primäre Antikörper ZAC1, SOCS3, Stat3, pStat3 (Tyr-705) und β-Aktin.

Für Reporter-Assays wurde ein 1,7 kb umfassendes humanes *SOCS3* Promotor-Konstrukt verwendet (Matthews et al., 2005). Die Zunahme der Luziferaseaktivität mit ansteigenden Mengen an kotransfizierten ZAC1 demonstrierte die Transaktivierung des menschlichen *SOCS3*-Promotors in SK-N-MC Zellen (**Abb.: 18**).

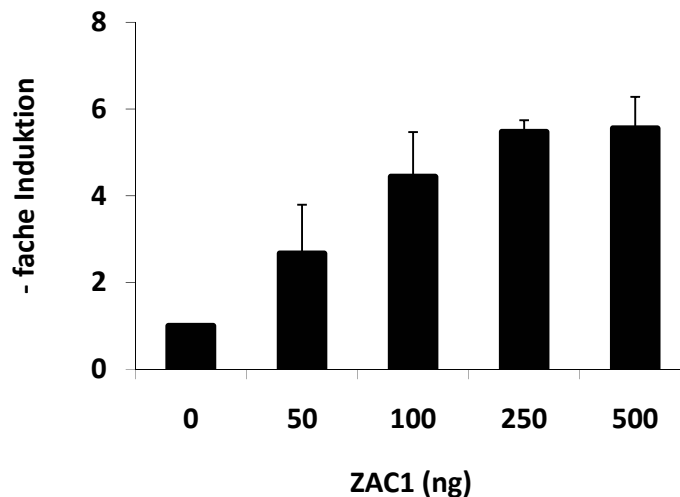


Abb. 18: Reporter-Assays mit humanen *SOCS3*-Promotorplasmid in SK-N-MC Zellen

- Kotransfektion von ZAC1-Expressionsplasmid mit 1,7 kb *SOCS3*-Promotorplasmid (200 ng). Luziferaseaktivität normalisiert auf β-Galactosidase-Expression. Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten. Balken, SA.

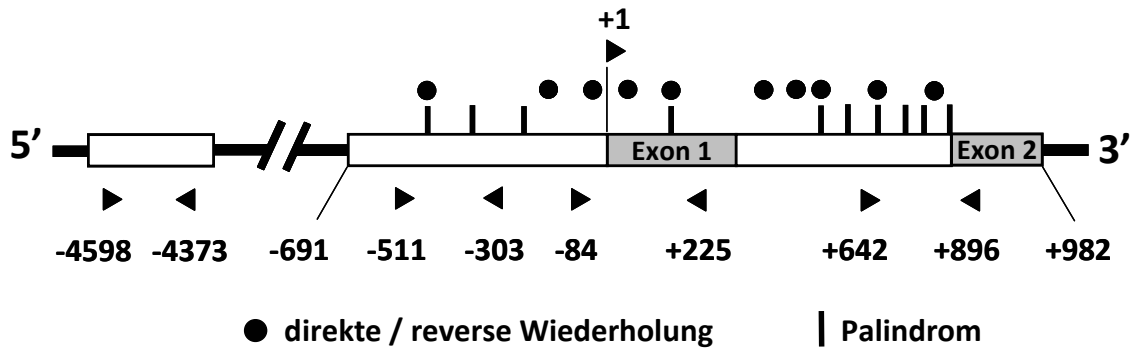


Abb. 19: Humaner SOCS3-Promotor mit potentiellen ZAC1-Bindungsstellen

Schema der 5'-regulatorischen Region des *SOCS3*-Gens 1,7 kb oberhalb der Translationsstartseite im Exon 2. Potentielle ZAC1 DNA-Bindungsmotive sind dargestellt. GC-reiche Palindrome (G_4C_4) und direkte reverse Wiederholungen ($(G_4N_6G_4)_2$) sind angezeigt. Die Primer flankierten Abschnitte im distalen Bereich (-4598/-4373), im proximalen Promotor (-511/-303), Exon 1 (-84/+225) und Intron (+642/+896) wurden in Chromatin-Immunoprecipitationsexperimenten (ChIP) verwendet.

Es wurden ChIP-Experimente zur Identifikation potentieller DNA-Bindungsstellen von ZAC1 am *SOCS3*-Promotor durchgeführt. Diese waren teilweise zwischen Maus und Mensch konserviert (**Abb. 19**). Trotz der bereits hohen endogenen Promotorbindung konnte durch Überexpression eine weitere Anreicherung von Promotor gebundenen ZAC1 erzielt werden (**Abb. 20**). Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse in SK-N-MC Zellen, dass ZAC1 zur Regulation des humanen *SOCS3*-Gens beiträgt.

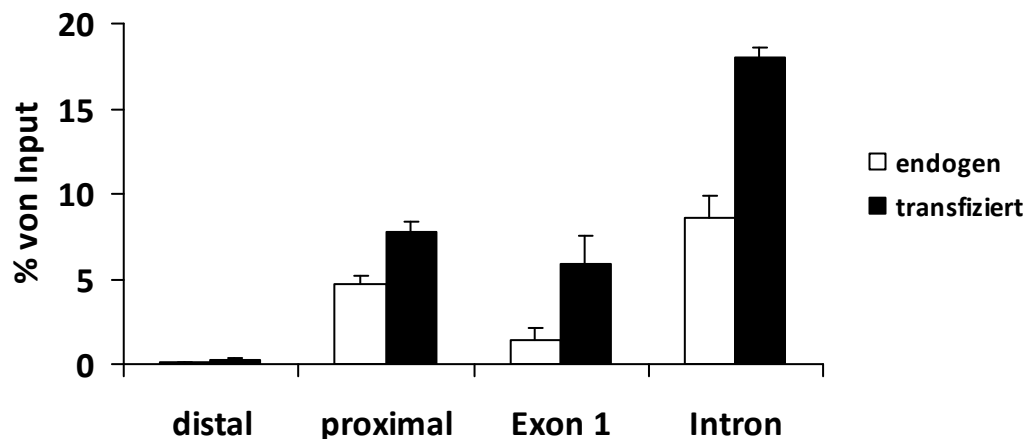


Abb. 20: ChIP-Assays von endogenen und transfizierten ZAC1 in SK-N-MC Zellen

Primer flankierte Abschnitte im distalen Bereiche (-4598/-4373), im proximalen Promotor (-511/-303), Exon 1 (-84/+225) und Intron (+642/+896) des humanen *SOCS3*-Gens zeigten Bindung von endogenen und überexprimierten (100 ng) ZAC1. Anreicherung von ZAC1 in Prozent relativ zum Input (1 %), korrigiert um die Immunglobulin-Kontrolle. Das distale Primerpaar diente als Negativ-Kontrolle der ZAC1-Bindung. Mittelwert aus drei Experimenten. Balken, SA

3.4 Differenzierung von Stammzellen als biologisches Modell

Frühere Studien haben gezeigt, dass Zac1 während der Entwicklung des murinen Nervensystems insbesondere in proliferativen Bereichen des Gehirnes, wie dem embryonalen Neuroepithelium und der im Entwicklungsverlauf später entstehenden subventrikulären Zone (SVZ), vorzufinden ist (Alam et al., 2005; Valente und Auladell, 2001; Valente et al., 2005). Die immunhistologischen Untersuchungen demonstrierten zudem eine Zac1-Expression in neuralen Stamm- und Vorläuferzellen vorwiegend während des proliferativen Zykluses vor dem Eintritt in einen Differenzierungsprozess zu postmitotischen Zellen. Dies deutet auf eine mögliche Rolle von Zac1 in der Kontrolle von Zellschicksalsentscheidungen hin (Valente und Auladell, 2001). Um in diesem Zusammenhang die Bedeutung einer durch Zac1 vermittelten *Socs3*-Expression zu untersuchen, wurde die Differenzierung der etablierten neuralen Stammzelllinien NS-5 (Conti et al., 2005) und O4ANS (Pollard et al., 2006) als biologisches Modell verwendet.

3.4.1 Charakterisierung der Stammzell-Modelle

Diese beiden Stammzelllinien weisen einen radialglialen Phänotyp auf und spiegeln die unterschiedlichen Entwicklungsstadien von embryonalen (NS-5) und adulten (O4ANS) neuralen Stammzellen wieder. Sie besitzen die für NSC typische Eigenschaft zur Multipotenz – der Differenzierung in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten (Glaser et al., 2007) – und sind darüber hinaus zur Transplantation ins adulte Gehirn geeignet (Conti et al., 2005). Hervorzuheben ist die immanente Fähigkeit dieser Stammzelllinien zur stabilen klonalen Selbsterneuerung ohne gerichtete Immortalisierung wie in der neuralen Stammzelllinie C17.2. Damit ermöglichen sie im Gegensatz zu den C17.2 Zellen die Untersuchung von *Socs3* während der Differenzierung und Zellzyklusregulation im Kontext biologisch relevanter Zellmodelle.

Die Differenzierung der in Zellkultur adhärent wachsenden neuralen Stammzelllinien NS-5 und O4ANS erfolgte anhand etablierter Protokolle für neuronale und astrogliale Zellschicksalsentscheidungen (Conti et al., 2005; Pollard et al., 2006). Zur Veranschaulichung

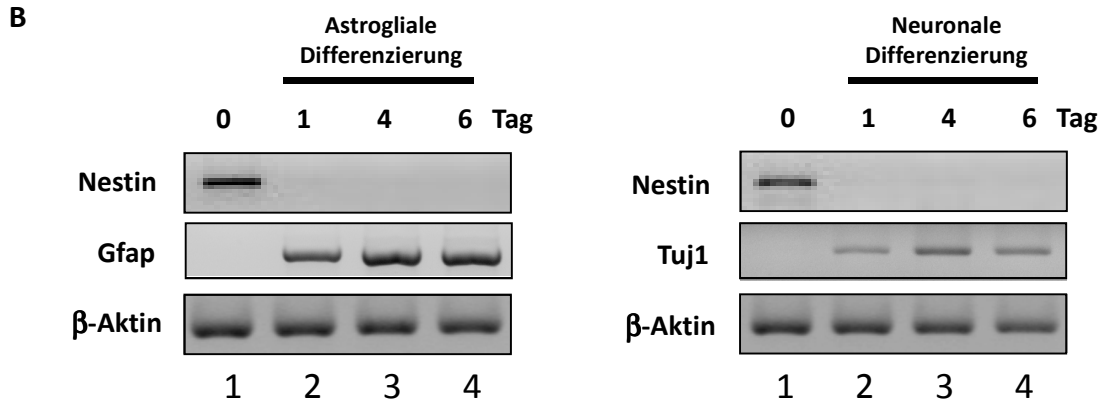


Abb. 22: Charakterisierung der neuralen Stammzelllinien NS-5 und O4ANS während der Differenzierung

Zeitabhängige RNA-Expressionsanalyse des Stammzellmarkers Nestin, des neuronalen Markers Tuj1 und des astroglialen Markers Gfap während der Differenzierung. Als Expressionskontrolle wurde β -Aktin verwendet.

(A) Embryonale neurale Stammzelllinie NS-5 mit neuronaler und astroglialer Differenzierung

(B) Adulte neurale Stammzelllinie O4ANS mit neuronaler und astroglialer Differenzierung

Hervorzuheben ist hierbei, dass die neuralen Stammzelllinien NS-5 und O4ANS einen radialglialen Phänotyp aufweisen (Conti et al., 2005; Pollard et al., 2006; Schnitzer et al., 1981). Im Gegensatz zu Radialgliazellen des Menschen und der Primaten, exprimieren radialgliale Zellen von Nagern (Rodentia) nicht den Marker Gfap (Doetsch et al., 1999).

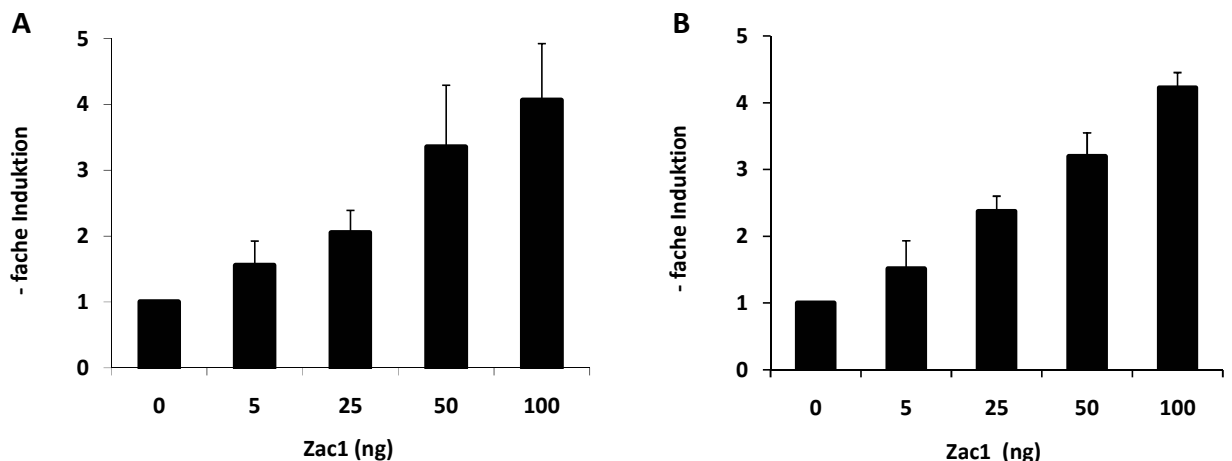


Abb. 23: Reporter-Assays von 2 kb *Socs3*-Promotorplasmid in den neuralen Stammzelllinien NS-5 und O4ANS

Kotransfektion von verschiedenen Mengen an Zac1-Expressionsplasmid mit 2 kb *Socs3*-Promotor-Plasmid (200 ng) in der undifferenzierten embryonalen neuralen Stammzelllinie NS-5 (A) und adulten neuralen Stammzelllinie O4ANS (B). Luziferaseaktivität normalisiert auf β -Galactosidase-Expression. Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten. Balken, SA.

Es wurden Reporter-Assays in den beiden Stammzellmodellen durchgeführt, um eine Transaktivierung des *Socs3*-Promotors durch *Zac1* zu überprüfen. Die Ergebnisse zeigten eine *Zac1*-abhängige bis zu 4-fache Induktion der Luziferaseaktivität des 2 kb murinen *Socs3*-Promotor-Konstrukts (**Abb. 23**). Darauf basierend wurde die Expression von *Zac1* und *Socs3* während der astroglialen und neuronalen Differenzierung untersucht.

3.4.2 Embryonale neurale Stammzelllinie NS-5

3.4.2.1 Expressionsanalyse während der Differenzierung

Während beider Linienentscheidungen nahm die Expression von *Zac1* zu, wohingegen *Socs3* nur während der astroglialen Differenzierung verstärkt exprimiert wurde (**Abb. 24**). Die Koexpression von *Zac1* und *Socs3* während der astroglialen Differenzierung zeigte einen graduellen Anstieg bis Tag 4, gefolgt von einer fortschreitenden Abnahme zu späteren Zeitpunkten, was auf eine frühe und temporäre Rolle im astroglialen Differenzierungsprozess hindeutete.

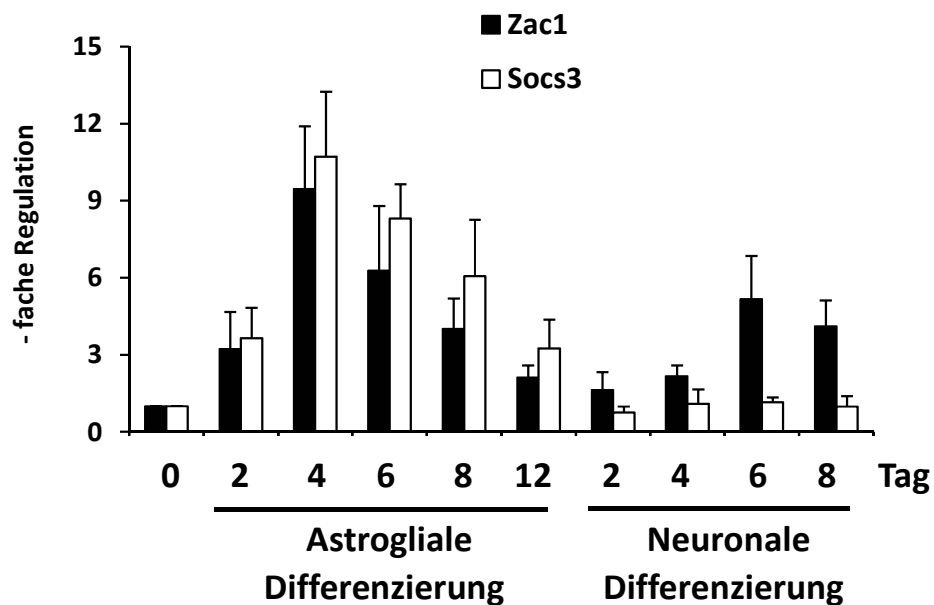


Abb. 24: Expressionsanalyse von *Zac1* und *Socs3* während der neuronalen und astroglialen Differenzierung

Regulation von *Zac1* und *Socs3* zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung von NS-5 Zellen zeigt ausschließlich während astroglialer Linienentscheidung gemeinsam auftretende *Zac1* und *Socs3* mRNA-Expression. Werte normalisiert auf β -Aktin-Expression. Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Balken, SA.

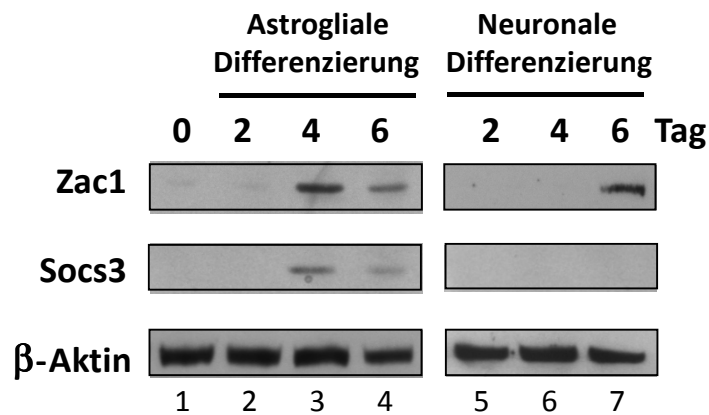


Abb. 25: Immunoblot von Zac1 und Socs3 während der neuronalen und astroglialen Differenzierung

Immunoblot (70 μ g GZE) von differenzierten NS-5 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Primäre Antikörper Zac1, Socs3 und β -Aktin detektiert durch HRP-Konjugate und Chemolumineszenz.

Untersuchungen auf Proteinebene mittels Immunoblot bestätigten die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen und zeigten ausschließlich während der astroglialen Differenzierung eine Expression des Socs3-Proteins. Im Gegensatz dazu war Zac1 während beider Linienentscheidungen exprimiert (**Abb. 25**).

3.4.2.2 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP-Assays)

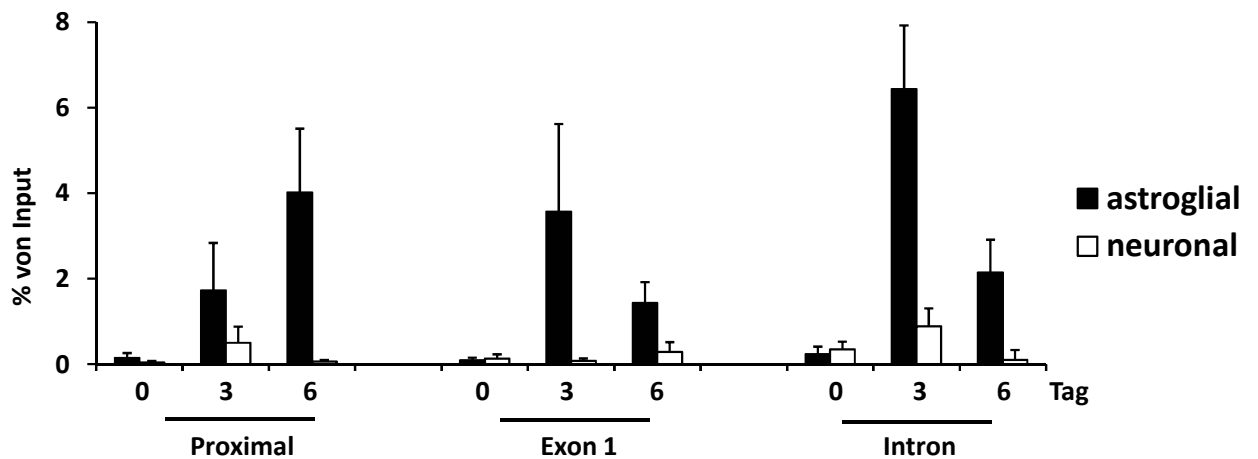


Abb. 26: ChIP von Zac1 in neuronal und astroglial differenzierten NS-5 Zellen

Primer flankierte Abschnitte im proximalen (-915/-713), exonischen (-83/+215) und intronischen (+637/+869) Bereich des murinen *Socs3*-Promotors zeigten Bindung von Zac1 ausschließlich während der astroglialen Differenzierung. Anreicherung von Zac1 in Prozent relativ zum Input (1 %), korrigiert um die Immunglobulin-Kontrolle. Mittelwert aus drei Experimenten. Balken, SA

Für die Überprüfung einer linienspezifischen DNA-Bindung von Zac1 am *Socs3*-Promotor wurden ChIP-Experimente in NS-5 Zellen während der neuronalen und astroglialen Differenzierung durchgeführt (**Abb. 26**). Die Resultate bestätigten eine ausschließliche Bindung von Zac1 an den *Socs3*-Promotor während der astroglialen Linienentscheidung innerhalb der drei untersuchten 5'-regulatorischen Abschnitte. Die Annahme einer transienten Regulation des *Socs3*-Gens während der astroglialen Differenzierung wurde durch die ChIP-Daten für den proximalen Bereich, im Exon1 und Intron des *Socs3*-Promotors unterstützt.

3.4.2.3 Immunocytochemische Färbung

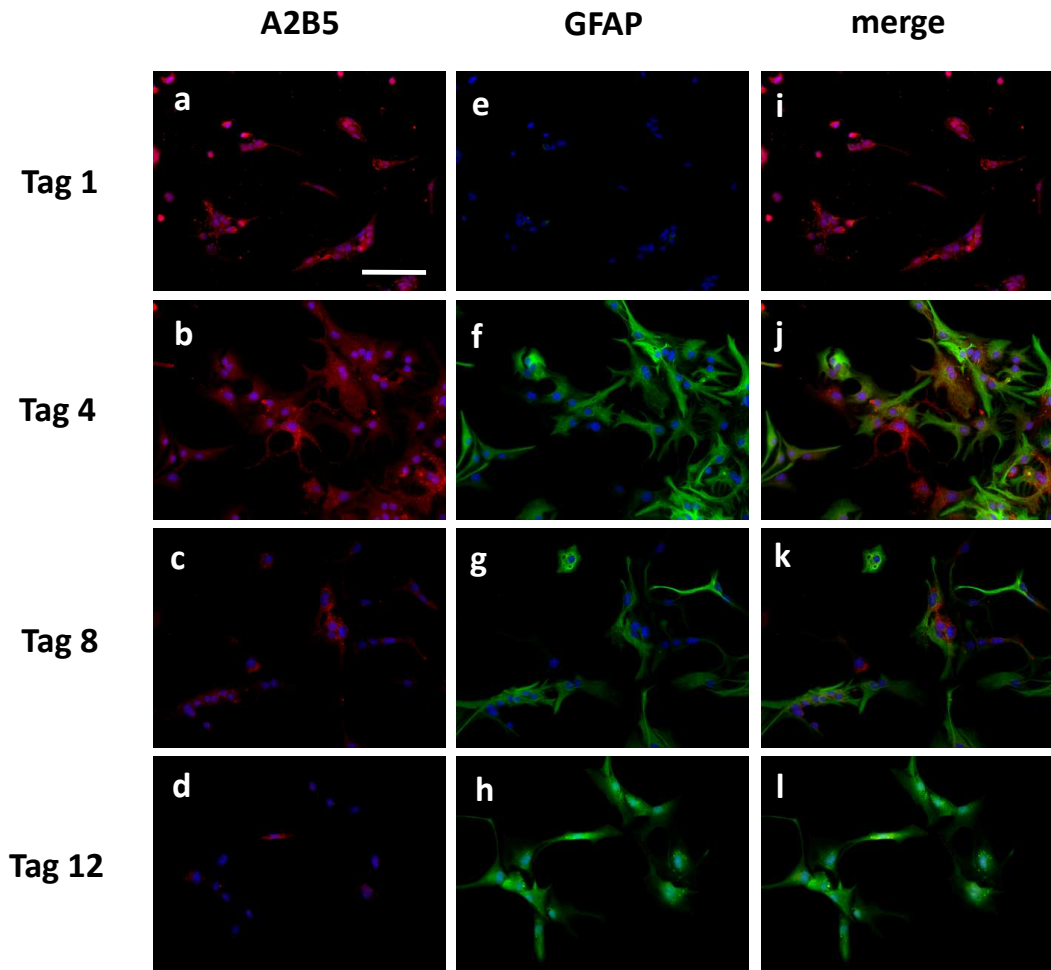


Abb. 27: Immunofluoreszenzfärbung glialer Marker in astroglial differenzierten embryonalen NS-5 Zellen

Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und gefärbt durch indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen (a-d) A2B5 [Abcam] verdünnt 1:100; (e-h) GFAP [Dako] verdünnt 1:1000; (i-l) merge, Bildzusammenführung. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:5000) gefärbt. Alle Bilder wurden unter Verwendung identischer Laserleistung und Verstärkung angefertigt. Balken, Maßstab 40 µm

Für Immunfluoreszenzanalysen der embryonalen neuralen Stammzelllinie NS-5 wurdenentwicklungsspezifische Marker der astroglialen Differenzierung eingesetzt (**Abb. 27**), die zur zellspezifischen Lokalisation der frühen und transienten Zac1-vermittelten Socs3-Expression während der astroglialen Zelllinienentscheidung dienten (**Abb. 28**). Zur Markierung unreifer Gliazellen wurde der A2B5-Antikörper verwendet, der ein in astroglialen Vorläuferzellen membrangebundenes Trisialinsäure-Epitop detektiert (Eisenbarth et al., 1979; Saito et al., 2001). Der Marker A2B5 ist im Zusammenhang mit astroglialen Vorläuferzellen beschrieben worden (Cai et al., 2004; Cai et al., 2002; Rao und Mayer-Proschel, 1997; Wu et al., 2002). Die Detektion der reifen Astrozyten erfolgte anhand eines Antikörpers, der gegen das Intermediärfilament GFAP gerichtet ist (Raff et al., 1979).

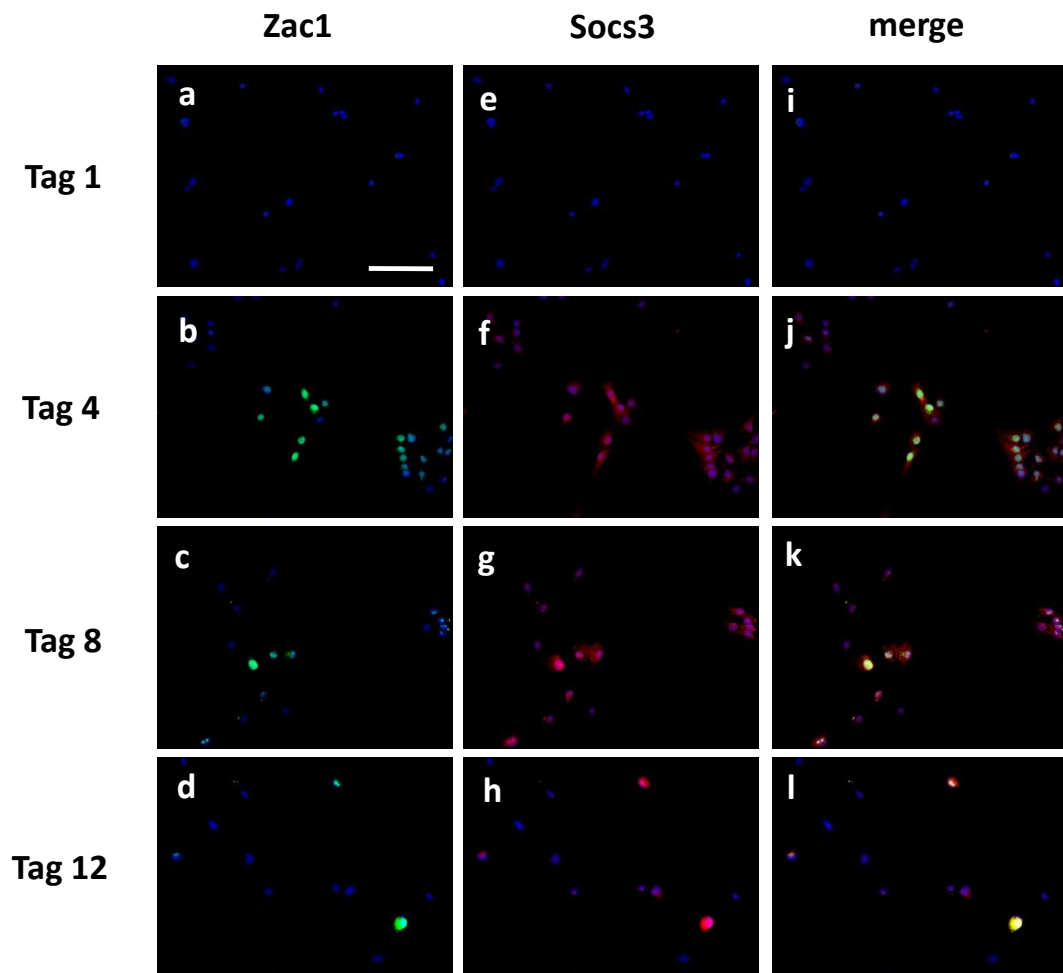


Abb. 28: Immunofluoreszenz von Zac1 und Socs3 während astroglialer Differenzierung in NS-5 Zellen

Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und gefärbt durch indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen (a-d) Zac1 [selbst generiert] verdünnt 1:1000; (e-h) Socs3 [Abcam] verdünnt 1:500; (i-l) merge, Bildzusammenführung. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:5000) gefärbt. Alle Bilder wurden unter Verwendung identischer Laserleistung und Verstärkung angefertigt. Balken, Maßstab 40 μm

In der frühen Phase der astroglialen Differenzierung (Tag 1) waren alle Zellen für den Marker A2B5 positiv, während die Expression des Markers GFAP fast nicht vorhanden war (**Abb. 27 a, e**). Zac1 und Socs3 wurden zu diesem Zeitpunkt nicht exprimiert (**Abb. 28 a, e**). Der weitere Verlauf war durch die Abnahme des Markers A2B5 und der Zunahme von GFAP-positiven Zellen gekennzeichnet (**Abb. 27 a-h**), was den Übergang von astroglialen Vorläuferzellen zu reifen Astrozyten anzeigte. Während der Reifungsphase traten A2B5 und GFAP doppelt positive Zellen auf (**Abb. 27 j, k**), deren quantitative Auswertung am Tag 4 eine Kolokalisation von 61% +/- 13,6 % ergab (**Abb. 29**).

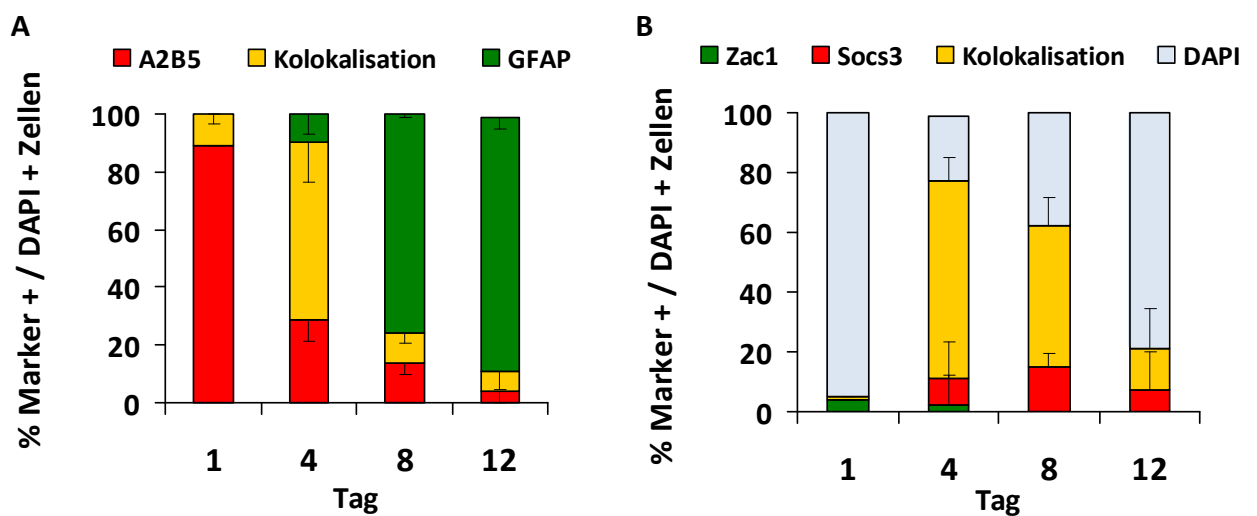


Abb. 29: Quantifizierung der Immunofluoreszenz während astroglialer Differenzierung von NS-5 Zellen

Kalkulation von Antigen-positiven zur Gesamtanzahl an Zellen markiert durch Kernfärbung mit DAPI.

(A) Quantitative-Analyse des Markers für astrogliale Vorläuferzellen A2B5 und des Markers für Astrozyten GFAP. Auswertung von jeweils fünf Bildern pro Differenzierungstag wie in Abb. 27 gezeigt. Balken, SA

(B) Quantitative-Analyse der Antigene Zac1 und Socs3. Auswertung von jeweils fünf Bildern pro Differenzierungstag wie in Abb. 28 gezeigt. Balken, SA

Die Immunofluoreszenzfärbung von Zac1 wies eine Lokalisierung im Zellkern auf, während Socs3 im Zytoplasma und teilweise im Zellkern exprimiert war (**Abb. 28**). In der Tat wurde eine nukleäre Lokalisation von Socs3 neben der zytoplasmatischen beschrieben (Lee et al., 2008). Zac1 und Socs3 waren überwiegend gemeinsam exprimiert und zeigten am Tag 4 ebenso wie die astroglialen Marker A2B5 und GFAP ein Maximum der Kolokalisation von 66% +/- 8,1% (**Abb. 28 j**). Die quantitative Auswertung zu späteren Zeitpunkten offenbarte eine rückläufige Kolokalisation von antigenpositiven Zellen. Für die Überprüfung, ob die

gemeinsam auftretende Zac1 und Socs3 Expression mit A2B5/GFAP doppelt positiven Zellen kolokalisiert, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Zac1 oder Socs3 mit den entwicklungsspezifischen, astroglialen Markern angefertigt (**Abb. 30**). Dabei wurde deutlich, dass am Tag 4 sowohl Zac1 als auch Socs3 mit den Markern A2B5 und GFAP kolokalisiert waren und somit keine Präferenz für einen der beiden glialen Marker zu erkennen war.

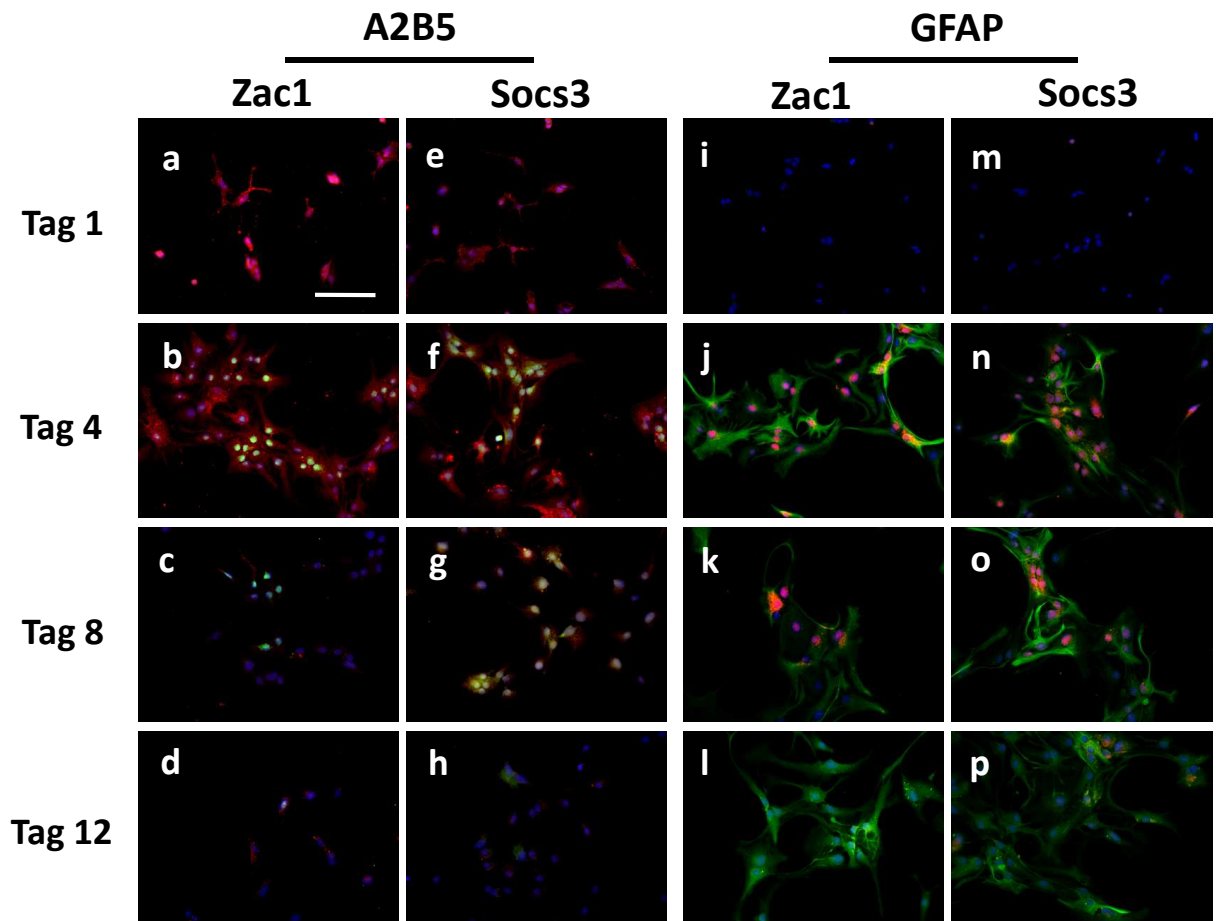


Abb. 30: Immunfluoreszenz von Zac1 und Socs3 mit astroglialen Markern in differenzierten NS-5 Zellen

Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und gefärbt durch indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Zac1 [selbst generiert] verdünnt 1:1000 (**a-d** in grün und **i-l** in rot); Socs3 [Abcam] verdünnt 1:500 (**e-h** in grün und **m-p** in rot); A2B5 [Abcam] verdünnt 1:100 (**a-h** in rot); GFAP [Dako] verdünnt 1:1000 (**i-p** in grün). Zellkerne gefärbt mit DAPI verdünnt 1:5000 (**a-p** in blau). Bilder angefertigt mit identischer Laserleistung und Verstärkung. Balken, Maßstab 40 µm

Zusätzlich wurde die Expression der astroglialen Marker mittels qRT-PCR nachgewiesen. Dabei diente für die Analyse der A2B5-Expression ein zur Bildung des Trisialinsäure-Epitopes benötigtes Enzym. Die Biosynthese des vom A2B5-Antikörper detektierten Antigens, der α -2,8-Trisialylsäure-glykolysierten Ganglioside oder Glykoproteine, wurde im Zusammen-

hang mit einer vom Signalweg Jak/Stat3-abhängigen Regulation bestimmter Glykosyltransferasen beschrieben (Li und Grumet, 2007). Die Enzymfamilie der Sialyltransferasen (IUPAC, EC 2.4.99.8) übertragen Sialingruppen. In Untersuchungen wurden für die Bildung des A2B5-Epitops auf Glykoproteinen die katalytische Aktivität der Sialyltransferase III (ST8Sia III) und für Ganglioside die ST8Sia I und ST8Sia V identifiziert (Inoko et al., 2010). Zudem konnte eine reziproke Expression während der Entwicklung für die embryonal auftretende ST8Sia I und die im adulten Gewebe aktive ST8Sia V gezeigt werden. Im Gegensatz dazu war die ST8Sia III nicht entwicklungsabhängig reguliert. Deshalb wurde die mRNA-Expressionsanalyse des astroglialen Markers A2B5 in der embryonalen neuronalen Stammzelllinie NS-5 anhand der ST8Sia I und III durchgeführt. Diese beiden Enzyme zeigten im Verlauf der Differenzierung eine abnehmende Expression, wohingegen der Astrozyten Marker GFAP erwartungsgemäß anstieg (**Abb. 31**).

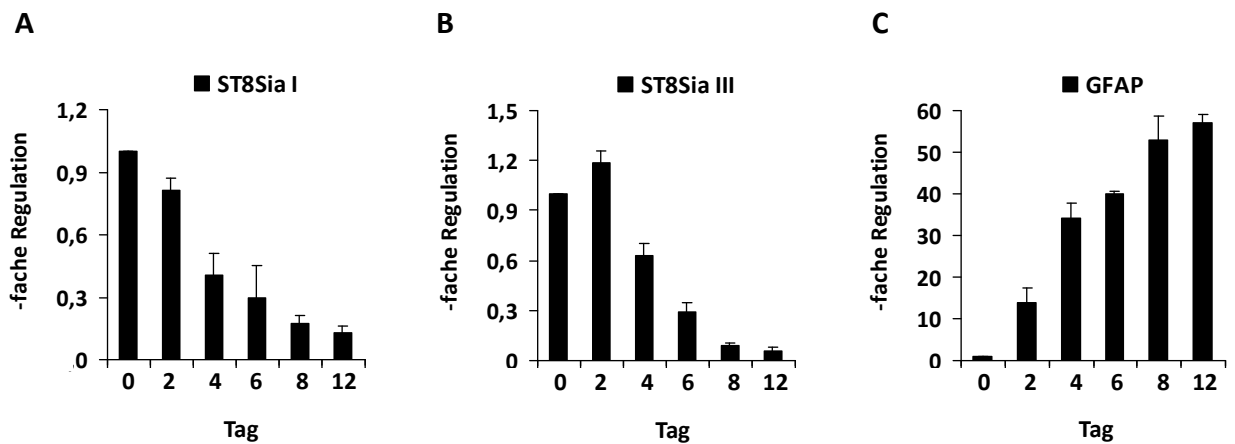


Abb. 31: Expressionsanalyse der astroglialen Marker von der differenzierten embryonalen NSC Zelllinie NS-5

Regulation des Markers für astrogliale Vorläuferzellen A2B5 anhand der Sialyltransferasen ST8Sia I und ST8Sia III sowie des Markers für Astrozyten GFAP zu verschiedenen Zeitpunkten der astroglialen Differenzierung von NS-5 Zellen. Werte normalisiert auf β -Aktin-Expression. Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Balken, SA.

- (A) A2B5 Epitop anhand des Enzyms Sialyltransferase I für α -2,8-Trisialylierung von Gangliosiden
- (B) A2B5 Epitop anhand des Enzyms Sialyltransferase III für α -2,8-Trisialylierung von Glykoproteinen
- (C) GFAP zeigt zunehmende Expression des Markers für reife Astrozyten während der Differenzierung

3.4.3 Adulte neurale Stammzelllinie O4ANS

3.4.3.1 Expressionsanalyse während der Differenzierung

RNA-Expressionsanalysen während der Differenzierung der adulten neuralen Stammzelllinie O4ANS (Pollard et al., 2006) zeigte eine vermehrte Expression von Zac1 in beiden Linienentscheidungen, wobei Socs3 ausschließlich während der astroglialen Differenzierung exprimiert wurde. Darüber hinaus konnte wie in der embryonalen neuralen Stammzelllinie NS-5 eine transiente Zac1 und Socs3 Expression während des astroglialen Differenzierungsprozesses festgestellt werden (**Abb. 32**).

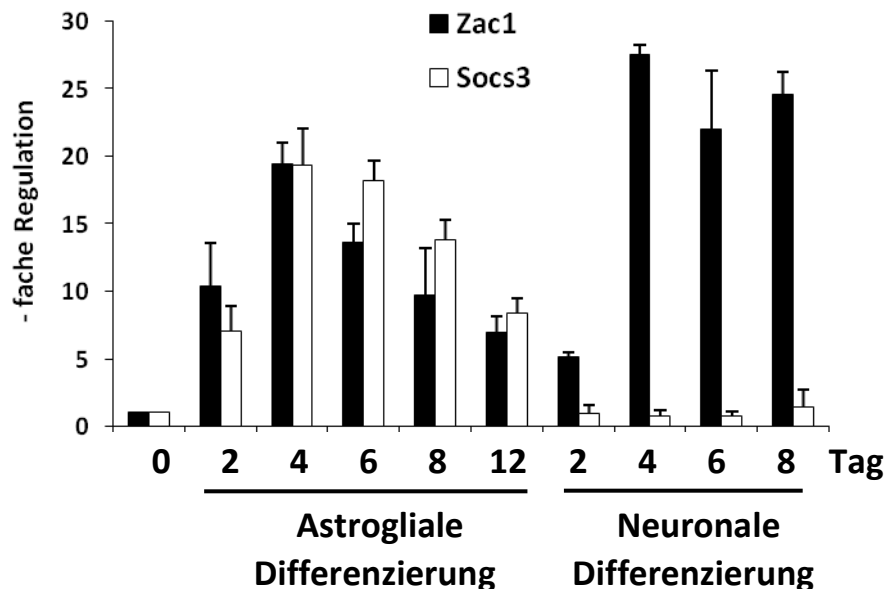


Abb. 32: Expression von Zac1 und Socs3 in der differenzierten adulten neuralen Stammzelllinie O4ANS

Regulation von Zac1 und Socs3 zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung von O4ANS Zellen zeigte ausschließlich während astroglialer Linienentscheidung eine gemeinsam auftretende Zac1 und Socs3 Expression. Werte normalisiert auf β -Aktin-Expression. Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Balken, SA.

Die Regulation der Proteinexpression wurde mittels Immunoblot überprüft und zeigte ausschließlich während der astroglialen Differenzierung eine Expression des Socs3-Proteins. Im Gegensatz dazu war das Zac1-Protein in beiden Linienentscheidungen exprimiert (**Abb. 33**). Zudem wurde ein Antikörper gegen das phosphorylierte Stat3-Epitop Tyr-705 eingesetzt. Dieser wies am astroglialen Differenzierungstag 4, an dem auch die höchste

Expression von Zac1 und Socs3 festgestellt wurde, eine reduzierte Phosphorylierung von Stat3 Tyr-705 auf. Die Gesamtproteinmenge von Stat3 blieb während der Differenzierung unverändert.

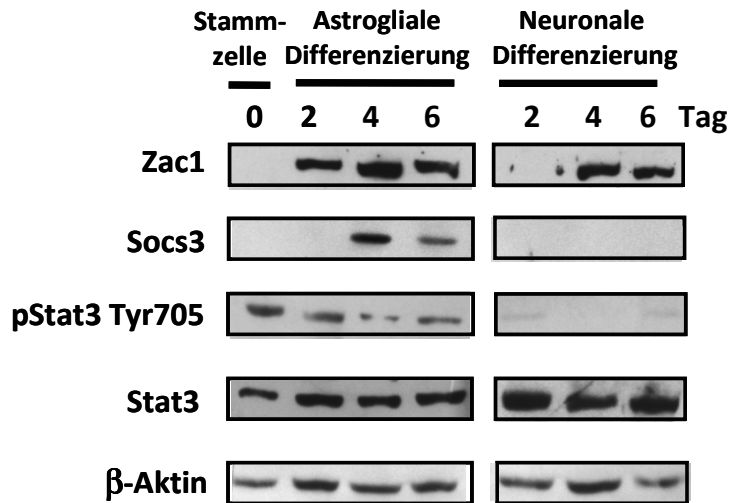


Abb. 33: Immunoblots der neuronal und astroglial differenzierten adulten neuronalen Stammzelllinie O4ANS

Immunoblot (70 µg GZE) zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Primäre Antikörper Zac1, Socs3, pStat3 (Tyr-705), Stat3 und β-Aktin detektiert durch HRP-Konjugate und Chemolumineszenz.

3.4.3.2 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP-Assays)

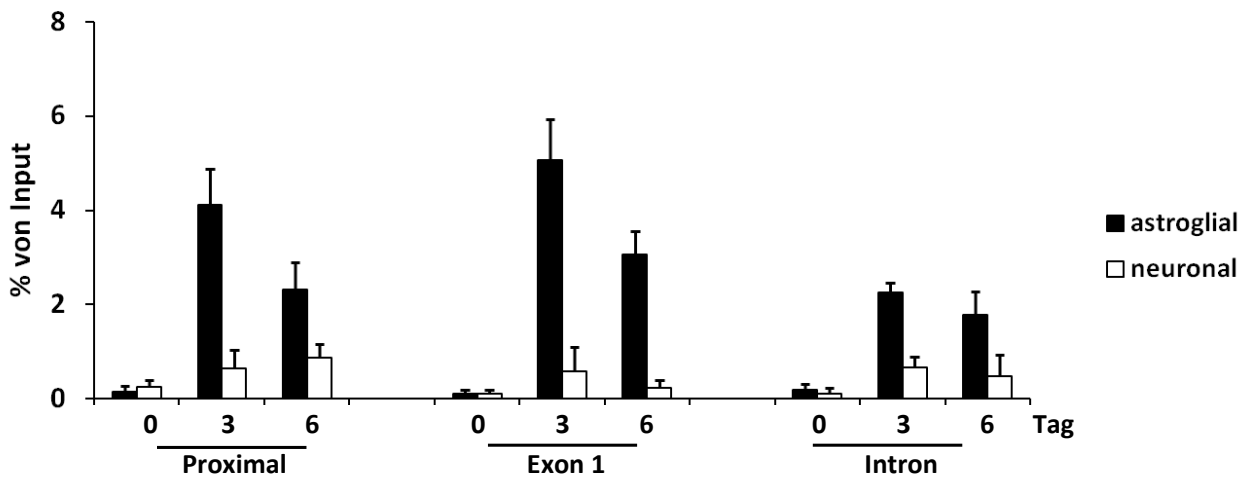


Abb. 34: ChIP-Assays von Zac1 in neuronalen und astroglialen differenzierten O4ANS Zellen

Primer flankierte Abschnitte im proximalen (-915/-713), exonischen (-83/+215) und intronischen (+637/+869) Bereiche des murinen Socs3-Promotors zeigten Bindung von Zac1 ausschließlich während der astroglialen Differenzierung. Anreicherung von Zac1 in Prozent relativ zum Input (1 %), korrigiert um die Immunglobulin-Kontrolle. Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Balken, SA

ChIP-Experimente in O4ANS Zellen während der neuronalen und astroglialen Differenzierung bestätigten eine ausschließlich während der astroglialen Linienentscheidung auftretende Bindung von Zac1 am *Socs3*-Promotor in den drei untersuchten 5'-regulatorischen Abschnitten (**Abb. 34**). Darüber hinaus zeigte sich im zeitlichen Verlauf der Differenzierung eine hohe Promotorbindung am Tag 3 mit Abschwächung zum Tag 6 hin, was in Verbindung mit den Resultaten der Expressionsanalyse eine transiente Regulation des *Socs3*-Gens unterstützt.

3.4.3.3 Immunozytochemische Färbung

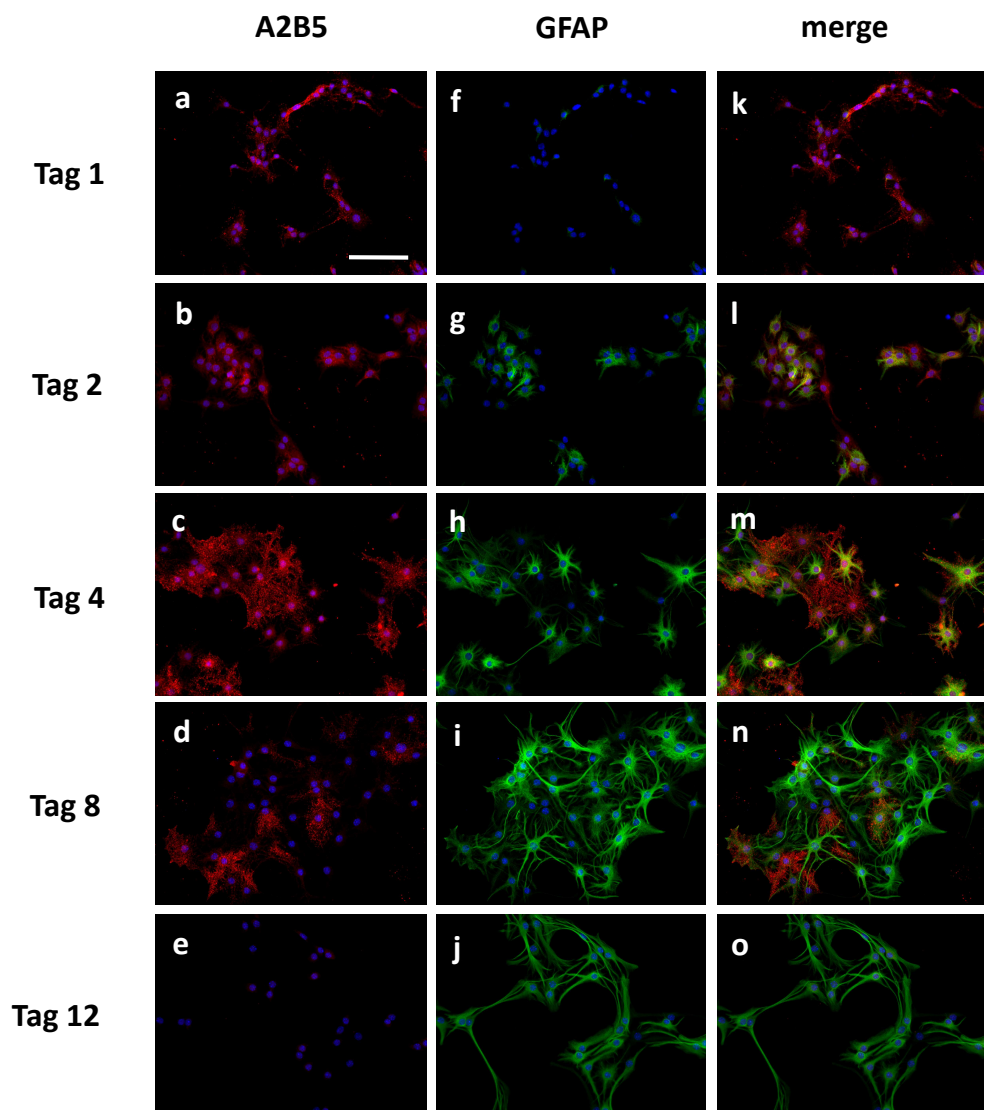


Abb. 35: Immunofluoreszenz von astroglial differenzierter adulten neuralen Stammzelllinie O4ANS Zellen
Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und gefärbt durch indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen (a-e) A2B5; (f-j) GFAP; (k-o) merge, Bildzusammenführung. Zellkerne gefärbt mit DAPI. Alle Bilder mit identischer Laserleistung und Verstärkung angefertigt. Balken, Maßstab 40 µm

Immunfluoreszenzanalysen von entwicklungspezifischen Markern der astroglialen Differenzierung in der adulten neuralen Stammzelllinie O4ANS wurden mit den Markern A2B5 für astrogliale Vorläuferzellen und GFAP für reife Astrozyten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Immunoreaktivität für A2B5 zu frühen Zeitpunkten der astroglialen Differenzierung ausgeprägt war, während sie im weiteren Verlauf abnahm (**Abb. 35 a-e**). Die Expression des Markers GFAP war am Tag 1 der Differenzierung gering und nahm in den darauf folgenden Tagen deutlich zu (**Abb. 35 f-j**).

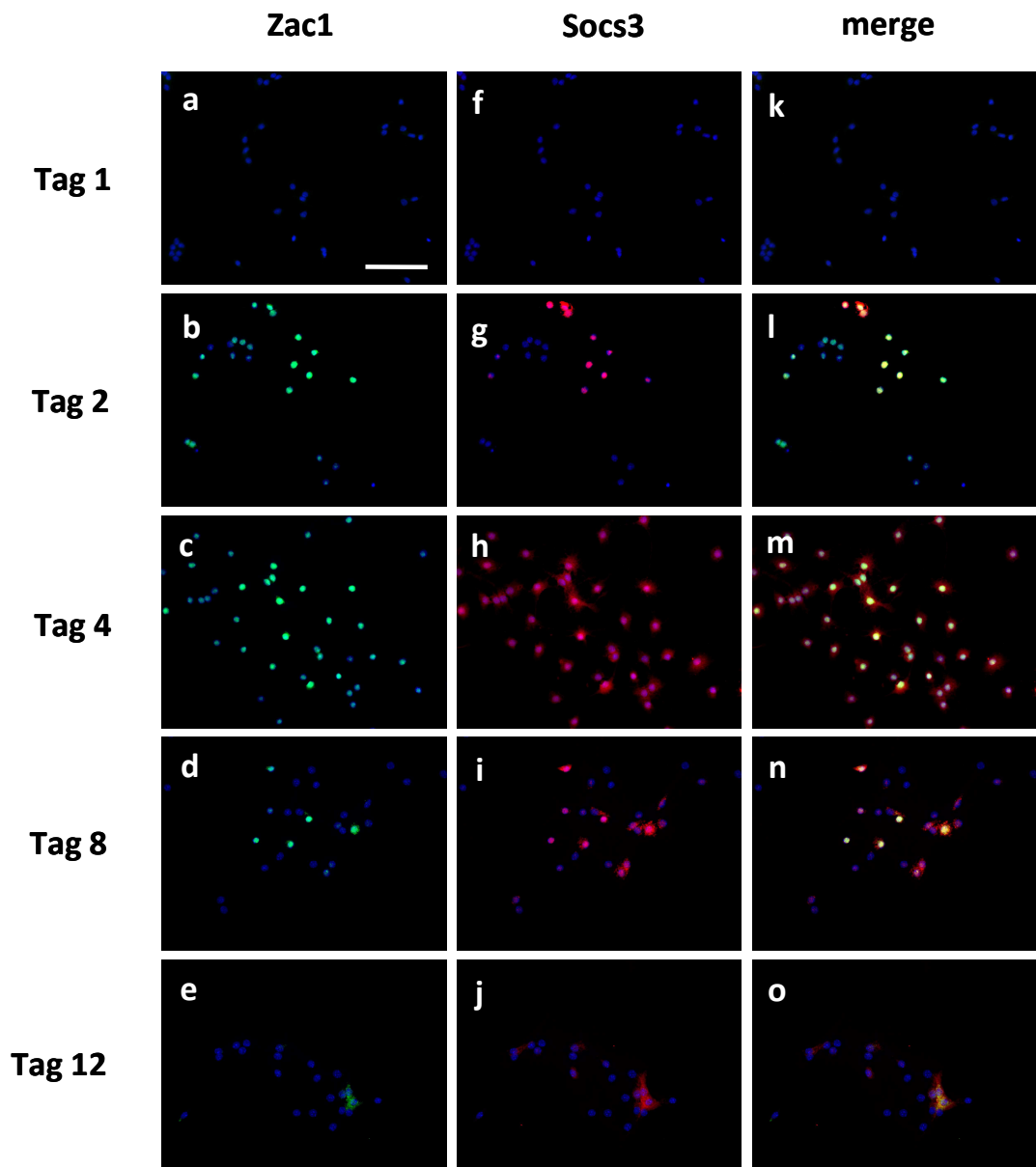


Abb. 36: Immunofluoreszenz von Zac1 und Socs3 während astroglialer Differenzierung der O4ANS Zellen

Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und gefärbt durch indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen (a-e) Zac1; (f-j) Socs3; (k-o) merge, Bildzusammenführung. Zellkerne gefärbt mit DAPI. Alle Bilder mit identischer Laserleistung und Verstärkung angefertigt. Balken, Maßstab 40 µm

Die Immunfluoreszenzfärbung von Zac1 wies eine Lokalisation im Zellkern auf, während Socs3 im Zytoplasma und teilweise im Zellkern exprimiert war (**Abb. 36**). Am Tag 1 des astroglialen Zellschicksals wurde keine Immunoreaktivität für Zac1 und Socs3 festgestellt (**Abb. 36 a, f**). Dagegen konnte am Tag 2 die Expression von Zac1 detektiert werden, die mit den zu diesem Zeitpunkt wenigen Socs3 exprimierenden Zellen kolokalisiert war (**Abb. 36 b, g**). Die maximale Immunoreaktivität der beiden Antigene wurde am Tag 4 erreicht und wies dabei eine hohe Kolokalisation von Zac1 und Socs3 auf (**Abb. 36 m**). Zu späteren Zeitpunkten nahm die Expression wieder ab und es erschienen vermehrt Socs3-positive Zellen ohne Zac1-Expression.

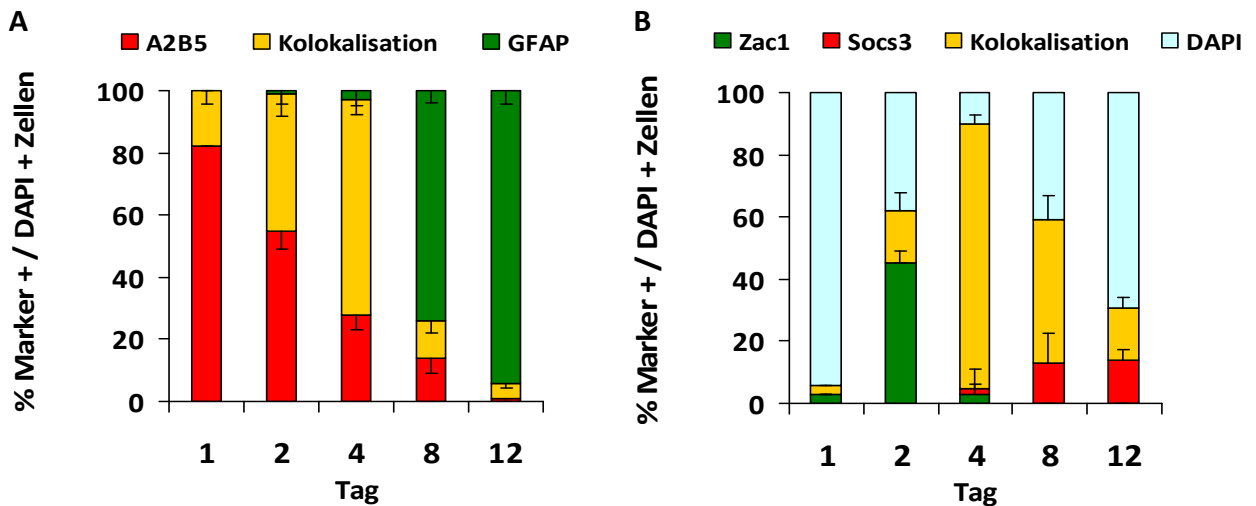


Abb. 37: Quantifizierung der Immunfluoreszenz während astroglialer Differenzierung von O4ANS Zellen

Kalkulation von Antigen-positiven zur Gesamtanzahl an Zellen markiert durch Kernfärbung mit DAPI.

Auswertung von jeweils fünf Bildern pro Differenzierungstag. Balken, SD

(A) Marker für astrogliale Vorläuferzellen A2B5 und für Astrozyten GFAP wie in Abb. 35 gezeigt.

(B) Quantitative-Analyse der Antigene Zac1 und Socs3 wie in Abb. 36 gezeigt.

Die quantitative Auswertung der immunozytochemischen Färbungen zeigte für die astroglialen Marker einen umgekehrten Verlauf während der Differenzierung. Mit dem Anstieg GFAP-positiver Zellen nahm die Immunoreaktivität des Markers A2B5 ab (**Abb. 37 A**). Dabei kam es während der Reifung zum Auftreten von A2B5 und GFAP doppelt positiven Zellen (**Abb. 35 m**), deren quantitative Auswertung eine Kolokalisation von 69% +/- 4,8 % am Tag 4 ergab. Zac1 und Socs3 waren überwiegend gemeinsam exprimiert und zeigten ebenso am Tag 4 ein Maximum der Kolokalisation von 85% +/- 2,3% mit einem rückwärtigen Verlauf zu späteren Zeitpunkten (**Abb. 37 B**).

Immunfluoreszenzfärbungen der entwicklungspezifischen astroglialen Marker A2B5 und GFAP wurden zusammen mit Zac1 oder Socs3 angefertigt, um die zellspezifische Lokalisation der frühen und transienten Zac1 vermittelten Socs3 Expression während der astroglialen Zelllinienentscheidung zu bestimmen (**Abb. 38**). Dabei zeigte sich am Tag 4 eine Kolokalisation von Zac1 als auch Socs3 mit den Markern A2B5 und GFAP. Es wurde keine Präferenz für einen der beiden glialen Marker ersichtlich, womit eine gemeinsame Expression in A2B5/GFAP doppelt positiven Zellen vorliegt.

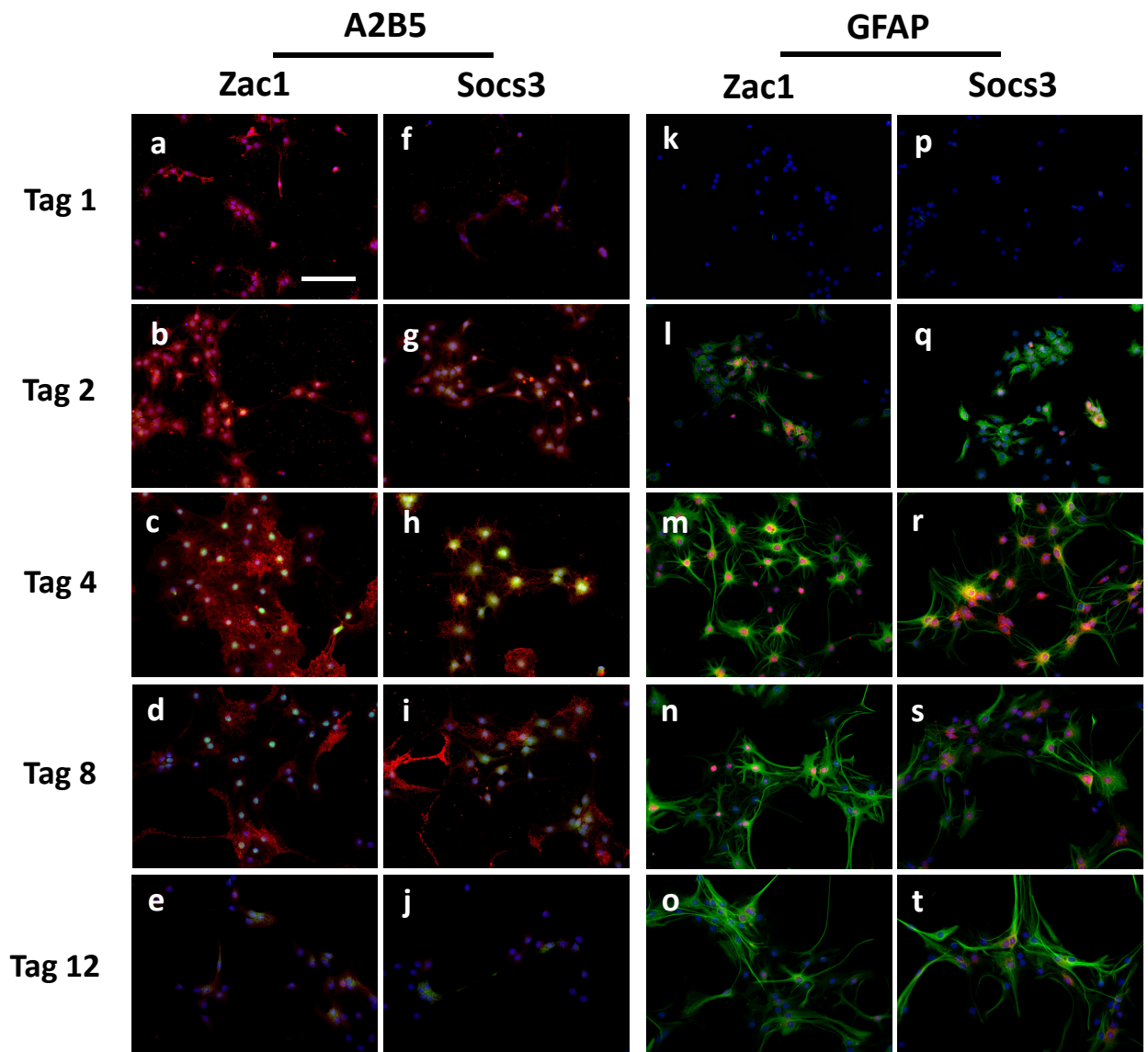


Abb. 38: Immunfluoreszenz von Zac1 und Socs3 mit astroglialen Markern in differenzierten O4ANS Zellen

Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und gefärbt durch indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Zac1 (**a-e** in grün und **k-o** in rot); Socs3 (**f-j** in grün und **p-t** in rot); A2B5 (**a-j** in rot) und GFAP (**k-t** in grün). Zellkerne mit DAPI gefärbt (**a-t** in blau). Bilder angefertigt mit identischer Laserleistung und Verstärkung. Balken, Maßstab 40 μm

Zudem wurde die Expression der astroglialen Marker in der differenzierten adulten neuronalen Stammzelllinie O4ANS mittels qRT-PCR nachgewiesen. Dabei wurde zur Analyse von A2B5, wie bereits für die NS-5 Zellen beschrieben, ein für die Biosynthese von α -2,8-trisialylglykosylierten Gangliosiden und Glykoproteinen benötigtes Enzym untersucht. Die einzelnen Sialyltransferasen (IUPAC, EC 2.4.99.8) besitzen eine unterschiedliche Substratspezifität und entwicklungspezifische Expression. Für die Bildung des A2B5-Epitops auf Glykoproteinen und Gangliosiden wurden die ST8Sia III und ST8Sia V näher untersucht. Die Sialyltransferase ST8Sia V ist entwicklungsabhängig reguliert und wird nur im adulten Gewebe exprimiert (Inoko et al., 2010). Beide Enzyme zeigten im Verlauf der Differenzierung eine abnehmende Expression, wogegen die mRNA des sauren Gliafaserproteins GFAP erwartungsgemäß anstieg (**Abb. 39**).

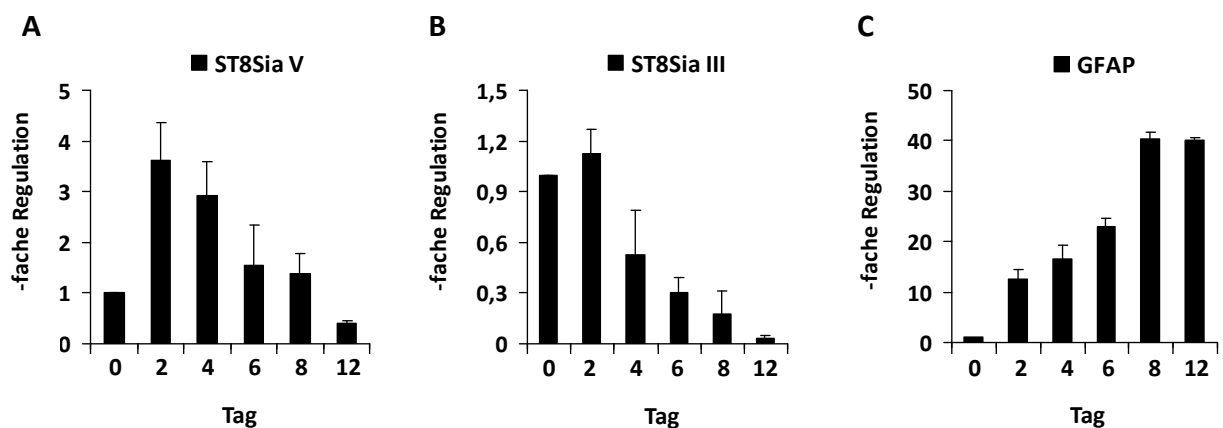
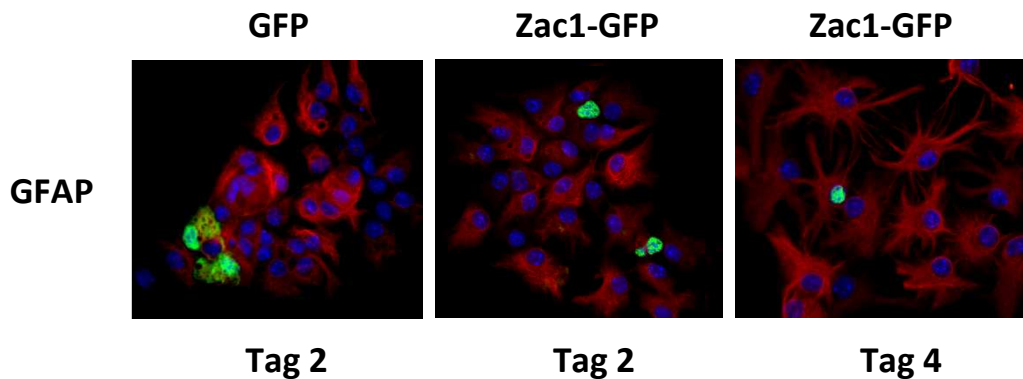


Abb. 39: Expression der astroglialen Marker von differenzierter adulten neuronaler Stammzelllinie O4ANS

Regulation des Markers für astrogliale Vorläuferzellen A2B5 anhand der Sialyltransferase ST8Sia V für A2B5 auf Gangliosiden (**A**) und ST8Sia III für A2B5 auf Glykoproteinen (**B**) sowie des Markers für Astrozyten GFAP (**C**) zu verschiedenen Zeitpunkten der astroglialen Differenzierung von O4ANS Zellen. Werte normalisiert auf β -Aktin-Expression. Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Balken, SA.

Zusammenfassend zeigten die anhand der Stammzellmodelle gewonnenen Ergebnisse, dass während der astroglialen Differenzierung die transiente Zac1- und Socs3-Expression in A2B5/GFAP doppelt positiven Zellen auftritt. Diese zeitliche und zellspezifische Kollokalisierung von Zac1 und Socs3 legten eine regulatorische Rolle der Zac1-vermittelten Socs3-Expression beim Übergang von astroglialen Vorläuferzellen zu postmitotischen Astrozyten nahe.

3.4.3.4 Transiente Transfektion von Zac1-GFP



Astrogliale Differenzierung

Abb. 40: Transiente Transfektion von Zac1-GFP während der astroglialen Differenzierung von O4ANS Zellen

Immunofluoreszenzfärbung von GFP und Zac1-GFP exprimierenden Zellen (grün) mit dem Marker für Astrozyten GFAP (rot). Transiente Transfektion von GFP und Zac1-GFP Konstrukten (je 100 ng) am Tag 1 der astroglialen Differenzierung.

Für die Analyse der Funktion von Zac1 während der astroglialen Differenzierung wurde die Auswirkung seiner Expression zu einem frühen Zeitpunkt untersucht. Dazu wurden 24 h nach Einleitung der astroglialen Differenzierung Zac1-GFP oder GFP (engl.: *green fluorescent protein*) kodierende Konstrukte transient transfiziert (**Abb. 40**). Darauf erfolgte am Tag 2 die Bestimmung der GFAP-Expression von GFP und Zac1-GFP positiven Zellen (**Abb. 41**). Einen Tag nach der Transfektion wurde keine Immunoreaktivität für den Marker GFAP in Zac1-GFP exprimierenden Zellen festgestellt. Dagegen waren am Tag 4 alle transfizierten Zellen GFAP-positiv.

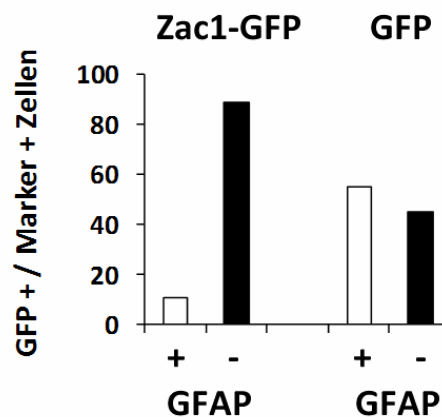


Abb. 41: Quantifizierung der Kolokalisation von GFP-positiven Zellen mit dem glialen Marker GFAP am Tag 2

Bestimmung der GFAP-Expression von je 100 mit Zac1-GFP und GFP-Konstrukten transfizierten Zellen.

3.4.3.5 Stabile Zac1-Überexpression und Zac1-shRNA

Die Beeinträchtigung der GFAP-Expression zu frühen Zeitpunkten der astroglialen Differenzierung nach Zac1-Transfektion ist mit der Induktion von Socs3 vereinbar. Deshalb wurden in O4ANS Zellen stabile Zellklone mit Überexpression oder Knock-down von Zac1 generiert, um dessen Funktion während der astroglialen Differenzierung zu analysieren. Verglichen mit den parentalen Zellen wiesen transgene Zac1-Klone eine Verdoppelung der Zac1-Expression auf. Im Gegensatz hierzu, wurde nach Knock-down eine 80%-ige Reduktion der Zac1-mRNA beobachtet (**Abb. 42 A**). Der Nachweis positiver Klone erfolgte durch den Nachweis der mit dem Flag-Epitop fusionierten Zac1-cDNA mit einem Flag-Antikörper oder der PCR-Analyse des stabil integrierten Selektionsresistenzgens Puromycin-N-Acetyltransferase (**Abb. 42 B**).

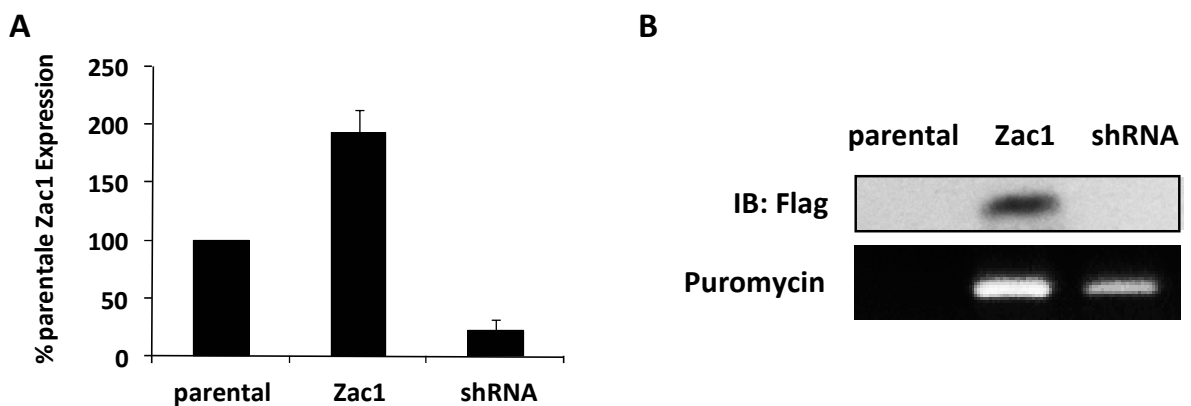


Abb. 42: Stabile Überexpression und Knock-down von Zac1 in O4ANS Zellen

- (A) Veränderung der Zac1-Expression in Zellklonen mit Überexpression oder Knock-down im Vergleich (%) zu parentalen O4ANS Zellen (100%). Stabile Transfektion von Flag-Zac1 (2 µg) oder shRNA (2 µg) Expressionsplasmiden und anschließender Selektion mit Puromycin für 14 Tage. Ergebnisse normalisiert auf β-Aktin-Expression. Mittelwert aus vier Experimenten. Balken, SA.
- (B) Nachweis der Zac1-Überexpression durch Immunblot mit Flag-Antikörper und der stabilen Integration der Transgene durch PCR-Analyse des Selektionsresistenzgens für Puromycin.

Die astrogliale Differenzierung der Zellklone offenbarte eine veränderte Regulation von Socs3 in Abhängigkeit von der Zac1 Expression (**Abb. 43**). Im Vergleich mit parentalen Zellen zeigte Zac1-Überexpression am Tag 2 eine doppelt so hohe Expression von Zac1 und Socs3,

während am Tag 4 dieser Unterschied abnahm. Dagegen war im Zellklon mit stabil exprimierter Zac1-shRNA die Expression von Socs3 reduziert.

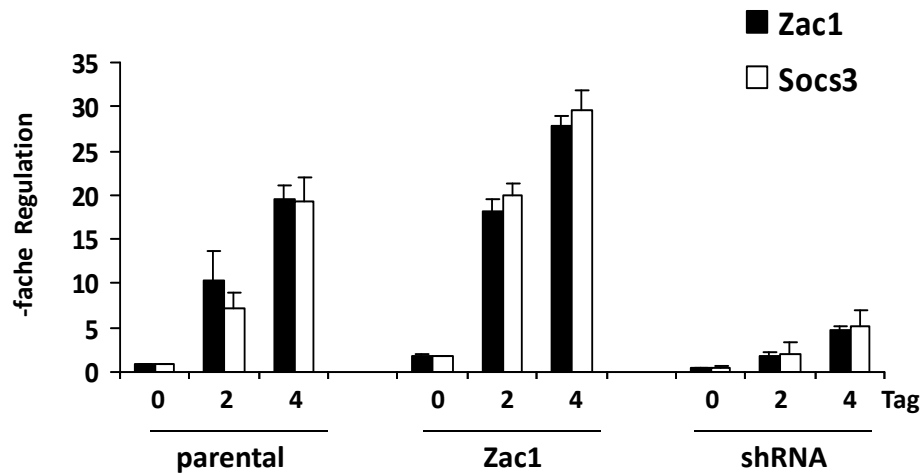


Abb. 43: Expressionsanalyse stabiler Zac1- und shRNA-Überexpression während der glialen Differenzierung
RNA-Expressionsanalyse von Zac1 und Socs3 mittels qRT-PCR. Werte normalisiert auf β -Aktin-Expression. Mittelwert aus drei Experimenten. Balken, SA.

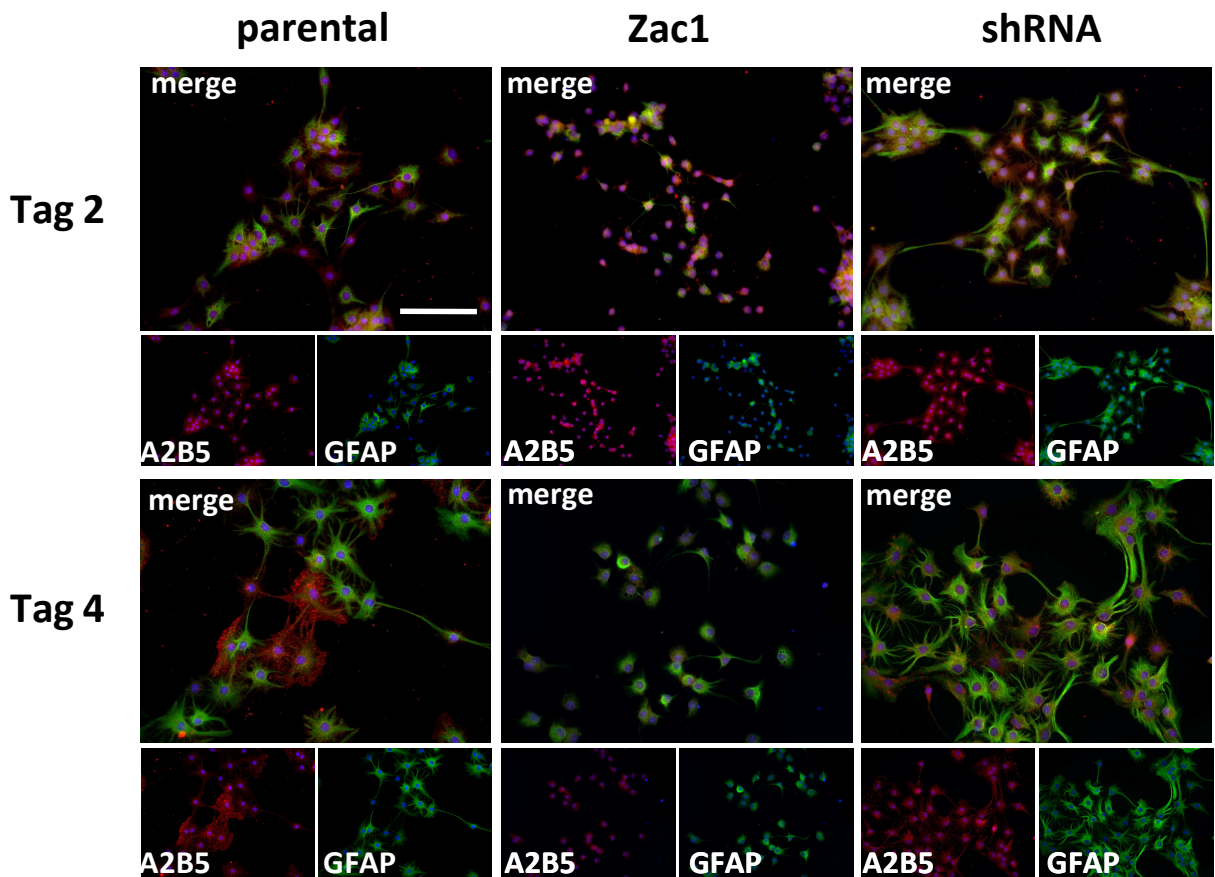


Abb. 44: Immunofluoreszenzfärbung astroglialer Marker in mit 1% FCS differenzierten O4ANS Zellklonen
Parentale Zellen und Klone mit Überexpression oder Repression von Zac1 wurden am Tag 2 und 4 fixiert und gefärbt mit Antikörpern gegen A2B5 (rot) und GFAP (grün). Zellkerne gefärbt mit DAPI. Bilder angefertigt mit identischer Laserleistung und Verstärkung. Balken, Maßstab 40 μ m

Die Konsequenzen einer veränderten Zac1- und Socs3-Expression auf die astrogliale Differenzierung wurden durch Immunfluoreszenzfärbungen überprüft (**Abb. 44**). Hierbei zeigten Doppelfärbungen mit den Markern A2B5 und GFAP eine verzögerte astrogliale Differenzierung infolge der Zac1-Überexpression. Im Gegensatz dazu war die Immunoreaktivität für die Marker GFAP und A2B5 in Zellen mit unterdrückter Zac1-Expression vergleichsweise stärker ausgeprägt als in den parentalen O4ANS. Insofern führte die unterdrückte Zac1-Expression zu einer Verstärkung der astroglialen Differenzierung, die nach kontinuierlicher Jak/Stat3-Signaltransduktion beobachtet wurde (Bonaguidi et al., 2005; Emery et al., 2006; Fukuda et al., 2007). Für die Analyse der proliferativen Eigenschaften der Zellklone wurden anhand des Markers Ki-67 Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt (**Abb. 45**). Diese zeigten während der astroglialen Differenzierung im Vergleich zu den parentalen O4ANS Zellen eine vorzeitige Abnahme der Ki-67 Immunoreaktivität durch Zac1-Überexpression. Dagegen führte die Unterdrückung der Zac1-Expression zu einem verzögerten Übergang in die G₀-Phase des postmitotischen Zustandes (**Abb. 46**).

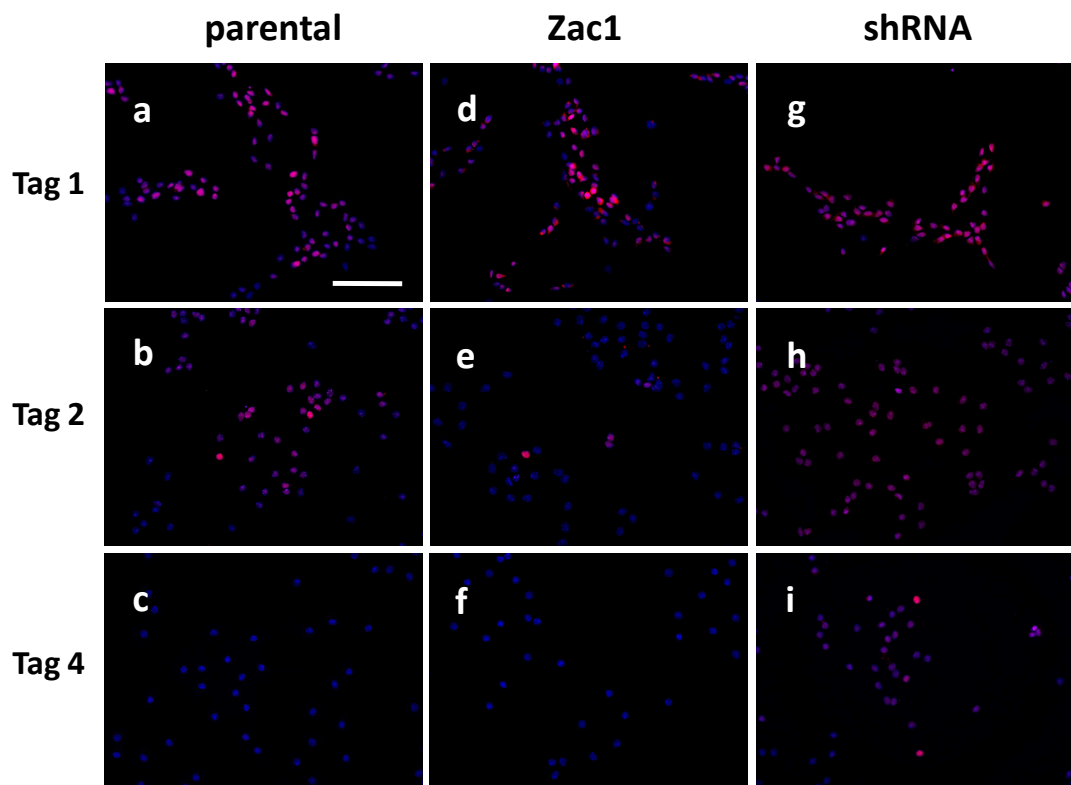


Abb. 45: Immunfluoreszenz des Proliferationsmarkers Ki-67 während der glialen Differenzierung von O4ANS
Parentale Zellen und Klone mit Überexpression oder Repression von Zac1 wurden am Tag 2 und 4 fixiert und gefärbt mit dem Antikörper Ki-67 (rot). Zellkerne gefärbt mit DAPI. Bilder angefertigt mit identischer Laserleistung und Verstärkung. Balken, Maßstab 40 μ m

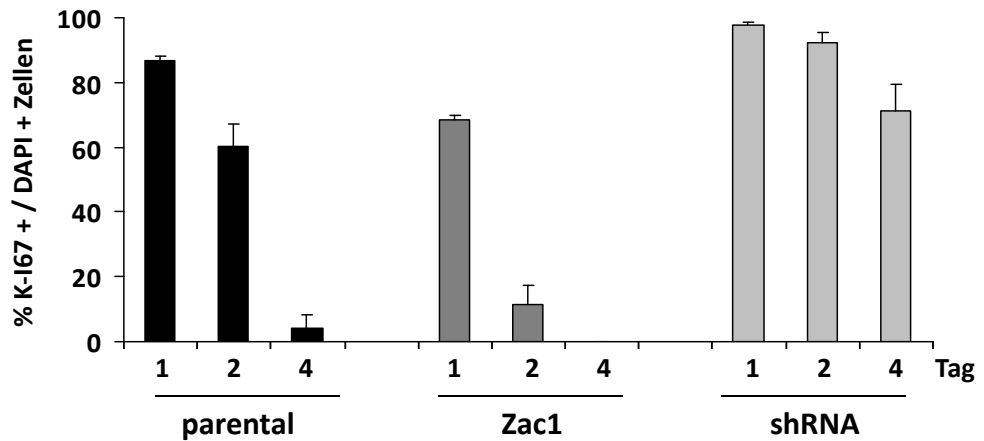


Abb. 46: Quantifizierung der Proliferation anhand Immunofluoreszenzfärbung des Antikörpers Ki-67

Parentale O4ANS Zellen und Klone mit Überexpression oder Repression von Zac1 zeigten während der glialen Differenzierung in stabil Zac1-überexprimierenden Zellen eine vorzeitige Abnahme, wohingegen shRNA von Zac1 anhaltende Immunoreaktivität für Ki-67 aufwies. Kalkulation von Antigen-positiven zur Gesamtanzahl an Zellen markiert durch Kernfärbung mit DAPI. Auswertung von jeweils fünf Bildern pro Differenzierungstag. Balken, SA

Weiterhin wurde die astrogliale Differenzierung der Zellen mit dem Zytokin CNTF oder dem Wachstumsfaktor BMP-4 durchgeführt, um die Regulierung des Jak/Stat3-Signalweges unter veränderter Zac1-Expression zu untersuchen. Die RNA-Expressionsanalyse von parentalen O4ANS Zellen zeigte im Vergleich zu den mit FCS differenzierten Zellen am Tag 4 eine höhere Zac1- und Socs3-Expression durch den vom Wachstumsfaktor CNTF regulierten Jak/Stat3-Signalweg (**Abb. 47**). Im Gegensatz dazu waren Zac1 und Socs3 in mit dem Wachstumsfaktor BMP-4 differenzierten Zellen geringer exprimiert. BMP-4 führt zu einer vom Jak/Stat3-unabhängigen Aktivierung des Smad-Signalweges.

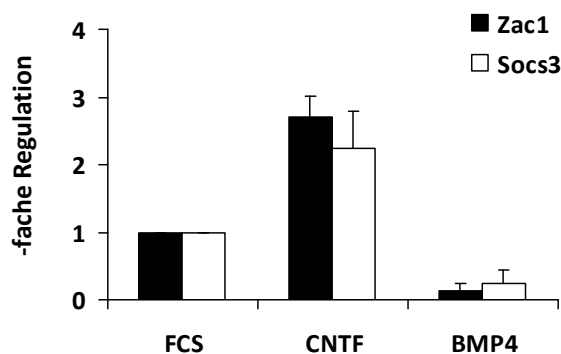


Abb. 47: Expressionsanalyse während der astroglialen Differenzierung am Tag 4 mit FCS, CNTF oder BMP-4

RNA-Expressionsanalyse von Zac1 und Socs3 mittels qRT-PCR von parentalen O4ANS Zellen am Tag 4. Werte normalisiert auf β -Aktin-Expression. Mittelwert aus zwei Experimenten. Balken, SA.

Im nächsten Schritt wurden Immunfluoreszenzfärbungen am Tag 4 der astroglialen Differenzierung mit den glialen Markern A2B5 und GFAP angefertigt (**Abb. 48**). Durchlichtmikroskopische Aufnahmen und Färberesultate der CNTF-differenzierten parentalen O4ANS Zellen zeigten einen A2B5-positiven glialen Phänotyp, der durch lang gestreckte Zellen mit geringer GFAP-Expression in Abwesenheit von ECM-Komponenten charakterisiert ist (Lillien et al., 1990). Dagegen zeigten die BMP4-differenzierten Zellen eine den Astrozyten typische sternförmige Morphologie mit erhöhter GFAP-Expression und fehlender Immunoreaktivität für A2B5 (Bonaguidi et al., 2005). Die CNTF- oder BMP4-induzierte astrogliale Differenzierung erfolgte im Zac1-shRNA Zellklon vergleichsweise ähnlich wie in den parentalen Zellen, während die Überexpression von Zac1 eine Beeinträchtigung der CNTF-induzierten Differenzierung aufzeigte. Im Gegensatz hierzu, war im Zac1-überexprimierenden Zellklon die Differenzierung mit BMP4 intakt und vergleichbar mit den parentalen Zellen.

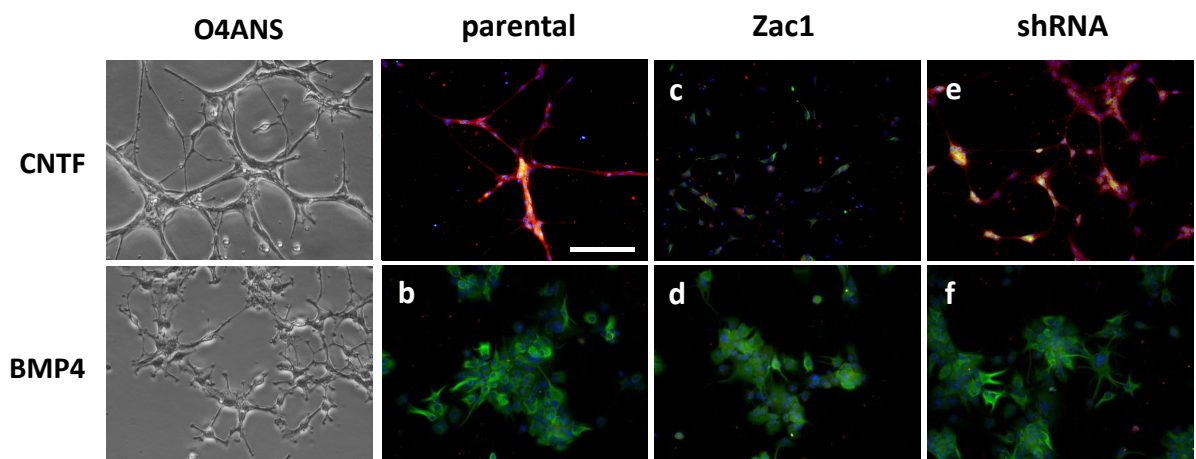


Abb. 48: Immunfluoreszenz von CNTF- oder BMP4-induzierter astroglialer Differenzierung in O4ANS Zellen

Parentale Zellen und Klone mit Überexpression oder Knock-down von Zac1 wurden am Tag 4 der astroglialen Differenzierung fixiert und gefärbt mit den Antikörpern A2B5 (rot) und GFAP (grün). Zellkerne gefärbt mit DAPI. Bilder angefertigt mit identischer Laserleistung und Verstärkung. Balken, Maßstab 40 μm

3.5 Neuronale Primärkultur der Maus (E18)

Abschließend wurden Experimente in Primärzellkulturen des embryonalen Gehirns der Maus vom Embryonaltag E18 durchgeführt, um die bisher gewonnenen Ergebnisse *ex vivo* zu überprüfen. Dazu wurden die in Form von sekundären Neurosphären angereicherten

Stammzellen in einzelne Zellen dissoziiert und in Expansionsmedium als adhärenente Zellen auf beschichteten Poly-D-Lysin Platten kultiviert. Die Differenzierung in neuronale und astrogliale Zellschicksale wurde durch die Expression des Stammzellmarkers Nestin, des neuronalen Markers Tuj1 und des astroglialen Markers Gfap überprüft (**Abb. 49**).

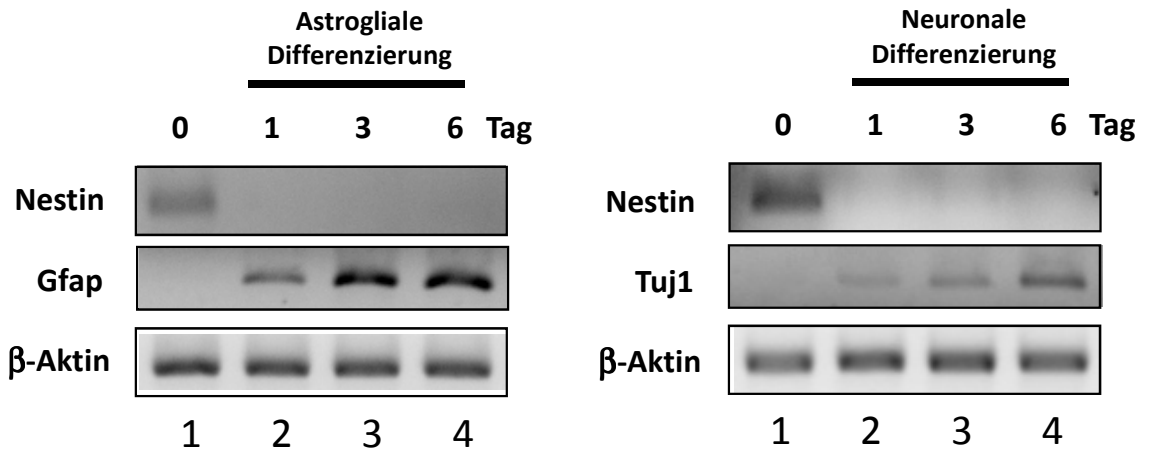


Abb. 49: Charakterisierung von Primärzellen des embryonalen Gehirns (E18) während der Differenzierung

Zeitabhängige RNA-Expressionsanalyse des Stammzellmarkers Nestin, des neuronalen Markers Tuj1 und des astroglialen Markers Gfap während der Differenzierung. Expressionskontrolle mittels β -Aktin.

In undifferenzierten adhärenent wachsenden Primärzellen wurden Reporter-Assays durchgeführt, die einen Anstieg der Luziferaseaktivität durch den *Socs3*-Promotor mit steigender Menge an transfizierten Zac1 aufzeigten (**Abb. 50**).

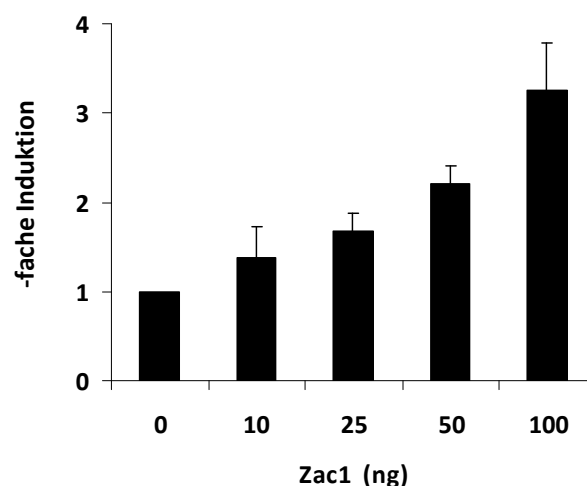


Abb. 50: Reporter-Assays mit murinen *Socs3*-Promotorplasmid in neuronalen embryonalen Primärzellen

Kotransfektion von Zac1-Expressionsplasmid (100 ng) mit 2 kb *Socs3*-Promotorplasmid (200 ng). Luziferaseaktivität normalisiert auf β -Galactosidase-Expression. Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Balken, SA.

Analysen der Zac1- und Socs3-Expression während der Differenzierung von neuronalen Primärzellen zeigten eine Zac1-Regulation in beiden Linienentscheidungen, während Socs3 ausschließlich unter der astroglialen Differenzierung hochreguliert wurde (**Abb. 51**). Die gemeinsame Expression in astroglial differenzierten Zellen trat transient mit einem Maximum am Tag 3 auf (**Abb. 52**).

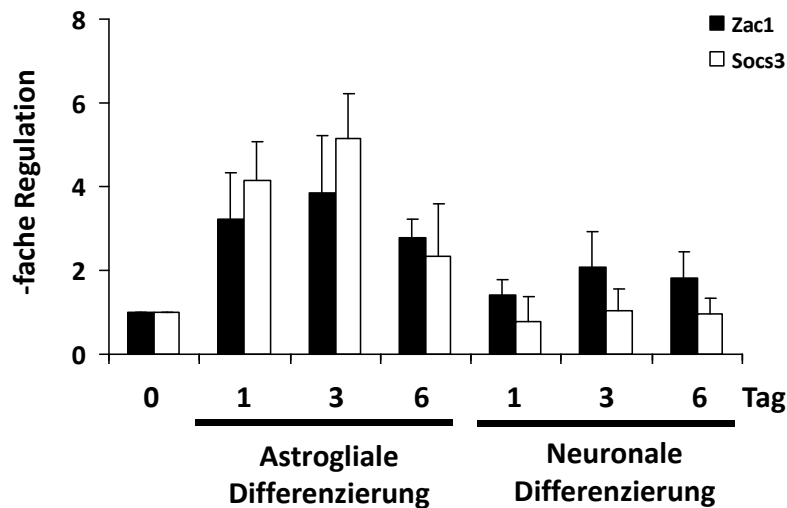


Abb. 51: Expressionsanalyse von Zac1 und Socs3 während der neuronalen und astroglialen Differenzierung

Regulation von Zac1 und Socs3 zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung von Primärzellen zeigt ausschließlich während astroglialer Linienentscheidung gemeinsam auftretende Zac1 und Socs3 Expression. Werte relativ zu β -Aktin-Expression. Mittelwert aus drei Experimenten. Balken, SA.

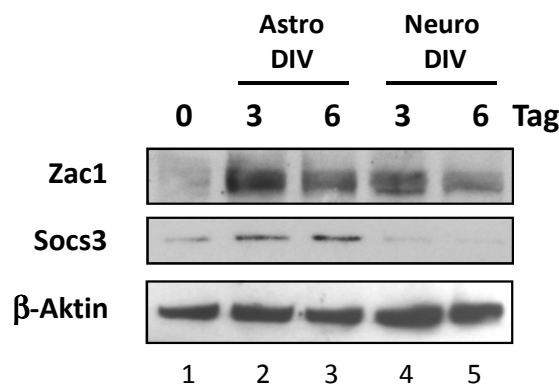


Abb. 52: Immunoblot von Zac1 und Socs3 während der neuronalen und astroglialen Differenzierung

Immunoblot (70 μ g GZE) von differenzierten Primärzellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Primäre Antikörper Zac1, Socs3 und β -Aktin detektiert durch HRP-Konjugate und Chemolumineszenz.

ChIP-Experimente bestätigten die transiente Bindung von Zac1 an dem Socs3-Promotor ausschließlich während der astroglialen Differenzierung (**Abb. 53**). Zudem wurden Re-ChIP-Experimente durchgeführt, welche die Zac1-Bindung am Socs3-Promotor im Zusammenhang mit transkriptioneller Aktivierung untersuchten. Dazu wurde für den Re-ChIP zuerst ein Zac1-

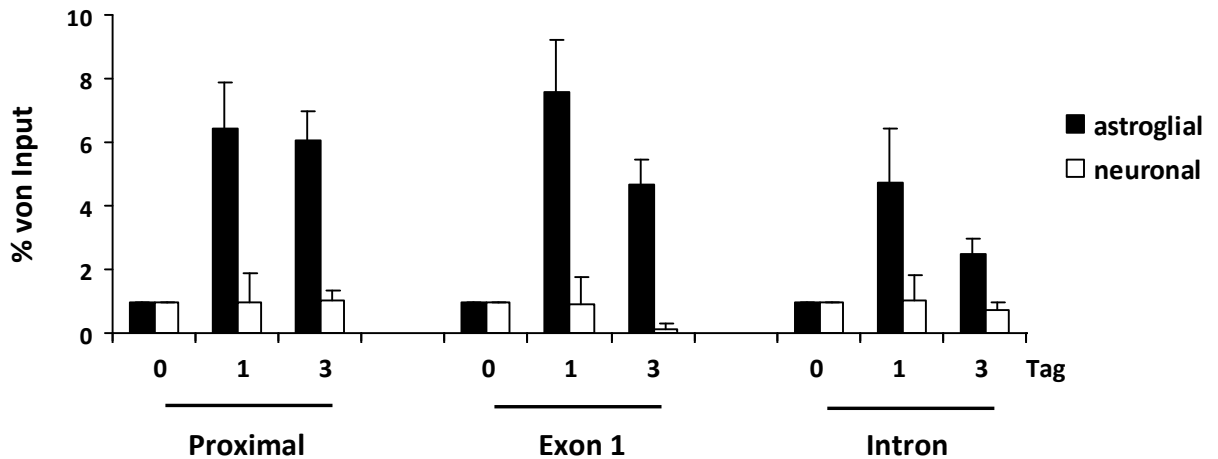


Abb. 53: ChIP-Assays von Zac1 in neuronalen und astroglialen differenzierten Primärzellen

Primer flankierte Bereiche im proximalen (-915/-713), Exon 1 (-83/+215) und Intron (+637/+869) des murinen *Socs3*-Promotors. Anreicherung von Zac1 in Prozent relativ zum Input (1%), korrigiert um die Immunglobulin-Kontrolle. Mittelwert aus drei Experimenten. Balken, SA

Antikörper verwendet und die angereicherten Protein-DNA-Komplexe in einem zweiten ChIP mit anti-acH3 (aktivierende Histonmarkierung) oder anti-H3K9me2 (reprimierende Histonmarkierung) immunopräzipitiert (**Abb. 54**). Dabei zeigte sich im Verlauf der astroglialen Differenzierung eine Abnahme reprimierender und gleichzeitig die Zunahme aktivierender Histonmarker im proximalen Promotor und Intron. Die Zac1-Bindung im Exon 1 führte nur zu geringen Veränderungen der untersuchten Histonmarker. Die Transaktivierung von *Socs3* wird daher vorallem durch die Zac1-Bindung im proximalen Promotor und Intron reguliert.

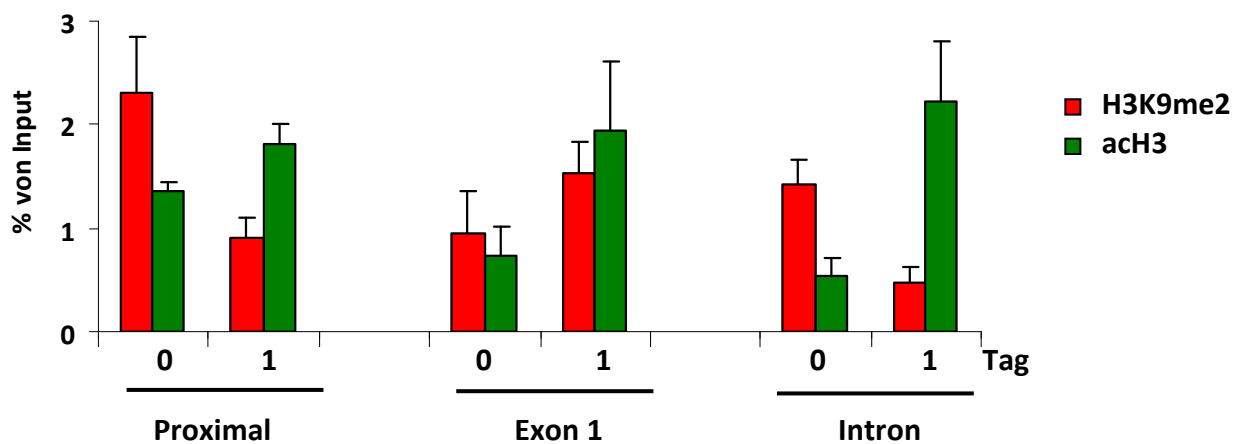


Abb. 54: Re-ChIP von Zac1 mit aktivierenden und reprimierenden Histonmarkern in neuronalen Primärzellen

Chromatinmarker im proximalen Bereich, Exon 1 und Intron des *Socs3*-Promotors während der astroglialen Differenzierung am Tag 1. Anreicherung der Histonmarker an Zac1-gebundener DNA in Prozent relativ zum Input (1 %), korrigiert um die Immunglobulin-Kontrolle. Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. Balken, SA

Abschließend wurden Immunfluoreszenzfärbungen astroglial differenzierter Primärzellen am Tag 3 durchgeführt (**Abb. 55**). Die Färberergebnisse demonstrierten die Kolokalisation von Zac1 und Socs3 (**Abb. 55 F**). Es wurden GFAP/A2B5 doppelt positive Zellen nachgewiesen (**Abb. 55 C**). Zudem zeigten Untersuchungen zur Kolokalisation von Zac1/Socs3 und glialen Markern die gemeinsame Expression mit dem Marker A2B5 (**Abb. 55 D, E**), wogegen die Kolokalisation mit dem Marker GFAP kaum vorhanden war (**Abb. 55 A, B**). Folglich sind die Zac1/Socs3 doppelt positiven Zellen mit astroglialen Vorläuferzellen und nicht mit den Astrozyten assoziiert.

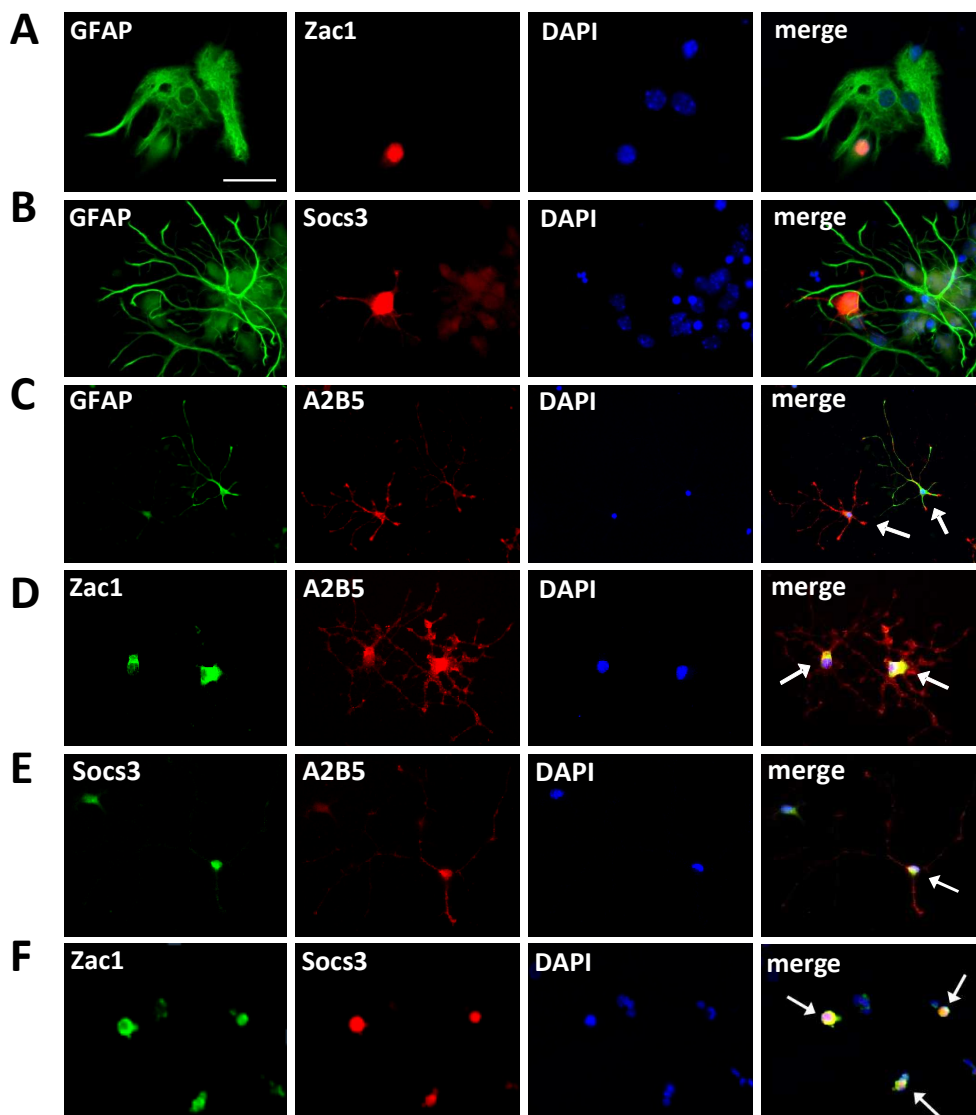


Abb. 55: Immunfluoreszenz von Zac1 und Socs3 mit astroglialen Markern in differenzierten Primärzellen

Zellen wurden am Tag 3 der astroglialen Differenzierung fixiert und gefärbt mit Antikörpern gegen Zac1 (**A** rot; **D, F** grün); Socs3 (**E** grün; **B, F** rot); A2B5 (**C-E** rot) und GFAP (**A-C** grün). Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Repräsentative Bilder wurden angefertigt mit identischer Laserleistung und Verstärkung. Balken, Maßstab 100 μm

In Vorarbeiten wurden genomweite Mikroarray-Analysen in verschiedenen neuronalen Stamm- und Vorläuferzelllinien durchgeführt, die zur Aufklärung der vom Transkriptionsfaktor Zac1 regulierten Gene und der davon abhängigen Signalwege dienten. In der vorliegenden Studie wurde *Socs3* als neues Zielgen von Zac1 untersucht. Das *Suppressor of Cytokine Signaling* (*Socs3*) Protein ist ein wirksamer Hemmer des Jak/Stat3-Signalweges (Baker et al., 2009; Boyle et al., 2009; Starr et al., 1997). In Differenzierungsstudien an neuronalen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass das Zac1-Zielgen *Socs3* die astrogliale Differenzierung über zytokinvermittelte Jak/Stat3-Signaltransduktion kontrolliert.

Molekularbiologische Analysen in der NSC-Zelllinie C17.2 zeigen, dass *Socs3* durch Zac1 transaktiviert wird und ein direktes *bona fide* Zielgen ist. In seiner Eigenschaft, die Genaktivität direkt oder indirekt zu regulieren, fungiert der Transkriptionsfaktor Zac1 einerseits als sequenzspezifischer DNA-bindender Faktor oder andererseits als Koregulator durch Interaktion mit unverwandten sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren (Hoffmann et al., 2003; Hoffmann und Spengler, 2008). Die durchgeführten Luziferase-Reporter-Assays zeigten nach Kotransfektion von Wildtyp-Zac1 und verschiedener Zac1-Mutanten die Notwendigkeit der Transaktivierungsdomäne (Δ LPR) und der DNA-Bindung, insbesondere von ZF 6 und ZF 7, für die Transaktivierung des *Socs3*-Promotors. Somit konnte eine indirekte Regulierung durch die Funktion von Zac1 als Koaktivator ausgeschlossen werden. Darüber hinaus zeigten Transfektionsexperimente die transkriptionelle Aktivierung des *Socs3*-Gens (qRT-PCR und Immunoblot) durch Zac1, wohingegen die Mutation der Zac1 Transaktivierungsdomäne (Δ LPR) zum Verlust Zac1-abhängiger *Socs3*-Regulation führte. Weitere Untersuchungen zeigten zudem eine verminderte Phosphorylierung des Stat3-Epitops Tyr-705 nach Zac1-Transfektion (Boyle et al., 2009; Starr et al., 1997; Yoshimura, 1998).

In silico Analysen der 5'-regulatorischen Abschnitte des murinen *Socs3*-Gens ergaben Hinweise auf mehrere potentielle DNA-Bindungsmotive von Zac1 an GC-reiche Palindrome (G_4C_4) oder direkte und umgekehrte Wiederholungselemente $(G_4N_6G_4)_2$ (Hoffmann et al., 2003). Um das bevorzugte DNA-Bindungsmotiv von Zac1 am *Socs3*-Promotor zu identifizieren, wurde mutiertes Zac1 verwendet, welches eine Transaktivierung von direkten und umgekehrt wiederholenden $(G_4N_6G_4)_2$ Elementen ausschloss (Hoffmann et al., 2003). Die Abnahme der Reporteraktivität zeigte, dass die Transaktivierung des *Socs3*-Promotors durch beide Klassen von Zac1-Bindungsmotiven erfolgt. *In vivo* Untersuchungen der Zac1-

Bindungsstellen am *Socs3*-Promotor mittels Chromatin-Immunopräzipitation konnte die Zac1-Bindung an den untersuchten Bereichen des proximalen Promotors, im Exon 1 und Intron nachweisen. Hingegen wurde in Kontrollversuchen im distalen Bereich keine Bindung nach Zac1-Überexpression festgestellt, womit die Spezifität der Zac1-Bindung am *Socs3*-Promotor gestützt wurde. Zur Eingrenzung der transkriptionellen Aktivierung von *Socs3* durch Zac1 wurden Reporter-Assays mit sukzessiv verkürzten *Socs3*-Promotorkonstrukten durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zac1-Bindung an den untersuchten Bereichen zur transkriptionellen Aktivierung des *Socs3*-Promotors führte. Re-ChIP-Experimente mit Histonmarkern in astroglial differenzierten Primärzellen legten nahe, dass die Zac1-Bindung am Exon 1 in der Summe zu keinem Überwiegen aktivierender Veränderung des Chromatins beitrug. Im Gegensatz dazu führte die Zac1-Bindung am Promotor und Intron zur Zunahme von aktivierenden Histonmodifikationen, wie die Acetylierung des Histonproteins 3 (acH3). Somit konnte gezeigt werden, dass die Regulation des *Socs3*-Gens vorwiegend durch Bindung von Zac1 im Promotor und Intron bestimmt wird. Die Untersuchungen in humanen SK-N-MC Zellen konnten eine zwischen Maus und Mensch konservierte transkriptionelle Regulation von *SOCS3* durch *ZAC1* nachweisen. Der humane *SOCS3*-Promotor weist eine hohe Homologie zur Maus auf (He et al., 2003). Damit sind die gewonnenen Erkenntnisse in der Maus auch auf das humane *SOCS3*-Gen übertragbar.

Die vorliegende Arbeit stellte somit erstmals einen direkten funktionellen Zusammenhang zwischen *Socs3*-Expression und seiner Regulation durch Zac1 bei der Kontrolle des Jak/Stat3-Signalweges her. Die anhaltende Aktivierung von *Socs3* durch Zac1-Überexpression führte zur Hemmung der durch Jak vermittelten Tyr-705 Phosphorylierung von Stat3. Damit verstärkt Zac1 die Stat3 induzierte negative Rückkopplung durch *Socs3* Induktion (Bousquet et al., 1999; Boyle et al., 2009; Kageyama et al., 2008). Neben den GC-reichen Bindungsstellen für Zac1 und den Stat3 bindenden GAS-Elementen sind weitere DNA-Motive von Transkriptionsfaktoren, wie Sp1, AP-1, JunB, c-Fos, NFκB und GATA, am *Socs3*-Promotor beschrieben (Auernhammer und Melmed, 2001; Qin et al., 2007). Im Zusammenhang mit der Funktion in Immunzellen werden nach Stimulation mit Lipopolysacchariden neben Jak/Stat3 auch andere Signalkaskaden von *Socs3* moduliert, wie der *Mitogene Activated Protein Kinase* (MAPK) und der *nuclear factor-kappa B* (NFκB) Signalweg (Baker et al., 2009).

Zellbiologische Untersuchungen orientierten sich an dem Zac1-Expressionsmuster während der Entwicklung des Nervensystems in der Maus. Die Rolle der Zac1-vermittelten *Socs3*

Expression wurde zunächst im Kontext der Differenzierung neuronaler Stammzellen untersucht (Alam et al., 2005; Valente und Auladell, 2001; Valente et al., 2005). Die C17.2 Zellen waren hierfür nicht optimal, da sie *in vitro* nur unzureichend ausdifferenzieren (Snyder et al., 1992). Deshalb wurden die von embryonalen Stammzellen abgeleiteten NS-5 Zellen und die aus der adulten murinen subventrikulären Zone (SVZ) isolierten O4ANS Zellen untersucht. Beide Zelllinien weisen einen den Radialgliazellen ähnlichen Phänotyp auf (Conti et al., 2005; Pollard et al., 2006). Hervorzuheben ist zudem die Fähigkeit dieser Stammzelllinien zur stabilen klonalen Selbsterneuerung und tripotenten Differenzierung. Damit ermöglichen sie im Gegensatz zu den C17.2 Zellen die Untersuchung des Zac1-Zielgens *Socs3* in Prozessen der Differenzierung und Zellzyklusregulation im Kontext biologisch relevanter Zellmodelle.

Die Ergebnisse zeigten ausschließlich in einem frühen Stadium während des astroglialen Zellschicksals eine temporäre Zac1-induzierte *Socs3*-Expression. Daher stellte sich die Frage, ob und warum eine vorübergehende Beeinträchtigung des Jak/Stat3-Signalweges Konsequenzen in der terminalen Differenzierung von astroglialen Vorläuferzellen hat. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Initiation der Gliogenese von der erstmaligen Aktivierung des Jak/Stat3-Signalweges durch die Zytokine CNTF oder LIF reguliert wird (Bonni et al., 1997; Freeman, 2010; Fukuda et al., 2007; He et al., 2005). Im Einklang damit wurde durch Deletion der Komponenten des Jak/Stat3-Signalweges, wie gp130, LIF und Stat3, eine Beeinträchtigung der astroglialen Differenzierung nachgewiesen (Bugga et al., 1998; He et al., 2005; Nakashima et al., 1999). Darüber hinaus wurde vorgeschlagen, dass das von astroglialen Vorläuferzellen exprimierte C-Reihe Gangliosid A2B5 (Saito et al., 2001) durch die Jak/Stat3-abhängige Regulation bestimmter Glycosyltransferasen gebildet wird (Inoko et al., 2010; Li und Grumet, 2007). Im weiteren Verlauf des astroglialen Reifungsprozesses üben BMPs eine wichtige Rolle durch Induktion der Smad-Signalweg-abhängigen Gene in der terminalen Differenzierung aus (Fukuda et al., 2007; Li und Grumet, 2007; Mabie et al., 1997). Der BMP-Signalweg ist in der GFAP-Expression A2B5-positiver Vorläuferzellen involviert und führt durch Induktion der Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21^{Waf1/Cip1} und p27^{Kip1} zur Inhibition der Zellproliferation (Bonaguidi et al., 2005; Kondo und Raff, 2004; Mabie et al., 1997). Vergleichende Studien von astroglial-differenzierten Zellen mit LIF oder BMP-4 offenbarten einen pro-differenzierenden Effekt durch den LIF-Signalweg, während

der BMP-Signalweg die Reifung der Zellen durch Induktion des Zellzyklusarrestes fördert (Bonaguidi et al., 2005).

In der Tat zeigten die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen die transiente Zelltyp-spezifische Kolo-kalisation von Zac1 und Socs3 in Vorläuferzellen, die sowohl A2B5 und GFAP exprimierten. Darüber hinaus zeigten die Färbeargebnisse des Proliferationsmarkers Ki-67 den postmitotischen Zustand dieses Phänotyps im Gegensatz zu den A2B5-positiven astroglialen Vorläuferzellen. Daher ließ die zeitliche und zellspezifische Kolo-kalisation von Zac1 und Socs3 eine regulatorische Funktion von Zac1 beim Übergang von astroglialen Vorläuferzellen zu postmitotischen Astrozyten vermuten. Dies unterstützten Transfektions-experimente mit Zac1-GFP, die eine Beeinträchtigung der GFAP-Expression zu einem frühen Zeitpunkt der astroglialen Differenzierung zeigten. Um der Frage der physiologischen Funktion von Zac1 während der Gliogenese nachzugehen, wurden Versuche in O4ANS Zellen mit stabiler Überexpression oder Knock-down von Zac1 durchgeführt. Dabei führte die veränderte Zac1-Expression gleichsam zur Verschiebung der Socs3-Expression. Im Vergleich mit den astroglial-differenzierten parentalen Zellen wies die Zac1-Überexpression eine Verdopplung der Socs3-Expression auf, wohingegen Zac1-shRNA diese reduzierte.

Der Knock-down von Zac1 durch shRNA führte zur Verlängerung der Proliferationsphase und einer verstärkten GFAP-Expression. Diese steht im Zusammenhang mit kontinuierlicher Stat3-Signaltransduktion und wurde gemeinsam mit der Smad-konzertierten Aktivierung des GFAP-Promotors beschrieben (Bonaguidi et al., 2005; Emery et al., 2006; Fukuda et al., 2007). Diese Beobachtungen wurden ebenfalls in *Zac1*-Null-Mutanten der Maus festgestellt. Valente et.al fand eine Zunahme von Zellpopulationen unreifer und reifer GFAP-positiver Astrozyten, die einen proliferativen Charakter aufwiesen (Valente, PhD thesis, 2005). Dieser Beobachtung könnte eine unausgewogene Regulation des Jak/Stat3-Signalweges zugrunde liegen. Der Jak/Stat3-Signalweg erfüllt wichtige Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Proliferation durch Induzierung der Zellzyklusproteine *Cyclin D1* und *c-myc*. Dagegen wird der G1-Arrest durch Unterdrückung der CDKI-Proteine *p21^{Waf1/Cip1}* und *p53* gehemmt (Cartwright et al., 2005; Fukuda et al., 1998; Niu et al., 2005). Andere Studien zeigten, dass *p21^{Waf1/Cip1}* durch Stat3 im Rahmen einer Negativ-Rückkopplungsregulation induziert werden kann, um die Stat3-Aktivität zu kontrollieren (Coqueret und Gascan, 2000).

Im Gegensatz dazu führte eine Verdopplung der Zac1-Dosis zum vorzeitigen Verlust der proliferativen Eigenschaften von astroglialen Vorläuferzellen und zur verzögerten

astroglialen Differenzierung. Darüber hinaus zeigte die begrenzte CNTF-induzierte Differenzierung durch Zac1-Überexpression eine von Socs3-vermittelte Hemmung des Jak/Stat3-Signalweges (**Abb. 56**). Deshalb scheint eine strikte Regulierung des geprägten *Zac1*-Gens für die Kontrolle der Gliogenese notwendig zu sein. In Studien zur Socs3-Überexpression während der Differenzierung NSCs wurde die Hemmung der Stat3-vermittelten Astrogliogenese nachgewiesen (Cao et al., 2006). Im Gegensatz dazu führte in NSCs eine beeinträchtigte Negativ-Rückkopplungsregulation durch Deletion von *Socs3* zur kontinuierlichen Stat3-Aktivierung und vorzeitigen Differenzierung in Astrozyten (Fukuda et al., 2007). Neben der Steuerung des Jak/Stat3-Signalweges wurde eine zusätzliche Funktion von Socs3 beschrieben. Die Protein-Protein-Wechselwirkung mit DP1 führt zur verminderten Bildung von DP1/E2F-Komplexen, was eine Zellzyklus-Progression in die S-Phase verhindert (Masuhiro et al., 2008). Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung von Socs3 an den terminalen Differenzierungsprozessen durch die Modulation des G1-Arrestes hin.

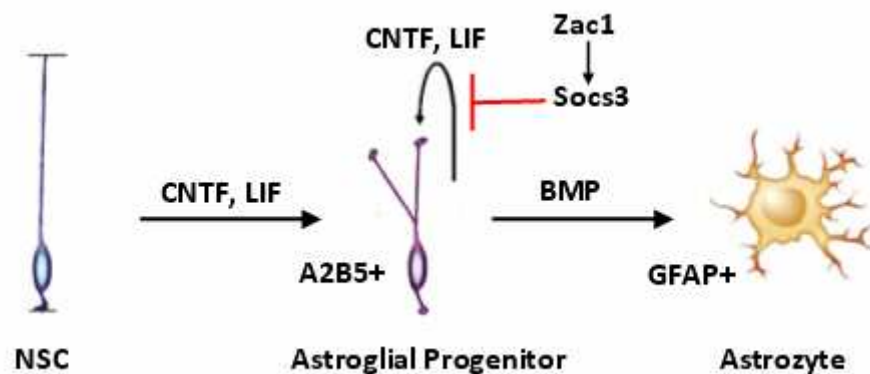


Abb. 56: Model der Zac1-induzierten Socs3-Regulation des Jak/Stat3-Signalweges während der Gliogenese

Der Stat3-Signalweg hat vielseitige biologische Aktivität u.a. während der Zellproliferation und Tumorgenese (Levy und Lee, 2002; Washburn und Neary, 2006). Bei entzündlichen Prozessen des Gehirns förderte die Aktivierung von Stat3 die Proliferation von ruhenden Astrozyten im Rahmen der reaktiven Astrogliosis (Tsuda et al., 2011), wobei Socs3 die Migration von Astrozyten hemmte (Okada et al., 2006). Studien zur Socs3-Überexpression zeigten antiproliferative Aktivität während der Tumorgenese (Iwahori et al., 2011). Darüber hinaus erhöhte Socs3 durch Inhibition von Stat3 und Aktivierung des p21^{Waf1/Cip1} vermittelten Zellzyklusarrestes die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber Strahlung (Sitko et al., 2008). Daher stellt sich die Frage, ob der Tumorsuppressor Zac1 seine Funktion auch durch die Socs3-vermittelte Regulierung des onkogenen Stat3-Signalweges erfüllt.

Das mütterlich geprägte Gen *Zac1* kodiert ein Zinkfingerprotein, das als Transkriptionsfaktor und Koregulator die Zellproliferation und Differenzierung während der Embryogenese und postnatalen Entwicklung reguliert. Während der Gehirnentwicklung der Maus wird *Zac1* in neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert, was die Frage aufwarf, ob *Zac1* zur Kontrolle von Zellschicksalsentscheidungen beiträgt. Deshalb wurden genomweite Expressionsanalysen in neuronalen Stammzellen der Maus durchgeführt, um das zugrunde liegende Gen-Netzwerk von *Zac1* zu analysieren. Hierbei wurde *Socs3* identifiziert, ein bekannter potenter Negativ-Regulator des Jak/Stat3-Signalweges. In der vorliegenden Arbeit konnte die Funktion von *Socs3* als Vermittler der biologischen Aktivität von *Zac1* in der Kontrolle proliferativer und pro-differenzierender Signaltransduktion gezeigt werden. Zum ersten Mal wurde demonstriert, dass *Socs3* ein *bona fide* Zielgen in Maus und Mensch ist, dessen Regulation von der Transaktivatorfunktion von *Zac1* bestimmt wird. Molekularbiologische Analysen zeigten eine Regulation des *Socs3*-Gens durch mehrfache *Zac1*-Bindung am proximalen Promotor und Intron.

Für die zellbiologische Untersuchung wurde die Rolle von *Zac1* während der Differenzierung in neuronalen Stammzellmodellen analysiert. Dabei wurde eine transiente *Zac1*- und *Socs3*-Expression ausschließlich während der frühen Phase der astroglialen Zelllinienentscheidung festgestellt. Immunfluoreszenzfärbungen zeigten die zelltypspezifische Kolo-kalisation von *Zac1* und *Socs3* in transient auftretenden astroglialen A2B5/GFAP doppelt positiven Zellen, die negativ für den Proliferationsmarker Ki-67 und somit postmitotisch waren. Darüber hinaus wurden durch die stabile *Zac1*-Überexpression ein vorzeitiger Verlust der proliferativen astroglialen Vorläuferzellen und eine verzögerte Gliogenese beobachtet. Weitergehende Analysen zeigten eine durch *Zac1*-Überexpression deutlich gestörte Jak/Stat3-abhängige CNTF-induzierte astrogliale Differenzierung. Im Gegensatz dazu, zeigte ein Knock-down von *Zac1* in astroglial-differenzierten Zellen eine frühzeitige und verstärkte Expression von glialen Markern. Dabei war die CNTF oder BMP-4 initiierte Differenzierung unbeeinträchtigt. Daraus wurde geschlossen, dass die *Zac1*-vermittelte *Socs3*-Expression zur Kontrolle des pro-differenzierenden Jak/Stat3-Signalweges beiträgt und somit an den Mechanismen der progressiven Reifung von astroglialen Vorläuferzellen beteiligt ist.

The maternally imprinted gene *Zac1* encodes a transcriptional regulator and coregulator in cell proliferation and differentiation during embryogenesis and postnatal development. During mouse brain development *Zac1* expression occurs in neural stem/progenitor cells, raising the question of whether *Zac1* controls cell fate decisions. Therefore, a genome-wide expression analysis was performed in the C17.2 mouse NSC line to unravel the gene networks regulated by *Zac1*. Hereby, *Socs3* was identified, a known potent negative regulator of the Jak/Stat3 signaling pathway. In this study, *Socs3* was highlighted as a promising candidate gene of *Zac1* underlying its biological activity through controlling proliferative and differentiative signal transduction. For the first time it was demonstrated that *Socs3* is a *bona fide* transcriptional target gene in mouse and human, whose regulation depends on the transactivator function of *Zac1*. ChIP experiments revealed multiple binding sites of *Zac1* at the *Socs3* 5'-regulatory region. Reporter assays confirmed that concerted *Zac1* occupancy led to synergistic transactivation. To investigate the role of *Zac1* during differentiation, the natural derived NS-5 and O4ANS mouse NSC models were used. Temporary *Socs3* promoter occupancy and induction by *Zac1* was found exclusively during an early stage of astroglial differentiation. Immunocytological analysis revealed the cell-type specific colocalization of *Zac1* and *Socs3* in transiently A2B5/GFAP double positive cells, which were postmitotic as assessed by proliferation marker Ki-67. Further, *Zac1* overexpression was linked to premature loss of proliferative astroglial progenitors and reduced A2B5 expression, as well as GFAP at early stages. To obtain more insights in related signaling pathways, CNTF or BMP-4 induced astroglial differentiation was investigated. A marked impairment by *Zac1* overexpression was found, most strikingly for CNTF. In contrast, a knock-down of *Zac1* revealed sustained proliferative capability of astroglial cells with enhanced glial marker expression and unimpaired CNTF or BMP4 initiated differentiation. Therefore, it is proposed that *Zac1* mediated *Socs3* expression has a negative impact on proliferation by controlling Jak/Stat3 signaling and participates in the mechanisms of progressive lineage restriction and maturation of astroglial progenitors.

1. Abdollahi,A. (2007). LOT1 (ZAC1/PLAGL1) and its family members: Mechanisms and functions. *J Cell Physiol* 210, 16-25.
2. Abdollahi,A., Godwin,A.K., Miller,P.D., Getts,L.A., Schultz,D.C., Taguchi,T., Testa,J.R., and Hamilton,T.C. (1997). Identification of a Gene Containing Zinc-Finger Motifs Based on Lost Expression in Malignantly Transformed Rat Ovarian Surface Epithelial Cells. *Cancer Res* 57, 2029-2034.
3. Akira,S. (1999). Functional Roles of STAT Family Proteins: Lessons from Knockout Mice. *Stem cells* 17, 138-146.
4. Alam,S., Zinyk,D., Ma,L., and Schuurmans,C. (2005). Members of the Plag gene family are expressed in complementary and overlapping regions in the developing murine nervous system. *Dev Dyn* 234, 772-782.
5. Allen,N.D., Logan,K., Lally,G., Drage,D.J., Norris,M.L., and Keverne,E.B. (1995). Distribution of parthenogenetic cells in the mouse brain and their influence on brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10782-10786.
6. Altman,J. and Das,G.D. (1965). Post-Natal Origin of Microneurons in the Rat Brain. *Nature* 207, 953-956.
7. Arima,T., Kamikihara,T., Hayashida,T., Kato,K., Inoue,T., Shirayoshi,Y., Oshimura,M., Soejima,H., Mukai,T., and Wake,N. (2005). Zac, Lit1 (Kcnq10t1) and P57(Kip2) (Cdkn1C) Are in An Imprinted Gene Network That May Play A Role in Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Nucleic Acids Res* 33, 2650-2660.
8. Auernhammer,C.J., Bousquet,C., and Melmed,S. (1999). Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: Characterization of the murine SOCS-3 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6964-6969.
9. Auernhammer,C.J. and Melmed,S. (2001). The central role of SOCS-3 in integrating the neuro-immunoendocrine interface. *J Clin Invest* 108, 1735-1740.
10. Babon,J.J., Sabo,J.K., Soetopo,A., Yao,S., Bailey,M.F., Zhang,J.G., Nicola,N.A., and Norton,R.S. (2008). The SOCS Box Domain of SOCS3: Structure and Interaction with the ElonginBC-Cullin5 Ubiquitin Ligase. *J Mol Biol* 381, 928-940.
11. Baker,B.J., Akhtar,L.N., and Benveniste,E.N. (2009). SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity. *Trends Immunol* 30, 392-400.
12. Barlow,D.P. (2011). Genomic Imprinting: A Mammalian Epigenetic Discovery Model. *Annu Rev Genet* 45, 379-403.
13. Barnabe-Heider,F., Wasylnka,J.A., Fernandes,K.J.L., Porsche,C., Sendtner,M., Kaplan,D.R., and Miller,F.D. (2005). Evidence that Embryonic Neurons Regulate the Onset of Cortical Gliogenesis via Cardiotrophin-1. *Neuron* 48, 253-265.
14. Barton,S.C., Surani,M.A.H., and Norris,M.L. (1984). Role of Paternal and Maternal Genomes in Mouse Development. *Nature* 311, 374-376.
15. Barz,T., Hoffmann,A., Panhuysen,M., and Spengler,D. (2006). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-1 Is a Zac Target Gene Mediating Zac Antiproliferation. *Cancer Res* 66, 11975-11982.
16. Basyuk,E., Coulon,V., Le Digarcher,A., Coisy-Quivy,M., Moles,J.P., Gandarillas,A., and Journot,L. (2005). The Candidate Tumor Suppressor Gene ZAC Is Involved in Keratinocyte Differentiation and Its Expression Is Lost in Basal Cell Carcinomas. *Mol Cancer Res* 3, 483-492.
17. Bertrand,N., Castro,D.S., and Guillemot,F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3, 517-530.
18. Biedler,J.L., Helson,L., and Spengler,B.A. (1973). Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer Res* 33, 2643-2652.
19. Bilanges,B., Varrault,A., Mazumdar,A., Pantaloni,C., Hoffmann,A., Bockaert,J., Spengler,D., and Journot,L. (2001). Alternative splicing of the imprinted candidate tumor suppressor gene ZAC regulates its antiproliferative and DNA binding activities. *Oncogene* 20, 1246-1253.
20. Bonaguidi,M.A., McGuire,T., Hu,M., Kan,L., Samanta,J., and Kessler,J.A. (2005). LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells. *Development* 132, 5503-5514.
21. Bonasio,R., Tu,S., and Reinberg,D. (2010). Molecular Signals of Epigenetic States. *Science* 330, 612-616.
22. Bonni,A., Sun,Y., Nadal-Vicens,M., Bhatt,A., Frank,D.A., Rozovsky,I., Stahl,N., Yancopoulos,G.D., and Greenberg,M.E. (1997). Regulation of Gliogenesis in the Central Nervous System by the JAK-STAT Signaling Pathway. *Science* 278, 477-483.
23. Borggreffe,T. and Liefke,R. (2012). Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway. *Cell Cycle* 11, 264-276.

24. Bousquet,C., Susini,C., and Melmed,S. (1999). Inhibitory roles for SHP-1 and SOCS-3 following pituitary proopiomelanocortin induction by leukemia inhibitory factor. *J Clin Invest* 104, 1277-1285.
25. Boyle,K., Zhang,J.G., Nicholson,S.E., Trounson,E., Babon,J.J., McManus,E.J., Nicola,N.A., and Robb,L. (2009). Deletion of the SOCS box of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in embryonic stem cells reveals SOCS box-dependent regulation of JAK but not STAT phosphorylation. *Cell Signal* 21, 394-404.
26. Bradford,M.M. (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
27. Bromberg,J.F., Wrzeszczynska,M.H., Devgan,G., Zhao,Y., Pestell,R.G., Albanese,C., and Darnell,J.E. (1999). Stat3 as an Oncogene. *Cell* 98, 295-303.
28. Bugga,L., Gadiant,R.A., Kwan,K., Stewart,C.L., and Patterson,P.H. (1998). Analysis of neuronal and glial phenotypes in brains of mice deficient in leukemia inhibitory factor. *J Neurobiol* 36, 509-524.
29. Caccamo,D., Katsetos,C.D., Herman,M.M., Frankfurter,A., Collins,V.P., and Rubinstein,L.J. (1989). Immunohistochemistry of a spontaneous murine ovarian teratoma with neuroepithelial differentiation. Neuron-associated beta-tubulin as a marker for primitive neuroepithelium. *Lab Invest* 60, 390-398.
30. Cai,J., Xue,H., Zhan,M., and Rao,M.S. (2004). Characterization of Progenitor-Cell-Specific Genes Identified by Subtractive Suppression Hybridization. *Dev Neurosci* 26, 131-147.
31. Cai,J., Wu,Y., Mirua,T., Pierce,J.L., Lucero,M.T., Albertine,K.H., Spangrude,G.J., and Rao,M.S. (2002). Properties of a Fetal Multipotent Neural Stem Cell (NEP Cell). *Dev Biol* 251, 221-240.
32. Cao,F., Hata,R., Zhu,P., Ma,Y.J., Tanaka,J., Hanakawa,Y., Hashimoto,K., Niinobe,M., Yoshikawa,K., and Sakanaka,M. (2006). Overexpression of SOCS3 inhibits astroglialogenesis and promotes maintenance of neural stem cells. *J Neurochem* 98, 459-470.
33. Cartwright,P., McLean,C., Sheppard,A., Rivett,D., Jones,K., and Dalton,S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132, 885-896.
34. Cattanach,B.M. and Kirk,M. (1985). Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* 315, 496-498.
35. Choi,B.H. (1988). Prenatal Gliogenesis in the Developing Cerebrum of the Mouse. *Glia* 1, 308-316.
36. Chung,C.D., Liao,J.Y., Liu,B., Rao,X.P., Jay,P., Berta,P., and Shuai,K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803-1805.
37. Chung,S.H., Marzban,H., Aldinger,K., Dixit,R., Millen,K., Schuurmans,C., and Hawkes,R. (2011). Zac1 plays a key role in the development of specific neuronal subsets in the mouse cerebellum. *Neural Dev* 6, 25.
38. Ciani,E., Frenquelli,M., and Contestabile,A. (2003). Developmental expression of the cell cycle and apoptosis controlling gene, *Lot1*, in the rat cerebellum and in cultures of cerebellar granule cells. *Dev Brain Res* 142, 193-202.
39. Ciani,E., Hoffmann,A., Schmidt,P., Journot,L., and Spengler,D. (1999). Induction of the PAC1-R (PACAP-type I receptor) gene by p53 and Zac. *Mol Brain Res* 69, 290-294.
40. Constancia,M., Kelsey,G., and Reik,W. (2004). Resourceful imprinting. *Nature* 432, 53-57.
41. Contestabile,A., Fila,T., Bartesaghi,R., and Ciani,E. (2005). Cyclic AMP-mediated Regulation of Transcription Factor *Lot1* Expression in Cerebellar Granule Cells. *J Biol Chem* 280, 33541-33551.
42. Conti,L., Pollard,S.M., Gorba,T., Reitano,E., Toselli,M., Biella,G., Sun,Y., Sanzone,S., Ying,Q.L., Cattaneo,E., and Smith,A. (2005). Niche-Independent Symmetrical Self-Renewal of a Mammalian Tissue Stem Cell. *PLoS Biol* 3, e283.
43. Coqueret,O. and Gascan,H. (2000). Functional Interaction of STAT3 Transcription Factor with the Cell Cycle Inhibitor p21 WAF1/CIP1/SDI1. *J Biol Chem* 275, 18794-18800.
44. Coskun,V., Zhao,J., and Sun,Y.E. (2007). Neurons or Glia? Can SHP2 Know It All? *Sci STKE* 2007, e58.
45. Croker,B.A., Kiu,H., and Nicholson,S.E. (2008). SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19, 414-422.
46. Czubryt,M.P., Lamoureux,L., Ramjiawan,A., Abrenica,B., Jangamreddy,J., and Swan,K. (2010). Regulation of Cardiomyocyte *Glut4* Expression by ZAC1. *J Biol Chem* 285, 16942-16950.
47. Dabir,S., Kluge,A., and Dowlati,A. (2009). The Association and Nuclear Translocation of the PIAS3-STAT3 Complex Is Ligand and Time Dependent. *Mol Cancer Res* 7, 1854-1860.
48. Davies,W., Isles,A.R., and Wilkinson,L.S. (2005). Imprinted gene expression in the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 421-430.
49. Deverman,B.E. and Patterson,P.H. (2009). Cytokines and CNS Development. *Neuron* 64, 61-78.
50. Doetsch,F., Caille,I., Lim,D.A., Garcia-Verdugo,J.M., and Alvarez-Buylla,A. (1999). Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* 97, 703-716.

51. Doetsch,F., Garcia-Verdugo,J.M., and Alvarez-Buylla,A. (1997). Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. *J Neurosci* 17, 5046-5061.
52. Eisenbarth,G.S., Walsh,F.S., and Nirenberg,M. (1979). Monoclonal Antibody to a Plasma Membrane Antigen of Neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4913-4917.
53. Elkabetz,Y., Panagiotakos,G., Al Shamy,G., Socci,N.D., Tabar,V., and Studer,L. (2008). Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev* 22, 152-165.
54. Emery,B., Merson,T.D., Snell,C., Young,K.M., Ernst,M., and Kilpatrick,T.J. (2006). SOCS3 negatively regulates LIF signaling in neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci* 31, 739-747.
55. Eriksson,P.S., Perfilieva,E., Bjork-Eriksson,T., Alborn,A.M., Nordborg,C., Peterson,D.A., and Gage,F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317.
56. Fath,T., Ke,Y.D., Gunning,P., Gotz,J., and Ittner,L.M. (2008). Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons. *Nat Protoc* 4, 78-85.
57. Fila,T., Trazzi,S., Crochemore,C., Bartesaghi,R., and Ciani,E. (2009). *Lot1* Is a Key Element of the Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide (PACAP)/Cyclic AMP Pathway That Negatively Regulates Neuronal Precursor Proliferation. *J Biol Chem* 284, 15325-15338.
58. Finlay,B.L. and Darlington,R.B. (1995). Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science* 268, 1578-1584.
59. Fitzgerald,J.S., Toth,B., Jeschke,U., Schleussner,E., and Markert,U.R. (2009). Knocking off the suppressors of cytokine signaling (SOCS): their roles in mammalian pregnancy. *J Reprod Immunol* 83, 117-123.
60. Freeman,M.R. (2010). Specification and Morphogenesis of Astrocytes. *Science* 330, 774-778.
61. Frontera,M., Dickins,B., Plagge,A., and Kelsey,G. (2008). Imprinted Genes, Postnatal Adaptations and Enduring Effects on Energy Homeostasis. *Genomic Imprinting*. J.F.Wilkins, ed. Springer New York, pp. 41-61.
62. Fukada,T., Ohtani,T., Yoshida,Y., Shirogane,T., Nishida,K., Nakajima,K., Hibi,M., and Hirano,T. (1998). STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G(1) to S cell-cycle transition. *EMBO J* 17, 6670-6677.
63. Fukuda,S., Abematsu,M., Mori,H., Yanagisawa,M., Kagawa,T., Nakashima,K., Yoshimura,A., and Taga,T. (2007). Potentiation of Astroglialogenesis by STAT3-Mediated Activation of Bone Morphogenetic Protein-Smad Signaling in Neural Stem Cells. *Mol Cell Biol* 27, 4931-4937.
64. Glaser,T., Pollard,S.M., Smith,A., and Brustle,O. (2007). Tripotential Differentiation of Adherently Expandable Neural Stem (NS) Cells. *Plos One* 2, e298
65. Gossen,M. and Bujard,H. (1992). Tight Control of Gene-Expression in Mammalian-Cells by Tetracycline-Responsive Promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-5551.
66. Gotz,M. and Huttner,W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 777-788.
67. Hatada,I., Namihira,M., Morita,S., Kimura,M., Horii,T., and Nakashima,K. (2008). Astrocyte-Specific Genes Are Generally Demethylated in Neural Precursor Cells Prior to Astrocytic Differentiation. *Plos One* 3, e3189.
68. He,B., You,L., Uematsu,K., Matsangou,M., Xu,Z., He,M., McCormick,F., and Jablons,D.M. (2003). Cloning and characterization of a functional promoter of the human SOCS-3 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 386-391.
69. He,F., Ge,W., Martinowich,K., Becker-Catania,S., Coskun,V., Zhu,W., Wu,H., Castro,D., Guillemot,F., Fan,G., de Vellis,J., and Sun,Y.E. (2005). A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nat Neurosci* 8, 616-625.
70. Heim,M.H. (1999). The Jak-Stat Pathway: Cytokine Signalling from the Receptor to the Nucleus. *J Recept Signal Transduct Res* 19, 75-120.
71. Heinrich,P.C., Behrmann,I., Muller-Newen,G., Schaper,F., and Graeve,L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334, 297-314.
72. Hermanson,O., Jepsen,K., and Rosenfeld,M.G. (2002). N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature* 419, 934-939.
73. Hirabayashi,Y. and Gotoh,Y. (2010). Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nat Rev Neurosci* 11, 377-388.
74. Hitchins,M.P. and Moore,G.E. (2002). Genomic imprinting in fetal growth and development. *Expert Rev Mol Med* 4, 1-19.

75. Ho,C.L., Huang,Y.C., Tai,C.K., Liu,S.T., Wang,J.K., Wang,W.M., and Huang,S.M. (2010). Modulation of the Zac1's transactivation and coactivation functions via PML and Daxx within distinct subcellular localizations. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 902-910.
76. Hoffmann,A., Ciani,E., Houssami,S., Brabet,P., Journot,L., and Spengler,D. (1998). Induction of Type I PACAP Receptor Expression by the New Zinc Finger Protein Zac1 and p53. *Ann N Y Acad Sci* 865, 49-58.
77. Hoffmann,A., Barz,T., and Spengler,D. (2006). Multitasking C2H2 Zinc Fingers Link Zac DNA Binding to Coordinated Regulation of p300-Histone Acetyltransferase Activity. *Mol Cell Biol* 26, 5544-5557.
78. Hoffmann,A., Ciani,E., Boeckardt,J., Holsboer,F., Journot,L., and Spengler,D. (2003). Transcriptional Activities of the Zinc Finger Protein Zac Are Differentially Controlled by DNA Binding. *Mol Cell Biol* 23, 988-1003.
79. Hoffmann,A. and Spengler,D. (2008). A New Coactivator Function for Zac1's C2H2 Zinc Finger DNA-Binding Domain in Selectively Controlling PCAF Activity. *Mol Cell Biol* 28, 6078-6093.
80. Hoffmann, A and Spengler, D. (2012). Transient Neonatal Diabetes Mellitus Gene *Zac1* Impairs Insulin Secretion in Mice through Rasgrf1. *Mol Cell Biol* 32:2549-2560.
81. Hoffmann,A., Villalba,M., Journot,L., and Spengler,D. (1997). A Novel Tetracycline-Dependent Expression Vector with Low Basal Expression and Potent Regulatory Properties in Various Mammalian Cell Lines. *Nucleic Acids Res* 25, 1078-1079.
82. Huang,S.M., Schonthal,A.H., and Stallcup,M.R. (2001). Enhancement of p53-dependent gene activation by the transcriptional coactivator Zac1. *Oncogene* 20, 2134-2143.
83. Huang,S.M. and Stallcup,M.R. (2000). Mouse Zac1, a Transcriptional Coactivator and Repressor for Nuclear Receptors. *Mol Cell Biol* 20, 1855-1867.
84. Hughes,C.S., Postovit,L.M., and Lajoie,G.A. (2010). Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 10, 1886-1890.
85. Ihle,J.N. (1995). Cytokine receptor signalling. *Nature* 377, 591-594.
86. Inoko,E., Nishiura,Y., Tanaka,H., Takahashi,T., Furukawa,K., Kitajima,K., and Sato,C. (2010). Developmental stage-dependent expression of an +|2,8-trisialic acid unit on glycoproteins in mouse brain. *Glycobiology* 20, 916-928.
87. Ivanova,E. and Kelsey,G. (2011). Imprinted genes and hypothalamic function. *J Mol Endocrinol* 47, R67-R74.
88. Iwahori,K., Serada,S., Fujimoto,M., Nomura,S., Osaki,T., Lee,C.M., Mizuguchi,H., Takahashi,T., Ripley,B., Okumura,M., Kawase,I., Kishimoto,T., and Naka,T. (2011). Overexpression of SOCS3 exhibits preclinical antitumor activity against malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer* 129, 993-1005.
89. Kageyama,R., Ohtsuka,T., Shimojo,H., and Imayoshi,I. (2008). Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nat Neurosci* 11, 1247-1251.
90. Kamakura,S., Oishi,K., Yoshimatsu,T., Nakafuku,M., Masuyama,N., and Gotoh,Y. (2004). Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat Cell Biol* 6, 547-554.
91. Kamikihara,T., Arima,T., Kato,K., Matsuda,T., Kato,H., Douchi,T., Nagata,Y., Nakao,M., and Wake,N. (2005). Epigenetic silencing of the imprinted gene ZAC by DNA methylation is an early event in the progression of human ovarian cancer. *Int J Cancer* 115, 690-700.
92. Kaptein,A., Paillard,V.r., and Saunders,M. (1996). Dominant Negative Stat3 Mutant Inhibits Interleukin-6-induced Jak-STAT Signal Transduction. *J Biol Chem* 271, 5961-5964.
93. Kas,K., Voz,M.L., Hensen,K., Meyen,E., and Van de Ven,W.J.M. (1998). Transcriptional Activation Capacity of the Novel PLAG Family of Zinc Finger Proteins. *J Biol Chem* 273, 23026-23032.
94. Kempermann,G. (2002). Why New Neurons? Possible Functions for Adult Hippocampal Neurogenesis. *J Neurosci* 22, 635-638.
95. Kile,B.T., Schulman,B.A., Alexander,W.S., Nicola,N.A., Martin,H.M.E., and Hilton,D.J. (2002). The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci* 27, 235-241.
96. Kondo,T. and Raff,M.C. (2004). A role for Noggin in the development of oligodendrocyte precursor cells. *Dev Biol* 267, 242-251.
97. Kuwahara,C., Takeuchi,A.M., Nishimura,T., Haraguchi,K., Kubosaki,A., Matsumoto,Y., Saeki,K., Matsumoto,Y., Yokoyama,T., Itohara,S., and Onodera,T. (1999). Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400, 225-226.
98. Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227, 680-685.
99. Lee,J.C., Mayer-Proschel,M., and Rao,M.S. (2000). Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 30, 105-121.

100. Lee,K.H., Moon, K.J., Kim,H.S., Yoo,B.C., Park,S., Lee,H., Kwon,S., Lee,E.S., and Yoon,S. (2008). Increased cytoplasmic levels of CIS, SOCS1, SOCS2, or SOCS3 are required for nuclear translocation. *FEBS Lett* 582, 2319-2324.
101. Lendahl,U., Zimmerman,L.B., and McKay,R.D.G. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595.
102. Levy,D.E. and Lee,C.k. (2002). What does Stat3 do? *J Clin Invest* 109, 1143-1148.
103. Li,H. and Grumet,M. (2007). BMP and LIF signaling coordinately regulate lineage restriction of radial glia in the developing forebrain. *Glia* 55, 24-35.
104. Li,L.L., Keverne,E.B., Aparicio,S.A., Ishino,F., Barton,S.C., and Surani,M.A. (1999). Regulation of Maternal Behavior and Offspring Growth by Paternally Expressed Peg3. *Science* 284, 330-334.
105. Lillien,L.E., Sendtner,M., and Raff,M.C. (1990). Extracellular-Matrix Associated Molecules Collaborate with Ciliary Neurotrophic Factor to Induce Type-2 Astrocyte Development. *J Cell Biol* 111, 635-644.
106. Liu,P.Y., Hsieh,T.Y., Liu,S.T., Chang,Y.L., Lin,W.S., Wang,W.M., and Huang,S.M. (2011). Zac1, an Sp1-like protein, regulates human p21WAF1Cip1 gene expression in HeLa cells. *Exp Cell Res* 317, 2925-2937.
107. Liu,P.Y., Chan,J.Y.-H., Lin,H.C., Wang,S.L., Liu,S.T., Ho,C.L., Chang,L.C., and Huang,S.M. (2008). Modulation of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21WAF1/Cip1 Gene by Zac1 through the Antagonistic Regulators p53 and Histone Deacetylase 1 in HeLa Cells. *Mol Cancer Res* 6, 1204-1214.
108. Luedi,P.P., Hartemink,A.J., and Jirtle,R.L. (2005). Genome-wide prediction of imprinted murine genes. *Genome Res* 15, 875-884.
109. Mabie,P.C., Mehler,M.F., Marmur,R., Papavasiliou,A., Song,Q., and Kessler,J.A. (1997). Bone morphogenetic proteins induce astroglial differentiation of oligodendroglial-astroglial progenitor cells. *J Neurosci* 17, 4112-4120.
110. Malatesta,P., Hartfuss,E., and Gotz,M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127, 5253-5263.
111. Masuhiro,Y., Kayama,K., Fukushima,A., Baba,K., Soutsu,M., Kamiya,Y., Gotoh,M., Yamaguchi,N., and Hanazawa,S. (2008). SOCS-3 Inhibits E2F/DP-1 Transcriptional Activity and Cell Cycle Progression via Interaction with DP-1. *J Biol Chem* 283, 31575-31583.
112. Mattar,P., Britz,O., Johannes,C., Nieto,M., Ma,L., Rebeyka,A., Klenin,N., Polleux,F., Guillemot,F., and Schuurmans,C. (2004). A screen for downstream effectors of Neurogenin2 in the embryonic neocortex. *Dev Biol* 273, 373-389.
113. Matthews,J., Almlöf,T., Kietz,S., Leers,J.r., and Gustafsson,J.A. (2005). Estrogen receptor-[alpha] regulates SOCS-3 expression in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 168-174.
114. McGrath,J. and Solter,D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37, 179-183.
115. Miller,F.D. and Gauthier,A.S. (2007). Timing Is Everything: Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex. *Neuron* 54, 357-369.
116. Monk,M. (1987). Memories of mother and father. *Nature* 328, 203-204.
117. Moore,T. and Haig,D. (1991). Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* 7, 45-49.
118. Morrens,J., Van Den Broeck,W., and Kempermann,G. (2012). Glial cells in adult neurogenesis. *Glia* 60, 159-174.
119. Murphy,S.K., Wylie,A.A., and Jirtle,R.L. (2001). Imprinting of PEG3, the Human Homologue of a Mouse Gene Involved in Nurturing Behavior. *Genomics* 71, 110-117.
120. Nakashima,K., Takitawa,T., Ochiai,W., Yanagisawa,M., Hisatsune,T., Nakafuku,M., Miyazono,K., Kishimoto,T., Kageyama,R., and Taga,T. (2001). BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5868-5873.
121. Nakashima,K. and Taga,T. (2002). Mechanisms underlying cytokine-mediated cell-fate regulation in the nervous system. *Mol Neurobiol* 25, 233-244.
122. Nakashima,K., Wiese,S., Yanagisawa,M., Arakawa,H., Kimura,N., Hisatsune,T., Yoshida,K., Kishimoto,T., Sendtner,M., and Taga,T. (1999). Developmental Requirement of gp130 Signaling in Neuronal Survival and Astrocyte Differentiation. *J Neurosci* 19, 5429-5434.
123. Niu,G.L., Wright,K.L., Ma,Y.H., Wright,G.M., Huang,M., Irby,R., Briggs,J., Karras,J., Cress,W.D., Pardoll,D., Jove,R., Chen,J.D., and Yu,H. (2005). Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Mol Cell Biol* 25, 7432-7440.
124. Noctor,S.C., Flint,A.C., Weissman,T.A., Dammerman,R.S., and Kriegstein,A.R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714-720.

125. Ochiai,W., Yanagisawa,M., Takizawa,T., Nakashima,K., and Taga,T. (2001). Astrocyte Differentiation of Fetal Neuroepithelial Cells Involving Cardiotrophin-1-Induced Activation of Stat3. *Cytokine* 14, 264-271.
126. Okada,S., Nakamura,M., Katoh,H., Miyao,T., Shimazaki,T., Ishii,K., Yamane,J., Yoshimura,A., Iwamoto,Y., Toyama,Y., and Okano,H. (2006). Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat Med* 12, 829-834.
127. Orlando,V. (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* 25, 99-104.
128. Parker,M.A., Anderson,J.K., Corliss,D.A., Abraria,V.E., Sidman,R.L., Park,K.I., Teng,Y.D., Cotanche,D.A., and Snyder,E.Y. (2005). Expression profile of an operationally-defined neural stem cell clone. *Exper Neurol* 194, 320-332.
129. Piras,G., El Kharroubi,A., Kozlov,S., Escalante-Alcalde,D., Hernandez,L., Copeland,N.G., Gilbert,D.J., Jenkins,N.A., and Stewart,C.L. (2000). Zac1 (Lot1), a Potential Tumor Suppressor Gene, and the Gene for + ϕ -Sarcoglycan Are Maternally Imprinted Genes: Identification by a Subtractive Screen of Novel Uniparental Fibroblast Lines. *Mol Cell Biol* 20, 3308-3315.
130. Polizzotto,M.N., Bartlett,P.F., and Turnley,A.M. (2000). Expression of suppressor of cytokine signalling (SOCS) genes in the developing and adult mouse nervous system. *J Comp Neurol* 423, 348-358.
131. Pollard,S.M., Conti,L., Sun,Y., Goffredo,D., and Smith,A. (2006). Adherent Neural Stem (NS) Cells from Fetal and Adult Forebrain. *Cereb Cortex* 16, i112-i120.
132. Qian,X., Shen,Q., Goderie,S.K., He,W., Capela,A., Davis,A.A., and Temple,S. (2000). Timing of CNS Cell Generation: A Programmed Sequence of Neuron and Glial Cell Production from Isolated Murine Cortical Stem Cells. *Neuron* 28, 69-80.
133. Qin,H., Roberts,K.L., Niyongere,S.A., Cong,Y., Elson,C.O., and Benveniste,E.N. (2007). Molecular Mechanism of Lipopolysaccharide-Induced SOCS-3 Gene Expression in Macrophages and Microglia. *J Immunol* 179, 5966-5976.
134. Raff,M.C., Fields,K.L., Hakomori,S.I., Mirsky,R., Pruss,R.M., and Winter,J. (1979). Cell-type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Res* 174, 283-308.
135. Rajan,P. and McKay,R.D.G. (1998). Multiple Routes to Astrocytic Differentiation in the CNS. *J Neurosci* 18, 3620-3629.
136. Rajan,P., Panchision,D.M., Newell,L.F., and McKay,R.D.G. (2003). BMPs signal alternately through a SMAD or FRAP/STAT pathway to regulate fate choice in CNS stem cells. *J Cell Biol* 161, 911-921.
137. Rao,M.S. and Mayer-Proschel,M. (1997). Glial-Restricted Precursors Are Derived from Multipotent Neuroepithelial Stem Cells. *Dev Biol* 188, 48-63.
138. Rodriguez-Henche,N., Jamen,F., Leroy,C., Bockaert,J., and Brabet,P. (2002). Transcription of the mouse PAC1 receptor gene: cell-specific expression and regulation by Zac1. *Biochim Biophys Acta* 1576, 157-162.
139. Rozenfeld-Granot,G., Krishnamurthy,J., Kannan,K., Toren,A., Amariglio,N., Givol,D., and Rechavi,G. (2002). A positive feedback mechanism in the transcriptional activation of Apaf-1 by p53 and the coactivator Zac-1. *Oncogene* 21, 1469-1476.
140. Ryder,E.F., Snyder,E.Y., and Cepko,C.L. (1990). Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer. *J Neurobiol* 21, 356-375.
141. Saito,M., Kitamura,H., and Sugiyama,K. (2001). The specificity of monoclonal antibody A2B5 to c-series gangliosides. *J Neurochem* 78, 64-74.
142. Sanosaka,T., Namihira,M., and Nakashima,K. (2009). Epigenetic mechanisms in sequential differentiation of neural stem cells. *Epigenetics* 4, 89-92.
143. Schmid,R.S., McGrath,B., Berechid,B.E., Boyles,B., Marchionni,M., Sestan,N., and Anton,E.S. (2003). Neuregulin 1-erbB2 signaling is required for the establishment of radial glia and their transformation into astrocytes in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4251-4256.
144. Schnitzer,J., Franke,W.W., and Schachner,M. (1981). Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol* 90, 435-447.
145. Sitko,J.C., Yeh,B., Kim,M., Zhou,H., Takaesu,G., Yoshimura,A., McBride,W.H., Jewett,A., Jamieson,C.A.M., and Cacalano,N.A. (2008). SOCS3 regulates p21 expression and cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell Signal* 20, 2221-2230.
146. Smith,R.J., Arnaud,P., Konfortova,G., Dean,W.L., Beechey,C.V., and Kelsey,G. (2002). The mouse Zac1 locus: basis for imprinting and comparison with human ZAC. *Gene* 292, 101-112.

147. Snyder,E.Y., Deitcher,D.L., Walsh,C., Arnold-Aldea,S., Hartweg,E.A., and Cepko,C.L. (1992). Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* 68, 33-51.
148. Spengler,D., Villalba,M., Hoffmann,A., Pantaloni,C., Houssami,S., Bockaert,J., and Journot,L. (1997). Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by Zac1, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain. *EMBO J* 16, 2814-2825.
149. Spengler,D., Waeber,C., Pantaloni,C., Holsboer,F., Bockaert,J., Seeburgt,P.H., and Journot,L. (1993). Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365, 170-175.
150. Starr,R., Willson,T.A., Viney,E.M., Murray,L.J.L., Rayner,J.R., Jenkins,B.J., Gonda,T.J., Alexander,W.S., Metcalf,D., Nicola,N.A., and Hilton,D.J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917-921.
151. Symes,A., Stahl,N., Reeves,S.A., Farruggella,T., Servidei,T., Gearan,T., Yancopoulos,G., and Fink,J.S. (1997). The protein tyrosine phosphatase SHP-2 negatively regulates ciliary neurotrophic factor induction of gene expression. *Curr Biol* 7, 697-700.
152. Takahashi,Y., Carpino,N., Cross,J.C., Torres,M., Parganas,E., and Ihle,J.N. (2003). SOCS3: an essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation. *EMBO J* 22, 372-384.
153. Temple,I. and Shield,J. (2010). 6q24 transient neonatal diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 11, 199-204.
154. Temple,S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112-117.
155. Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
156. Tsuda,M., Kohro,Y., Yano,T., Tsujikawa,T., Kitano,J., Tozaki-Saitoh,H., Koyanagi,S., Ohdo,S., Ji,R.R., Salter,M.W., and Inoue,K. (2011). JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats. *Brain* 134, 1127-1139.
157. Tsuda,T., Markova,D., Wang,H., Evangelisti,L., Pan,T.C., and Chu,M.L. (2004). Zinc finger protein Zac1 is expressed in chondrogenic sites of the mouse. *Dev Dyn* 229, 340-348.
158. Valente,T., Dominguez,M.I., Bellmann,A., Journot,L., Ferrer,I., and Auladell,C. (2004). Zac1 is up-regulated in neural cells of the limbic system of mouse brain following seizures that provoke strong cell activation. *Neurosci* 128, 323-336.
159. Valente,T. and Auladell,C. (2001). Expression pattern of Zac1 mouse gene, a new zinc-finger protein that regulates apoptosis and cellular cycle arrest, in both adult brain and along development. *Mech Dev* 108, 207-211.
160. Valente,T., Junyent,F.+, and Auladell,C. (2005). Zac1 is expressed in progenitor/stem cells of the neuroectoderm and mesoderm during embryogenesis: Differential phenotype of the Zac1-expressing cells during development. *Dev Dyn* 233, 667-679.
161. Valleley,E.M., Cordery,S.F., and Bonthron,D.T. (2007). Tissue-specific imprinting of the ZAC/PLAGL1 tumour suppressor gene results from variable utilization of monoallelic and biallelic promoters. *Hum Mol Genet* 16, 972-981.
162. Varrault,A., Ciani,E., Apiou,F., Bilanges,B., Hoffmann,A., Pantaloni,C., Bockaert,J., Spengler,D., and Journot,L. (1998). hZAC encodes a zinc finger protein with antiproliferative properties and maps to a chromosomal region frequently lost in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8835-8840.
163. Varrault,A., Gueydan,C., Delalbre,A., Bellmann,A., Houssami,S., Akin,C., Severac,D., Chotard,L., Kahli,M., Le Digarcher,A., Pavlidis,P., and Journot,L. (2006). Zac1 Regulates an Imprinted Gene Network Critically Involved in the Control of Embryonic Growth. *Dev Cell* 11, 711-722.
164. Wang,X., Sun,Q., McGrath,S.D., Mardis,E.R., Soloway,P.D., and Clark,A.G. (2008). Transcriptome-Wide Identification of Novel Imprinted Genes in Neonatal Mouse Brain. *Plos One* 3, e3839.
165. Washburn,K.B. and Neary,J.T. (2006). P2 purinergic receptors signal to STAT3 in astrocytes: Difference in STAT3 responses to P2Y and P2X receptor activation. *Neurosci* 142, 411-423.
166. Wilkinson,L.S., Davies,W., and Isles,A.R. (2007). Genomic imprinting effects on brain development and function. *Nat Rev Neurosci* 8, 832-843.
167. Wu,Y.Y., Mujtaba,T., Han,S.S.W., Fischer,I., and Rao,M.S. (2002). Isolation of a glial-restricted tripotential cell line from embryonic spinal cord cultures. *Glia* 38, 65-79.
168. Yokogami,K., Wakisaka,S., Avruch,J., and Reeves,S.A. (2000). Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol* 10, 47-50.
169. Yoshimura,A. (1998). The CIS Family: Negative Regulators of JAK-STAT Signaling. *Cytokine Growth factor Rev* 9, 197-204.

170. Yoshimura,A., Nishinakamura,H., Matsumura,Y., and Hanada,T. (2005). Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins. *Arthritis Res Ther* 7, 100-110.
171. Yuasa,S., Onizuka,T., Shimoji,K., Ohno,Y., Kageyama,T., Yoon,S.H., Egashira,T., Seki,T., Hashimoto,H., Nishiyama,T., Kaneda,R., Murata,M., Hattori,F., Makino,S., Sano,M., Ogawa,S., Prall,O.W.J., Harvey,R.P., and Fukuda,K. (2010). Zac1 Is an Essential Transcription Factor for Cardiac Morphogenesis. *Circ Res* 106, 1083-1091.

acH3	Azetyliertes Histon 3
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	<i>Bone morphogenetic pathway</i> (morphogenetische Knochen Signalweg)
bHLH	<i>basic-Helix-Loop-Helix</i> (basische Helix-Loop-Helix)
CBP	CRE Bindungsprotein
CDKI	<i>Cycline dependend kinase inhibitor</i> (Zyclin abhängiger Kinase Inhibitor)
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CNTF	Ziliare neurotrophe Faktor
CRE	<i>cAMP response element</i> (cAMP Resonanzelement)
CT-1	Cardiotrophin-1
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMR	<i>Differentially methylated CpG island region</i> (verschieden methylierte CpG Insel-Region)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i> (verstärkt Chemolumineszenz)
ECM	<i>Extracellular matrix</i> (Extrazelluläre Matrix)
EDTA	Diaminoethylentetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EGL	<i>external granule layer</i> (äußere granuläre Schicht)
ENS	Esel-Normalserum
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälber-Serum)
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> (Fibroblastenwachstumsfaktor)
IB	Immunoblot
ICC	<i>Immunocytochemistry</i> (Immunozytochemie)
IGN	Imprinting Gen Netzwerk
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> (Saures Gliafaser Protein)
GZE	Gesamtzellextrakt
H3K27me3	Histon3-Lysine27-Trimethylierung
HDAC1	Histondeacetylase 1
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IGF2	<i>Insulin growth factor 2</i> (Insulinwachstumsfaktor 2)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Jak	Janus Kinasen
Hes	Hairless
HAT	Histonacetyltransferase
KIR	<i>Kinase inhibiting region</i> (Kinase inhibierende Region)
Lot1	<i>Lost in transformation 1</i>
NCoR	<i>Nuclear receptor corepressor</i> (Korepressor nukleärer Rezeptoren)
Ngn	Neurogenin

Nrg	Neuregulin
NSC	<i>neuronal stem cell</i> (neuronale Stammzelle)
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactosid
P	Postnataltag
PAC1-R	<i>Pituitary adenylat cyclase typ1-rezeptor</i> (Hypophysen Adenylat Zyklase Typ-1 Rezeptor)
PACAP	<i>Pituitary adenylat cyclase activating peptid</i> (Hypophysen Adenylat Zyklase aktivierendes Peptid)
PAGE	Polyacrylamid Gel-Elektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
PIAS3	<i>Protein inhibitor of activated Stat3</i> (Protein-Inhibitor von aktivierten Stat3)
Plag	Pleiomorphisches Adenoma Gen
PPARgamma	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
RBP-Jk	<i>recombination signal binding protein for Ig kappa J</i> (Rekombination Signalbindungsprotein der Immunglobuline)
RMS	<i>rostral migratory stream</i> (rostraler migratorischer Strom)
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecylsulphate</i> (Natriumdodezylsulfat)
SGZ	Subgranuläre Zone
SH2	<i>Src-homology 2</i> (Src-Homologie 2)
SHP-2	Src-Homologie Phosphatase-2
shRNA	<i>small hairpin RNA</i> (kleine Haarnadel RNA)
Socs	<i>Suppressor of cytokine signaling</i> (Suppressor von Zytokin Signalwegen)
Stat	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> (Signal Vermittler und Aktivator der Transkription)
SVZ	subventrikuläre Zone
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TSS	<i>Translational start site</i> (Startseite der Translation)
TEMED	N, N, N', N' – Tetramethylethylendiamin
TNDM	<i>Transient Neonatal Diabetes Mellitus</i> (transienter Frühgeborenen Diabetes Mellitus)
Tyr-AS	Tyrosin-Aminosäurerest
UV	Ultraviolett-Licht
VZ	ventrikuläre Zone
WNT	Wingless-Int1
Zac1	<i>Zinc finger protein regulator of Apoptosis and cell cycle arrest</i>
ZF	Zinkfinger
ZNS	zentralen Nervensystems

Bei Frau Professor Dr. Elisabeth Weiss möchte ich mich für die Betreuung meiner Arbeit an der Fakultät für Biologie, der Ludwig-Maximilians-Universität München recht herzlich bedanken.

Herrn Professor Dr. Rainer Landgraf möchte ich recht herzlich danken für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit und die Unterstützung bei dessen Bearbeitung am Max-Planck-Institut für Psychiatrie.

Herrn Professor Dr. Dr. Dr. Florian Holsboer möchte ich für die Ermöglichung dieser Arbeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dietmar Spengler für die entgegengebrachte Unterstützung, sowie Anke Hoffman für die Hilfe bei den Versuchsdurchführungen. Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Spengler für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken, die mir in Erinnerung bleiben wird.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle meiner Frau Romy Edelkraut und meinen Eltern und Geschwistern danken, durch deren liebevolle Unterstützung mir diese Doktorarbeit ermöglicht wurde.

Erklärung zur eigenständigen Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Doktorarbeit stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder anderer Prüfungsverfahren vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen oder von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

München, 2012

Udo Schmidt-Edelkraut

.....
Unterschrift