

Charakterisierung der Wechselwirkungen  
zwischen dem Notch-Signalweg und  
intrinsischen und extrinsischen Signalen  
in hämatopoetischen Zellen

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von

Konstanze Henning

Kiel, im September 2007

Referent:

Koreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

<b>1. Zusammenfassung der Arbeit</b>	<b>6</b>
1.1 Zusammenfassung .....	6
1.2 Summary .....	7
<b>2. Einleitung</b>	<b>8</b>
2.1 Hämatopoese .....	8
2.1.1 Funktionen des Blutsystems .....	8
2.1.2 Regulation der Hämatopoese .....	9
2.1.3 Regulation der Erythropoese und der $\beta$ -Globin-Expression .....	11
2.1.3.1 Erythropoese .....	11
2.1.3.2 Regulation der Erythropoese .....	12
2.1.3.3 Regulation der $\beta$ -Globin-Expression .....	13
2.1.4 FDCP-mix-Zellen als Modellsystem .....	15
2.2 Notch .....	16
2.2.1 Struktur der Notch-Rezeptoren .....	16
2.2.2 Struktur der Notch-Liganden .....	17
2.2.3 Der klassische Notch-Signalweg .....	17
2.2.4 Weitere Notch-Signalwege .....	19
2.2.5 Regulation des Notch-Signalweges .....	20
2.2.6 Funktionen der Notch-Rezeptoren in <i>Drosophila</i> .....	20
2.2.7 Funktionen von Notch in Säugern .....	21
2.2.8 Notch in der Hämatopoese .....	23
2.2.8.1 Funktionen von Notch in der lymphoiden Differenzierung .....	23
2.2.8.2 Funktionen von Notch in der myeloiden und erythroiden Differenzierung .....	24
2.2.9 Notch und Krankheiten .....	25
2.2.10 Das NERT-Protein: ein System zur konditionellen Aktivierung von Notch1 .....	26
2.3 p53 .....	27
2.3.1 Struktur des p53-Proteins .....	27
2.3.2 Regulation von p53 .....	28
2.3.3 Der Zellzyklus und dessen Regulation durch p53 .....	29
2.3.4 Weitere Funktionen von p53 .....	31
2.4 Caspasen .....	32
2.4.1 Struktur von Caspasen .....	32
2.4.2 Rolle der Caspasen während der Apoptose .....	33
2.4.3 Caspasen in nicht-apoptotischen Prozessen .....	34
2.5 Fragestellung der Arbeit .....	35
<b>3. Material &amp; Methoden</b>	<b>37</b>
3.1 Material .....	37
3.1.1 Reagenzien .....	37
3.1.2 Geräte und Zubehör .....	38
3.1.3 Kits .....	38
3.1.4 Primer .....	38
3.1.5 Puffer und Lösungen .....	39
3.1.6 Assays für Real-time PCR .....	40
3.1.7 Zellen und Bakterien .....	40
3.1.8 Plasmide .....	41
3.2 Methoden .....	42
3.2.1 Bakterienkultur .....	42
3.2.1.1 Bakterienkultivierung .....	42
3.2.1.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> .....	42
3.2.1.3 Transformation .....	42
3.2.2 DNA-Techniken .....	43

3.2.2.1 Extraktion von Plasmiden.....	43
3.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	43
3.2.2.3 Restriktion von Plasmiden.....	43
3.2.2.4 Auffüllen von DNA-Fragmenten.....	43
3.2.2.5 Dephosphorylierung von DNA.....	44
3.2.2.6 Ligation.....	44
3.2.2.7 Agarosegel.....	44
3.2.2.8 Gelextraktion .....	44
3.2.2.9 Gezielte Mutagenese .....	45
3.2.3 RNA-Techniken .....	49
3.2.3.1 Isolation von RNA.....	49
3.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von RNA.....	49
3.2.3.3 Reverse Transkription .....	49
3.2.3.4 Real-time PCR.....	49
3.2.3.5 Fällern von RNA.....	50
3.2.4 Protein-Analysen .....	50
3.2.4.1 Isolation von Proteinen.....	50
3.2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	50
3.2.4.3 Western Blot.....	51
3.2.5 Zellbiologische Methoden .....	51
3.2.5.1 Kultur von FDCP-mix-Zellen.....	51
3.2.5.2 Differenzierung von FDCP-mix-Zellen.....	51
3.2.5.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	52
3.2.5.4 Ficoll-Gradient .....	52
3.2.5.5 Kultur von K562-Zellen .....	52
3.2.5.6 FACS-Analyse.....	52
3.2.5.7 Elektroporation .....	53
3.2.5.8 Luciferase-Assay .....	53
3.2.5.9 Proliferationsassay.....	53
3.2.5.10 Mycoplasmentest.....	54
3.2.6 Statistische Methoden.....	54
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>55</b>
4.1 Notch und Erythropoese .....	55
4.1.1 Notch1 beschleunigt die erythroide Differenzierung .....	55
4.1.2 Notch1 reguliert die Expression von $\beta$ -Globin.....	56
4.1.3 Notch1 hat keinen Einfluss auf die Expression von Gata1, Fog1, Eklf und Nfe2 .....	57
4.1.4 Notch1 reguliert die hypersensitive Stelle 2 des $\beta$ -Globin Locus .....	58
4.1.5 Notch1 aktiviert die HS2 nicht, wenn die Bindungsstelle für RBP-J mutiert ist	59
4.1.6 Notch1 aktiviert die regulatorische Region HS2 des $\beta$ -Globin-Locus nicht in K562-Zellen.....	60
4.2 Notch und p53 .....	61
4.2.1 Der p53-Status in p53 <sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen.....	62
4.2.2 Der Notch1-Signalweg ist in den p53 <sup>null</sup> rNERTneo Klonen aktiv .....	63
4.2.3 Einfluss von Notch1 auf die Proliferation von FDCP-mix-Zellen.....	64
4.2.4 Rekonstitution des p53 <sup>wt</sup> Phänotyps in p53 <sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen.....	65
4.2.5 Notch1 reguliert p53 nicht auf RNA-Ebene .....	67
4.2.6 Notch1 aktiviert die Expression des Proteins p21 <sup>Waf/Cip</sup> .....	68
4.2.7 Notch1 aktiviert den p21-Promotor p53-abhängig.....	70
4.2.8 Die Transaktivierung des p21-Promotors erfolgt nicht über RBP-J.....	71
4.2.9 Notch1 aktiviert den p21-Promotor über p53.....	72

4.3 Notch und Caspasen .....	74
4.3.1 Notch1 hat keinen Einfluss auf die Expression von Caspase-3 .....	74
4.3.2 Notch1 hat keinen Einfluss auf die Expression von Caspase-6 .....	75
4.3.3 Notch1 erhöht die Expression von Caspase-7 .....	76
4.3.4 Aktiviertes Notch1 erhöht die Apoptoserate nicht .....	77
4.3.5 Einfluss der Caspasen auf die Differenzierung von FDCP-mix-Zellen .....	79
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>80</b>
5.1 Notch und Erythropoese .....	80
5.2 Notch und p53 .....	83
5.3 Notch und Caspasen .....	90
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>95</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>97</b>
<b>8. Eigene Veröffentlichungen</b> .....	<b>111</b>
<b>9. Lebenslauf</b> .....	<b>112</b>
<b>10. Danksagung</b> .....	<b>113</b>
<b>11. Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>114</b>

# 1. Zusammenfassung der Arbeit

## 1.1 Zusammenfassung

Der Notch-Signalweg ist ein wichtiger Regulator von Differenzierungsprozessen, Proliferationsvorgängen und der Apoptose. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, die eine so breite Wirkungspalette ermöglichen, sind jedoch weitgehend unverstanden. Ziel dieser Arbeit war es, Notch1 und dessen Zusammenspiel mit verschiedenen Interaktionspartnern in hämatopoetischen Zellen genauer zu charakterisieren. Unter Verwendung der multipotenten hämatopoetischen Zelllinie FDCP-mix, die ein Tamoxifen-induzierbares System der konstitutiv aktiven intrazellulären Domäne des Notch1-Rezeptors trägt, sollte der Einfluss des Notch1-Rezeptors auf die Differenzierung und Proliferation hämatopoetischer Zellen untersucht werden. Im ersten Projekt wurde die Wirkung von Notch1 auf die Erythropoese analysiert. Notch1 beschleunigte dabei die erythroide Differenzierung und erhöhte die Expression von  $\beta$ -Globin, indem der Notch1-Signalweg über das Effektormolekül RBP-J die hypersensitive Stelle 2 (HS2) der Locus-Kontroll-Region des  $\beta$ -Globins aktiviert. Die Expression der erythroiden Transkriptionsfaktoren Gata1, Fog1, Ekf und Nfe2 wurde dagegen durch die Aktivierung von Notch1 nicht beeinflusst. Das zweite Projekt beschäftigte sich mit der funktionellen Interaktion des Notch1-Signalweges mit p53, einem wichtigen Faktor der Tumorsuppression und des Proliferationsarrests. Die Aktivierung von Notch1 in hämatopoetischen Zellen führte zu einem p53-abhängigen Zellzyklusblock. Dabei wurde durch Notch1 die Expression des Zellzyklusregulators  $p21^{Waf/Cip}$  in  $p53^{Wildtyp}$ , nicht aber in  $p53^{null}$  FDCP-mix-Zellen erhöht. Die Regulation der  $p21^{Waf/Cip}$ -Expression durch Notch1 erfolgte hierbei nicht über RBP-J, sondern über verstärkte Bindung von p53 an den  $p21^{Waf/Cip}$ -Promoter. Eine Wiedereinbringung des p53-Gens in  $p53^{null}$  Zellen stellte den Notch1-vermittelten Zellzyklusblock wieder her. In einem weiteren Projekt wurde der Einfluss von Notch1 auf Caspasen, die für apoptotische Prozesse verantwortlich sind, untersucht. Die in Vorarbeiten gezeigte Regulation von Caspase-6 mRNA durch Notch1 konnte in dieser Arbeit auf Proteinebene weder für Caspase-6 noch für Caspase-3 bestätigt werden. Jedoch wurde die Expression von Caspase-7 durch Notch1 verstärkt, was allerdings nicht zu einer erhöhten Apoptoserate führte. Weitere Forschung muss hier aufzeigen, ob Notch1 über Caspasen eine Wirkung auf Differenzierungsprozesse hat und wie diese molekular vermittelt wird.

## 1.2 Summary

Notch1 is an important mediator of cell fate determination, proliferation and apoptosis. However, the underlying molecular mechanisms facilitating this broad range of impact are largely unknown. The aim of this work was the characterization of the Notch1 signaling pathway and the molecular interactions between Notch1 and its interaction partners in hematopoietic progenitor cells in detail. Multipotent FDCP-mix cell lines carrying a conditional tamoxifen-inducible system of the constitutively active intracellular domain of Notch1 were used to analyze the effects of activated Notch1 on differentiation and proliferation processes in hematopoietic cells. In the first part, the effect of Notch1 on erythropoiesis was examined. Notch1 was shown to accelerate erythroid differentiation and upregulate  $\beta$ -globin expression by activating the hypersensitive site 2 (HS2) of the  $\beta$ -globin locus control region via the Notch1 effector RBP-J. In contrast, the expression of the erythroid transcription factors Gata1, Fog1, Eklf and Nfe2 was not altered after activation of Notch1. The issue of the second project was the interplay of Notch1 with p53, a critical factor of tumor suppression and growth arrest. It was demonstrated that activation of Notch1 led to a p53-dependent inhibition of the cell cycle in hematopoietic cells. Furthermore, Notch1 upregulated the cell cycle inhibitor p21<sup>Waf/Cip</sup> in p53<sup>wild-type</sup>, but not in p53<sup>null</sup> FDCP-mix cells. Induction of the p21<sup>Waf/Cip</sup> gene by activated Notch1 was mediated by a RBP-J independent pathway, but involved increased binding of p53 to the p21<sup>Waf/Cip</sup> promoter. The re-expression of p53 in p53<sup>null</sup> cells restored the Notch1-mediated inhibition of proliferation. In another project the effect of Notch1 on caspases, a group of proteins responsible for apoptotic processes, was analyzed. Previously, Notch1 was shown to activate caspase-6 mRNA expression. The upregulation of both caspase-6 and caspase-3 by Notch1 could not be confirmed at the protein level. In contrast, caspase-7 was found to be activated by Notch1, though this activation did not result in an enhanced apoptosis. Further work is needed to analyze if Notch1 regulates differentiation processes via activation of caspases and how this is mediated.

## **2. Einleitung**

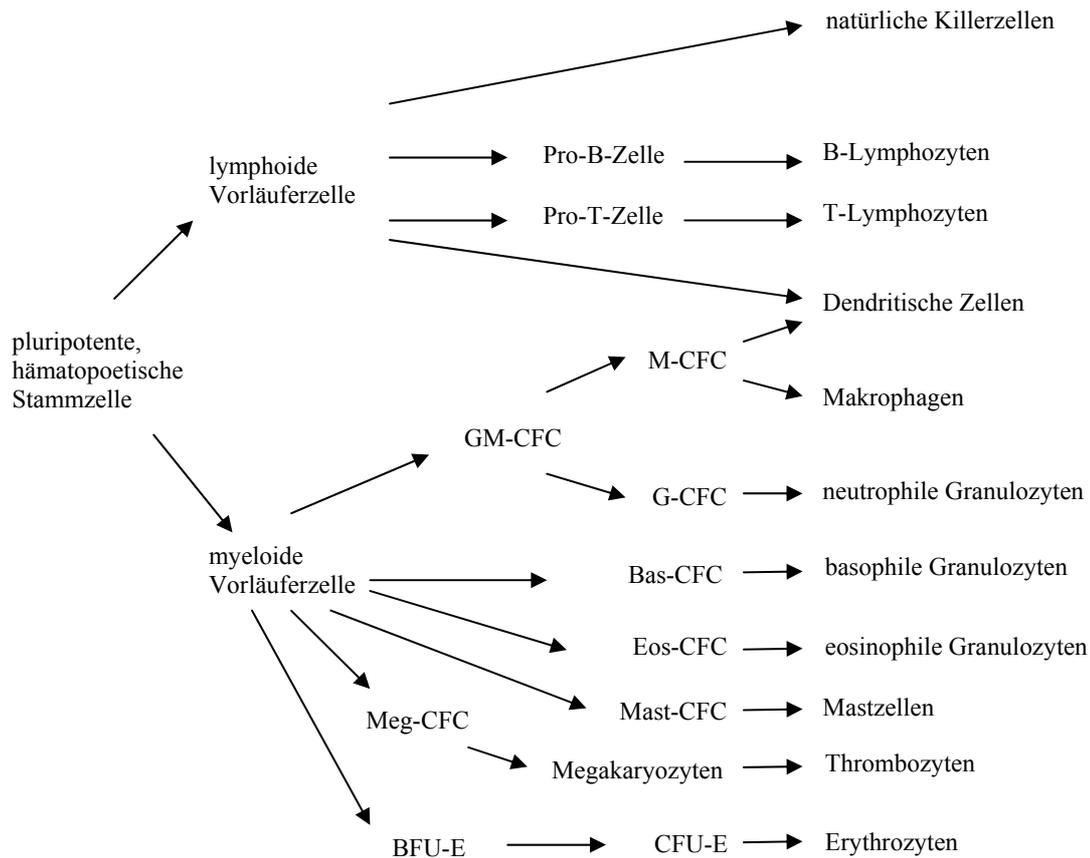
### **2.1 Hämatopoese**

#### **2.1.1 Funktionen des Blutsystems**

Das Blut übernimmt lebenswichtige Funktionen im Körper. So ist es z. B. für den Transport von Sauerstoff, Nährstoffen, Hormonen und Stoffwechselendprodukten verantwortlich. Eine weitere wichtige Aufgabe ist die Abwehr von Krankheitserregern.

Das Blut besteht aus Blutplasma und den Blutzellen, welche fortlaufend erneuert werden müssen. Diesen Vorgang, bei dem aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen spezialisierte, differenzierte Blutzellen reifen, bezeichnet man als Hämatopoese. Die Reifung erfolgt dabei über verschiedene Zwischenstufen. Am Anfang stehen pluripotente Stammzellen, die eine hohe Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und in alle weiteren Blutzellen differenzieren können. Daraus entwickeln sich multipotente Vorläuferzellen und über weitere Zwischenstufen ausgereifte Blutzellen. Der Differenzierungsgrad erhöht sich bei diesem Prozess, wohingegen das Proliferationspotential abnimmt.

Die Hämatopoese findet beim Erwachsenen im Knochenmark statt. Im ersten Schritt entwickeln sich aus den Stammzellen lymphoide und myeloide Vorläuferzellen. Aus den lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln sich B-Lymphozyten, die die Antikörper produzieren, T-Lymphozyten, die virusbefallene Zellen zerstören und die Aktivität anderer Immunzellen regulieren können, und natürliche Killerzellen, die sowohl Tumorzellen als auch virusbefallene Zellen beseitigen können. Aus den myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Thrombozyten, Erythrozyten und Mastzellen (s. Abb. 1). Makrophagen und neutrophile Granulozyten sind für die Phagozytose von Mikroorganismen zuständig, eosinophile und basophile Granulozyten sind an allergischen Reaktionen und Entzündungsprozessen beteiligt und die dendritischen Zellen dienen der Antigenpräsentierung. Thrombozyten dagegen sind wesentlicher Bestandteil der Blutgerinnung und Erythrozyten übernehmen den Transport von Sauerstoff im Blut.



### Abb. 1 Hämatopoese

Schematische Darstellung des derzeitigen Modells der Hämatopoese. Gezeigt ist die Entwicklung reifer Blutzellen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Der Differenzierungsgrad nimmt während dieses Prozesses zu, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung dagegen ab.

BFU-E: frühe erythroide Vorläuferzelle (burst-forming unit erythroid); CFU-E: späte erythroide Vorläuferzelle (colony-forming unit erythroid); CFC: Kolonie-bildende Zelle (colony-forming cell); Bas: basophil; Eos: eosinophil; M: Makrophagen; Mast: Mastzellen; Meg: Megakaryozyten; G: neutrophile Granulozyten; GM: Granulozyten/ Makrophagen

#### 2.1.2 Regulation der Hämatopoese

Die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben der hämatopoetischen Stammzellen werden sowohl von extrinsischen als auch intrinsischen Faktoren reguliert. Zu den extrinsischen Faktoren gehören die Stromazellen des Knochenmarks und die Zytokine. Die Stromazellen stehen in unmittelbarem Zell-Zell-Kontakt mit den hämatopoetischen Stammzellen und können diese somit direkt beeinflussen. Zytokine sind Proteine, die von Zellen gebildet werden, um das Verhalten anderer Zellen zu beeinflussen. Sie werden auch als Wachstumsfaktoren bezeichnet. Zu den intrinsischen Faktoren, die Zelllinienentscheidungen beeinflussen können, gehört die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren (Laiosa et al., 2006). Diskutiert wird weiterhin, dass auch

MicroRNAs diesen Prozess unterstützen. MicroRNAs (miRNA) sind kurze, einzelsträngige, regulatorische RNA-Moleküle, die an bestimmte Sequenzen der mRNA binden können und deren Expression verhindern, indem sie entweder die Degradation der mRNA induzieren oder die Translation verhindern. Die miRNA miR-181 wird hauptsächlich in B-Lymphozyten exprimiert. Wird diese miRNA in hämatopoetischen Vorläuferzellen in Mäusen überexprimiert, bilden sich vermehrt B-Lymphozyten im Vergleich zu T-Lymphozyten. Daher besteht die Möglichkeit, dass miR-181 Gene reguliert, die an der Zelllinienentscheidung in lymphoiden Vorläuferzellen beteiligt sind (Chen et al., 2004).

Es gibt zahlreiche Zytokine, die die Hämatopoese beeinflussen können. Man unterscheidet dabei zwischen Wachstumsfaktoren, die erst während den späteren Zelllinienentscheidungen eine Rolle spielen und daher meist Linien-spezifisch agieren, und Wachstumsfaktoren, die auf die frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen wirken, und daher meist nicht Zelllinien-spezifisch sind. Zu den Zytokinen, die früh wirksam sind, gehören z. B. Interleukin-3 (IL-3) und der Stammzellefaktor (SCF). Diese beeinflussen das Überleben, die Selbsterneuerung und Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle und frühen Vorläuferzellen. Zu den Wachstumsfaktoren, die später wirken, gehören z. B. Erythropoietin (EPO), das bei der Erythropoese involviert ist, und Interleukin-7 (IL-7), das an der Entwicklung von B- und T-Lymphozyten beteiligt ist. Oftmals wirken die Zytokine nicht nur für sich und auf eine bestimmte Population an Vorläuferzellen, sondern haben in Kombination mit anderen Zytokinen Einfluss auf verschiedene Zelllinienentscheidungen. Neben diesen bisher erwähnten Wachstumsfaktoren, die einen positiven Einfluss auf die Hämatopoese haben, gibt es auch Zytokine, die die Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen inhibieren. Dazu zählt z. B. TGF- $\beta$ 1 (Ogawa, 1993; Greenberger, 2000; Ezoe et al., 2004; Blom and Spits, 2006).

Transkriptionsfaktoren sind die Hauptregulatoren der Zelllinienentscheidungen. Diese werden zu definierten Zeitpunkten im Differenzierungsprozess an- und abgeschaltet und wirken im Zusammenspiel mit weiteren Transkriptionsfaktoren, Co-Aktivatoren und Co-Repressoren. (Rosmarin et al., 2005). Ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der sowohl die lymphoide als auch die myeloide Differenzierung reguliert, ist PU.1. Entscheidend für die Funktion von PU.1 ist u. a. seine Expressionsrate. In hämatopoetischen Stammzellen wird PU.1 in großen Mengen exprimiert. Für die normale Entwicklung von Vorläuferzellen der Megakaryozyten und Erythrozyten sowie der B- und T-Lymphozyten ist eine reduzierte PU.1-Expression notwendig. Dagegen lässt es sich in Vorläuferzellen von Granulozyten

und Makrophagen in steigenden Konzentrationen detektieren (Dekoter et al., 2007). Schroeder et al. konnten nachweisen, dass PU.1 in myeloiden Vorläuferzellen ein direktes Zielgen von Notch1 ist und Notch1 auf diese Weise Einfluss auf Zelllinienentscheidungen nehmen kann (Schroeder et al., 2003).

Die Frage, welche Rolle die einzelnen bisher diskutierten Faktoren bei der Zelllinienentscheidung spielen, ist nicht abschließend geklärt. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die Zytokine nur für das Überleben der Zelle verantwortlich sind, nicht aber darüber entscheiden, in welche Richtung die Zellen differenzieren. Dies würde nur durch die intrinsischen Faktoren festgelegt werden. Dieses Modell wird als stochastisch bezeichnet (Enver et al., 1998). Das deterministische Modell dagegen schlägt vor, dass nur die externen Stimuli das Schicksal der Zelle festlegen (Metcalf, 1998). Das Hybridmodell fasst diese beiden Modelle zusammen und besagt, dass nur Gene, die in einer offenen Chromatinstruktur vorliegen, durch äußere Einflüsse wie den Zytokinen induziert werden können (Just et al., 1991).

### **2.1.3 Regulation der Erythropoese und der $\beta$ -Globin-Expression**

#### **2.1.3.1 Erythropoese**

Die Erythropoese bezeichnet die Entwicklung der roten Blutkörperchen, den Erythrozyten. Die Reifung der Erythrozyten erfolgt über verschiedene Zwischenstufen (s. Abb. 1). Aus der hämatopoetischen Stammzelle entwickelt sich über die Zwischenstufen der frühen (BFU-E) und späten (CFU-E) erythroiden Vorläuferzellen der Proerythroblast, der weiter zum Erythroblasten reift. Während dieser Entwicklung der erythroiden Vorläuferzellen verringert sich die Größe der Zellen, die Konzentration an Hämoglobin steigt an und die Kondensation des Chromatins nimmt zu. Aus den Erythroblasten reifen die frühen Erythrozyten, die man Retikulozyten nennt. Diese haben bereits ihren Zellkern verloren, sind aber noch größer als die reifen Erythrozyten. Die reifen Erythrozyten sind gleich große, runde, bikonkave Scheiben, die keinen Zellkern und keine Zellorganellen mehr besitzen und eine Lebensdauer von ca. 120 Tagen haben (Testa, 2004).

Die Erythropoese verläuft in drei Phasen. Die ersten Erythrozyten werden im Dottersack gebildet, später dann in der fötalen Leber. Noch vor der Geburt wechselt der Ort der Erythropoese von der fötalen Leber zum Knochenmark, wo sie dann auch beim Erwachsenen erfolgt. Die Erythropoese beginnt in der Maus ungefähr an Tag 7,5 der Embryonalentwicklung im Dottersack, wenn sich erste Blutinseln bilden. Diese bestehen aus einer Population an erythroiden Zellen, die von Angioblasten umgeben sind, aus denen

sich in der Folge das Blutgefäßsystem entwickelt. Die erythroiden Zellen der Blutinseln werden als primitive Erythrozyten bezeichnet, da sie sich von denen, die im Erwachsenen gebildet werden, dahingehend unterscheiden, dass sie größer sind und embryonales Hämoglobin bilden. Ab Tag 8.5 der Embryonalentwicklung können die primitiven Erythrozyten im Embryo über die neu gebildeten Blutgefäße zirkulieren (Keller et al., 1999).

Die frühen Vorläuferzellen der endgültigen Erythrozyten (BFU-E) werden ab Tag 8 der Embryonalentwicklung im Dottersack gebildet. Die reiferen Vorläuferzellen (CFU-E) befinden sich dann sowohl im Dottersack als auch in den Blutgefäßen. Über diese Blutbahnen können sie in die fötale Leber wandern, um dort in endgültige Erythrozyten zu differenzieren (Palis and Yoder, 2001). Desweiteren entwickeln sich in einer zweiten Welle hämatopoetische Stammzellen aus der Aorta-Gonad-Mesonephros (AGM)-Region, die anschließend auch in die Leber einwandern (McGrath and Palis, 2005).

### **2.1.3.2 Regulation der Erythropoese**

Das wichtigste Zytokin, das die Erythropoese reguliert, ist Erythropoietin (EPO). Erythropoietin wird von der Niere und der fötalen Leber sekretiert und wirkt auf erythroide Zellen des Knochenmarks, die den Erythropoietin-Rezeptor (EpoR) tragen. Die besondere Bedeutung, die Erythropoietin und der Erythropoietin-Rezeptor für die Erythropoese haben, konnte in Mausmodellen gezeigt werden, denen diese Proteine fehlen. Sowohl EPO<sup>-/-</sup> als auch EpoR<sup>-/-</sup> Mäuse sterben an Tag 12,5 der Embryonalentwicklung an schweren Anämien. Diese Mäuse weisen indes eine normale Anzahl an erythroiden Vorläuferzellen (BFU-E und CFU-E) in der fötalen Leber auf. Dies legt nahe, dass nur die späteren erythroiden Differenzierungsschritte Erythropoietin-abhängig sind (Wu et al., 1995). Nach Bindung von EPO an den EpoR erfährt der Rezeptor eine Konformationsänderung, welche zur Aktivierung der gebundenen zytoplasmatischen Tyrosinkinase Janus Kinase 2 (JAK2) führt. Diese phosphoryliert den EpoR an verschiedenen zytoplasmatischen Tyrosinresten, an die dann Proteine mit einer Src-homology 2-Domäne (SH2) binden können. Über diese können verschiedene Signalwege aktiviert werden, die zur Differenzierung und dem Überleben der Erythrozyten beitragen (Richmond et al., 2005).

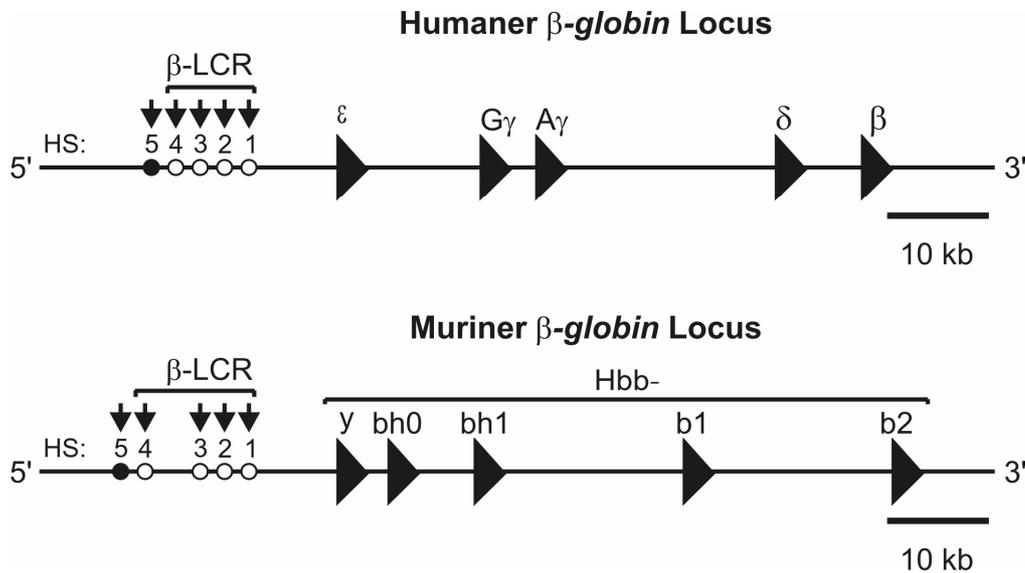
Auch Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Erythropoese. Zu den wichtigsten erythroiden Transkriptionsfaktoren gehören GATA1, FOG1, EKLF und NF-E2. GATA1 wird in Erythrozyten, Megakaryozyten, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen exprimiert (Tsai et al., 1989) und wirkt als direkter Transkriptionsfaktor für verschiedene

erythroide Gene, z. B. auch für  $\beta$ -Globin, in dessen Promotor sich eine Bindungsstelle für GATA1 befindet (Cao and Moi, 2002). Mäuse, denen das Gen für Gata1 fehlt, sterben während der Embryonalentwicklung an schweren Anämien mit fehlender Reifung der Erythrozyten. FOG1 (Friend Of GATA) wird in Erythrozyten und Megakaryozyten exprimiert. Es ist ein wichtiger Interaktionspartner von GATA1, bindet aber selbst nicht an DNA. Auch  $Fog1^{-/-}$ -Mäuse sterben während der Embryonalentwicklung an einem ähnlichen Phänotyp wie  $Gata1^{-/-}$ -Mäuse (Cantor and Orkin, 2002). Weiterhin ist bekannt, dass eine direkte Interaktion zwischen FOG1 und GATA1 für eine normale Erythropoese und die Induktion der  $\beta$ -Globin Expression essentiell ist (Crispino et al., 1999). EKLF (Erythroid Krüppel-like Factor) ist ein Transkriptionsfaktor, der ebenfalls direkt an den  $\beta$ -Globin-Promotor binden kann und im Menschen für den Wechsel von der Expression des fötalen  $\gamma$ -Globins zur Expression des adulten  $\beta$ -Globins verantwortlich ist. Daher sterben  $Eklf^{-/-}$ -Mäuse an Anämien mit fehlender Expression des adulten  $\beta$ -Globins (Cantor and Orkin, 2002). NF-E2 (Nuclear factor erythroid derived 2) ist auch ein Transkriptionsfaktor, der aus zwei Untereinheiten besteht, die 18 kDa und 45 kDa groß sind. Es wird in hämatopoetischen Vorläuferzellen, Erythrozyten, Megakaryozyten und Mastzellen exprimiert. NF-E2 ist an der Regulation der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globin-Expression durch Interaktion mit der entsprechenden Locus-Kontroll-Region beteiligt (Talbot and Grosveld, 1991; Andrews, 1998).

### 2.1.3.3 Regulation der $\beta$ -Globin-Expression

Der Sauerstofftransport im Blut erfolgt über das Protein Hämoglobin. Hämoglobin ist ein Tetramer, das sich aus zwei  $\alpha$ -Globin-Proteinketten und zwei  $\beta$ -Globin-Ketten zusammensetzt, die sich in ihrer Affinität zum Sauerstoff unterscheiden. Beim Menschen gibt es fünf verschiedene Gene, die zur  $\beta$ -Globin-Familie gezählt werden. Diese liegen auf dem Chromosom 11 in der Reihenfolge vor, in der sie auch während der Entwicklung exprimiert werden. Im embryonalen Dottersack wird  $\varepsilon$ -Globin exprimiert, die beiden  $\gamma$ -Globine  $G\gamma$  und  $A\gamma$  in der fötalen Leber und nach der Geburt werden überwiegend  $\beta$ -Globin und in geringem Umfang  $\delta$ -Globin exprimiert. Auch in der Maus findet man ein  $\beta$ -Globin-Cluster, das aus folgenden Genen besteht: Am 5'-Ende befindet sich  $Hbb-\gamma$ , gefolgt von  $Hbb-bh0$ ,  $Hbb-bh1$ ,  $Hbb-b1$  und  $Hbb-b2$  3' (s. Abb 2).  $Hbb-\gamma$  codiert für das embryonale  $\beta$ -Globin-Gen  $\gamma$  und  $Hbb-bh1$  für ein frühes embryonales  $\beta$ -Globin-Gen, das auch als z-Protein bezeichnet wird. Für  $Hbb-b0$  konnte bisher keine Funktion

nachgewiesen werden. Hbb-b1 und Hbb-b2 codieren für die adulten  $\beta$ -Globin-Gene in der Maus, wobei Hbb-b1 deutlich häufiger vorkommt als Hbb-b2 (Cao and Moi, 2002; Li et al., 2002).



**Abb. 2 Der humane und murine  $\beta$ -Globin Locus**

Gezeigt ist die schematische Darstellung des humanen und murinen  $\beta$ -Globin Locus mit den fünf  $\beta$ -Globin Genen und der Locus-Kontroll-Region (LCR). Die LCR besteht aus fünf hypersensitiven Stellen (HS), an die verschiedene Transkriptionsfaktoren binden können und über die die Expression der  $\beta$ -Globin-Gene reguliert wird.

Die Expression der einzelnen  $\beta$ -Globin-Gene wird zum einen durch den eigenen Promotor reguliert, der sich jeweils innerhalb der ersten 500 bp stromaufwärts des entsprechenden  $\beta$ -Globin-Gens befindet. Die Promotoren aller Globin-Gene sind ähnlich aufgebaut. So enthalten sie alle eine TATA-Box, die den Transkriptionsstart markiert, und CAAT- und CACCC-Boxen, welche als Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren dienen (Cao and Moi, 2002). Zum anderen gibt es aber noch ein übergeordnetes Regulationselement, das sich ca. 20 kb stromaufwärts des ersten  $\beta$ -Globin-Gens befindet: die  $\beta$ -Globin Locus-Kontroll-Region (LCR). Diese setzt sich aus fünf DNase hypersensitiven Stellen (HS1-HS5) zusammen, die alle eine Größe von ungefähr 250 bp haben und an die zahlreiche Transkriptionsfaktoren wie z. B. GATA1 und NF-E2 binden können. Deletiert man eine einzelne HS, hat dies nur geringe Auswirkungen auf die  $\beta$ -Globin-Expression. Dagegen führt die Deletion der kompletten LCR im Menschen zu einem vollständigen Verlust der  $\beta$ -Globin-Expression und in der Maus zu einer 100fachen Reduktion der Expression der Globin-Gene. Es gibt verschiedene Modelle, die zu erklären versuchen, auf welche Weise die LCR die Expression der Globin-Gene regulieren kann.

Eine davon ist das sogenannte Looping-Modell, bei dem man davon ausgeht, dass die LCR eine Schleife bildet, um so mit den Promotoren der Globin-Gene in Kontakt zu treten und um dann mit Hilfe der gebundenen Transkriptionsfaktoren die Gen-Expressionen zu modulieren. Dabei interagiert die LCR nur mit einem Promotor gleichzeitig (Cao and Moï, 2002; Li et al., 2002; Stamatoyannopoulos, 2005).

### 2.1.4 FDCP-mix-Zellen als Modellsystem

Zur Untersuchung der Hämatopoese sind primäre, aus Knochenmark gewonnene hämatopoetischen Stammzellen am besten geeignet. Da deren Anzahl allerdings sehr gering ist – nur ca. eine von 10.000 Knochenmarkszellen ist eine hämatopoetische Stammzelle –, ist es schwierig, eine für Experimente ausreichende Menge geeigneter Zellen zu isolieren (Rosmarin et al., 2005). Zudem haben primäre Zellen *in vitro* eine begrenzte Lebensdauer.

Durch die Verwendung von hämatopoetischen Zelllinien kann man diese Probleme umgehen. Für diese Arbeit wurden daher FDCP-mix-Zellen (factor dependent cell from Paterson institute with mixed differentiation potential) verwendet. Dies sind faktorabhängige, myeloische Vorläuferzellen, die aus murinen Knochenmark-Langzeitkulturen durch retrovirale Insertionsmutagenese gewonnen wurden (Spooncer et al., 1984; Just et al., 2000). Sie können wie normale hämatopoetische Vorläuferzellen – je nach Kulturbedingungen – in Erythrozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Mastzellen, Megakaryozyten, dendritische Zellen und Osteoklasten differenzieren (Spooncer et al., 1986; Hagenaars et al., 1991; Heyworth et al., 1991; Just et al., 1991; Ford et al., 1992; Schroeder et al., 2000). Allerdings weisen sie im Vergleich zu normalen hämatopoetischen Stammzellen eine erhöhte Selbsterneuerungskapazität *in vitro* auf. Deshalb können FDCP-mix-Zellen in Anwesenheit von IL-3 oder Stromazellen unbegrenzt *in vitro* kultiviert werden. FDCP-mix-Zellen weisen einen normalen Karyotyp auf und sind nach Injektion in Mäuse nicht leukämogen. Für mehrere Monate können sie sogar zur Hämatopoese von sub-lethal bestrahlten Mäusen beitragen.

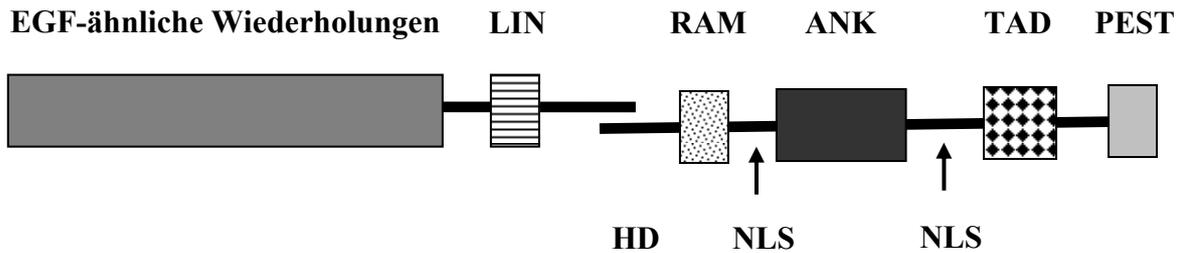
Da FDCP-mix-Zellen primären hämatopoetischen Stammzellen sehr ähnlich sind, aber in unbegrenzter Menge für Experimente zur Verfügung stehen, stellen sie ein nützliches Modellsystem für die Hämatopoese dar.

## 2.2 Notch

Notch wurde erstmals in *Drosophila melanogaster* 1919 entdeckt. Einige Fruchtfliegen wiesen Einkerbungen (engl. notch) an den Flügelrändern auf, die auf eine Haploinsuffizienz des Notch-Gens zurückzuführen waren (Mohr, 1919). Seitdem sind in *Drosophila* ein Notch-Gen und die zwei Liganden Serrate und Delta beschrieben worden. In Säugern gibt es vier Notch-Rezeptoren (Notch1-Notch4) und fünf Liganden: drei Delta-ähnliche Liganden Delta-like1, 3 und 4 sowie zwei Homologe zum Liganden Serrate, die als Jagged1 und Jagged2 bezeichnet werden.

### 2.2.1 Struktur der Notch-Rezeptoren

Die Notch-Rezeptoren sind heterodimere Transmembranrezeptoren, die als ca. 300 kDa große einkettige Vorläuferproteine synthetisiert und im trans-Golgi Netzwerk durch eine Furin-ähnliche Protease in eine extrazelluläre und eine intrazelluläre Untereinheit gespalten werden. Diese interagieren über nicht-kovalente Bindungen miteinander. Die extrazelluläre Domäne von Notch besteht aus 29 bis 36 EGF (epidermalen Wachstumsfaktor)-ähnlichen Wiederholungen, die die Notch-Liganden binden. Die Anzahl dieser Wiederholungen variiert zwischen den verschiedenen Notch-Rezeptoren. Außerdem gibt es in der extrazellulären Domäne drei LIN-Wiederholungen, die die Liganden-unabhängige Aktivierung verhindern. Die intrazelluläre Notch-Domäne ( $N^{IC}$ ) enthält eine RBP-J-assoziiertes-Molekül (RAM)-Domäne, über die Notch u. a. mit seinem Effektormolekül RBP-J in Kontakt treten kann. Des Weiteren befinden sich dort eine Ankyrin-Domäne, welche auch für Protein-Protein Wechselwirkungen zuständig ist, zwei Kernlokalisationssequenzen und eine PEST (Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threonin-reichen)-Domäne, die den Abbau von Notch reguliert. Zudem findet man in Notch1 und Notch2 noch eine Transaktivierungsdomäne (TAD) (s. Abb. 3) (Dumortier et al., 2005; Osborne and Minter, 2007).



**Abb. 3 Struktur des Notch1-Rezeptors**

Schematische Darstellung des Notch1-Rezeptors. Die extrazelluläre Domäne enthält die EGF-ähnlichen Wiederholungen und die LIN-Wiederholungen. Die intrazelluläre Domäne besteht aus der RAM-Domäne, den Ankyrin-Wiederholungen, der Transaktivierungsdomäne (TAD) und der PEST-Sequenz. Außerdem befinden sich zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS) im intrazellulären Teil. Die intrazelluläre und die extrazelluläre Domäne werden über nicht-kovalente Bindungen in der Heterodimerisierungsdomäne (HD) zusammengehalten.

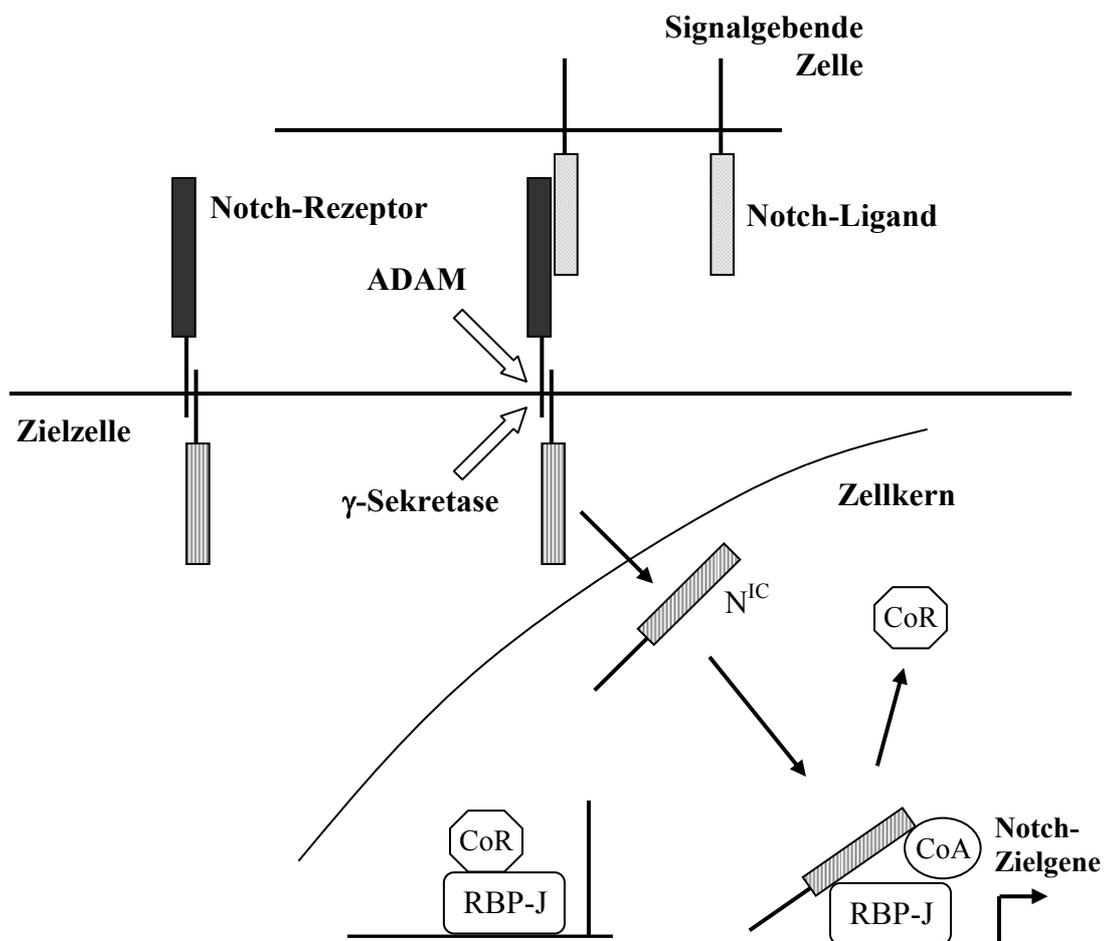
### 2.2.2 Struktur der Notch-Liganden

Auch die Notch-Liganden sind Transmembranproteine, die in ihrer extrazellulären Domäne eine variable Anzahl an EGF-ähnlichen Wiederholungen und eine N-terminale DSL (Delta, Serrate, Lag2)-Domäne haben. Diese interagieren mit den Notch-Rezeptoren. Serrate, Jagged1 und Jagged2 besitzen zusätzlich eine cysteinreiche-Domäne. Die intrazellulären Domänen der einzelnen Liganden unterscheiden sich erheblich voneinander. Wie die Liganden den Notch-Rezeptor aktivieren und welchen Einfluss die einzelnen Liganden auf die verschiedenen Rezeptoren haben, ist bisher noch nicht genau geklärt (Dumortier et al., 2005). Es ist zwar bekannt, dass sowohl die Liganden der Delta- als auch der Serrate-Familie die Notch-Rezeptoren aktivieren, doch können durch die verschiedenen Liganden unterschiedliche physiologische Antworten des Notch-Rezeptors hervorgerufen werden. So wurde z. B. die Wirkung der Liganden Jagged1 und Delta1 auf hämatopoetische Vorläuferzellen, die aus Nabelschnurblut gewonnen wurden, untersucht. Dabei zeigte sich, dass Jagged1 die Anzahl an myeloiden Vorläuferzellen erhöht, während Delta1 diese reduziert (Neves et al., 2006).

### 2.2.3 Der klassische Notch-Signalweg

Die Aktivierung des Notch-Signalweges erfolgt über die Interaktion des Notch-Rezeptors mit einem seiner Liganden, der auf einer benachbarten Zelle exprimiert wird. Dadurch werden zwei proteolytische Schritte eingeleitet: In der ersten proteolytischen Spaltung, welche durch eine Metalloprotease der ADAM-Familie erfolgt, wird die extrazelluläre

Domäne des Notch-Rezeptors freigesetzt. Die zweite Spaltung, welche im Transmembranbereich durch einen  $\gamma$ -Sekretase-Komplex vollzogen wird, setzt die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors frei. Diese wandert dann auf Grund der Kernlokalisationssequenzen in den Zellkern und kann dort mit Proteinen der CSL-Familie interagieren. Die CSL-Familie ist nach ihren Vertretern aus dem Menschen (CBF-1; auch RBP-J genannt), *Drosophila melanogaster* (Suppressor of hairless) und *Caenorhabditis elegans* (Lag-1) benannt. Die CSL-Proteine sind in der Abwesenheit von Notch Transkriptionsrepressoren, indem sie an spezielle Bindungsstellen im Promoterbereich binden und dort mit Co-Repressoren, wie z. B. Histondeacetylasen, interagieren. Bindet die intrazelluläre Domäne von Notch an CSL-Proteine, werden die Co-Repressoren gegen Co-Aktivatoren, wie z. B. Histon-Acetyl-Transferasen, ausgetauscht und die Transkription von Notch-Zielgenen wird eingeleitet (s. Abb. 4) (Osborne and Minter, 2007).



**Abb. 4 Der klassische Notch-Signalweg**

Dargestellt ist der klassische Notch-Signalweg, der über die Interaktion der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors ( $N^{IC}$ ) mit einem Protein der CSL-Familie (in Säugern: RBP-J) die Transkription der Zielgene bewirkt. CoR: Co-Repressoren; CoA: Co-Aktivatoren; ADAM: eine Disintegrin- und Metalloprotease

Zu den bekannten Zielgenen gehören die Proteine der Familie Hairy and Enhancer-of-split (HES) in *Drosophila* und die verwandten Proteine Hes und Hey im Säuger. Diese können als Transkriptionsrepressoren während verschiedener Differenzierungsprozesse wirken (Fischer and Gessler, 2007).

Die durch die Interaktion des Notch-Rezeptors mit einem seiner Liganden ausgelöste Signaltransduktion ist mechanistisch noch nicht abschließend geklärt. In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass nach Interaktion mit dem Liganden Delta die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors zusammen mit Delta über Endozytose in die Liganden-exprimierende Zelle transportiert wird und dass dieser Prozess für die Aktivierung des Notch-Rezeptors notwendig ist (Parks et al., 2000). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor und die anschließende Endozytose eine Zugwirkung auf den Rezeptor ausüben, wodurch die notwendige Schnittstelle für den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex zugänglich wird, was die weitere Spaltung des Rezeptors erst ermöglicht und für die Aktivierung notwendig ist. Dass die Endozytose des Liganden oder des Rezeptors auch in anderen Organismen für die Aktivierung des Notch-Rezeptors erforderlich ist, konnte bisher nicht nachgewiesen werden und wird weiter untersucht (Le Borgne et al., 2005).

Es wurde auch ein weiterer Ligand für den Notch-Rezeptor beschrieben, der nicht mit Delta oder Serrate verwandt ist. Der Ligand F3/contactin aus der Immunoglobulin-Superfamilie kann direkt mit Notch interagieren, was zur Freisetzung der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors führt. Dieser Prozess ist an der Differenzierung von Oligodendrozyten im Nervensystem beteiligt (Hu et al., 2003).

### **2.2.4 Weitere Notch-Signalwege**

Neben dem klassischen Notch-Signalweg, der über Interaktion der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors mit den Proteinen der CSL-Familie erfolgt, werden auch CSL-unabhängige Notch-Signalwege diskutiert. Ein möglicher Mechanismus verläuft über die Ubiquitin-Ligase Deltex (Ordentlich et al., 1998; Yamamoto et al., 2001; Hori et al., 2004). So wird die Möglichkeit beschrieben, dass Notch und Deltex im Zellkern interagieren und dort andere Transkriptionsfaktoren regulieren (Yamamoto et al., 2001). Ein anderer Vorschlag ist, dass Deltex den Notch-Rezeptor im späten Endosomen anreichert, indem es den Transport zum Lysosomen und die damit verbundene Degradation des Rezeptors verhindert (Hori et al., 2004). Dadurch könnte Notch in zwei verschiedenen Kompartimenten wirken: der CSL-abhängige Notch-Signalweg findet im Zellkern und der

CSL-unabhängige Signalweg im späten Endosomen statt. Um den genauen Mechanismus zu verstehen, bedarf es allerdings weiterer Forschung.

### 2.2.5 Regulation des Notch-Signalweges

Der Notch-Signalweg kann auf verschiedenen Stufen reguliert werden. Fringe, eine Glycosyltransferase, beeinflusst z. B. die Selektivität von Notch für seine Liganden. An die extrazelluläre Domäne von Notch ist an den Serin- oder Threoninresten der EGF-ähnlichen Wiederholungen Fukose gekoppelt (Moloney et al., 2000b). Diese Fukose dient als Ausgangspunkt für weitere Glycosylierungen durch Fringe, das N-Acetylglucosamin anhängen kann (Moloney et al., 2000a). Dadurch wird die Aktivierung des Notch-Rezeptors durch die Liganden Jagged/Serrate inhibiert, während es die Aktivierung durch die Liganden Delta fördert (Fleming et al., 1997; Panin et al., 1997). Während Fringe den Notch-Signalweg auf der extrazellulären Seite beeinflusst, wirkt Numb intrazellulär. Numb wurde zuerst während der Neurogenese entdeckt. Es wird asymmetrisch zwischen den Tochterzellen verteilt und beeinflusst so die Differenzierungsrichtung (Zhong et al., 1996). Numb ist als negativer Regulator von Notch beschrieben worden, da es die Ubiquitinierung und damit den Abbau von Notch fördert (McGill and McGlade, 2003). Mastermind aus *Drosophila* und das in Säugern homologe MAML1 (Mastermind-like-1) sind dagegen Beispiele für positive Regulatoren von Notch (Schuldt and Brand, 1999; Wu et al., 2000). MAML1 bindet an die Ankyrin-Wiederholungen von Notch und bildet mit der intrazellulären Notch-Domäne und RBP-J einen Komplex, der die Transkription von Zielgenen aktiviert.

### 2.2.6 Funktionen der Notch-Rezeptoren in *Drosophila*

Der Notch-Signalweg ist evolutionär konserviert. Man findet ihn von *Drosophila* über *Caenorhabditis elegans* bis hin zum Säuger. Am besten untersucht ist er in *Drosophila melanogaster*. Dort hat er Einfluss auf die Entwicklung des Nervensystems, der Flügel, der Augen, der Beine und Muskeln und während der Oogenese (Portin, 2002).

Notch kann auf zwei Arten wirken: zum einen über laterale Inhibition, wenn Notch und seine Liganden auf der gleichen Zellart exprimiert werden, und zum anderen über einen induktiven Signalweg, wenn der Rezeptor und die Liganden sich auf verschiedenen Zelltypen befinden. Bei der lateralen Inhibition geht man davon aus, dass der Notch-Rezeptor und seine Liganden in etwa gleichen Mengen auf equipotenten Zellen exprimiert werden. Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist die Entwicklung des Zentralen

Nervensystems (ZNS) in *Drosophila*. Das ZNS entwickelt sich aus Vorläuferzellen, die sowohl Notch als auch seinen Liganden Delta tragen. Aus ihnen entwickeln sich neuronale und epidermale Zellen. Die Vorläuferzellen, die ein wenig mehr Delta exprimieren als ihre Nachbarzellen, aktivieren den Notch-Signalweg in den Nachbarzellen, was zur Inhibition der neuronalen Differenzierung in diesen Zellen führt. Somit entwickeln sich die Zellen, in denen Notch aktiviert wurde, zu epidermalen Zellen, während sich die Zellen, die mehr Delta tragen, zu neuronalen Zellen weiter entwickeln. Anders ist es hingegen bei der Flügelentwicklung in *Drosophila*. Hier wirkt der induktive Signalweg (Portin, 2002). Notch und sein Ligand Serrate werden in der Flügelanlage auf verschiedenen Zelltypen exprimiert. Den Notch-Rezeptor findet man auf den ventralen Zellen und Serrate auf den dorsalen Zellen. Auf diese Weise wird die dorso-ventrale Achse der Flügel festgelegt (de Celis et al., 1996).

### **2.2.7 Funktionen von Notch in Säugern**

Auch während der Entwicklung der Säuger spielen die Notch-Rezeptoren und ihre Liganden eine entscheidende Rolle. So beeinflussen sie die Zelllinienentscheidungen in vielen verschiedenen Geweben, wie z. B. dem Pankreas, der Niere, bei der Myogenese, bei der Skelettentwicklung, der Vaskularisierung, der Hämatopoese und der Neurogenese. Dabei können sich in einem Gewebe verschiedene Rezeptoren und Liganden befinden oder es wird nur ein spezielles Rezeptor-Liganden-Paar exprimiert (Harper et al., 2003; Lai, 2004). Für einen Überblick sollen im Folgenden einige Beispiele näher betrachtet werden. Wie schon in *Drosophila* beschrieben, ist der Notch-Signalweg auch während der Neurogenese in Säugern aktiv. So konnte mit Hilfe von Notch1 knock-out-Mäusen gezeigt werden, dass Notch1 für den Erhalt, nicht aber für die Entstehung von neuronalen Vorläuferzellen essentiell ist (Hitoshi et al., 2002). Des Weiteren treibt Notch1 die Reifung von Gliazellen voran, während es die Differenzierung von Neuronen blockiert (Morrison et al., 2000). Auch eine Beteiligung der Notch-Rezeptoren an der Differenzierung radialer Gliazellen wurde nachgewiesen. Radiale Gliazellen bilden das Gerüst, an dem die neu entstandenen Neuronen entlang wandern. Diese sind die einzigen Gliazellen, die vor oder zeitgleich mit den Neuronen gebildet werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Notch1 in Vorläuferzellen aus dem Telencephalon zur Differenzierung in radiale Gliazellen führt (Gaiano et al., 2000). Da beschrieben worden ist, dass radiale Gliazellen auch als Vorläuferzellen für Neuronen dienen (Campbell and Gotz, 2002), wird diskutiert, dass Notch auch zum Erhalt neuronaler Vorläuferzellen in Form von radialen

Gliazellen beiträgt (Ever and Gaiano, 2005). Außerdem reguliert Notch1 das Wachstum und die Verzweigungen der Dendriten (Redmond et al., 2000).

Bei der Vaskularisierung bildet sich aus endothelialen Vorläuferzellen ein Netzwerk an Blutgefäßen. Sowohl Notch1 als auch Notch4 sind an diesem Prozess beteiligt. Während Mäuse, die kein Notch4 tragen, vital sind, sterben Notch1 knock-out-Mäuse während der Embryonalentwicklung und weisen dabei u. a. Defekte in der Angiogenese auf. Diese treten in Notch1/Notch4 Doppelmutanten verstärkt auf. Daher scheinen Notch1 und Notch4 hierbei redundante Funktionen zu haben (Krebs et al., 2000).

Eine weitere Funktion hat Notch bei der Myogenese. Die Muskelzellendifferenzierung wird in der Regel durch die Transkriptionsregulatoren der MyoD-Familie vorangetrieben. Indem Notch die Transkription dieser Gene hemmt, kann es die gesamte Muskelentwicklung inhibieren (Kuroda et al., 1999). Weiterhin wird auch die Differenzierung des Pankreas durch Notch inhibiert (Murtaugh et al., 2003).

Neben den verschiedenen Differenzierungsprozessen beeinflusst der Notch-Signalweg auch die Zellproliferation. In humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen führte die Aktivierung von Notch1 durch seinen Liganden Jagged1 zur Inhibition der Proliferation (Walker et al., 1999) und auch das Notch-Zielgen Hes1 blockiert den Zellzyklus von humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen (Yu et al., 2006). Auch die Proliferation von anderen Zellen, wie Endothelzellen (Nosedá et al., 2004; Niimi et al., 2007), Lungenkrebszellen (Sriuranpong et al., 2001), Zungencarcinomzellen (Duan et al., 2006), Leberkarzinomzellen (Qi et al., 2003) und Keratinozyten (Rangarajan et al., 2001) kann durch Notch1 inhibiert werden. In einigen dieser Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Notch1 den Zellzyklusregulator p53 oder den Zellzyklusinhibitor p21<sup>Waf/Cip</sup> aktiviert und auf diese Weise die Zellzyklusblockade auslöst (Rangarajan et al., 2001; Sriuranpong et al., 2001; Qi et al., 2003; Duan et al., 2006; Niimi et al., 2007). Besonders interessant ist, dass in Keratinozyten gezeigt werden konnte, dass das Notch-Effektormolekül RBP-J an den p21-Promotor binden kann (Rangarajan et al., 2001). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen, konnte in anderen Zellen gezeigt werden, dass Notch die Proliferation positiv beeinflusst. Dies wurde z. B. in Pankreaskarzinomzellen (Wang et al., 2006), Gliomazellen (Purow et al., 2005) und T-Lymphozyten (Palaga et al., 2003) nachgewiesen. Dies verdeutlicht, dass die Notch-Rezeptoren die Zellproliferation Zellkontext-abhängig regulieren.

Notch hat nicht nur einen Einfluss auf Differenzierungsvorgänge und die Zellproliferation, sondern auch auf die Apoptose. Der Effekt der Notch-Aktivierung wird dabei abermals

stark von der Zellumgebung beeinflusst. So führte die Aktivierung von Notch1 in neuronalen Vorläuferzellen - nicht aber in Neuronen - zur erhöhten Expression von p53 und dessen pro-apoptotischen Zielgenen Bax und PUMA und damit zu einer gesteigerten Apoptoserate (s. auch Abschnitt 2.3.4) (Yang et al., 2004). Auch in B-Zell-Leukämie-Zellen führte die Aktivierung von Notch1 zu einer erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen (Zweidler-McKay et al., 2005). Dagegen inhibiert Notch4 die Apoptose in Endothelzellen (MacKenzie et al., 2004). Auch in vaskulären glatten Muskelzellen führte die konstitutive Aktivierung von Notch1 und Notch3 zu einer verringerten Apoptoserate (Sweeney et al., 2004). Purow et al. konnten zeigen, dass Notch1 für das Überleben von Gliomazellen wichtig ist. So stieg die Apoptoserate in Gliomazellen an, wenn diese mit siRNA gegen Notch1 behandelt wurden (Purow et al., 2005).

### **2.2.8 Notch in der Hämatopoese**

Alle vier Notch-Rezeptoren konnten auf hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden, auch wenn sie unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen (Ohishi et al., 2003). Notch1 und Notch 2 werden auf hämatopoetischen Vorläuferzellen, Monozyten (Vorläufer der Makrophagen, dendritischen Zellen und Osteoklasten) und während der Entwicklung der B-Lymphozyten exprimiert. Weiterhin findet man Notch1 auch während der T-Lymphozytenentwicklung. Die Expression von Notch2 und Notch3 konnte auf Mastzellen gezeigt werden. Ferner wird Notch3 während der Reifung der T-Zellen exprimiert. Notch4 wurde zuerst auf Endothelzellen nachgewiesen, man findet es aber auch auf Monozyten. Die Notch-Liganden werden auf Stromazellen, aber auch auf ausgereiften Blutzellen exprimiert. So konnten Jagged1 und Delta1 und -4 auf Stromazellen des Knochenmarks nachgewiesen werden und Jagged1 und -2 auf dendritischen Zellen. Auch Makrophagen, Megakaryozyten und Mastzellen exprimieren Jagged1.

#### **2.2.8.1 Funktionen von Notch in der lymphoiden Differenzierung**

Gut untersucht ist die Wirkung von Notch1 während der lymphoiden Differenzierung (Maillard et al., 2005). So wurde gezeigt, dass Notch1 die Reifung von T-Lymphozyten aus lymphoiden Vorläuferzellen induziert, während es die Reifung von B-Lymphozyten hemmt (Radtke et al., 2004). Wird Notch1 deletiert, verringert sich die Größe des Thymus und die T-Lymphozyten fehlen, während sich B-Lymphozyten anhäufen (Radtke et al., 1999). Wird Notch1 dagegen überexprimiert, kommt es zu einer verstärkten Entwicklung von T-Lymphozyten und die Reifung von B-Lymphozyten wird reduziert (Pui et al., 1999).

Neben dieser frühen Zelllinienentscheidung beeinflusst Notch auch noch spätere Differenzierungsschritte der T-Lymphozytenentwicklung. So unterstützt Notch1 die Entwicklung der T-Lymphozyten, die den T-Zellrezeptor mit den  $\alpha$ : $\beta$ -Untereinheiten tragen, und verhindert die Reifung der T-Lymphozyten mit den seltener vorkommenden  $\gamma$ : $\delta$ -T-Zell-Rezeptoren (Washburn et al., 1997). Diskutiert wird auch die Rolle von Notch1 in der Zelllinienentscheidung zwischen T-Helferzellen, die CD4 exprimieren und zytotoxischen T-Zellen, die CD8 auf ihrer Zelloberflächen tragen. Dabei soll Notch1 die Differenzierung in die CD8-Richtung begünstigen (Robey et al., 1996). Dieser Einfluss konnte in Mäusen, in denen Notch1 ausgeschaltet wurde, allerdings nicht bestätigt werden (Wolfer et al., 2001).

Obwohl Notch1 die Differenzierung der B-Lymphozyten aus den Vorläuferzellen inhibiert, wird Notch2, das in B-Lymphozyten vorrangig exprimiert wird, eine Beteiligung an der weiteren Reifung der B-Lymphozyten zugeschrieben (Saito et al., 2003; Maillard et al., 2005). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Notch1 eine entscheidende Rolle bei der Reifung von B-Zellen in Antikörper-sekretierende Zellen spielt (Santos et al., 2007).

### **2.2.8.2 Funktionen von Notch in der myeloiden und erythroiden Differenzierung**

Die ersten Untersuchungen zur Rolle von Notch in der myeloiden Differenzierung wurden in 32D-Zellen durchgeführt. 32D-Zellen sind IL-3-abhängige hämatopoetische Vorläuferzellen, die in neutrophile Granulozyten differenzieren können und als Modell für die myeloide Differenzierung verwendet werden (Valtieri et al., 1987). Die Expression der konstitutiv aktiven intrazellulären Domäne des Notch1-Rezeptors verhindert die Differenzierung der 32D-Zellen (Milner et al., 1996). Ein ähnliches Ergebnis konnte in Kokultorexperimenten gewonnen werden, in denen 32D-Zellen auf Stromazellen, die den Notch-Liganden Jagged1 tragen, kultiviert wurden (Li et al., 1998).

Es gibt aber auch gegenteilige Beobachtungen. In 32D- und FDCP-mix-Zellen konnte unter Verwendung einer konditionell aktivierbaren Variante des Notch1-Rezeptors die myeloide Differenzierung induziert werden, was gleichzeitig zu einem Block des Zellzyklus in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase führte (Schroeder and Just, 2000b; Schroeder and Just, 2000a; Schroeder et al., 2003). Diese gegensätzlichen Ergebnisse, die unter Verwendung der 32D-Zellen als Modellsystem gewonnen wurden, lassen sich mit der unterschiedlichen Aktivierung des Notch-Rezeptors erklären. Unter physiologischen Bedingungen werden die Notch-Rezeptoren zu definierten Zeitpunkten der Entwicklung an- und wieder abgeschaltet. Eine kontinuierliche Aktivierung des Notch-Signalweges – wie es bei

Verwendung der konstitutiv aktiven intrazellulären Domäne des Rezeptors der Fall ist – entspricht dagegen nicht den natürlichen Verhältnissen und führt vermutlich zur Selektion von Zellklonen, die nicht mehr physiologisch auf den Notch-Signalweg reagieren (Schroeder and Just, 2000a). Im Einklang mit den Arbeiten von Schroeder et al. sind Ergebnisse, die unter Verwendung des Notch-Liganden Delta1 erhalten worden sind. So wiesen Mizutani et al. nach, dass Delta1 die myeloide Differenzierung von murinen Knochenmarkszellen fördert (Mizutani et al., 2000).

Der Notch-Signalweg beeinflusst auch die Erythropoese. So konnte in den Erythroleukämie-Zelllinien K562 und F5-5 gezeigt werden, dass Notch1 die erythroide Differenzierung inhibiert (Lam et al., 2000; Kumano et al., 2001; Ishiko et al., 2005). Im Gegensatz dazu führte die Aktivierung von Notch1 durch seinen Liganden Delta-4 in primären humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen zu einer verstärkten Erythropoese (Sugimoto et al., 2006). Diese konträren Ergebnisse lassen sich vermutlich durch die Verwendung unterschiedlicher Modellsysteme erklären, denn Leukämiezellen entsprechen in einigen wichtigen Punkten nicht den natürlichen hämatopoetischen Zellen. Sie reagieren zum Beispiel nicht auf die gleiche Weise auf physiologische Stimuli. So ist die Präsenz von Erythropoietin für die normale Erythropoese unerlässlich (Wu et al., 1995), wohingegen sie auf die Differenzierung von K562-Zellen keine Auswirkung hat (Hoffman et al., 1979).

### **2.2.9 Notch und Krankheiten**

Da die Notch-Rezeptoren in zahlreiche Entwicklungsprozesse involviert sind, verwundert es nicht, dass Störungen des Notch-Signalweges zu Entwicklungsstörungen und zur Entstehung von Krebs führen.

So führt die konstitutive Expression des Notch1-Rezeptors zur Entstehung einer Form der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) der T-Zellen (Ellisen et al., 1991). Auch an der Entwicklung der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) der B-Zellen ist der Notch-Signalweg beteiligt. Für die CLL ist das Epstein-Barr-Virus verantwortlich, das für das Protein EBNA2 codiert. Dieses kann mit den Proteinen der CSL-Familie interagieren und auf diese Weise die Transkription von Notch-Zielgenen induzieren (Zimmer-Strobl and Strobl, 2001). Außerdem konnte die Beteiligung der Notch-Rezeptoren auch an der Entwicklung von Tumoren, wie z. B. dem Zervixkarzinom und dem Brustkrebs nachgewiesen werden (Weijzen et al., 2003; Pece et al., 2004).

Der Notch-Signalweg ist nicht nur an der Entstehung von Krebs beteiligt, sondern auch mit anderen Krankheiten assoziiert. Dazu gehört CADASIL (Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy). CADASIL ist gekennzeichnet durch wiederkehrende Schlaganfälle, psychische Störungen, Migräneanfälle und fortschreitender Demenz und führt etwa 15 - 20 Jahre nach Ausbruch der Krankheit zum Tod. Verursacht wird die Krankheit durch Mutationen des Notch3-Rezeptors. Dadurch kommt es zur Zerstörung der glatten Muskelzellen in den Arterien, wodurch der Aufbau der mehrschichtigen Gefäßwand gestört ist. Betroffen von den Mutationen sind die EGF-ähnlichen Wiederholungen der extrazellulären Domäne des Notch3-Rezeptors, wodurch die Struktur des gesamten Rezeptors verändert wird (Harper et al., 2003).

Das Alagille-Syndrom wird durch Mutationen des Notch-Liganden Jagged1 hervorgerufen. Bei dieser Krankheit, die innerhalb der ersten Lebensjahre ausbricht, treten Fehlbildungen im Bereich der Leber, des Herzens, des Skeletts und der Augen auf. Sie führt zu einer erhöhten Sterblichkeit (Harper et al., 2003).

### **2.2.10 Das NERT-Protein: ein System zur konditionellen Aktivierung von Notch1**

Um die Effekte von Notch1 auf das hämatopoetische System besser untersuchen zu können, wurde ein konditionell aktivierbares Notch1-System entwickelt (Schroeder and Just, 2000a). Dazu wurde die intrazelluläre Domäne des Notch1-Rezeptors, die konstitutiv aktiv ist, mit der mutierten Hormonbindungsdomäne des humanen Östrogenrezeptors fusioniert, die durch 4-Hydroxy-Tamoxifen (OHT) induzierbar ist. Dieses Fusionsprotein wurde als NERT (N<sup>IC</sup>-Estrogen Receptor-Tamoxifen Sensitive Variant) bezeichnet. Das NERT-Protein befindet sich bei Abwesenheit des Östrogen-Antagonisten Tamoxifen im Zytoplasma, da es an das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) gebunden ist. Nach Zugabe von OHT bindet dieses an die Hormonbindungsdomäne, wodurch das NERT-Protein freigesetzt wird. Dadurch kann das NERT-Protein aufgrund der Kernlokalisationssequenz der intrazellulären Notch-Domäne in den Zellkern wandern und dort die Transkription von Notch-Zielgenen anschalten.

Das NERT-Protein und der leere Kontrollvektor rneo wurden stabil in FDCP-mix-Zellen transfiziert und einzelne Klone selektiert, mit denen die Wirkung des Notch1-Rezeptors auf die Hämatopoese untersucht werden kann (Schroeder, 2001).

## 2.3 p53

p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der innerhalb der Metazoen konserviert ist. Es wurde 1979 als ein Protein entdeckt, das mit dem großen T-Antigen, einem Onkoprotein des SV40-Virus, interagiert (Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979). Die ersten cDNA-Konstrukte für p53 wurden aus Tumorzellen isoliert, wiesen Variationen in der Sequenz auf und erwiesen sich als onkogen. Die Isolation von Wildtyp-p53 ( $p53^{wt}$ ) aus gesunden Zellen zeigte, dass Wildtyp-p53 Zellen nicht transformieren kann und einen Block des Zellzyklus auslöst (Eliyahu et al., 1988; Mercer et al., 1990a; Mercer et al., 1990b). Daher handelt es sich bei p53 um ein Tumorsuppressorprotein. Da es allerdings in mindestens 50% aller menschlichen Tumore mutiert ist, kann es dort seine schützende Funktion nicht ausüben. Unterstützend konnte nachgewiesen werden, dass Mäuse, in denen das Gen für p53 ausgeschaltet wurde, eine erhöhte Neigung zur Tumorentwicklung aufweisen (Donehower et al., 1992).

### 2.3.1 Struktur des p53-Proteins

Das humane Protein p53 besteht aus 393 Aminosäuren und besitzt vier funktionelle Domänen (s. Abb 5).



#### Abb. 5 Struktur von p53

Dargestellt ist der schematische Aufbau des p53-Proteins. Die Transaktivierungsdomäne (TAD) befindet sich am N-Terminus (N) und umfasst die Aminosäuren (AS) 1-42. Die DNA-Bindungsdomäne befindet sich zwischen den AS 102-292. Zwischen den AS 324 und 355 befindet sich die Oligomerisierungsdomäne (Oligom.D.). Am C-Terminus (C) ist die regulatorische Domäne, die die AS 363-393 umspannt, lokalisiert.

Am N-Terminus befindet sich die Transaktivierungsdomäne. Diese interagiert mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie, wie den Transkriptionsfaktoren TFIID und TFIID. Auch der p53-Inhibitor MDM2 bindet an diese Region. In der Mitte des p53-Proteins befindet sich die DNA-Bindungsdomäne, welche die sequenzspezifische Bindung von p53 an die DNA vermittelt. An diese Domäne ist auch ein Zink-Ion gebunden, welches für die DNA-Bindung essentiell ist. Die meisten Mutationen des p53-Proteins treten in der DNA-Bindungsdomäne auf. Die Oligomerisierungsdomäne vermittelt

die Interaktion zwischen verschiedenen p53-Proteinen. Es konnte gezeigt werden, dass p53 als Tetramer an die DNA bindet. Die Konsensus-DNA-Sequenz, an die p53 bindet, besteht daher auch aus zwei Wiederholungen der palindromischen Sequenz 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3', welche durch 0 - 13 bp voneinander getrennt sind. Am C-Terminus des p53-Proteins befindet sich eine regulatorische Domäne, die unspezifisch an DNA bindet. Die C-terminale regulatorische Domäne und die N-terminale Transaktivierungsdomäne sind die Regionen, an denen p53 am häufigsten posttranslational modifiziert und damit reguliert wird (Giono and Manfredi, 2006).

### 2.3.2 Regulation von p53

Das Protein p53 liegt in gesunden Zellen nur in geringer Konzentration vor und hat eine kurze Halbwertszeit von ungefähr 20 min (Levine, 1997). Wird es allerdings durch DNA-Schaden, UV-Bestrahlung,  $\gamma$ -Strahlung oder anderen Einflüssen aktiviert, erhöht sich die p53-Proteinmenge innerhalb von 12 h auf Grund einer erhöhten Translationsrate und vor allem einer Reduktion der Degradationsrate (Momand et al., 2000).

Der Hauptregulator von p53 ist das Protein MDM2 (Murine Double Minute 2). MDM2 wurde 1987 als Onkogen entdeckt und es konnte später gezeigt werden, dass es die Aktivität von p53 inhibiert. Dies geschieht auf verschiedenen Wegen. Zum einen wirkt MDM2 als Ubiquitin-Ligase und markiert p53 durch Ubiquitylierung für den proteasomalen Abbau. Dazu ist auch der Transport des p53-Proteins vom Zellkern in das Zytoplasma notwendig, welcher durch MDM2 vermittelt wird. MDM2 besitzt sowohl eine Kernlokalisationssequenz (NLS) als auch eine Kernexportsequenz (NES), wodurch es konstant vom Zytoplasma in den Zellkern und zurück wandert und auf diese Weise auch p53 transportieren kann. Zum anderen kann MDM2 direkt an die Transaktivierungsdomäne von p53 binden und auf diese Weise die Transaktivierungsfunktion von p53 blockieren. Interessanterweise ist MDM2 ein Zielgen von p53 und wird somit direkt von p53 reguliert. Durch diesen Feedback-Mechanismus wird die korrekte Inaktivierung von p53 sichergestellt. Doch wie wird p53 aktiviert? Es konnte gezeigt werden, dass p53 nach Aktivierung an verschiedenen Aminosäureresten, wie Serin15 und Serin20, in der Transaktivierungsdomäne phosphoryliert wird und dadurch die Interaktion mit MDM2 aufgehoben wird. Dadurch wird die Stabilität und in der Folge auch die Aktivität des p53-Proteins erhöht (Momand et al., 2000). p53 kann noch durch weitere posttranslationale Modifikationen reguliert werden, wozu auch Methylierungen und Acetylierungen gehören (Lavin and Gueven, 2006).

### 2.3.3 Der Zellzyklus und dessen Regulation durch p53

Der Zellzyklus ist ein komplexer Vorgang, der die Replikation der DNA und die anschließende Zellteilung beinhaltet. Man unterscheidet vier Phasen des Zellzyklus, die in der folgenden zeitlichen Reihenfolge ablaufen: zuerst kommt die G<sub>1</sub>-Phase, dann die S-Phase, woran sich die G<sub>2</sub>-Phase anschließt und zum Schluss folgt die M-Phase. Die G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phasen stellen zwei Unterbrechungsphasen (engl. gap) des Zellzyklus dar. Die G<sub>1</sub>-Phase dient als Vorbereitung für die DNA-Synthese, die in der S-Phase stattfindet. Die G<sub>2</sub>-Phase leitet die M-Phase ein, in der die Mitose stattfindet, ein Prozess, bei der die replizierten Chromosomen an die zwei Tochterzellen weitergegeben werden. Des Weiteren gibt es noch eine G<sub>0</sub>-Phase. Die Bezeichnung G<sub>0</sub>-Phase wird für die Zellen verwendet, die den Zellzyklus verlassen haben und nun ruhen und sich nicht mehr teilen. Dies stellt allerdings keinen Endzustand dar, da ruhende Zellen jederzeit wieder in die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus eintreten können (Schafer, 1998).

Der Ablauf des Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) kontrolliert. Dabei handelt es sich um Serin/Threonin-Proteinkinasen, die zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus aktiviert werden. Ihre Aktivität wird durch Cycline reguliert, mit denen sie einen Komplex eingehen und die für den Transport der CDKs in den Zellkern sorgen. Im Säuger sind bisher neun CDKs bekannt, die als CDK1 bis CDK9 bezeichnet werden. Dazu gibt es mindestens 16 Cycline. Es sind aber nicht alle CDKs und alle Cycline an der Zellzyklusregulation beteiligt. So wirken einige der Cyclin/CDK-Komplexe z. B. auf die Regulation der Transkription. Zu den wichtigsten Cyclinen, die den Zellzyklus regulieren können, zählen die Cycline A, B1, B2, D1, D2, D3 und E. Die Aktivität der Cycline wird durch Ubiquitylierungen bestimmt. Dadurch werden die Cycline zum korrekten Zeitpunkt wieder abgebaut und können so nur in definierten Zeiträumen die CDKs aktivieren. Die CDKs können weiterhin durch Phosphorylierungen, die entweder aktivierend oder inhibierend wirken, und durch CDK-Inhibitoren (CKI) reguliert werden (Johnson and Walker, 1999).

Die sequenzielle Aktivierung und Inaktivierung der CDKs, die durch den periodischen Auf- und Abbau der Cycline reguliert werden, führt zur Einleitung der einzelnen Phasen des Zellzyklus. Die Cycline D1, D2 und D3 sind die ersten Cycline, die gebildet werden, wenn Zellen in die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus eintreten. Diese interagieren mit CDK4 und CDK6. Das Hauptsubstrat dieser Komplexe ist das Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein (Rb). Das Rb-Protein ist ein wichtiger Regulator, der das Fortschreiten des Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase kontrolliert. Es bindet an zahlreiche Proteine, wie z. B. den

Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. Diese regulieren viele Gene, die am Zellzyklus und der DNA-Synthese beteiligt sind, wie z. B. die der Cycline A und E und der DNA-Polymerase  $\alpha$ . Bindet Rb an die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, werden diese inhibiert. Wird Rb durch den Komplex aus CDK4 oder 6 und den D-Cyclinen phosphoryliert, kann es nicht mehr mit den E2F-Proteinen interagieren und die Expression der durch E2F regulierten Gene wird angeschaltet. Durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren E2F wird die Expression des Cyclin E induziert, welches mit CDK2 interagiert. Dieser Komplex ist für die anhaltende Phosphorylierung des Rb-Proteins notwendig und sorgt für den Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase. Die S-Phase wird durch Cyclin A reguliert, welches zuerst mit CDK2 und im weiteren Verlauf der S-Phase mit CDK1 interagiert. Diese Komplexe initiieren und kontrollieren die DNA-Replikation. In der M-Phase sind die Cycline B1 und B2, welche mit CDK1 einen Komplex bilden, aktiv. Diese Komplexe sorgen u. a. für den Zerfall der Kernmembran, die Kondensation des Chromatins und die Assemblierung der mitotischen Spindel, wodurch die Mitose eingeleitet wird. Im Anschluss an die Mitose werden die Cycline der M-Phase wieder abgebaut und die Zellen treten wieder in die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus über (Johnson and Walker, 1999; Todd et al., 2002).

Werden Zellen und deren DNA geschädigt, muss verhindert werden, dass sich diese Zellen teilen und so die Mutationen an die Tochterzellen weitergeben. Daher gibt es verschiedene Kontrollpunkte, an denen die Zelle auf DNA-Schäden überprüft wird, und die dafür sorgen, dass nur gesunde Zellen den Zellzyklus durchlaufen. Diese Kontrollpunkte liegen in der G<sub>1</sub>-, der G<sub>2</sub>- und der S-Phase. An diesen Kontrollpunkten kann der Zellzyklus angehalten werden, um die geschädigte DNA zu reparieren. Der Zellzyklusarrest wird durch CDK-Inhibitoren (CKIs) vermittelt. Man unterscheidet dabei zwei CKI-Familien. Die einen gehören zur p16<sup>INK4a</sup>- und die anderen zur p21<sup>CIP/WAF1</sup>-Familie. Die Inhibitoren der p16<sup>INK4a</sup>-Familie, zu denen neben p16<sup>INK4a</sup>, auch p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> und p19<sup>INK4d</sup> gehören, binden an CDK4 und CDK6 und inhibieren diese oftmals bevor sie an die Cycline gebunden sind. Durch die p16<sup>INK4a</sup>-Inhibitoren wird der Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase blockiert, da das Protein Rb nicht phosphoryliert und damit inaktiviert wird. Zu den CKIs der p21<sup>CIP/WAF1</sup>-Familie zählt man die Proteine p21<sup>CIP/WAF1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> und p57<sup>Kip2</sup>. Diese können mit fast allen Cyclin/CDK-Komplexen interagieren und diese inhibieren. Sie wirken sowohl in der G<sub>1</sub>- als auch der S-Phase des Zellzyklus (Kim and Zhao, 2005).

Der Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus nach DNA-Schaden wird durch p53 vermittelt. Nur wenige Minuten nach Schädigung der DNA werden entweder das Protein ATM

(Ataxia telangiectasia mutated) oder das verwandte Protein ATR (ATM-Rad3-related) aktiviert. Dies sind Proteinkinasen, die durch unterschiedliche Einflüsse aktiviert werden. So wird ATM eine große Bedeutung für den Zellzyklusarrest nach Schädigung durch ionisierende Strahlung zugewiesen, während ATR besonders wichtig für die Zellantwort nach UV-Bestrahlung ist. Substrate für ATM und ATR sind die beiden Kinasen CHK1 und CHK2, die in der Folge p53 aktivieren, oder direkt das p53-Protein, welches dann durch Phosphorylierungen aktiviert wird (Samuel et al., 2002). p53 wirkt anschließend als Transkriptionsfaktor für den CDK-Inhibitor p21<sup>Waf/Cip</sup>, in dessen Promotor sich zwei p53-Bindungsstellen befinden (el-Deiry et al., 1993; el-Deiry et al., 1995). Das Protein p21<sup>Waf/Cip</sup> kann dann den Zellzyklus auf zwei verschiedenen Wegen blockieren. Zum einen inhibiert es den Cyclin E/CDK2-Komplex und verhindert dadurch die Phosphorylierung des Proteins Rb. Zum anderen interagiert es mit PCNA, einer Untereinheit der DNA-Polymerase  $\delta$ , und inhibiert dadurch die PCNA-abhängige DNA-Replikation, nicht aber die PCNA-abhängige Nukleotid-Excisions-Reparatur (Samuel et al., 2002; Weinberg and Denning, 2002).

### 2.3.4 Weitere Funktionen von p53

Neben der bedeutenden Rolle, die es während der Zellzyklusregulation ausübt, ist p53 auch für seine wichtigen Funktionen in der Apoptose bekannt. Diese wird eingeleitet, wenn der DNA-Schaden in einer Zelle nicht beseitigt werden kann und so die Gefahr bestünde, dass Mutationen an die Tochterzellen vererbt würden.

Die Einleitung der Apoptose erfolgt über p53-induzierte Expression von pro-apoptotischen Genen, die man zur Bcl-2-Familie zählt. Die Bcl-2-Proteine sind wichtige Regulatoren der Apoptose und können sowohl anti-apoptotische als auch pro-apoptotische Funktionen ausüben. Zu den Bcl-2-Proteinen, die pro-apoptotische Funktionen haben, gehören z. B. Bax (Bcl-2-associated X protein), PUMA und NOXA, welche alle als direkte p53-Zielgene beschrieben worden sind. PUMA und NOXA können auch Bax aktivieren, welches im Anschluss die Mitochondrien-Membran permeabilisiert, wodurch Cytochrom C freigesetzt wird. Dadurch kann zusammen mit Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) und der Procaspase-9 das Apoptosom gebildet werden, welches die Caspase-9 aktiviert. Diese aktiviert in der Folge die Effektorcaspasen Caspasen-3 und -7. Auf diese Weise kann p53 den intrinsischen Signalweg der Apoptose initiieren (Chipuk and Green, 2006). Es ist aber auch bekannt, dass p53 den extrinsischen Signalweg der Apoptose regulieren kann (zur Apoptose s. auch 2.4.2). So sind die Todesrezeptoren Fas und DR5/Killer bekannte

Zielgene von p53. Diese können an der Zelloberfläche von ihren Liganden aktiviert werden, wodurch durch Vermittlung von Adaptermolekülen Caspase-8 aktiviert und die Apoptose in Gang gesetzt wird (Haupt et al., 2003).

Neben der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose kann p53 auch auf Ebene der DNA-Reparatur eingreifen, um entstandenen DNA-Schaden zu beheben. Dies erfolgt entweder über transkriptionelle Regulation von p53-Zielgenen oder über direkte Interaktion mit an der DNA-Reparatur beteiligten Proteinen. Zu den Zielgenen von p53, die in die DNA-Reparatur involviert sind, gehört z. B. GADD45. Dieses interagiert auch mit PCNA und aktiviert die Nukleotid-Excisions-Reparatur. Zu den direkten Interaktionspartnern von p53 zählt z. B. das Replikationsprotein A (RPA). Dabei handelt es sich um ein DNA-Einzelstrang-Bindungsprotein, das an der DNA-Replikation, der homologen Rekombination und der Nukleotid-Excisions-Reparatur beteiligt ist. Durch UV-Strahlung wird die Bindung zwischen p53 und RPA zerstört, RPA freigesetzt und dadurch die Nukleotid-Excisions-Reparatur aktiviert (Giono and Manfredi, 2006).

## 2.4 Caspasen

### 2.4.1 Struktur von Caspasen

Caspasen sind für ihre Rolle während der Apoptose bekannt. Die Apoptose - auch als programmierter Zelltod bezeichnet - ist ein gut regulierter physiologischer Vorgang, der eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung, der Homöostase und der Immunabwehr spielt. Caspasen sind Cysteinproteasen, die ihre Substrate hinter Asparaginsäureresten spalten und als Zymogen in fast allen tierischen Zellen exprimiert werden. Man findet Caspasen in zahlreichen Organismen, wie z. B. *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und dem Menschen. Bisher sind im Säuger 14 Caspasen beschrieben worden, die man anhand der Länge ihrer N-terminalen Prodomäne klassifizieren kann. Procaspasen mit einer kurzen Prodomäne gehören zu den Effektor-Caspasen und die Procaspasen mit einer langen N-terminalen Prodomäne gehören zu den Initiator-Caspasen. Die Initiator-Caspasen leiten die Apoptose ein. Dazu zählen die Caspasen-2, -8, -9 und -10. Die Initiator-Caspasen können über Oligomerisierung aktiviert werden, da die Procaspasen eine schwache Protease-Aktivität besitzen. Über diese können andere Procaspasen gespalten werden, wenn sie sich in unmittelbarer Nähe befinden. Die Caspasen-3, -6 und -7 gehören zu den Effektor-Caspasen. Diese werden durch die Initiator-Caspasen aktiviert und spalten dann zellulären Substrate, was in der Folge zum Zelltod führt. Aktive Caspasen liegen in der Zelle als Tetramer vor, welche aus jeweils zwei

Procaspase-Molekülen durch proteolytische Spaltung entstehen. Eine Procaspase wird jeweils in eine große und eine kleine Untereinheit gespalten. Für das aktive Tetramer lagern sich je zwei kleine Untereinheiten zwischen zwei großen Untereinheiten zusammen (Kumar, 2007; Rupinder et al., 2007).

### **2.4.2 Rolle der Caspasen während der Apoptose**

Es wurden zwei Signalwege beschrieben, über die die Apoptose eingeleitet werden kann: der extrinsische und der intrinsische Signalweg. Der extrinsische Signalweg wird an der Zelloberfläche durch Ligandenbindung an einen Todesrezeptor (z. B. CD95 und den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-1) aktiviert. Dieser bindet auf der zytoplasmatischen Seite an Adaptermoleküle wie TRADD (TNFR associated death domain) oder FADD (Fas associated death domain), die dann zusammen mit der Procaspase-8 einen DISC-Komplex (death inducing signal complex) bilden. Dabei wird die Procaspase-8 autokatalytisch gespalten und aktiviert. Die aktive Caspase-8 aktiviert dann die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7, welche anschließend weitere Substrate spalten und die Apoptose auslösen. Der intrinsische Signalweg wird durch verschiedene Stimuli, wie z. B. UV-Strahlung, oxidativer Stress oder Entzug von benötigten Wachstumsfaktoren, ausgelöst und verläuft über die Mitochondrien. Durch diese Stimuli werden Proteine der Bcl-2 Familie aktiviert, zu denen Bax (Bcl-2-associated X protein), PUMA und NOXA gehören und bei denen es sich um Zielgene von p53 handelt. Durch den Einfluss dieser Proteine wird die Mitochondrienmembran permeabilisiert, woraufhin Cytochrom C freigesetzt wird. Dieses kann zusammen mit dem Adaptermolekül Apaf-1 und der Procaspase-9 das Apoptosom bilden, welches zur Aktivierung der Caspase-9 führt, die im Anschluss die Effektor-Caspasen aktiviert (Rupinder et al., 2007).

Es sind zahlreiche Substrate der Caspasen identifiziert worden. Dazu gehören u. a. Zytoskelettproteine, wie  $\beta$ -Aktin und  $\alpha$ -Tubulin, Zelladhäsionsmoleküle, wie  $\beta$ -Catenin und E-Cadherin, und Zellkernstrukturelemente, wie die Lamine. Die Inaktivierung dieser Proteine trägt dazu bei, dass die apoptotische Zelle schrumpfen kann und der Zellkern aufgelöst wird. Auch DNA-Synthese und -Reparaturproteine, wie z. B. PARP (Poly (ADP-ribose) Polymerase), und Proteine, die an der Translation beteiligt sind, wie die eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIF), zählen zu den Caspase-Substraten. Auf diese Weise wird die Neusynthese von DNA und Proteinen verhindert. Insgesamt sind über 280 verschiedene Substrate von Caspasen beschrieben worden, wobei die funktionelle

Bedeutung dieser Spaltung bisher nicht bei jedem Substrat bekannt ist (Fischer et al., 2003).

### 2.4.3 Caspasen in nicht-apoptotischen Prozessen

Vor einigen Jahren konnte nachgewiesen werden, dass Caspasen nicht nur den Zelltod induzieren, sondern auch wichtige Funktionen in nicht-apoptotischen Prozessen übernehmen. Caspase-1 wurde ursprünglich als Interleukin-1 $\beta$ -konvertierendes Enzym (ICE) entdeckt, also als ein Enzym, dessen Aufgabe die Aktivierung von IL-1 $\beta$  ist. Dadurch kann Caspase-1 in den Entzündungsprozess eingreifen (Thornberry et al., 1992). Auch Proliferationsprozesse können von Caspasen reguliert werden. So konnte gezeigt werden, dass in Caspase-3<sup>-/-</sup> Mäusen ein verstärktes Wachstum von B-Lymphozyten auftritt, was darauf deuten lässt, dass Caspase-3 die Proliferation von B-Lymphozyten inhibiert (Woo et al., 2003). Im Gegensatz dazu konnte nachgewiesen werden, dass Caspase-6 den Übergang von ruhenden B-Lymphozyten von der G<sub>0</sub>- in die G<sub>1</sub>-Phase vermittelt und somit einen positiven Einfluss auf die Zellproliferation hat (Olson et al., 2003).

Eine weitere Rolle konnte den Caspasen in Differenzierungsvorgängen zugewiesen werden. Dabei wurde diese Beteiligung zuerst in Zellen festgestellt, die ihren Zellkern und andere Zellorganellen im Laufe des Differenzierungsprozesses verlieren. Dazu gehören z. B. Erythrozyten und Keratinozyten. Die endgültige Differenzierung in Erythrozyten weist auch einige Gemeinsamkeiten mit der Apoptose auf. So treten in beiden Prozessen Chromatinkondensationen und die Degradation des Zellkerns auf. Zermati et al. konnten nachweisen, dass die Inhibierung der Caspasen durch den Caspase-Inhibitor zVAD-fmk die erythroide Differenzierung von humanen erythroiden Vorläuferzellen verhindert und dass Caspase-3 während der Erythropoese durch den mitochondrialen Signalweg aktiviert wird. Diese spaltet anschließend Proteine, die für den Kernmembranaufbau und die Chromatinkondensation nötig sind (Zermati et al., 2001). Zu den Substraten von Caspase-3 zählt ebenso der Transkriptionsfaktor GATA-1, der für die Erythropoese essentiell ist. Ribeil et al. legten dar, dass während der erythroiden Differenzierung das Hitzeschockprotein 70 die Spaltung von GATA-1 durch Caspase-3 verhindert und damit die Apoptose verhindert (Ribeil et al., 2007). Es konnte auch gezeigt werden, dass Caspasen an der Differenzierung von Keratinozyten beteiligt sind. Besonders Caspase-14 soll für diesen Prozess eine wichtige Funktion haben (Eckhart et al., 2000). In Mäusen wurde dokumentiert, dass auch Caspase-3 die Differenzierung von Keratinozyten reguliert

und es sich in diesen Zellen bei Caspase-3 um ein Zielgen von Notch1 handelt (Okuyama et al., 2004). Inzwischen wurde aber auch in anderen Zellen, die nicht ihren Zellkern während der Differenzierung verlieren, eine Caspase-Aktivität nachgewiesen, die für die weitere Reifung der Zellen notwendig ist. Ein Knock-out der Caspase-8 in myelomonozytischen Vorläuferzellen verhinderte z. B. die Differenzierung in Makrophagen (Kang et al., 2004). Weiter konnte gezeigt werden, dass die Caspase-3 an der Differenzierung von Skelettmuskelzellen beteiligt ist (Fernando et al., 2002), aber dass eine konstitutiv aktive Aktivität der Caspase-3 die Reifung der dendritischen Zellen blockiert (Santambrogio et al., 2005). Dagegen spielen die Caspasen-3 und -9 bei der Reifung von Makrophagen aus Monozyten eine Rolle (Sordet et al., 2002).

Wodurch festgelegt wird, ob Caspasen die Apoptose auslösen oder nicht-apoptotische Prozesse vermitteln, ist noch nicht ausreichend geklärt. Diskutiert wird, dass eine große Menge an Caspase-Aktivität zur Apoptose führt und dass bei begrenzter Caspase-Aktivierung die Regulation von nicht-apoptotischen Funktionen, wie Proliferation und Differenzierung, überwiegt (Lamkanfi et al., 2007). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Chaperone die Zugänglichkeit von Caspasesubstraten regulieren können und damit die Entscheidung Apoptose versus Zelldifferenzierung beeinflussen. So schützte die nukleäre Interaktion des Substrates GATA1 mit dem Hitzeschockprotein 70 vor Spaltung durch Caspase-3 und ermöglichte damit die erythroide Differenzierung. Dagegen wurde das Hitzeschockprotein 70 bei Einleitung der Apoptose in das Zytoplasma transportiert, wodurch GATA1 durch Caspase-3 gespalten werden kann (Ribeil et al., 2007).

### **2.5 Fragestellung der Arbeit**

Der Notch-Signalweg ist ein wichtiger Regulator von Differenzierungsvorgängen. Ziel dieser Arbeit war, die Rolle des Notch1-Rezeptors während der myeloischen und erythroiden Differenzierung näher zu untersuchen. Als Modellsystem diente die myeloische Vorläuferzelllinie FDCP-mix. Für die Untersuchung des Einflusses des Notch1-Rezeptors standen FDCP-mix-Zellen zur Verfügung, die das NERT-Protein tragen und damit durch Zugabe von Tamoxifen (OHT) eine konditionelle Aktivierung von Notch1 ermöglichen.

Im ersten Projekt dieser Arbeit sollte die Funktion von Notch1 auf die erythroide Differenzierung näher charakterisiert werden. In einer dieser Doktorarbeit vorausgegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass Notch1 die Differenzierung der FDCP-mix-Zellen entlang der erythroiden Richtung beschleunigt (Schroeder, 2001). Erste

Ergebnisse im Northern Blot wiesen darauf hin, dass Notch1 die Expression des Globingens erhöht (Rieber, 2004). Ob Notch1 einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Globinexpression hat und wie der zugrunde liegende Mechanismus aussieht, sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden.

Das zweite Teilprojekt der Arbeit betrachtete die Interaktionen zwischen dem Zellzyklusregulatorprotein p53 und Notch1. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Notch1 in hämatopoetischen Vorläuferzellen zu einem Proliferationsstopp in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase führt (Schroeder and Just, 2000a). Dieser Proliferationsstopp ist in FDCP-mix-Zellen, denen funktionelles p53 fehlt, nicht mehr zu beobachten (Schroeder, 2001; Heering, 2005). In einem ersten Experiment sollte durch Transfektion eines Plasmides, das das Gen für p53 enthält, der normale Phänotyp in den p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen wieder hergestellt werden, um dann nachzuweisen, dass die Aktivierung von Notch1 auch in diesen rekonstituierten Zellen zu einem Zellzyklusarrest führt. Eine weitere Frage war, wie das Zusammenspiel von p53 und Notch1 während des Proliferationsvorgangs mechanistisch funktioniert, um so den Einfluss von Notch1 auf die Proliferation besser verstehen zu können.

Das dritte Projekt dieser Doktorarbeit beschäftigte sich mit der Interaktion von Caspasen und dem Notch1-Rezeptor. Mit Hilfe eines DNA-Arrays konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Notch1 die Expression von Caspase-6 erhöht (Rieber, 2004). Weiterhin ist aus der Literatur bekannt, dass Caspase-3 ein Zielgen von Notch1 ist und dass diese an der Differenzierung von Keratinozyten beteiligt ist (Okuyama et al., 2004). Daher sollte überprüft werden, ob Caspasen auch während der Hämatopoese in die Differenzierungsprozesse eingreifen. Zuerst galt es, die Erhöhung der Caspase-Expression nach Notch1-Aktivierung im Western Blot zu bestätigen. Dafür standen nicht nur ein Antikörper, der Caspase-6 erkennt, zur Verfügung, sondern auch Antikörper, die Caspase-3 und Caspase-7 detektieren. Im Anschluss daran sollte untersucht werden, ob die Zugabe eines Caspase-Inhibitors die Differenzierung der FDCP-mix-Zellen nach Notch1-Aktivierung verändert, um so einen Einfluss der Caspasen auf Differenzierungsvorgänge nachzuweisen.

## 3. Material & Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Reagenzien

Nicht aufgelistete Reagenzien wurden von Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Reagenz	Hersteller
ABsolute QPCR ROX Mix	ABgene (Hamburg, Deutschland)
Agarose	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Antikörper Aktin, I1004	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
Antikörper Caspase-3	Cell Signaling (Danvers, USA)
Antikörper Caspase-6	Cell Signaling (Danvers, USA)
Antikörper Caspase 7	Cell Signaling (Danvers, USA)
Antikörper Goat Anti-Mouse IgG, konjugiert mit einer Peroxidase	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)
Antikörper Goat Anti-Rabbit IgG, konjugiert mit einer Peroxidase	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, UK)
Antikörper p21, SX118	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Antikörper für FACS	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
CFDA-SE	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Complete, EDTA-frei (Protease Inhibitor)	Roche (Mannheim, Deutschland)
DMSO	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
DNA-Größenmarker	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
DNA-Oligonukleotide (HPSF gereinigt)	MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland)
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega (Mannheim, Deutschland)
ECL, ECL Advance	GE Healthcare (München, Deutschland)
Erythropoietin	Roche (Mannheim, Deutschland)
FC Block (# O1241D)	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Ficoll	GE Healthcare (München, Deutschland)
Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
4-Hydroxy-Tamoxifen	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
IMDM, hyperosmolar	PAN (Aidenbach, Deutschland)
Natriumpyruvat	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Pferdeserum	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Pfu-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Proteingrößenmarker	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Roti-Quant	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
RPMI-1640	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Via-Probe	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
zVAD-fmk	Imgenex (San Diego, USA)

### 3.1.2 Geräte und Zubehör

Geräte und Zubehör	Hersteller
BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Brutschrank	Heraeus (Osterode, Deutschland)
Einfrierboxen	Nalgene (Neerijse, Belgien)
FACSCanto, FACScan	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Geldokumentation LAS 3000	Fujifilm (Düsseldorf, Deutschland)
Gelkammer Typ B1A (für Nukleinsäuren)	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Gelkammer Mini-Protean (für Proteine)	BioRad (München, Deutschland)
MikroLumat plus	Berthold Technologies (Bad Wildbach, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Nitrozellulose-Membran (0,45 µM)	Whatman (Dassel, Deutschland)
PCR-Gerät T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Real-time PCR System 7900HT	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Sterilbank	Heraeus (Osterode, Deutschland)
Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

### 3.1.3 Kits

Kit	Hersteller
ApoAlert FITC-Annexin V Apoptosis Kit	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
High Fidelity PCR Enzyme Mix	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Mycoplasma PCR Elisa Kit	Roche (Mannheim, Deutschland)
NucleoBond PC500EF	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNeasy Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

### 3.1.4 Primer

Primer	Sequenz (5'-3')
AvaIII rev	caagcacacatgcatcagatcc
HS2mut for	cactctaggcaccgtccatctgggcacacaccct
HS2mut rev	gcccagatggacggtgcttagagtgatgactcct
NheI for	tacgcgtgctagcccgggctc
PstI rev	cgggtcccgaacctcgcgtgctgcagagg
p21mut for	gagggatcacaccgtctagaggtgatattgtggg
p21mut rev	tcaccttagacggtgtgatccctcactaggtca
p53 BS1 for	ggccattagagctctggcatagaagag
p53 BS1 rev	gccagagctctaatggccagaaagcca
p53 BS2 for	agaggaagagagattccagactctga
p53 BS2 rev	ggaaatctctcttctcttaacgcagct
XhoI for	tcttacgcgtgctagcccgggctcagatc

## 3.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Blockierlösung	5% Milchpulver in PBS
Blotting-Puffer (1x)	1 x SDS-Laufpuffer
DNA-Ladepuffer (6x)	Methanol 20% 0,09% Bromphenolblau 0,09% Xylencyanol FF 60% Glycerol
HU-Puffer	60 mM EDTA 200 mM Tris pH 6,8 8 M Harnstoff 0,1 M EDTA 15 mg/ml DTT
LB-Medium (für 1 l)	0,01% Bromphenolblau Hefe Extrakt 5 g Trypton 10 g NaCl 5 g
LB-Agar (für 1 l)	LB-Medium + 15 g Agar
Lysispuffer für Proteine	50 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40 1% TritonX-100
RF1	100 mM RbCl 50 mM MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O 30 mM KAc 10 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 15% Glycerol
RF2	pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, steril filtrieren 10 mM RbCl 10 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 15% Glycerol
PBS (1x)	pH 6,8 mit NaOH einstellen, steril filtrieren 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS-Tween	pH 7,4 1 x PBS
Ponceau S	0,1% Tween 20 0,2% Ponceau S 3% TCA
SDS-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris HCl 1,92 M Glycin 1% SDS

TAE (50x)	2 M Tris/HCl 1 M Natriumacetat 62,5 mM EDTA pH 8,5
Waschpuffer	0,1% Tween-20 in PBS

### 3.1.6 Assays für Real-time PCR

Die Assays für die Real-time PCR (TaqMan Gene Expression Assays-on-Demand) stammen von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland).

Gen	Nummer des Assays
Hes1	Mm00468601_m1
Hey1	Mm00468865_m1
Gata1	Mm00484678_m1
Fog1 (Zfp1)	Mm00494336_m1
Eklf	Mm00516096_m1
NF-E2 (Nfe2)	Mm000801891_m1
Hbb-b2 ( $\beta$ -Globin minor)	Mm00731743_mH

### 3.1.7 Zellen und Bakterien

Zellen	Beschreibung
rneo3	FDCP-mix-Zellen, murine myeloische Vorläuferzelllinie transfiziert mit Kontrollvektor rneo (Schroeder, 2001)
rNERTneo24	FDCP-mix-Zellen, murine myeloische Vorläuferzelllinie transfiziert mit induzierbarem Notch1 Klon 24 (Schroeder, 2001)
rNERTneo26	FDCP-mix-Zellen, murine myeloische Vorläuferzelllinie transfiziert mit induzierbarem Notch1 Klon 26 (Schroeder, 2001)
p53 <sup>null</sup> rneo3	p53 <sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen, murine myeloische Vorläuferzelllinie transfiziert mit Kontrollvektor rneo (Schroeder, 2001)
p53 <sup>null</sup> rNERTneo11	p53 <sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen, murine myeloische Vorläuferzelllinie transfiziert mit induzierbarem Notch1 Klon 11 (Schroeder, 2001)
p53 <sup>null</sup> rNERTneo24	p53 <sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen, murine myeloische Vorläuferzelllinie transfiziert mit induzierbarem Notch1 Klon 24 (Schroeder, 2001)
p53 <sup>null</sup> rNERTneo31	p53 <sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen, murine myeloische Vorläuferzelllinie transfiziert mit induzierbarem Notch1 Klon 31 (Schroeder, 2001)
p53 <sup>null</sup> rNERTneo33	p53 <sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen, murine myeloische Vorläuferzelllinie transfiziert mit induzierbarem Notch1 Klon 33 (Schroeder, 2001)
K562	humane Zelllinie, Chronische Myeloische Leukämie ATCC-Nummer: CCL-243
DH5 $\alpha$	E. coli

### 3.1.8 Plasmide

Plasmid	Beschreibung
NIC-FL	enthält die gesamte intrazelluläre Domäne von mNotch1 („full length“)
pCAG-3SIP	Kontrollvektor, trägt Puromycin-Resistenzgen
pCAG-3SIP-wtp53	trägt Puromycin-Resistenzgen und das Gen für Wildtyp-p53 (Heering, 2005)
p $\gamma$ luc	Firefly-Luciferaseplasmid, enthält $\gamma$ -Globin-Promotor (Lam and Bresnick, 1996)
pHS2 $\gamma$ luc	Firefly-Luciferaseplasmid, enthält hypersensitive Stelle 2 der Locus-Kontroll-Region des $\beta$ -Globingens unter der Kontrolle des $\gamma$ -Globin-Promotors (Lam and Bresnick, 1996)
pHS2 $\gamma$ mut	Firefly-Luciferaseplasmid, enthält hypersensitive Stelle 2 der Locus-Kontroll-Region des $\beta$ -Globingens mit mutierter (nicht-funktioneller) RBP-J-Bindungsstelle unter der Kontrolle des $\gamma$ -Globin-Promotors
p21luc	Firefly-Luciferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3), enthält den humanen p21-Promotor (Kim et al., 1999)
p21RBP-Jmut	Firefly-Luciferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3), enthält den humanen p21-Promotor mit mutierter (nicht-funktioneller) RBP-J-Bindungsstelle
p21 $\Delta$ p53BS1luc	Firefly-Luciferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3), enthält den humanen p21-Promotor, in dem die erste p53-Bindungsstelle deletiert wurde
p21 $\Delta$ p53BS2luc	Firefly-Luciferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3), enthält den humanen p21-Promotor, in dem die zweite p53-Bindungsstelle deletiert wurde
p21 $\Delta$ p53BS1+2luc	Firefly-Luciferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3), enthält den humanen p21-Promotor, bei dem sowohl die erste als auch die zweite p53-Bindungsstelle deletiert wurden
RBP-J-luc	Firefly-Luciferaseplasmid, 12 RBP-J-Bindungsstellen unter der Kontrolle des minimalen $\beta$ -Globin-Promotors (Kato et al., 1997)
0-luc	Firefly-Luciferaseplasmid, Kontrollvektor zu RBP-J-luc
TK-Renilla	Renilla-Luciferaseplasmid, enthält Renilla-Luciferase unter der Kontrolle des TK-Promotors

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Bakterienkultur**

#### **3.2.1.1 Bakterienkultivierung**

Die Bakterien wurden nach der Transformation auf LB-Agarplatten, die Ampicillin (100 µg/l Endkonzentration) oder Kanamycin (30 µg/l Endkonzentration) enthielten, bei 4°C gelagert. Davon konnte, wie unter 3.2.2.1 beschrieben, eine Flüssigkultur angesetzt werden. Zur dauerhaften Lagerung der Bakterien wurde ein Glycerolstock (ein Gemisch aus 0,5 ml 50%-igem Glycerol und 1 ml einer Bakterienkultur) angelegt, der bei -80°C eingefroren wurde.

#### **3.2.1.2 Herstellung kompetenter *E. coli***

Zur Herstellung kompetenter Bakterien (DH5α) wurde eine Übernachtskultur in 10 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Damit wurden 100 ml LB-Medium mit einer OD von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD von 0,4 bis 0,6 wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 5.100 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml Puffer RF1 aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 5.100 rpm und 4°C für 5 min. Das Pellet wurde in 4 ml Puffer RF2 gelöst, wieder 15 min auf Eis inkubiert und anschließend in 100 µl Aliquots zuerst auf Trockeneis und anschließend bei -80°C eingefroren.

#### **3.2.1.3 Transformation**

Für die Transformation von Bakterien wurden ca. 100 ng DNA in 100 µl kompetente Zellen (s. 3.2.1.2) gegeben und 30 – 45 min auf Eis inkubiert. Es folgte für 90 s ein Hitzeschock bei 42°C. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Zellen wurden bei 37°C für 1 h geschüttelt. Davon wurden 100 µl auf einer LB-Agarplatte, die zur Selektion ein entsprechendes Antibiotikum enthielt, ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

### 3.2.2 DNA-Techniken

#### 3.2.2.1 Extraktion von Plasmiden

Zur Vorbereitung einer Plasmidextraktion musste eine Flüssigkultur der entsprechenden Bakterien angelegt werden. Dazu wurde LB-Medium mit einem Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/l oder Kanamycin 30 µg/l Endkonzentration) zur Selektion versetzt. Für eine Plasmid-Mini-Präparation wurden 3 ml Medium verwendet, für eine Plasmid-Maxi-Präparation 200 ml. Von einer LB-Agarplatte (s. 3.2.1.1) wurde eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und damit das Medium angeimpft. Die Kultur wurde ÜN bei 37°C und 300 rpm geschüttelt.

Die Plasmid-Mini-Präparation erfolgte mit dem Kit NucleoSpin Plasmid von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) und die Plasmid-Maxi-Präparation mit dem Kit NucleoBond PC500EF von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers.

#### 3.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes einer Probe erfolgte im Photometer. Dazu wurde die Absorption der Probe bei 260 nm und 280 nm gemessen. Über die  $OD_{260nm}$  kann die Konzentration über folgende Formel berechnet werden:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = OD_{260nm} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Das Verhältnis  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  gibt über den Reinheitsgrad der DNA Auskunft. Liegt der Wert zwischen 1,8 und 2, liegen keine Protein-Verunreinigungen vor.

#### 3.2.2.3 Restriktion von Plasmiden

Zur Kontrolle und für Klonierungen wurde 1µg DNA mit 1 U des Restriktionsenzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer bei 37°C für 1 h oder ÜN geschnitten. Wurde nur ein Restriktionsenzym verwendet, betrug das Endvolumen 10 µl, bei Verwendung von zwei Restriktionsenzymen 20 µl.

#### 3.2.2.4 Auffüllen von DNA-Fragmenten

Entstanden nach einem Restriktionsverdau (s. 3.2.2.3) an einem Plasmid überhängende Enden und wurden für die weitere Klonierung glatte Enden benötigt, so wurden die überhängenden DNA-Enden aufgefüllt. Dazu wurden 10 µl der DNA, 5 µl 2 mM dNTPs, 0,5 µl Pfu-Polymerase, 5 µl des entsprechenden Puffers mit  $MgSO_4$  und 29,5 µl  $ddH_2O$

gemischt und für 15 min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

#### **3.2.2.5 Dephosphorylierung von DNA**

Sollte zur Ligation (s. 3.2.2.6) ein Plasmid verwendet werden, das entweder nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurde oder mit zwei Restriktionsenzymen, die kompatible Enden erzeugen, so musste der Vektor zur Verhinderung der Religation dephosphoryliert werden. Dazu wurden 30 µl DNA mit 1 µl CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) und 3,5 µl des entsprechenden Puffers gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 85°C für 15 min.

#### **3.2.2.6 Ligation**

Der Ligationsansatz setzte sich aus 0,5 µl T4-DNA-Ligase, 0,5 µl des entsprechenden Puffers, 0,5 µl des Vektors und 3,5 µl des Inserts zusammen. Der Ansatz wurde 1 h bei RT inkubiert.

#### **3.2.2.7 Agarosegel**

Die DNA wurde in einem 1-prozentigen Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurde 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle gelöst. Zur Färbung der DNA wurde je 100 ml Puffer 8 µl einer 1-prozentigen Ethidiumbromidlösung zugegeben und anschließend das Gel gegossen. Die DNA wurde vor dem Auftragen mit DNA-Ladepuffer versetzt. Zur Größenbestimmung wurde gleichzeitig ein DNA-Längenmarker benutzt.

#### **3.2.2.8 Gelextraktion**

Sollten bestimmte DNA-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert werden, wurde die DNA unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm sichtbar gemacht und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers.

### 3.2.2.9 Gezielte Mutagenese

Zum Mutieren ausgewählter Promotorsequenzen wurden zwei verschiedene Varianten der gezielten Mutagenese angewandt.

Für die Mutierung der RBP-J-Bindungsstelle in der HS2-Region des Plasmids HS2 $\gamma$ luc wurde der High Fidelity PCR Enzyme Mix von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Dabei kamen die Primer HS2mut for und HS2mut rev zum Einsatz. Als Matrize diente der Vektor pHS2 $\gamma$ luc. Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde dieser vollständig amplifiziert. Die Primer waren ca. 30 bp lang und banden sowohl an der RBP-J-Bindungsstelle der HS2-Region als auch stromaufwärts und stromabwärts davon. Da sich die Primer in fünf Positionen von der Ausgangssequenz unterschieden (s. Abb. 13), wurde durch die PCR die RBP-J-Bindungsstelle so mutiert, dass sie nicht mehr funktionsfähig war. Da nur der Ausgangsvektor methyliert war, konnte dieser nach der PCR mit dem Restriktionsenzym DpnI ÜN bei 37°C verdaut werden und man erhielt den Vektor mit der mutierten RBP-J-Bindungsstelle pHS2 $\gamma$ mut. Die Einführung der Mutation wurde durch Sequenzierung bestätigt.

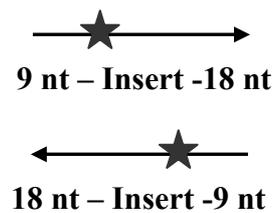
Folgender Ansatz wurde für die PCR pipettiert:

0,2 µg pHS2 $\gamma$ luc	1 µl
10 x High Fidelity PCR Polymerase Mix Puffer	5 µl
2 mM dNTPs	5 µl
High Fidelity PCR Polymerase Mix	0,5 µl
HS2mut for	2 µl
HS2mut rev	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	34,5 µl

Folgendes Programm wurde verwendet:

95°C	5 min	} 39 x
95°C	1 min	
53°C	30 sek	
68°C	7 min	
68°C	10 min	
4°C	∞	

Für die Mutierung der RBP-J-Bindungsstelle und die Deletion der p53-Bindungsstellen im p21-Promotor wurde eine andere Variante der gezielten Mutagenese angewandt. Dafür waren drei PCR-Schritte notwendig. Für die Mutierung der RBP-J-Bindungsstelle im p21-Promotor wurden je ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer (p21mut for und p21mut rev) gewählt, die an die RBP-J-Bindungsstelle und jeweils 9 bp stromaufwärts und 18 bp stromabwärts davon banden (s. Abb. 6), aber an fünf Positionen so verändert wurden, dass die Bindungsstelle nicht mehr funktionell war (s. 4.2.8).

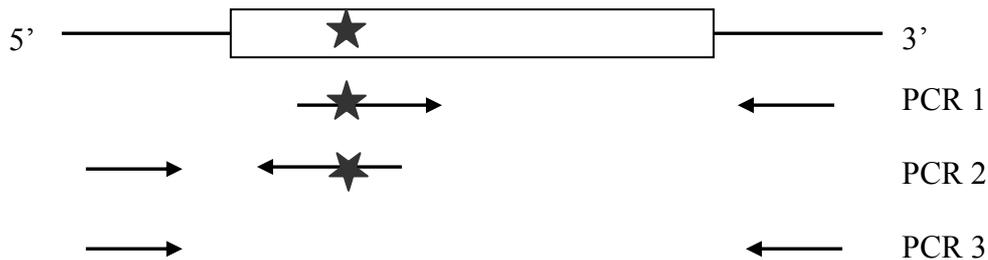


#### **Abb. 6: Primerdesign**

Schematische Darstellung zur Generierung von Primern, die zur Einführung von Mutationen verwendet wurden. Die Stelle, die mutiert werden soll, ist mit einem Stern (Insert) gekennzeichnet. Die Primer binden jeweils 9 bp stromaufwärts und 18 bp stromabwärts von dieser Stelle.

Hinzu kamen Primer (NheI for und PstI rev), die ca. 500 – 1800 bp stromaufwärts bzw. stromabwärts der RBP-J-Bindungsstelle an einer Stelle im Promotor banden, die eine Schnittstelle für ein spezielles Restriktionsenzym enthielt, das den Ausgangsvektor p21luc nur einmal schneidet.

In einer ersten PCR wurden die Primer NheI for und p21mut rev verwendet, in einer zweiten PCR PstI rev und p21mut for. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden im Agarosegel (s. 3.2.2.7) aufgetrennt und mit Hilfe der Gelextraktion (3.2.2.8) isoliert und dienten in einer dritten PCR, bei der nur die flankierenden Primer PstI rev und NheI for verwendet wurden, als Matrize (s. Abb. 7).



### Abb. 7: PCR zur Einführung von Mutationen

Schema des Ablaufes der gezielten Mutagenese. In den PCR-Schritten 1 und 2 wurden jeweils mit einem Primer, der die Mutation einführt (mit einem Stern gekennzeichnet), und einem flankierendem Primer, der eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym enthält, zwei DNA-Fragmente generiert, die in einer dritten PCR als Matrize dienen. Für die dritte PCR wurden die beiden flankierenden Primer, die die Restriktionsschnittstellen enthalten, verwendet.

Folgende Ansätze wurden pipettiert:

Für PCR 1:

0,2 µg p21luc (Matrize)	1 µl
10 x Polymerase Puffer (-MgCl <sub>2</sub> )	10 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	10 µl
2 mM dNTPs	10 µl
Deep Vent Polymerase	1 µl
p21mut for	2 µl
PstI rev	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	64 µl

Für PCR 2:

0,2 µg p21luc (Matrize)	1 µl
10 x Polymerase Puffer (-MgCl <sub>2</sub> )	10 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	10 µl
2 mM dNTPs	10 µl
Deep Vent Polymerase	1 µl
p21mut rev	2 µl
NheI for	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	64 µl

Programm für PCR 1 und PCR 2:

95°C	5 min	
95°C	1 min	} 29 x
53°C	30 sek	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
4°C	∞	

Für die PCR 3 wurde folgender Ansatz pipettiert und folgendes Programm verwendet:

Fragment PCR 1	5 $\mu$ l				
Fragment PCR 2	5 $\mu$ l	95°C	5 min		
10 x Polymerase Puffer (-MgCl <sub>2</sub> )	10 $\mu$ l	95°C	1 min	}	29 x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	10 $\mu$ l	53°C	30 sek		
2 mM dNTPs	10 $\mu$ l	72°C	2,5 min		
Deep Vent Polymerase	1 $\mu$ l	72°C	10 min		
NheI for	2 $\mu$ l	4°C	$\infty$		
PstI rev	2 $\mu$ l				
ddH <sub>2</sub> O	55 $\mu$ l				

Das so gewonnene dritte DNA-Fragment wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers gereinigt und ÜN bei 37°C mit den Restriktionsenzymen PstI und NheI geschnitten. Auch der Ausgangsvektor p21luc wurde mit diesen Restriktionsenzymen geschnitten. Die ausgeschnittenen Fragmente wurden über Ligation (s. 3.2.2.6) ausgetauscht und der so gewonnene Vektor in E.coli transformiert (s. 3.2.2.1). Die Einführung der Mutation wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

Die Deletion der beiden p53-Bindungsstellen im p21-Promotor erfolgte nach demselben Prinzip wie die Mutation der RBP-J-Bindungsstelle im p21-Promotor. Die Primer für die Deletion wurden so gewählt, dass sie jeweils 9 bp stromaufwärts und 18 bp stromabwärts von der jeweiligen p53-Bindungsstelle banden, nicht aber die zu deletierende Sequenz enthielten. Zur Deletion der ersten p53-Bindungsstelle wurden in der ersten PCR die Primer XhoI for und p53BS1 rev und in der zweiten PCR AvaIII rev und p53BS1 for verwendet. Zur Deletion der zweiten p53-Bindungsstelle kamen in der ersten PCR die Primer NheI for und p53BS2 rev und in der zweiten PCR die Primer PstI rev und p53BS2 for zum Einsatz. In der dritten PCR wurden jeweils die flankierenden Primer benutzt, die die speziellen Restriktionsschnittstellen enthielten. Die so gewonnenen Fragmente wurden für die Deletion der ersten p53-Bindungsstelle mit XhoI und AvaIII und für die Deletion der zweiten p53-Bindungsstelle mit PstI und NheI geschnitten und gegen die entsprechenden Fragmente des Ausgangsvektors p21luc ausgetauscht. Die erfolgreiche Deletion der p53-Bindungsstellen wurde mittels Sequenzierung bestätigt. Die neuen Konstrukte wurden als p21 $\Delta$ p53BS1 für das Plasmid, indem die erste p53-Bindungsstelle deletiert wurde, und als p21 $\Delta$ p53BS2 für das Plasmid, in dem die zweite p53-

Bindungsstelle deletiert wurde, bezeichnet. Diese beiden Vektoren dienten als Ausgangspunkt für die Klonierung des Plasmids p21Δp53BS1+2, in dem beide p53-Bindungsstellen deletiert sind.

#### **3.2.3 RNA-Techniken**

##### **3.2.3.1 Isolation von RNA**

Die Isolation der RNA erfolgte aus  $1 - 5 \times 10^6$  Zellen je Probe mit Hilfe des RNeasy Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers.

##### **3.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von RNA**

Die Bestimmung des RNA-Gehaltes einer Probe erfolgte ähnlich wie für DNA-Proben unter 3.2.2.2 beschrieben. Die Absorption der Probe wurde bei 260 nm bestimmt. Über die  $OD_{260nm}$  kann die Konzentration über folgende Formel berechnet werden:

$$\text{für RNA: } c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = OD_{260nm} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

##### **3.2.3.3 Reverse Transkription**

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Es wurden 1  $\mu\text{g}$  RNA und die Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer für die Reaktion verwendet.

##### **3.2.3.4 Real-time PCR**

Für die Vorbereitung der Proben wurde der Absolute QPCR ROX Mix von Abgene (Hamburg, Deutschland) verwendet. Dabei wurden 0,5  $\mu\text{l}$  der cDNA-Probe mit 4,5  $\mu\text{l}$  des QPCR Mix gemischt und in eine 384-well PCR-Platte pipettiert. Für die Bestimmung der Expression eines bestimmten Gens wurde ein Ansatz, bestehend aus 0,5  $\mu\text{l}$  des entsprechenden Gen-Assays (s. 3.1.6) und 4,5  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, zu den Proben gegeben. Die Proben wurden in Doppelwerten aufgetragen. Die Messung erfolgte mit dem 7900HT Fast Real-Time-PCR System. Die relative Konzentration der Genexpression wurde mit Hilfe einer Standardkurve bestimmt. Die Expression der zu untersuchenden Gene wurde auf eine interne Kontrolle (GAPDH) normalisiert.

### 3.2.3.5 Fällern von RNA

RNA kann am besten in gefällter Form gelagert werden. Dazu werden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und zwei Volumen Ethanol zugegeben. Anschließend kann die RNA bei –80°C gelagert werden.

### 3.2.4 Protein-Analysen

#### 3.2.4.1 Isolation von Proteinen

Zur Isolation von Proteinen wurden die Zellen bei 1.000 rpm für 5 min zentrifugiert und 2 x mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 100 µl Lysepuffer (inkl. Proteaseinhibitor Complete) je  $4 \times 10^6$  Zellen und einer 30 minütigen Inkubation mit mehrmaligem Mischen. Der anschließende Zentrifugationsschritt erfolgte bei 16.400 rpm und 4°C für 15 min. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode unter Verwendung der Roti-Quant-Lösung bestimmt. Die Standardkurve wurde mit bekannten Konzentrationen an BSA erstellt. Zum Schluss wurde dem Überstand das gleiche Volumen an HU-Puffer zugesetzt und die Proteine bei 95°C für 5 min denaturiert.

#### 3.2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte im SDS-Polyacrylamidgel, das aus einem Trenngel und einem Sammelgel besteht, wobei das Sammelgel erst nach Auspolymerisierung des Trenngels gegossen wurde. Die Gele hatten folgende Zusammensetzung:

	Trenngel 8%	Trenngel 12%	Trenngel 15%	Sammelgel 4%
Acrylamid	3,35 ml	4,0 ml	5 ml	650 µl
ddH <sub>2</sub> O	4,0 ml	3,4 ml	2,35 ml	3,1 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	
0,5 M Tris pH 6,8				1,25 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
10% APS	75 µl	75 µl	75 µl	30 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	6 µl

Es wurden 20 µg Protein je Spur aufgetragen. Die Gele liefen für 1 h bei 200V.

#### 3.2.4.3 Western Blot

Der Transfer der Proteine von dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte im Tank-Blot-Verfahren bei 350 mA und 4°C für 1 h. Die Kassette wurde so aufgebaut, dass zwischen der Anode und der Membran sowie zwischen der Kathode und dem Gel je ein Schwamm und zwei Filterpapiere lagen. Mit Hilfe der Ponceau-S-Lösung konnte der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die Membran nachgewiesen werden.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran wurden die Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Dafür wurden freie Bindungsstellen auf der Membran durch Zusatz von Blockierlösung (1 h bei RT) besetzt. Anschließend wurde der Primärantikörper in einer 1:1.000 Verdünnung zugegeben. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 4°C. Nach dreimaligem Spülen der Membran mit Waschpuffer (je 5 min bei RT) wurde der entsprechende Sekundärantikörper, an den eine Peroxidase gekoppelt war, in einer 1:5.000 Verdünnung für 1 h zugegeben. Daran schloss sich erneut ein dreimaliger Waschschrift an. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Zugabe von ECL oder ECL Advance im Geldokumentationsgerät LAS 3000.

#### 3.2.5 Zellbiologische Methoden

##### 3.2.5.1 Kultur von FDCP-mix-Zellen

Die FDCP-mix-Zellen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde die Zellzahl neu eingestellt und frisches Medium zu den Zellen gegeben. Das Medium bestand aus 20% Pferdeserum (HS), 10% IL-3 konditioniertem Medium und IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) mit einer Osmolarität von 310 -320 mosm/kg.

Die Aktivierung des NERT-Proteins erfolgte durch Zugabe von 50 nM bis 1 µM 4-Hydroxy-Tamoxifen (OHT).

##### 3.2.5.2 Differenzierung von FDCP-mix-Zellen

Das Medium, das die erythroide Differenzierung der FDCP-mix-Zellen ermöglichte, bestand aus 20% FCS, 5 U/ml Erythropoietin und 5 U/ml IL-3 und IMDM.

Für die myeloische Differenzierung wurde folgendes Medium verwendet: 20% FCS, 5 U/ml IL-3, 250 U/ml GM-CSF und IMDM.

Bevor die Zellen in das jeweilige Differenzierungsmedium überführt wurden, wurden sie 1x mit IMDM gewaschen.

#### **3.2.5.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden in Aliquots von  $1 - 5 \times 10^6$  Zellen eingefroren. Dazu wurden die Zellen zentrifugiert und in 1 ml Einfriermedium (90% HS oder FCS und 10% DMSO) aufgenommen. Für das langsame Kühlen der Zellen auf  $-80^\circ\text{C}$  wurden die Einfrierboxen von Nalgene verwendet. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff (bei  $-180^\circ\text{C}$ ).

Zum Auftauen der Zellen wurden diese kurz bei  $37^\circ\text{C}$  angetaut und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Für einen langsamen Konzentrationsausgleich wurden 10 ml Medium über einen Zeitraum von 10 min tropfenweise zugegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die Zellen zentrifugiert und in entsprechendem Medium – unter dem Zusatz von 1% Penicillin und Streptomycin – aufgenommen.

#### **3.2.5.4 Ficoll-Gradient**

Betrug die Anzahl der toten FDCP-mix-Zellen - z. B. nach dem Auftauen – mehr als 50%, so wurde ein Ficoll-Gradient durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in 1 ml IMDM-Medium aufgenommen und vorsichtig auf 2 ml Ficoll geschichtet. Die Abtrennung der toten Zellen erfolgte über einen Zentrifugationsschritt (15 min,  $4^\circ\text{C}$ , 800 g, keine Bremse), wobei sich die toten Zellen auf dem Boden des Zentrifugationsröhrchens und die lebenden Zellen sich in der Phase zwischen dem Ficoll und dem Medium befanden. Diese konnten mit Hilfe einer Spritze abgenommen und anschließend mit 10 ml IMDM-Medium gewaschen werden.

#### **3.2.5.5 Kultur von K562-Zellen**

K562-Zellen wurden in Medium, das sich aus 10% FCS, 1% Natriumpyruvat und RPMI-1640 zusammensetzte, gehalten. Sie wurden dreimal pro Woche in einem Verhältnis von 1:4 mit frischem Medium verdünnt.

#### **3.2.5.6 FACS-Analyse**

Mit Hilfe der FACS-Analyse (Fluoreszenz-aktivierte Zell Sortierung) können die Größe und die Granularität von Zellen sowie die Expression von Oberflächenmarkern anhand der Bindung von Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern bestimmt werden. Dazu wurden  $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen in 50  $\mu\text{l}$  PBS inkl. 5% FCS und 0,5  $\mu\text{l}$  FC Block aufgenommen und 5 min stehen gelassen. Der Antikörper, der gegen ein spezielles Oberflächenantigen gerichtet war und an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, wurde in einer 1:100

Verdünnung zugegeben und im Dunkeln für 60 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 500 µl PBS inkl. 2% FCS resuspendiert. Zum Ausschluss von toten Zellen wurde zu jedem Ansatz 20 µl Via-Probe zugegeben. Die FACS-Analyse erfolgte am FACSCanto, die Auswertung mit Hilfe der Software FACSDiva.

#### **3.2.5.7 Elektroporation**

Für die Elektroporation von FDCP-mix-Zellen wurden  $1 - 5 \times 10^6$  Zellen in 500 µl Elektroporationsmedium (IMDM und 10% IL-3 konditioniertem Medium) aufgenommen und mit den Einstellungen 320 V, 1050 µF und unendlichem Widerstand elektroporiert. Danach wurden die Zellen zuerst für 2 min auf Eis und anschließend für 2 min bei RT inkubiert, um dann für die nächsten Versuche eingesetzt werden zu können.

Die Elektroporation der K562-Zellen erfolgte in 500 µl K562-Medium (s. 3.2.5.5) je  $5 \times 10^6$  Zellen mit den Einstellungen 240 V, 1050 µF und unendlichem Widerstand.

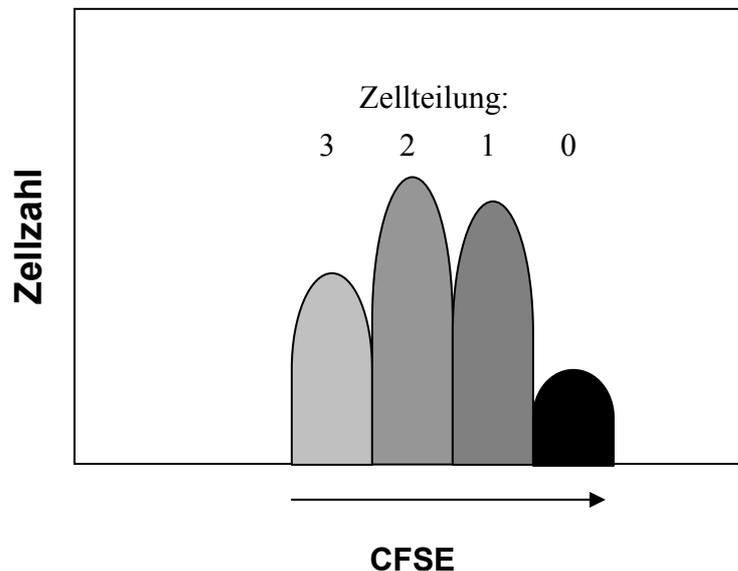
#### **3.2.5.8 Luciferase-Assay**

Für den Luciferase-Assay wurden  $3 - 5 \times 10^6$  FDCP-mix-Zellen mit 18 µg des Firefly-Luciferaseplasmides und 3 µg des Renilla-Luciferaseplasmides elektroporiert. Für die Elektroporation von K562-Zellen wurden 5-10 µg des Luciferaseplasmides und 1 µg des Renilla-Luciferaseplasmides verwendet. Zu den FDCP-mix-Zellen wurden verschiedene Konzentrationen an OHT gegeben. Nach 16 h (FDCP-mix-Zellen) bzw. 36 h (K562-Zellen) wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen, der Überstand vollständig abgesaugt und das Zellpellet in 25 µl Lysepuffer aufgenommen. Zur besseren Lyse wurden die Zellen zweimal bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut. Die Zellen wurden für 15 min bei 16.400 rpm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand vollständig für den Luciferase-Assay eingesetzt. Die Luciferase-Aktivität wurde mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems von Promega (Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

#### **3.2.5.9 Proliferationsassay**

Die Proliferation wurde mit Hilfe des CFSE-Assays bestimmt. CFSE ist die Abkürzung für Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidyl Ester (auch: CFDA-SE). Es handelt sich dabei um einen Fluoreszenzfarbstoff, der zellpermeabel ist, im Zellplasma durch Esterasen gespalten werden kann und dann an Proteine bindet. Bei jeder Zellteilung wird die Fluoreszenz an beide Tochterzellen in gleichen Anteilen weitergegeben, wodurch die

Fluoreszenzintensität je Zelle abnimmt (s. Abb. 8). Dies kann man mit Hilfe einer FACS-Analyse auswerten.



**Abb. 8 CFSE-Assay**

Schematische Darstellung einer FACS-Analyse des CFSE-Assays. Die CFSE-Menge je Zelle nimmt mit jeder Zellteilung ab und lässt sich an Hand der Fluoreszenzintensität nachweisen.

Für den CFSE-Assay wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 1 ml PBS/0,1% BSA aufgenommen. In einem zweiten Röhrchen wurden 2  $\mu$ l 5 mM CFSE mit 1 ml PBS/0,1% BSA gemischt und anschließend die Zellen mit dem CFSE vereint und für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml komplettem Medium gestoppt und der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und 2 x mit kaltem komplettem Medium gewaschen. Danach wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1 - 2 \times 10^5$  Zellen/ml aufgenommen. Der Proliferationsverlauf wurde nach drei Tagen mit Hilfe der FACS-Analyse bestimmt.

### 3.2.5.10 Mycoplasmentest

Die verwendeten Zelllinien wurden alle drei Monate auf das Vorhandensein von Mycoplasmen getestet. Hierfür wurde das Mycoplasma PCR Elisa Kit von Roche (Mannheim, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Keine der eingesetzten Zellen enthielt Mycoplasmen.

### 3.2.6 Statistische Methoden

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der erhaltenen Ergebnisse wurde der Student's t-Tests für gepaarte Daten angewandt.

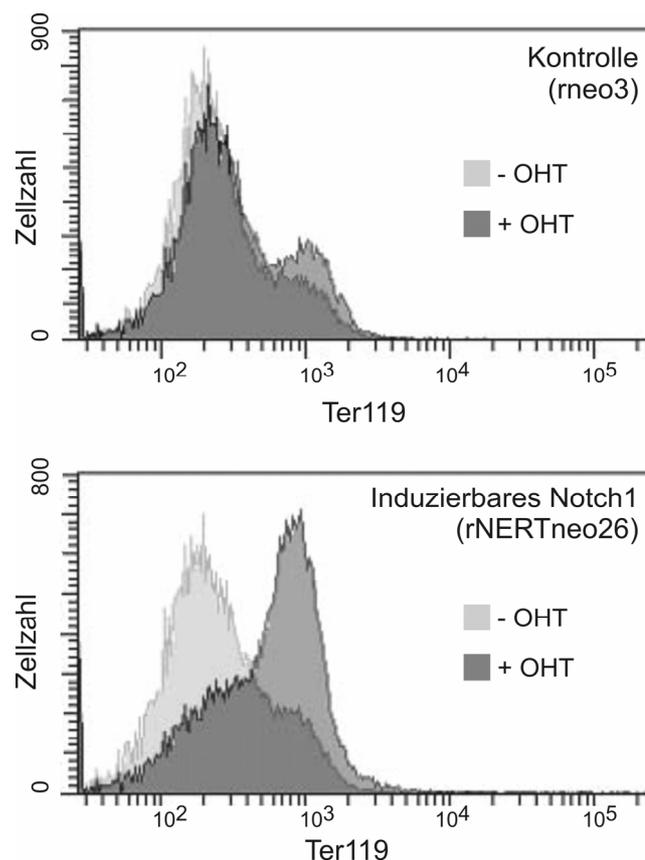
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Notch und Erythropoese

#### 4.1.1 Notch1 beschleunigt die erythroide Differenzierung

Im ersten Teilprojekt der Arbeit sollte der Einfluss des Notch1-Rezeptors auf die erythroide Differenzierung von FDCP-mix-Zellen untersucht werden. Dazu wurden die FDCP-mix Zellklone rNERTneo24 und rNERTneo26 verwendet, die das Tamoxifen-abhängige Fusionsprotein NERT stabil exprimieren (Schroeder, 2001). Als Kontrolle diente der Klon neo3, welcher nur den Leervektor mit dem Resistenzgen trägt.

Die Zellen wurden unter erythroiden Differenzierungsbedingungen, d. h. in Anwesenheit von Erythropoietin, unter Verwendung von FCS anstelle von Pferdeserum und 5 U/ml IL-3 (s. 3.2.5.2), gehalten und der Notch1-Signalweg wurde durch die Zugabe von 500 nM OHT aktiviert. Nach acht Tagen wurde eine FACS-Analyse durchgeführt, um die Expression des erythroiden Oberflächenmarkers Ter119 zu bestimmen (s. Abb. 9).



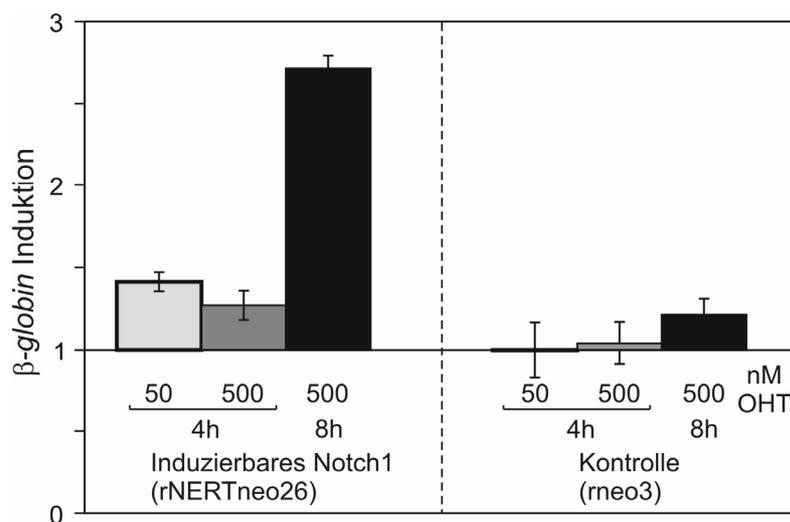
#### Abb. 9 Notch1 beschleunigt die erythroide Differenzierung

Die FDCP-mix-Zellen wurden unter erythroiden Differenzierungsbedingungen in der An- oder Abwesenheit von 500 nM OHT kultiviert. Nach acht Tagen wurde die Expression des erythroiden Oberflächenproteins Ter119 mittels FACS-Analyse ausgewertet. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Wie bereits beschrieben, differenzieren die FDCP-mix-Zellen unter den gewählten Bedingungen in die erythroide Richtung (Heyworth et al., 1995), so dass nach acht Tagen in der Abwesenheit von OHT sowohl in den Kontroll- als auch in den NERT-tragenden Zellen bereits ca. 7 – 8 % Ter119 positive Zellen im FACS nachweisbar waren. Wurde der Notch1-Signalweg durch die Zugabe von OHT aktiviert, erhöhte sich der Anteil der Ter119 positiven Zellen auf ungefähr 14 – 18 %. In den Kontrollzellen war dagegen kein Unterschied nach Zugabe von OHT nachweisbar.

#### 4.1.2 Notch1 reguliert die Expression von $\beta$ -Globin

Um zu untersuchen, ob Notch1 die erythroide Differenzierung beschleunigt, indem es die Expression von  $\beta$ -Globin induziert, wurde dessen Expression vor und nach Aktivierung von Notch1 überprüft. Die FDCP-mix-Zellen wurden unter erythroiden Differenzierungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von zwei verschiedenen OHT-Konzentrationen kultiviert. Nach vier und acht Stunden wurde RNA isoliert.



#### Abb. 10 Notch1 erhöht die Expression von $\beta$ -Globin

Die FDCP-mix-Zellen wurden unter erythroiden Differenzierungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 50 bzw. 500 nM OHT gehalten. Nach vier und acht Stunden wurde RNA isoliert und die Expression von  $\beta$ -Globin mittels Real-time PCR analysiert. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

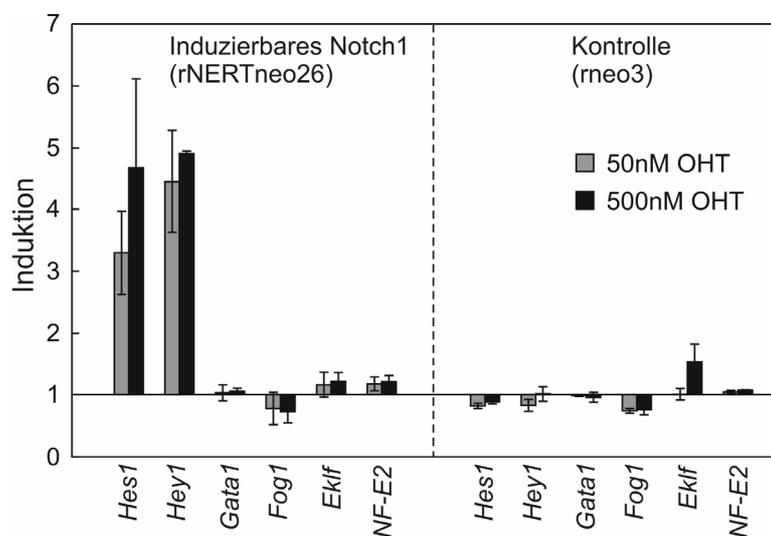
Die Auswertung erfolgte mittels Real-time PCR, mit der die Expression des adulten  $\beta$ -Globins Hbb-b2 nachgewiesen wurde (s. Abb. 10). Es zeigt sich, dass bereits vier Stunden nach Zugabe von 50 nM bzw. 500 nM OHT die  $\beta$ -Globin Expression in den NERT-tragenden Zellen leicht hochreguliert ist. Deutlich sichtbar ist der Effekt acht Stunden nach Notch1-Aktivierung, wenn die Expression von  $\beta$ -Globin im Vergleich zu den nicht mit

OHT behandelten Zellen ca. 2,7-fach erhöht war ( $p < 0,02$ ). In den Kontrollzellen ist dagegen kein Effekt nach OHT-Zugabe nachweisbar.

#### 4.1.3 Notch1 hat keinen Einfluss auf die Expression von Gata1, Fog1, Eklf und Nfe2

Als nächstes sollte überprüft werden, auf welche Weise Notch1 das  $\beta$ -Globin Gen reguliert. Eine Möglichkeit ist, dass Notch die Expression der erythroiden Transkriptionsfaktoren Gata1, Fog1, Eklf oder Nfe2 erhöht, da diese als direkte Transkriptionsfaktoren für das  $\beta$ -Globin Gen wirken (Pevny et al., 1991; Talbot and Grosveld, 1991; Nuez et al., 1995; Perkins et al., 1995; Crispino et al., 1999).

Dazu wurde vier Stunden nach Zugabe von 50 bzw. 500 nM OHT RNA isoliert und die Expression der betreffenden Transkriptionsfaktoren mittels Real-time PCR analysiert. Dabei wurde deutlich, dass die Aktivierung von Notch1 keinen Einfluss auf die RNA-Expression von Gata1, Fog1, EKLf und NF-E2 hat. Dagegen wurden die bekannten Notch1-Zielgene Hes1 und Hey1 (Jarriault et al., 1995; Maier and Gessler, 2000) positiv reguliert ( $p < 0,01$ , s. Abb 11).

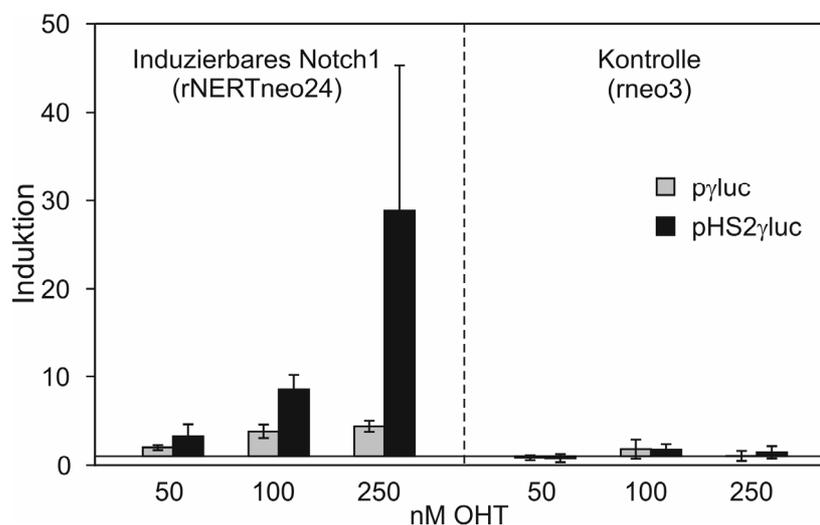


**Abb. 11 Notch1 hat keinen Einfluss auf die Expression von Gata1, Fog1, Eklf und Nfe2**

Die FDCP-mix-Zellen wurden unter erythroiden Differenzierungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 50 bzw. 500 nM OHT kultiviert. Die RNA wurde nach vier Stunden isoliert und die Expression von Gata1, Fog1, Eklf, Nfe2 und den bekannten Notch1-Zielgenen Hes1 und Hey1 mittels Real-time PCR analysiert. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.1.4 Notch1 reguliert die hypersensitive Stelle 2 des $\beta$ -Globin Locus

Es ist beschrieben, dass die hypersensitive Stelle 2 (HS2) der Locus-Kontroll-Region (LCR) des  $\beta$ -Globin Gens eine Bindungsstelle für das Notch-Effektormolekül RBP-J enthält (Lam and Bresnick, 1996; Lam and Bresnick, 1998). Daher besteht die Möglichkeit, dass Notch1 direkt über RBP-J die Expression von  $\beta$ -Globin reguliert. Dies sollte mit Hilfe von Luciferase-Assays überprüft werden. Dazu wurden die FDCP-mix-Zellen mit einem Luciferase-Konstrukt, das die HS2 mit der funktionellen RBP-J-Bindungsstelle enthält (pHS2 $\gamma$ luc), und einem Kontrollvektor, der nur einen basalen Promotor enthält (p $\gamma$ luc) (Lam and Bresnick, 1996), transfiziert und mit steigenden Konzentrationen an OHT aktiviert (s. Abb 12).

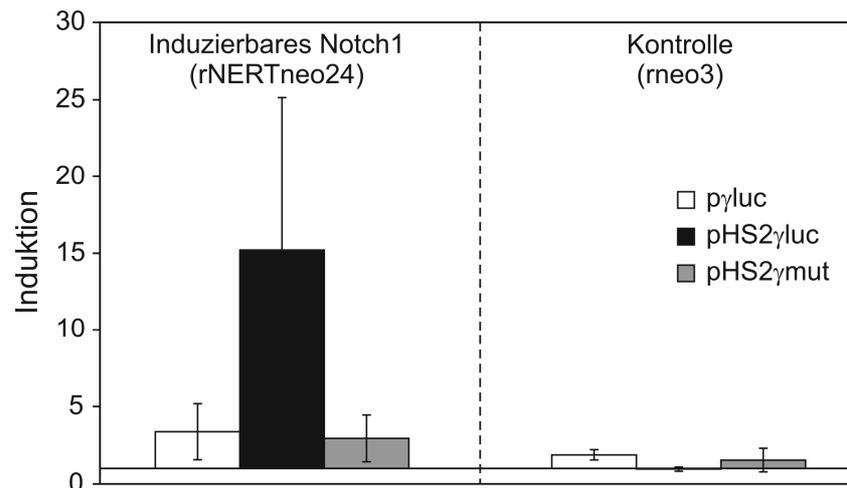


#### Abb. 12 Notch1 reguliert die HS2 des $\beta$ -Globin Lokus

Die FDCP-mix-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an OHT gehalten. Die Zellen wurden transient mit dem Plasmid pHS2 $\gamma$ luc und dem Kontrollplasmid p $\gamma$ luc transfiziert und nach 16 Stunden lysiert. Die Luciferaseaktivität wurde bestimmt und auf die Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert. Die Werte bei 100 und 250 nM OHT sind in den rNERTneo24 Zellen für pHS2 $\gamma$ luc signifikant reguliert ( $p < 0,01$ ). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung eines Experimentes. Der Versuch wurde einmal wiederholt. Dabei wurden inhaltlich vergleichbare Ergebnisse erhalten.

Mit diesem Experiment ließ sich nachweisen, dass in den rNERTneo Zellen die HS2 durch Zugabe von Tamoxifen konzentrationsabhängig aktiviert werden kann, während in den Kontrollzellen rneo3 keine Regulation durch Notch1 nachweisbar war. Der Kontrollvektor p $\gamma$ luc wurde nach Zugabe von OHT nicht reguliert.



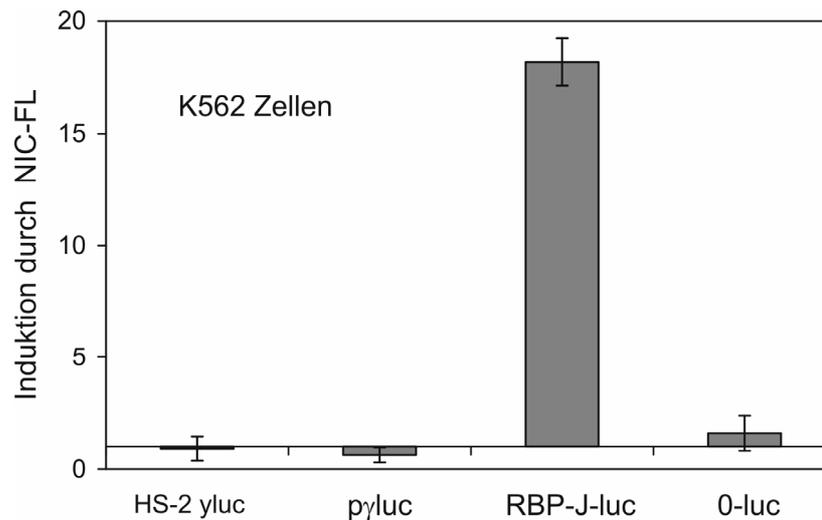


#### Abb. 14 Notch1 aktiviert HS2 $\gamma$ mut nicht

Die FDCP-mix-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 250 nM OHT kultiviert. Die Zellen wurden transient mit den Plasmiden p $\gamma$ luc, pHS2 $\gamma$ luc und pHS2 $\gamma$ mut transfiziert und nach 16 Stunden lysiert. Die Luciferase-Aktivität wurde bestimmt und auf die Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert. Nur der Wert in den rNERTneo24 Zellen für pHS2 $\gamma$ luc ist signifikant reguliert ( $p < 0,01$ ). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.1.6 Notch1 aktiviert die regulatorische Region HS2 des $\beta$ -Globin-Locus nicht in K562-Zellen

Anschließend sollte überprüft werden, ob Notch1 auch in der Leukämie-Zelllinie K562 die Expression des  $\beta$ -Globin-Gens reguliert. Dazu wurden die K562-Zellen mit dem Plasmid pHS2 $\gamma$ luc und dem Kontrollvektor p $\gamma$ luc transfiziert. Die Aktivierung des Notch1-Signalweges erfolgte durch die gleichzeitige Transfektion eines Plasmides, das die konstitutiv aktive intrazelluläre Domäne des Notch1-Rezeptors (NIC-FL) enthält. Der dazugehörige Leervektor ist das Plasmid 0-luc.



#### Abb. 15 Notch1 aktiviert pHS2 $\gamma$ luc nicht in den Zellen K562

Die Zellen K562 wurden transient mit den Plasmiden p $\gamma$ luc und pHS2 $\gamma$ luc transfiziert. Als Kontrolle für den funktionellen Notch/RBP-J-Signalweg wurden die Plasmide RBP-J-luc und 0-luc benutzt. Die Aktivierung des Notch1-Signalweges erfolgte durch gleichzeitige Transfektion des Vektors NIC-FL, der die konstitutiv aktive intrazelluläre Domäne des Notch1-Rezeptors enthält. Die Zellen wurden 40 h nach der Transfektion geerntet. Die Luciferaseaktivität wurde bestimmt und auf die Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert. Nur der Vektor RBP-J-luc wurde signifikant aktiviert ( $p < 0,05$ ). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung, die aus drei Einzelwerten gewonnen wurden. Der Versuch wurde einmal wiederholt. Dabei wurden inhaltlich vergleichbare Ergebnisse erhalten.

Wie in Abb. 15 zu sehen, hatte Notch1 in den K562-Zellen keinen Einfluss auf die  $\beta$ -Globin Expression. Weder das Kontrollplasmid p $\gamma$ luc noch das Plasmid pHS2 $\gamma$ luc, das die HS2 enthält, wurden durch Ko-Transfektion des Plasmides NIC-FL aktiviert. Der Notch/RBP-J-Signalweg ist in den K562-Zellen allerdings aktiv. Ein Luciferase-Plasmid, das 12 RBP-J-Bindungsstellen enthält (RBP-J-luc), wurde im Gegensatz zum Leervektor (0-luc) durch NIC-FL aktiviert.

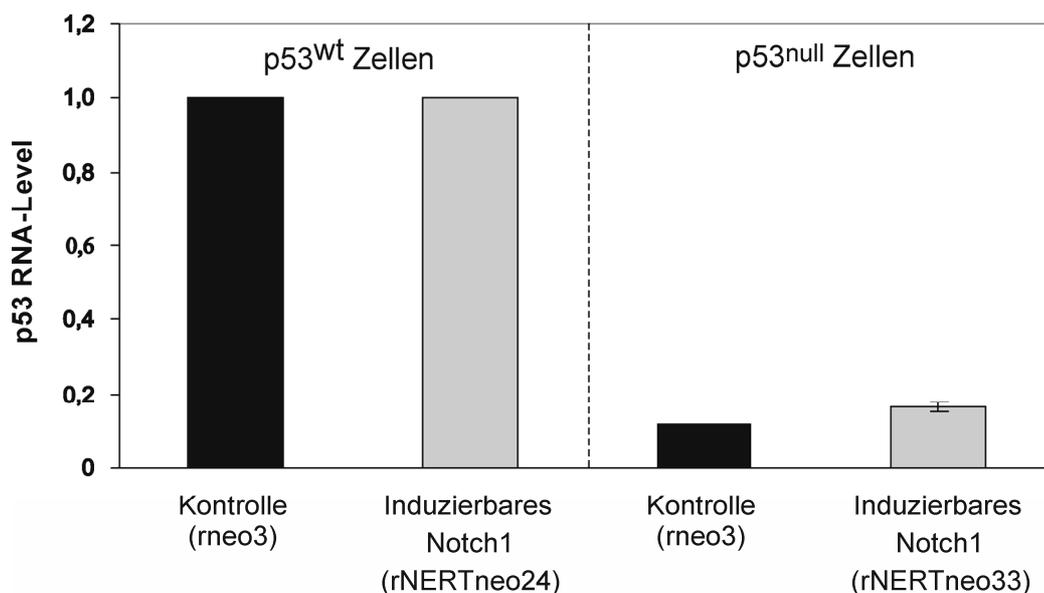
## 4.2 Notch und p53

In einem weiteren Teilprojekt der Arbeit sollte die Interaktion von Notch1 und p53 untersucht werden. Dazu standen neben den Wildtyp FDCP-mix-Zellen (p53<sup>wt</sup>) auch p53 defiziente FDCP-mix-Zellen (p53<sup>null</sup>) zur Verfügung (Francis et al., 2000; Pierce et al., 2000), die das NERT-Protein bereits stabil exprimieren (rNERTneo24, rNERTneo26, p53<sup>null</sup> rNERTneo11, p53<sup>null</sup> rNERTneo24, p53<sup>null</sup> rNERTneo31 und p53<sup>null</sup> rNERTneo33)

und als Kontrolle Zellen, die nur den leeren rneo-Vektor (rneo3 und p53<sup>null</sup> rneo3) tragen (Schroeder, 2001).

#### 4.2.1 Der p53-Status in p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen

Zu Beginn der Arbeit war wenig über die p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen, die für die Versuche verwendet werden sollten, bekannt. Besonders der p53-Status war ungeklärt, da nicht bekannt ist, aus welchen p53-defizienten Mäusen, die p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen gewonnen wurden. In Vorversuchen ließ sich auch in den p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen im Western Blot eine Expression des p53-Proteins nachweisen (Schroeder, 2001). Um dies genauer zu überprüfen, sollte die RNA-Konzentration von p53 bestimmt werden. Dazu wurde RNA sowohl aus den p53<sup>wt</sup> FDCP-mix Zellklonen rneoR3 und rNERTneo24 als auch aus den p53<sup>null</sup> Zellklonen p53<sup>null</sup> rneo3 und p53<sup>null</sup> rNERTneo33 isoliert und mittels Real-time PCR überprüft.



#### Abb. 16 Der p53-Status in p53<sup>null</sup> Zellen

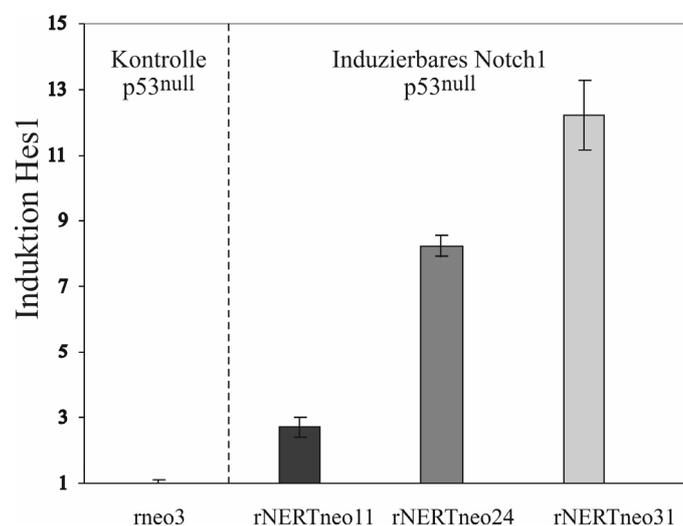
Die FDCP-mix-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen gehalten. Aus je zwei p53<sup>wt</sup> und p53<sup>null</sup> Klonen wurde RNA isoliert und mit Hilfe der Real-time PCR die Expression von p53 analysiert. Abgebildet ist das Verhältnis der Menge an p53-RNA in p53<sup>null</sup> Zellen zu der Menge in den p53<sup>wt</sup> Zellen, welche auf 1 normalisiert wurde. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von Ergebnissen, die aus drei unabhängigen Experimenten gewonnen wurden.

Abb.16 zeigt die RNA-Menge an p53 in den p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen im Verhältnis zur Menge in den p53<sup>wt</sup> FDCP-mix-Zellen. Es ist zu sehen, dass die Menge an p53 RNA in den

$p53^{null}$  Zellen um ca. den Faktor 6 geringer ist als in den  $p53^{wt}$  Zellen, aber auch, dass noch  $p53$ -RNA vorhanden ist. Für die weiteren Arbeiten musste sichergestellt werden, dass das in den  $p53^{null}$  Zellen exprimierte  $p53$  ein nicht-funktionelles Protein ist. Dazu wurde während einer parallel zu dieser Arbeit geschriebenen Diplomarbeit ein Funktionalitätsassay entwickelt. Dieser beruht auf der Funktion des  $p53$  als Transkriptionsfaktor. Werden Zellen  $\gamma$ -Strahlung ausgesetzt, wird  $p53$  aktiviert und agiert als Transkriptionsfaktor für den Zellzyklusinhibitor  $p21^{Waf/Cip}$  (Dulic et al., 1994). Mit Hilfe dieses Tests konnte nachgewiesen werden, dass die  $p53^{null}$  FDCP-mix-Zellen kein funktionelles  $p53$  exprimieren (Heering, 2005).

#### 4.2.2 Der Notch1-Signalweg ist in den $p53^{null}$ rNERTneo Klonen aktiv

In einem weiteren Experiment sollte nachgewiesen werden, dass der Notch1-Signalweg in den  $p53^{null}$  rNERTneo Zellen durch Zugabe von OHT induzierbar ist. Dazu wurden drei verschiedene  $p53^{null}$  rNERTneo Klone ( $p53^{null}$  rNERTneo11,  $p53^{null}$  rNERTneo24 und  $p53^{null}$  rNERTneo31) und die Kontrolle  $p53^{null}$  rneo3 mit 500 nM OHT stimuliert und nach acht Stunden RNA isoliert. Es folgte eine Real-time PCR, in der die Expression des bekannten Notch1-Zielgens Hes1 (Jarriault et al., 1995) analysiert wurde.



**Abb. 17 Notch1 aktiviert die Expression von Hes1 in  $p53^{null}$  rNERTneo Zellen**

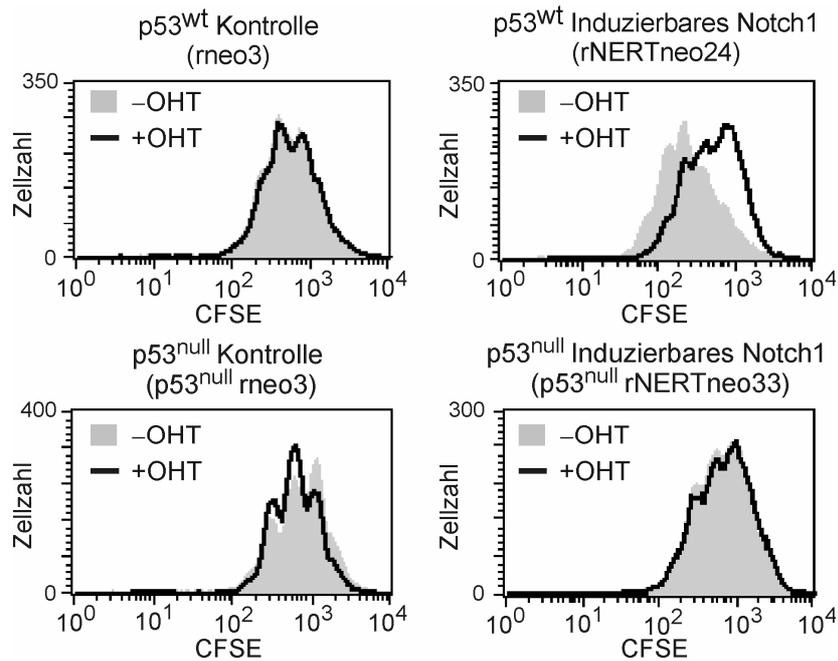
Die FDCP-mix-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 500 nM gehalten. Die RNA wurde nach acht Stunden isoliert und die Expression von Hes1 mit Hilfe der Real-time PCR analysiert. Die Induktionen, die für die Klone rNERTneo erhalten worden sind, sind signifikant ( $p < 0,01$ ). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Das Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt. Es zeigte sich, dass in den Kontrollzellen p53<sup>null</sup> rneo3 die Expression von Hes1 nach Zugabe von OHT nicht induziert wurde. Dagegen war in den drei verschiedenen p53<sup>null</sup> rNERTneo Klonen, in denen Notch1 durch Tamoxifen aktivierbar ist, eine Induktion der Hes1 Expression nachweisbar. Diese fällt je nach Klon unterschiedlich stark aus. In dem Klon p53<sup>null</sup> rNERTneo11 ist die Hes1 Expression nach OHT-Zugabe ca. 3-fach hochreguliert, in dem Klon p53<sup>null</sup> rNERTneo24 ca. 8-fach und am stärksten ist die Induktion des Gens im Klon p53<sup>null</sup> rNERTneo31 (ca. 12-fach) reguliert. Damit konnte bewiesen werden, dass das durch OHT induzierbare NERT-System in den p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen funktioniert.

#### 4.2.3 Einfluss von Notch1 auf die Proliferation von FDCP-mix-Zellen

Bereits in vorhergehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Notch1 die Proliferation von FDCP-mix-Zellen blockiert und dass dieser Effekt in p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen nicht mehr nachweisbar ist (Schroeder, 2001; Schroeder et al., 2003; Heering, 2005). Zur Untersuchung der Proliferation wurde in den früheren Versuchen der <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau verwendet. Nachteil dieser Methode ist, dass damit nur der Einbau von radioaktiv-markiertem Thymidin in die Gesamtpopulation der Zellen nachweisbar ist. Man kann aber nicht sagen, ob sich ein bestimmter Teil der Population besonders häufig und ein anderer gar nicht geteilt hat oder ob sich alle Zellen der Population gleich oft geteilt haben. Daher sollte der Versuch zum Proliferationsverhalten der FDCP-mix-Zellen mit einer sensitiveren Methode wiederholt werden. Dazu wurde der CFSE-Assay gewählt. CFSE (Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidyl Ester) ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der durch die Zellmembran diffundieren kann und im Zytoplasma durch intrazelluläre Esterasen gespalten wird. Dort kann es mit den Amino-Gruppen von Proteinen reagieren und wird stabilisiert. Teilt sich eine Zelle, gibt sie die Hälfte des CFSE an die Tochterzelle weiter. Damit nimmt auch die Fluoreszenzintensität je Zelle mit jeder Teilung genau um die Hälfte ab. Dies kann man mit einer FACS-Analyse nachweisen (s. Abb. 8).

Um den Einfluss von Notch1 auf die Proliferation von p53<sup>wt</sup> FDCP-mix-Zellen und p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen zu untersuchen, wurde mit den p53<sup>wt</sup> Klonen rNERTneo24, der Kontrolle rneo3, den p53<sup>null</sup> Zellklonen p53<sup>null</sup> rNERTneo31 und der p53<sup>null</sup> Kontrolle p53<sup>null</sup> rneo3, wie unter 3.2.5.9 beschrieben, ein Proliferationsassay angesetzt. Notch1 wurde durch die Zugabe von 500 nM OHT aktiviert und die Proliferation nach drei Tagen analysiert.



#### Abb. 18 Einfluss von Notch1 auf die Proliferation

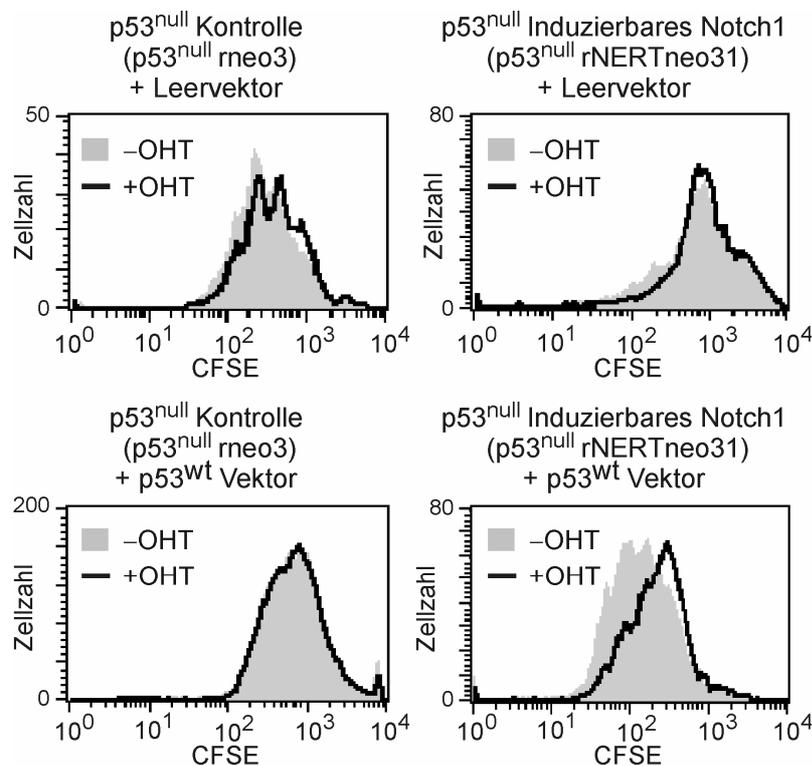
Die FDCP-mix-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 500 nM OHT gehalten. Die Proliferation wurde nach drei Tagen mit Hilfe der FACS-Analyse überprüft. Das Experiment wurde zweimal wiederholt. Dabei wurden inhaltlich vergleichbare Ergebnisse erhalten.

Die Zugabe von OHT hatte weder in den  $p53^{wt}$  Kontrollzellen (rneo3) noch in den  $p53^{null}$  Kontrollzellen ( $p53^{null}$  rneo3) Auswirkungen auf die Proliferation (s. Abb. 18). Wurde Notch1 dagegen in den  $p53^{wt}$  Zellen rNERTneo24 durch Zugabe von OHT aktiviert, verlangsamte sich die Proliferation. Dies ist daran zu erkennen, dass im Vergleich zu unbehandelten Zellen mehr Zellen mit einer größeren Fluoreszenzintensität (dargestellt auf der x-Achse als CFSE) nachweisbar waren. Dabei handelt es sich um Zellen, die sich nicht oder zumindest seltener geteilt haben. Im Gegensatz dazu beeinflusste die Aktivierung von Notch1 in den  $p53^{null}$  rNERTneo31 Zellen die Proliferation nicht. Das lässt vermuten, dass der Proliferationsstopp, den die Aktivierung von Notch1 in FDCP-mix-Zellen bewirkt, über p53 vermittelt wird.

#### 4.2.4 Rekonstitution des $p53^{wt}$ Phänotyps in $p53^{null}$ FDCP-mix-Zellen

Die  $p53^{null}$  FDCP-mix-Zellen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie kein funktionelles p53 besitzen (Heering, 2005). Es war aber nicht bekannt, ob durch das Fehlen dieses wichtigen Zellzyklusregulators weitere Mutationen in den Zellen aufgetreten sind. Um nachzuweisen, dass der beobachtete Zellzyklusstopp, der nach Aktivierung von Notch1 in  $p53^{wt}$  FDCP-

mix-Zellen, nicht aber in  $p53^{\text{null}}$  FDCP-mix-Zellen auftritt, tatsächlich an das Vorhandensein des Proteins  $p53$  geknüpft ist, sollte der  $p53^{\text{wt}}$  Status in den  $p53^{\text{null}}$  FDCP-mix-Zellen wieder hergestellt werden. Dazu wurde der Vektor pCAG-3SIP-wtp53 (Heering, 2005), der das Gen für  $p53^{\text{wt}}$  und als Selektionsmarker ein Gen für die Puromycinresistenz trägt, in die  $p53^{\text{null}}$  FDCP-mix-Zellen transient transfiziert. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pCAG-3SIP, der nur den Selektionsmarker enthält. Nach Transfektion der Plasmide wurden die  $p53^{\text{null}}$  Zellen im CFSE-Assay eingesetzt. Eine Anreicherung erfolgreich transfizierter Zellen erfolgte durch Zugabe von 2  $\mu\text{g/ml}$  Puromycin, einer Konzentration, bei der nicht-transfizierte Zellen sterben. Notch1 wurde durch die Zugabe von 500 nM OHT aktiviert. Die Analyse des Proliferationsverhaltens erfolgte nach drei Tagen durch FACS-Analyse.



### Abb. 19 Rekonstitution des $p53^{\text{wt}}$ Phänotyps in $p53^{\text{null}}$ Zellen

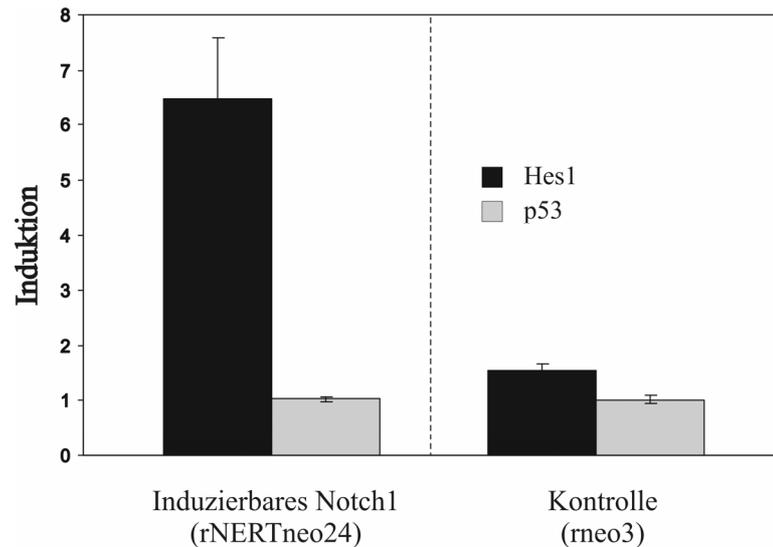
Die FDCP-mix-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 500 nM OHT kultiviert. Die  $p53^{\text{null}}$  Zellen wurden mit dem Vektor pCAG-3SIP- $p53$ , der das Gen für  $p53^{\text{wt}}$  enthält, und dem Leervektor pCAG-3SIP transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden durch Zugabe von 2  $\mu\text{g/ml}$  Puromycin angereichert. Das Proliferationsverhalten wurde nach drei Tagen mit Hilfe der FACS-Analyse überprüft. Das Experiment wurde zweimal wiederholt. Dabei wurden inhaltlich vergleichbare Ergebnisse erhalten.

Die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt. Wie erwartet, war nach Zugabe von OHT zu den mit dem Leervektor pCAG-3SIP transfizierten Zellen weder in den Kontrollzellen p53<sup>null</sup> rneo3 noch in den Notch1-induzierbaren Zellen p53<sup>null</sup> rNERTneo31 ein Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen zu erkennen. Wurde hingegen der p53<sup>wt</sup> Status in den p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen durch Transfektion des Vektors pCAG-3SIP-p53, der das Gen für p53<sup>wt</sup> enthält, wiederhergestellt, blockierte die Aktivierung von Notch1 durch Zugabe von 500 nM OHT die Proliferation der p53<sup>null</sup> rNERTneo31 Zellen. In den rekonstituierten Kontrollzellen p53<sup>null</sup> rneo3 veränderte die Zugabe von OHT das Proliferationsverhalten nicht.

Somit konnte gezeigt werden, dass der durch Aktivierung von Notch1 hervorgerufene Zellzyklusblock, den man in p53<sup>wt</sup>, nicht aber in p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen sieht (s. Abb. 18), nach Transfektion von p53<sup>wt</sup> in p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen erneut nachweisbar und somit p53-abhängig ist (s. Abb. 19).

#### **4.2.5 Notch1 reguliert p53 nicht auf RNA-Ebene**

Da Notch1 die Proliferation von p53<sup>wt</sup> FDCP-mix-Zellen und mit p53<sup>wt</sup> transfizierten p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen, nicht aber in p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen blockieren kann und dieser Effekt somit p53-abhängig ist, sollte überprüft werden, ob Notch1 die mRNA-Menge von p53 reguliert. Dazu wurde acht Stunden nach Zugabe von 500 nM OHT zu den p53<sup>wt</sup> Zellen rNERTneo24 und der Kontrolle rneo3 RNA isoliert. Die RNA-Menge von p53 vor und nach Notch1-Aktivierung wurde und mittels Real-time PCR überprüft.



#### Abb. 20 Notch1 reguliert p53 nicht auf RNA-Ebene

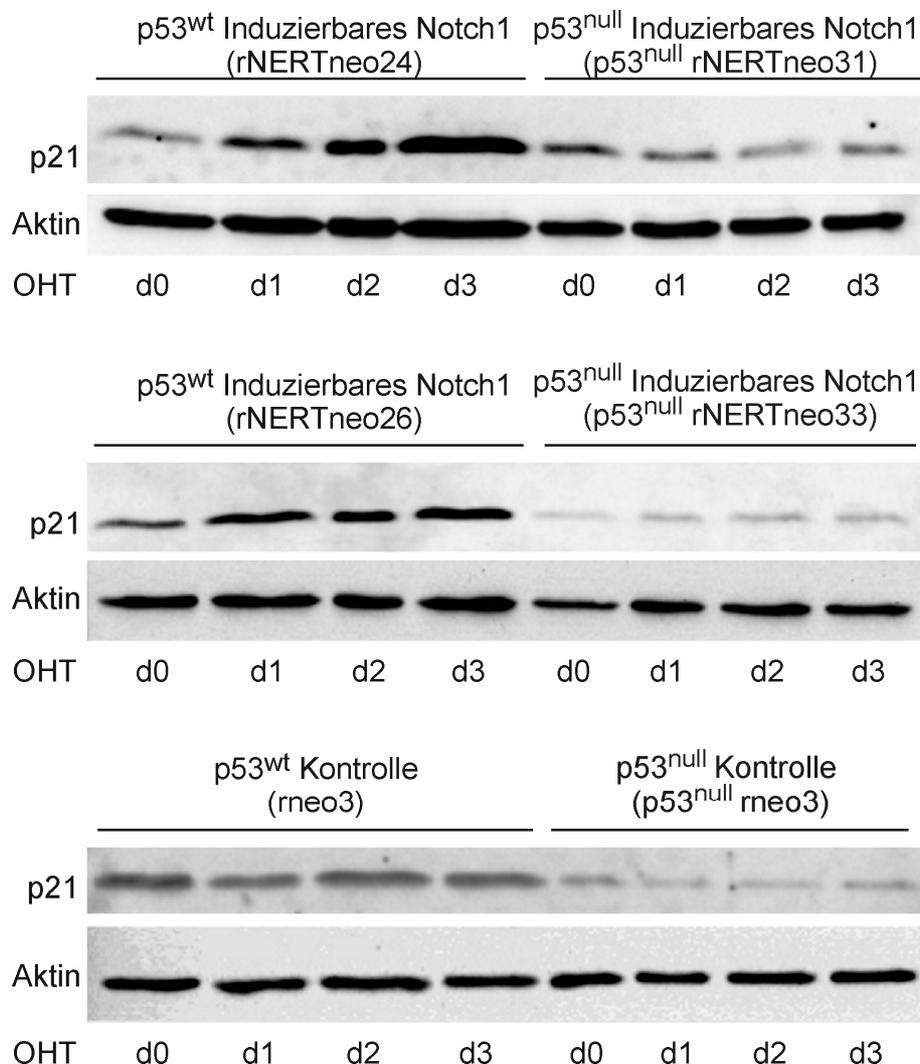
Die FDCP-mix-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 500 nM OHT kultiviert. Nach 24h wurde die RNA isoliert und die RNA-Menge von p53 und dem bekannten Notch1-Zielgen Hes1 mittels Real-time PCR analysiert. Nur Hes1 ist in den Zellen rNERTneo24 signifikant reguliert ( $p < 0,02$ ). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von Ergebnissen aus drei unabhängigen Experimenten.

Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von OHT die RNA-Menge des p53-Gens weder in den Kontrollzellen (rneo3) noch in den Zellen rNERTneo24, die aktivierbares Notch1 tragen, reguliert hat (s. Abb. 20). Zur Kontrolle wurde die Regulation des bekannten Notch1-Zielgens Hes1 untersucht (Jarriault et al., 1995). Die Transkription dieses Gens war nach Aktivierung von Notch1 – im Unterschied zu den Kontrollzellen - ca. 6,5-fach hochreguliert.

#### 4.2.6 Notch1 aktiviert die Expression des Proteins p21<sup>Waf/Cip</sup>

Wie zuvor gezeigt wurde, reguliert Notch1 p53 nicht auf RNA-Ebene. Eine weitere Möglichkeit, durch die Notch1 den Zellzyklusblock vermitteln könnte, ist die p53-abhängige Regulation des Zellzyklusinhibitors p21<sup>Waf/Cip</sup> (Gu et al., 1993; Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993). p21<sup>Waf/Cip</sup> ist ein Zielgen von p53 und kann den Zellzyklus blockieren, in dem es den Cyclin E/CDK2-Komplex inhibiert und damit die Phosphorylierung des Proteins Rb verhindert. Außerdem kann es mit PCNA, einer Untereinheit der DNA-Polymerase  $\delta$ , interagieren und auf diese Weise die PCNA-abhängige DNA-Replikation verhindern (Samuel et al., 2002; Weinberg and Denning, 2002). Daher sollte überprüft werden, ob Notch1 die Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> aktiviert.

Dazu wurden die FDCP-mix-Zellen mit 500 nM OHT stimuliert. Zu vier verschiedenen Zeitpunkten wurden Proteine isoliert. Die Expression des Proteins p21<sup>Waf/Cip</sup> wurde anschließend im Western Blot kontrolliert. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet (s. Abb. 21).



#### Abb. 21 Notch1 aktiviert die Expression von p21

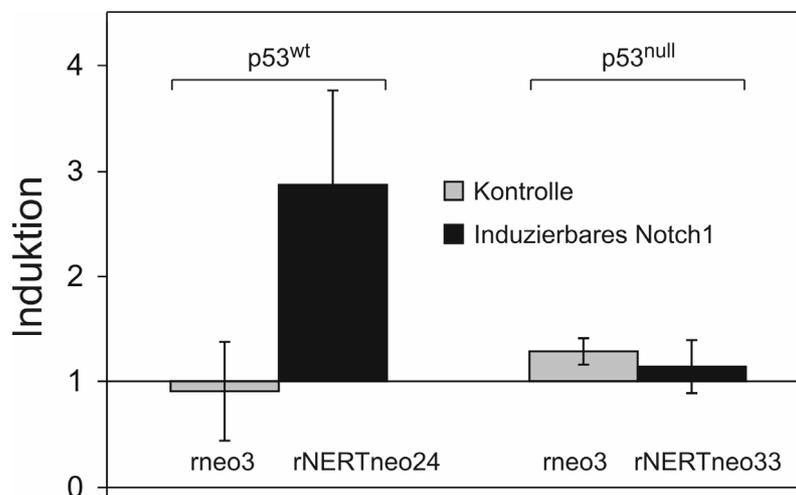
Die FDCP-mix-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 500 nM OHT gehalten. An den angegebenen Tagen wurden die Proteine isoliert. Es wurden je 10 µg Gesamtprotein pro Spur im Gel aufgetragen und die Expression des Proteins p21 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Der Nachweis von Aktin diente zur Ladekontrolle. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Dabei wurden inhaltlich vergleichbare Ergebnisse erhalten.

Zum Nachweis der Expression des Zellzyklusregulators p21<sup>Waf/Cip</sup> wurden von den p53<sup>wt</sup> und den p53<sup>null</sup> Zellen je zwei Zellklone, die das induzierbare Notch1 tragen (rNERTneo24, rNERTneo26, p53<sup>null</sup> rNERTneo31 und p53<sup>null</sup> rNERTneo33), und eine Kontrolle (rneo3

und p53<sup>null</sup> rneo3) verwendet. Wie in Abb. 21 erkennbar ist, war das Protein p21<sup>Waf/Cip</sup> in allen untersuchten p53<sup>null</sup> Zellklonen deutlich schwächer exprimiert als in den p53<sup>wt</sup> Zellen. Wurde Notch1 durch die Zugabe von OHT aktiviert, so war in den Klonen rNERTneo24 und rNERTneo26 bereits nach einem Tag eine erhöhte Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> nachweisbar, die sich bis zum dritten Tag noch verstärkte. Im Vergleich dazu bewirkte die Zugabe von OHT zu den Kontrollzellen rneo3 keine Veränderung in der Proteinmenge von p21<sup>Waf/Cip</sup>. Auch in den p53<sup>null</sup> Zellen p53<sup>null</sup> rNERTneo31 und p53<sup>null</sup> rNERT33 und der dazugehörigen Kontrolle p53<sup>null</sup> rneo3 hatte die Zugabe von OHT keinen Einfluss auf die Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup>. Dies lässt vermuten, dass die Induktion der Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> durch Notch1 p53-abhängig ist.

#### 4.2.7 Notch1 aktiviert den p21-Promotor p53-abhängig

Zur Bestätigung, dass Notch1 die Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> p53-abhängig aktiviert, wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Dazu wurde der Vektor p21<sup>Waf/Cip</sup> luc, der den Promotor des p21<sup>Waf/Cip</sup>-Gens enthält, verwendet (Kim et al., 1999). Nach der Transfektion des Plasmides wurden die FDCP-mix-Zellen mit 250 nM OHT behandelt und nach 16 h geerntet. Danach wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt.



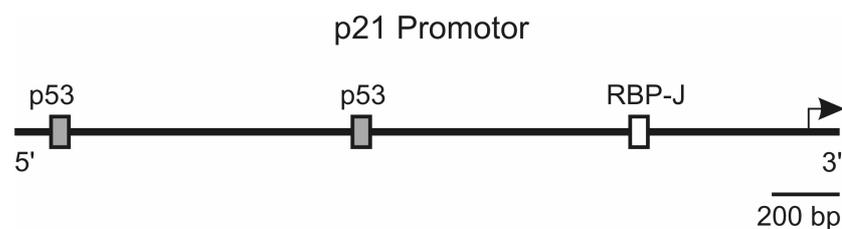
#### Abb. 22 Notch1 reguliert den p21-Promotor p53-abhängig

Die FDCP-mix-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 250 nM OHT kultiviert. Das Plasmid p21<sup>Waf/Cip</sup> luc wurde transient transfiziert. Zellysate wurden nach 16 h geerntet. Die Luciferase-Aktivität wurde bestimmt und auf die Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert. Nur der Wert in den rNERTneo24 Zellen ist signifikant induziert ( $p < 0,02$ ). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Abb. 22 zeigt, dass das Plasmid p21luc in den p53<sup>wt</sup> Zellen rNERTneo24 durch die Aktivierung von Notch1 fast 3-fach induziert wurde. Dagegen führt die Aktivierung von Notch1 in den p53<sup>null</sup> Zellen p53<sup>null</sup> rNERTneo33 zu keiner Induktion des p21-Promotors. Auch in den Kontrollzellen fand keine Regulation des Plasmides p21luc nach Zugabe von OHT statt. Diese Ergebnisse des Luciferase-Assays stützen die Ergebnisse aus dem Western Blot (s. 4.2.6): Notch1 reguliert die Transkription von p21<sup>Waf/Cip</sup> in einer p53-abhängigen Weise.

#### 4.2.8 Die Transaktivierung des p21-Promotors erfolgt nicht über RBP-J

Nun stellte sich die Frage, durch welchen Mechanismus Notch1 die Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> bewirken kann. Die Analyse des ca. 2,4 kB großen p21-Promotors lässt zwei Regulationsmechanismen wahrscheinlich erscheinen. Zum einen enthält der p21-Promotor zwei bekannte Bindungsstellen für p53, so dass eine p53 vermittelte Regulation der p21<sup>Waf/Cip</sup>-Expression durch Notch1 denkbar ist (el-Deiry et al., 1993; el-Deiry et al., 1995). Zum anderen weist er eine Bindungsstelle für RBP-J auf (Rangarajan et al., 2001), so dass Notch1 auch über direkte Interaktion mit RBP-J, das dann als Transkriptionsaktivator für p21<sup>Waf/Cip</sup> wirken kann, p21<sup>Waf/Cip</sup> hochregulieren könnte (s. Abb. 23).

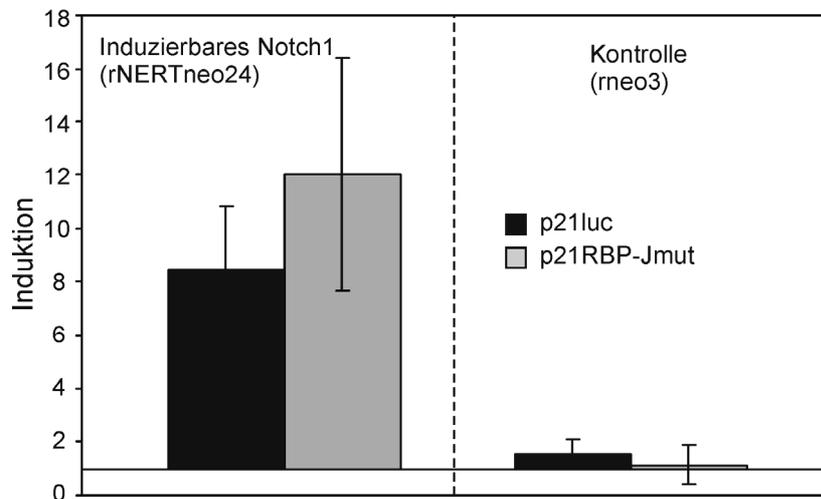


#### Abb. 23 Schematische Darstellung des p21-Promotors

Gezeigt ist die schematische Darstellung des p21-Promotors. Er ist ca. 2,4 kB groß und besitzt zwei bekannte Bindungsstellen für p53 und eine Bindungsstelle für RBP-J. Der Pfeil markiert den Transkriptionsstart.

Als erstes wurde überprüft, ob Notch1 die Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> über RBP-J vermittelt. Dazu wurde die Bindungsstelle für RBP-J (bp 1798-1804, 5'-gtggaa-3') im p21-Promotor durch gezielte Mutagenese (s. 3.2.2.9) an fünf Positionen (bp 1798-1804; 5'-caccgtc-3') so verändert, dass RBP-J nicht mehr an diese Sequenz binden kann (Tun et al., 1994). Dieses Konstrukt wurde als p21RBP-Jmut bezeichnet und vergleichend mit dem

Ausgangskonstrukt p21luc im Luciferase-Assay getestet. Als Zellen wurden die p53<sup>wt</sup> Zellen rNERTneo24 und als Kontrolle meo3 verwendet.



#### Abb. 24 Die Transaktivierung des p21-Promotors erfolgt nicht über RBP-J

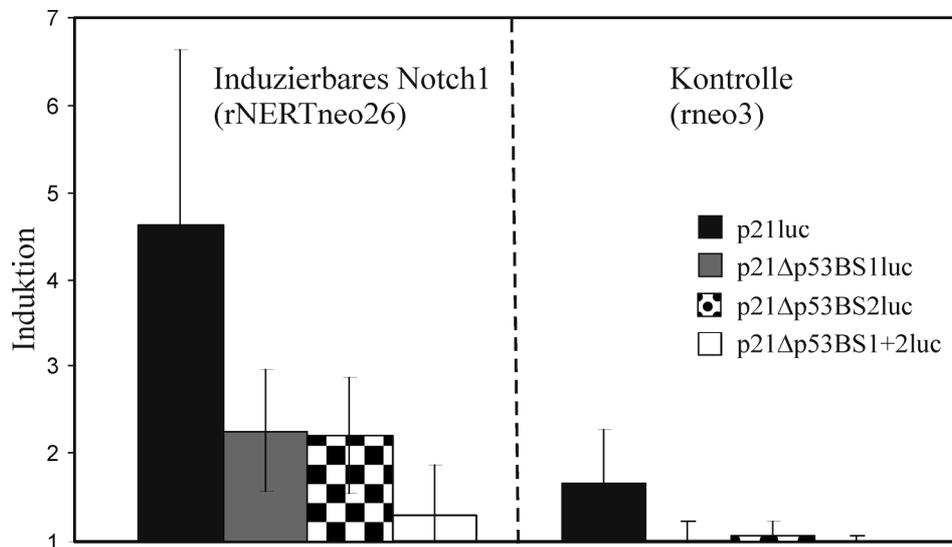
Die FDCP-mix-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 250 nM OHT kultiviert. Die Plasmide p21luc und p21RBP-Jmut wurden transient transfiziert. Zellysate wurden nach 16 h geerntet. Die Luciferase-Aktivität wurde bestimmt und auf die Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert. Nur die Werte in den Zellen rNERTneo24 sind signifikant reguliert ( $p < 0,02$ ). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Es zeigte sich, dass die Aktivierung von Notch1 zu einer vergleichbaren Induktion der Plasmide p21luc und p21RBP-Jmut, bei dem die RBP-J-Bindungsstelle mutiert wurde, führte. In den Kontrollzellen wurden die Konstrukte durch die OHT-Zugabe nicht reguliert (s. Abb. 24). Dies deutet darauf, dass die Notch1-vermittelte Transaktivierung des p21-Promotors nicht über das Notch1-Effektormolekül RBP-J verläuft.

#### 4.2.9 Notch1 aktiviert den p21-Promotor über p53

Als nächste Möglichkeit sollte überprüft werden, ob Notch1 die Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> über die beiden Bindungsstellen für p53 im p21-Promotor reguliert. Dafür wurden drei weitere Konstrukte mit Hilfe der gezielten Mutagenese (s. 3.2.2.9) hergestellt. Ausgangsvektor war jeweils p21luc, der den p21-Promotor enthält. Im ersten Plasmid wurde die erste p53-Bindungsstelle deletiert (p21 $\Delta$ p53BS1luc), im nächsten Plasmid die zweite (p21 $\Delta$ p53BS2luc) und im letzten Plasmid wurden beide p53-Bindungsstellen des p21-Promotor deletiert (p21 $\Delta$ p53BS1+2luc). Diese drei neuen Plasmide wurden

vergleichend mit dem Ausgangsvektor p21-luc im Luciferase-Assay eingesetzt. Die Aktivierung von Notch1 erfolgte durch Zugabe von 250 nM OHT.



#### Abb. 25 Notch1 aktiviert den p21-Promoter über p53

Die FDCP-mix-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 250 nM OHT kultiviert. Die Plasmide p21luc, p21Δp53BS1, p21Δp53BS2 und p21Δp53BS1+2 wurden transient transfiziert. Zelllysate wurden nach 16 h geerntet. Die Luciferase-Aktivität wurde bestimmt und auf die Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert. Nur der Wert für das Plasmid p21luc ist in den Zellen rNERTneo24 signifikant reguliert ( $p < 0,05$ ). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Abb. 25 zeigt, dass die beiden Luciferasekonstrukte, in denen jeweils nur eine der beiden p53-Bindungsstellen deletiert wurde (p21Δp53BS1luc und p21Δp53BS2luc), nur noch ca. halb so viel nach Notch1-Aktivierung induziert wurden wie das Ausgangskonstrukt p21luc, das noch beide p53-Bindungsstellen enthält. Nach Deletion beider p53-Bindungsstellen im p21-Promotor (p21Δp53BS1+2luc) wurde das Luciferasekonstrukt nicht mehr durch Notch1 induziert. In den Kontrollzellen rneo3 wurde keines der vier zu testenden Konstrukte nach OHT-Zugabe induziert. Dieses Experiment lässt darauf schließen, dass die Notch1-vermittelte Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> über p53 verläuft und die Bindung von p53 an die DNA-Erkennungssequenzen im p21-Promotor dafür essentiell sind.

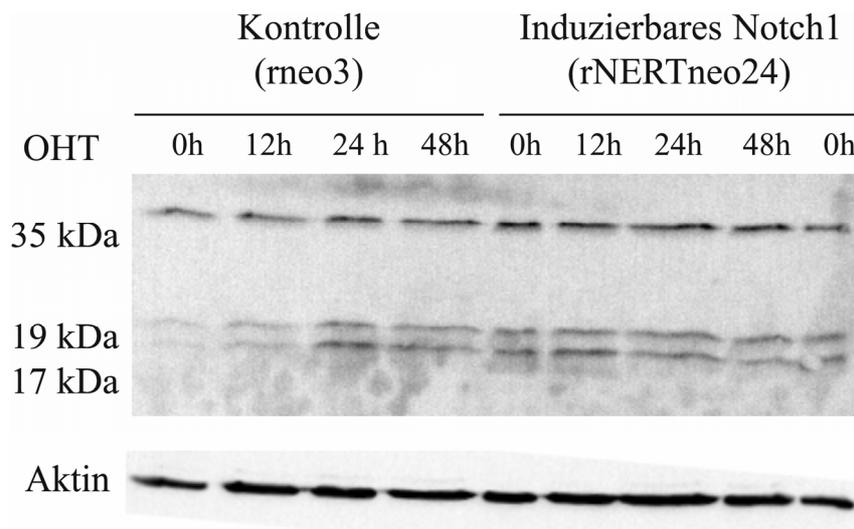
### 4.3 Notch und Caspasen

Im dritten Projekt dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Caspasen Zielgene des Notch1-Signalweges in hämatopoetischen Zellen sind. In einer vorangegangenen Arbeit konnte mit Hilfe eines Atlas cDNA-Filters – einem DNA-Array der Firma Clontech (Mountain View, USA) - nachgewiesen werden, dass nach Aktivierung von Notch1 die Expression von Caspase-6 erhöht wird (Rieber, 2004). Diesen Einfluss von Notch1 auf die Expression von Caspase-6 und anderen Caspasen galt es mit Hilfe des Western Blots zu bestätigen und funktionell zu charakterisieren. Interessant ist dieses Projekt besonders vor dem Hintergrund, dass Caspase-3 in Keratinozyten als Notch1-Zielgen beschrieben worden ist (Okuyama et al., 2004).

Für diese Versuche wurde der FDCP-mix Zellklon rNERTneo24, der das konditionell aktivierbare Notch1 trägt, und die Kontrollzellen meo3, die den Leervektor mit dem Resistenzgen tragen, verwendet. Die Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen gehalten und Notch1 wurde durch Zugabe von 500 nM OHT aktiviert. Für die Western Blots wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, je 10 µg Protein auf das Gel aufgetragen und die Expression der Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7 nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente jeweils die Menge des Zytoskelettproteins Aktin.

#### 4.3.1 Notch1 hat keinen Einfluss auf die Expression von Caspase-3

Für den Nachweis, welchen Einfluss die Aktivierung von Notch1 auf die Expression von Caspase-3 hat, wurden 12, 24 und 48 Stunden nach Zugabe von OHT Proteine geerntet und im Western Blot nachgewiesen. Der verwendete Antikörper erkennt die ungeschnittene, inaktive Vorstufe der Caspase-3, die eine Größe von 35 kDA hat, und die aktiven, geschnittenen Formen, die eine Größe von 17 und 19 kDA aufweisen.



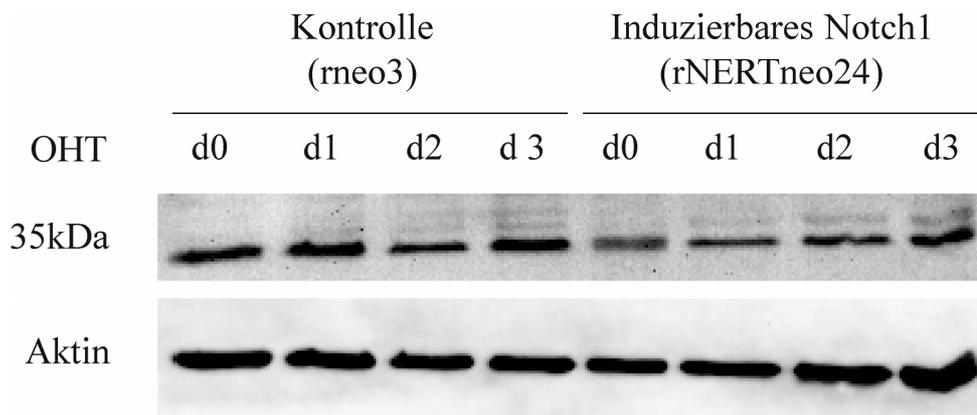
#### **Abb. 26 Notch1 hat keinen Einfluss auf die Expression von Caspase-3**

Die FDCP-mix-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 500 nM OHT gehalten. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proteine isoliert. Es wurden je 10 µg Gesamtprotein pro Spur im Gel aufgetragen und die Expression der Caspase-3 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Der Nachweis von Aktin diente zur Ladekontrolle. Dieses Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Wie in Abb. 26 zu sehen ist, liegt in den untersuchten Zellen Caspase-3 sowohl in der inaktiven als auch in der aktiven Form vor (0h). Nach Zugabe von OHT änderte sich weder die Menge der inaktiven Caspasevorstufe (35 kDa) noch der aktiven Formen (17 und 19 kDa) in den Kontrollzellen rneo3 und den NERT-tragenden Zellen rNERTneo24. Daraus kann man schließen, dass die Aktivierung von Notch1 weder einen Einfluss auf die Expression der Caspase-3 hat, da sich die Menge der Vorstufe nicht ändert, noch dass es einen Einfluss auf die Aktivierung der Caspase-3 hat, da auch die Menge der aktiven Caspase-3 nicht erhöht wird.

#### **4.3.2 Notch1 hat keinen Einfluss auf die Expression von Caspase-6**

Für die Frage, ob Notch1 einen Einfluss auf die Expression der Caspase-6 hat, wurden die Proteine ein, zwei und drei Tage nach Zugabe von 500 nM OHT geerntet. Der verwendete Antikörper erkennt nur die inaktive Vorstufe der Caspase-6, die eine Größe von ca. 35 kDa hat (s. Abb. 27).



**Abb. 27 Notch1 hat keinen Einfluss auf die Expression von Caspase-6**

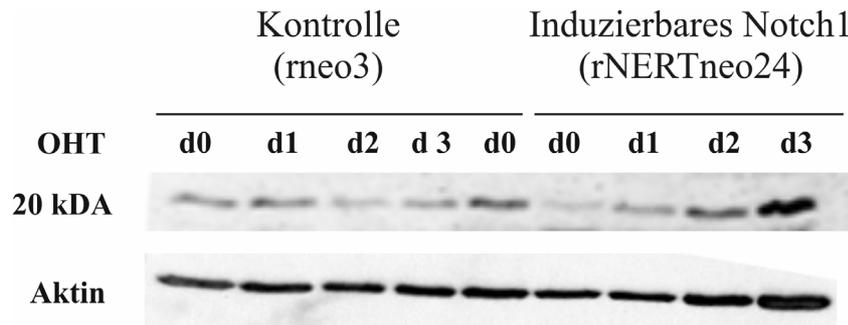
Die FDCP-mix-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 500 nM OHT gehalten. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proteine isoliert. Es wurden je 10 µg Gesamtprotein pro Spur im Gel aufgetragen und die Expression der inaktiven Vorstufe der Caspase-6 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Der Nachweis von Aktin diente zur Ladekontrolle. Das Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Experimenten wiederholt.

Die über einen Verlauf von drei Tagen erfolgte Zugabe von OHT zu den NERT-tragenden Zellen rNERTneo24 hat – wie in den Kontrollzellen rneo3 – keinen Einfluss auf die Menge der exprimierten inaktiven Vorstufe der Caspase-6. Somit lässt sich die mit Hilfe des DNA-Arrays auf RNA-Ebene gezeigte erhöhte Expression der Caspase-6 nach Notch1-Aktivierung auf Proteinebene nicht bestätigen.

**4.3.3 Notch1 erhöht die Expression von Caspase-7**

Der Antikörper, der für den Nachweis der Caspase-7 verwendet wurde, erkennt die aktive Form der Caspase-7, die ca. 20 kDa groß ist. Wieder wurden die Proteine ein, zwei und drei Tage nach Zugabe von 500 nM OHT geerntet und im Western Blot nachgewiesen (s. Abb 28).

Die aktive Form der Caspase-7 ließ sich bereits ohne OHT-Zugabe nachweisen (d0). Wurde Notch1 durch die Zugabe von OHT in den Zellen rNERTneo24 aktiviert, erhöhte sich die Proteinmenge an Caspase-7 von Tag zu Tag. Am Tag drei nach Aktivierung von Notch1 war die größte Menge an aktiver Caspase-7 nachweisbar. Im Vergleich dazu wurde in den Kontrollzellen die Menge an Caspase-7 nach OHT-Gabe nicht reguliert.



**Abb. 28 Notch1 erhöht die Expression von Caspase-7**

Die FDCP-mix-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 500 nM OHT gehalten. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proteine isoliert. Es wurden je 10 µg Gesamtprotein pro Spur im Gel aufgetragen und die Expression der aktiven Caspase-7 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Der Nachweis von Aktin diente zur Ladekontrolle. Das Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass sich nach Induktion von Notch1 die Caspase-7 aktiviert wird. Notch1 hat unter den getesteten Bedingungen aber scheinbar keinen Einfluss auf die Proteinexpression von Caspase-3 und Caspase-6.

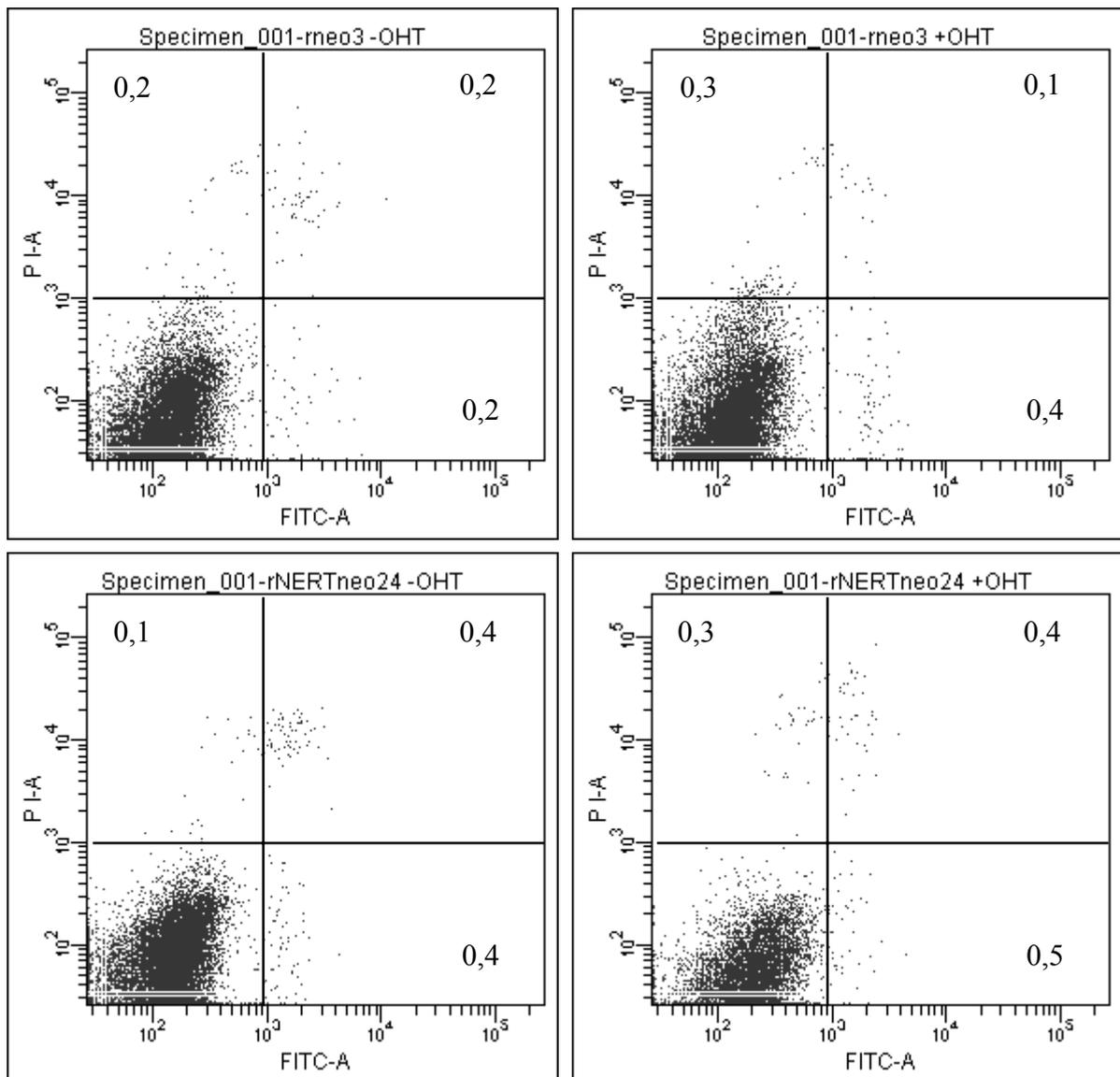
**4.3.4 Aktiviertes Notch1 erhöht die Apoptoserate nicht**

Mit Hilfe des Western Blots konnte nachgewiesen werden, dass in den FDCP-mix-Zellen immer aktive Formen an Caspase-3 und Caspase-7 vorhanden sind und sich die Menge an aktiver Caspase-7 nach Aktivierung von Notch1 erhöht. Daher stellte sich die Frage, ob Notch1 durch die Aktivierung von Caspase-7 die Apoptoserate der Zellen erhöht.

Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Apoptoseassay mit Annexin V durchgeführt. In gesunden Zellen befindet sich Phosphatidylserin auf der Innenseite von Zellmembranen. In einer apoptotischen Zelle befindet es sich dagegen an der Außenseite der Membran. Dort kann Phosphatidylserin von Annexin V erkannt werden. Koppelt man Annexin V mit einem Fluoreszenzfarbstoff, wie z. B. FITC, kann man apoptotische Zellen mittels FACS-Analyse nachweisen. Kombiniert man die Annexin V- Färbung mit der Gabe von Propidiumjodid (PI), kann man nekrotische Zellen (positiv für PI und Annexin V) von apoptotischen Zellen (nur positiv für Annexin V) unterscheiden.

Um zu testen, ob Notch1 einen Einfluss auf die Apoptoserate von FDCP-mix-Zellen hat, wurde 1 µM OHT zu den Notch1-induzierbaren Zellen rNERTneo24 und den Kontrollzellen rneo3 gegeben. Nach drei Tagen wurde eine Färbung mit Annexin V-FITC

und PI durchgeführt und der Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt (s. Abb. 29).



### Abb. 29 Apoptoseassay

Die FDCP-mix-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 1  $\mu$ M OHT kultiviert. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit PI und Annexin V-FITC gefärbt und die Apoptoserate mittels FACS-Analyse ermittelt. Die Quadrantenstatistik ist in % angegeben. Das Experiment ist zweimal mit inhaltlich vergleichbaren Ergebnissen wiederholt worden.

Die FACS-Analyse der rNERTneo24 und der Kontroll-Zellen (rneo3) zeigte, unabhängig von der Aktivierung von Notch1 durch OHT-Zugabe, ein fast identisches Bild. Der Anteil an Annexin V-positiven, d. h. apoptotischen Zellen, betrug sowohl mit als auch ohne Zugabe von OHT in den Zellen rNERTneo24 ca. 0,4 %. Auch der Anteil an nekrotischen Zellen (positiv für PI und Annexin V) war in beiden Fällen mit ca. 0,4 % ähnlich. Daneben

hatte die Zugabe von OHT in den Kontrollzellen auch keinen Einfluss auf die Anzahl der apoptotischen (ca. 0,3%) und nekrotischen Zellen (ca. 0,2 %). Daraus lässt sich schließen, dass Notch1 die Apoptoserate in FDCP-mix-Zellen nicht erhöht.

#### **4.3.5 Einfluss der Caspasen auf die Differenzierung von FDCP-mix-Zellen**

Aus der Literatur ist bekannt, dass Caspasen nicht nur eine wichtige Funktion bei der Apoptose haben, sondern auch in Differenzierungsprozesse involviert sind (Siegel, 2006; Lamkanfi et al., 2007). Daher besteht die Möglichkeit, dass die Caspasen – und hierbei insbesondere die durch Notch1 aktivierte Caspase-7 – auch in FDCP-mix-Zellen die Differenzierung beeinflussen. Um das zu überprüfen, sollten die Caspasen durch den pan-Caspase-Inhibitor zVAD inhibiert werden und anschließend die Differenzierung mit und ohne Notch1-Aktivierung untersucht werden. Die Idee war, dass Notch1 durch Aktivierung der Caspase-7 (und möglicher anderer nicht untersuchter Caspasen) die Differenzierung der FDCP-mix-Zellen bewirkt und diese durch Gabe von zVAD unterdrückt wird.

Um diese These zu überprüfen, wurden verschiedene Konzentrationen an zVAD zu den FDCP-mix-Zellen rNERTneo24 und der Kontrolle rneo3 gegeben. Nach drei Tagen sollte die myeloide Differenzierung anhand der Expression der Oberflächenmarker Sca1 und Mac1 mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht werden. Die Gabe von 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  zVAD hatte keinen Einfluss auf die Differenzierung der FDCP-mix-Zellen. Deshalb wurden höhere Konzentrationen an Caspase-Inhibitor getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die Zellen allein durch die Gabe des Caspase-Inhibitors zVAD sterben, unabhängig davon, ob OHT zugegeben wurde oder nicht. Es wurden drei weitere Konzentrationen an zVAD getestet (50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ ), aber bei allen Konzentrationen trat derselbe Effekt auf. Da kein anderer Caspase-Inhibitor zur Verfügung stand, musste das Experiment an dieser Stelle abgebrochen werden. Somit konnte die Frage, ob und welchen Einfluss die Caspasen auf die Differenzierung von FDCP-mix-Zellen haben, nicht abschließend geklärt werden.

## 5. Diskussion

### 5.1 Notch und Erythropoese

In dem ersten Projekt dieser Arbeit wurde der Einfluss von Notch1 auf die Erythropoese untersucht. Als Modellsystem standen hierfür – wie auch für die folgenden Projekte – FDCP-mix-Zellen zur Verfügung, die die konditionell aktivierbare intrazelluläre Domäne des Notch1-Rezeptors tragen. FDCP-mix-Zellen sind aus murinen Knochenmark-Langzeitkulturen gewonnene Zellen, die in vielen Eigenschaften den hämatopoetischen Vorläuferzellen entsprechen und entlang der myeloiden und erythroiden Reihe differenzieren können (Spooncer et al., 1984). Diese wurden in einer früheren Arbeit mit dem NERT-Protein stabil transfiziert (Schroeder et al., 2003). Das NERT-Protein ist ein Fusionsprotein, bestehend aus der konstitutiv aktiven intrazellulären Domäne des Notch1-Rezeptors und der Hormonbindungsdomäne des humanen Östrogenrezeptors, das nach Zugabe von Tamoxifen (OHT) in den Zellkern wandert und dort die Transkription von Notch1-Zielgenen bewirkt.

FDCP-mix-Zellen können durch Änderung der Kulturbedingungen (Verwendung von FCS statt Pferdeserum, Zugabe von 5 U/ml Erythropoietin und der Einsatz von 5 U/ml IL-3 anstelle von 100 U/ml) zur Differenzierung in die erythroide Richtung induziert werden (Heyworth et al., 1995). In dieser Arbeit konnte mit Hilfe einer FACS-Analyse des erythroiden Oberflächenmarkers Ter119 gezeigt werden, dass die Aktivierung von Notch1 durch Zugabe von OHT zu einer beschleunigten erythroiden Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen führt. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu Ergebnissen, die andere Arbeitsgruppen bei Verwendung der Erythroleukämie-Zelllinien K562 und F5-5 erhalten haben, denn in diesen Zellen verhindert Notch1 die erythroide Differenzierung (Lam et al., 2000; Kumano et al., 2001; Ishiko et al., 2005). Die Verwendung von Leukämiezellen als Modellsystem für die Hämatopoese ist allerdings mit dem Nachteil verbunden, dass diese Zellen sich in einigen wichtigen Punkten von den natürlichen hämatopoetischen Zellen unterscheiden und oftmals nicht in der gleichen Weise auf physiologische Bedingungen reagieren. So bewirkt zum Beispiel die Zugabe von Erythropoietin, das für die Reifung von Erythrozyten essentiell ist, nur eine marginale erythroide Differenzierung der K562-Zellen (Hoffman et al., 1979). Daher verwundert es nicht, wenn Notch1 in Leukämiezellen eine andere Wirkung haben kann als in den in dieser Arbeit verwendeten Zellen. Unterstützt wird das hier gezeigte Ergebnis durch Experimente, die in primären humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen durchgeführt wurden. Der Notch-Ligand Delta-4 induzierte die erythroide Differenzierung dieser Zellen

(Sugimoto et al., 2006). Desweiteren wurde in unserer Arbeitsgruppe auch schon in früheren Experimenten gezeigt, dass Notch1 die myeloide Differenzierung nicht inhibiert, sondern fördert (Schroeder and Just, 2000b; Schroeder et al., 2003).

In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass Notch1 in FDCP-mix-Zellen nicht nur die Reifung der Erythrozyten beschleunigt, sondern, dass nach Aktivierung von Notch1 auch die Expression von  $\beta$ -Globin erhöht wird (Rieber, 2004). Daher wurde in einem weiteren Experiment überprüft, ob Notch1 die Expression von  $\beta$ -Globin beeinflusst. Im Menschen gibt es fünf verschiedene  $\beta$ -Globin-Gene:  $\epsilon$ -Globin wird während der Embryonalentwicklung exprimiert, die beiden  $\gamma$ -Globine  $G\gamma$  und  $A\gamma$  in der fötalen Leber und nach der Geburt findet man im Menschen das überwiegend exprimierte  $\beta$ -Globin und das in deutlich geringerem Umfang exprimierte  $\delta$ -Globin. In der Maus findet man auch ein  $\beta$ -Globin-Gen-Cluster, das das embryonale  $\beta$ -Globin-Gen Hbb- $\gamma$ , das frühe embryonale  $\beta$ -Globin-Gen Hbb-bh1 und die adulten  $\beta$ -Globin-Gene Hbb-b1 und Hbb-b2 umfasst (Cao and Moi, 2002; Li et al., 2002).

Mit Hilfe der Real-time PCR konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Notch1 zu einer erhöhten Expression des  $\beta$ -Globins Hbb-b2 führt. Die Induktion der  $\beta$ -Globin-Expression durch Notch1 wurde dabei nicht nur unter Zellkulturbedingungen, die die erythroide Differenzierung fördern, nachgewiesen, sondern auch unter Bedingungen, die die Selbsterneuerung der Zellen erlauben, d. h. auch in Abwesenheit von Erythropoietin (Daten nicht gezeigt). Für das Überleben und die vollständige Differenzierung der FDCP-mix-Zellen zu reifen Erythrozyten war hingegen das Vorhandensein von Erythropoietin notwendig (Rieber, 2004).

Da Notch1 als Transkriptionsfaktor wirkt, wurde überprüft, ob es die Expression von erythroiden Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation des  $\beta$ -Globin-Gens beteiligt sind, beeinflusst. Zu den wichtigsten dieser Faktoren gehören GATA1, FOG1, EKLF und NF-E2. GATA1 hat eine essentielle Funktion während der erythroiden Differenzierung und wirkt als Transkriptionsfaktor für zahlreiche erythroide Gene. Im  $\beta$ -Globin-Promotor befindet sich eine Bindungsstelle für GATA1, daher kann GATA-1 als direkter Transkriptionsfaktor für  $\beta$ -Globin wirken (Cao and Moi, 2002). GATA-1 kann durch FOG1 (Friend Of GATA) reguliert werden. Diese beiden Proteine interagieren direkt miteinander, FOG1 bindet selbst aber nicht an die DNA. Es konnte nachgewiesen werden, dass die direkte Interaktion zwischen GATA1 und FOG1 für die Erythropoese notwendig ist (Crispino et al., 1999). Der Transkriptionsfaktor EKLF (Erythroid Krüppel-like Factor) kann auch direkt an den  $\beta$ -Globin-Promotor binden. Er sorgt im Menschen für den

Übergang von der  $\gamma$ -Globins-Expression im Fötus zur Expression des adulten  $\beta$ -Globins (Cantor and Orkin, 2002). NF-E2 (Nuclear Factor E2) ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von  $\beta$ -Globin durch Interaktion mit der Locus-Kontroll-Region reguliert (Talbot and Grosveld, 1991). Mittels Real-time PCR wurde die Expression der Gene Gata1, Fog1, Nfe2 und Eklf vor und nach Aktivierung von Notch1 überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass Notch1 die Expression dieser Gene nicht verändert. Das schließt allerdings nicht aus, dass Notch1 die Expression anderer erythroider Transkriptionsfaktoren beeinflusst oder dass Notch1 die untersuchten Faktoren auf Proteinebene reguliert.

Die Regulation der Expression der  $\beta$ -Globin-Gene erfolgt zum einen über die Promotoren der einzelnen  $\beta$ -Globin-Gene (Cao and Moi, 2002) und zum anderen über die Locus-Kontroll-Region (LCR), die sich ca. 20 kb stromaufwärts des ersten  $\beta$ -Globin-Gens befindet. Dabei handelt es sich um ein übergeordnetes Regulationselement, das aus fünf DNase hypersensitiven Stellen (HS1-HS5) besteht, die jeweils eine Größe von ca. 250 bp aufweisen. An die LCR können verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie z. B. GATA1 und NF-E2, binden, die im Folgenden die Expression der  $\beta$ -Globin-Gene regulieren (Cao and Moi, 2002; Li et al., 2002). Lam et al. konnten zeigen, dass die HS2 eine Bindungsstelle für das Notch-Effektormolekül RBP-J aufweist (Lam and Bresnick, 1996; Lam and Bresnick, 1998). Daher wurde mittels eines Reporterplasmids, das für die HS2 codiert (Lam and Bresnick, 1996), überprüft, ob Notch1 auf direktem Weg über Interaktion mit RBP-J die Expression des  $\beta$ -Globins reguliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass Notch1 dieses Konstrukt dosisabhängig aktiviert. Durch Mutation der RBP-J-Bindungsstelle in der HS2 wurde dagegen die Transaktivierung dieses Reporterplasmides verhindert. Dies lässt darauf schließen, dass Notch1 über Bindung von RBP-J an dessen Bindungsstelle in der HS2 die Expression von  $\beta$ -Globin erhöht und dadurch die erythroide Differenzierung der FDCP-mix-Zellen beschleunigt.

Die Luciferase-Assays wurden auch in K562-Zellen durchgeführt. In diesen Zellen bewirkte Notch1 keine Aktivierung der HS2, auch wenn der Notch1-Signalweg generell in den K562-Zellen funktioniert, wie die Transaktivierung eines künstlichen RBP-J-Reporterplasmides zeigt. Dieses Resultat steht im Einklang mit den Ergebnissen, dass Notch1 die erythroide Differenzierung von K562-Zellen verhindert und nicht aktiviert (Lam et al., 2000; Ishiko et al., 2005). Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den FDCP-mix-Zellen und den K562-Zellen lassen sich zum einen damit erklären, dass es sich bei den K562-Zellen um Leukämie-Zellen handelt, die im Gegensatz zu den FDCP-mix-

Zellen nicht mehr auf alle Stimuli physiologisch reagieren. Die Gabe von Erythropoietin führt in K562-Zellen z. B. nicht zur erythroiden Differenzierung, auch wenn es in gesunden Zellen für die Erythropoese essentiell ist (Hoffman et al., 1979). Die K562-Zellen exprimieren außerdem nur das fötale und embryonale  $\epsilon$ - und  $\gamma$ -Globin, nicht aber die adulten  $\beta$ -Globin Gene (Benz et al., 1980). Überdies können die K562-Zellen nicht vollständig in Erythrozyten differenzieren. FDCP-mix-Zellen stammen dagegen von Langzeitkulturen normaler muriner Knochenmarkszellen, sind nicht leukämogen und benötigen – wie primäre hämatopoetische Zellen – Zytokine oder Stromazellen zum Wachstum. Weiterhin ist deren vollständige erythroide Differenzierung an das Vorhandensein von Erythropoietin gebunden. Da die FDCP-mix-Zellen zudem einer unreiferen myeloiden Vorläuferstufe entsprechen, ist es auch möglich, dass Notch1 auf die unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Zellen nicht den gleichen Einfluss hat.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Notch1 die erythroide Differenzierung von FDCP-mix-Zellen beschleunigt und die Expression des  $\beta$ -Globin-Gens über Aktivierung der HS2 der LCR durch RBP-J erhöht. Es wäre interessant heraus zu finden, welche Proteine im Detail an die RBP-J-Bindungsstelle der HS2 vor und nach Aktivierung von Notch1 binden, um so ein genaueres Verständnis für die Regulation zu erhalten. Dazu könnte man z. B. einen Chromatin-Immunopräzipitations-Assay (ChIP) durchführen. Man könnte dann vergleichen, welche Proteine an der Regulation der HS2 in den FDCP-mix-Zellen und in den K562-Zellen beteiligt sind, um so den unterschiedlichen Einfluss, den Notch1 in diesen Zellen auf die Erythropoese hat, aufzuklären. Es ist allerdings auch möglich, dass Notch1 noch über andere Mechanismen einen Einfluss auf die Erythropoese nimmt. So konnte zwar gezeigt werden, dass Notch1 die Expression der Gene für die Transkriptionsfaktoren Gata1, Fog1, Ekf und Nfe2 nicht beeinflusst, aber es ist möglich, dass Notch1 die Stabilität dieser Faktoren durch Änderung der Proteinmodifikationen reguliert. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivität anderer erythroider Transkriptionsfaktoren, wie z. B. GATA2 oder SCL, durch Notch1 beeinflusst wird.

## 5.2 Notch und p53

Das zweite Projekt dieser Arbeit betrachtete die Wechselwirkungen zwischen dem Notch-Signalweg und p53.

Das Protein p53 ist ein Tumorsuppressor, der die Entstehung von Krebs verhindert, indem es einerseits die Reparatur von stressinduziertem DNA-Schaden einleitet und andererseits die Proliferation von geschädigten Zellen verhindert. Die Aktivierung von p53 kann aber

auch zum apoptotischen Zelltod führen. Fehlt p53 oder ist der p53-Signalweg auf andere Weise gestört, führt dies zu einer deutlich erhöhten Prädisposition für Tumore. p53 agiert als Transkriptionsfaktor und kann daher über die Regulation verschiedener Zielgene die unterschiedlichen Funktionen bewirken. Doch wodurch wird festgelegt, welche Zellantwort die Aktivierung von p53 hervorruft? Zum einen wird p53 durch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren reguliert. So konnte gezeigt werden, dass für das Auslösen des Proliferationsstopps oftmals die Bindung von p53 an seine DNA-Erkennungssequenz ausreichend ist, während die Apoptose erst dann aktiviert wird, wenn p53 mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert. Zum anderen gibt es verschiedene posttranslationale Modifikationen des p53-Proteins, die die Aktivität beeinflussen. Dazu zählen z. B. Phosphorylierungen, Methylierungen, Acetylierungen und Ubiquitylierungen. Die Phosphorylierung des humanen p53 an der Position Serin 46 ist z. B. notwendig, damit p53 die Apoptose induzieren kann. Wird diese Position nicht phosphoryliert, kann p53 apoptotische Gene nicht aktivieren. Dies beeinträchtigt allerdings nicht seine Funktion als Transkriptionsfaktor für Gene, die den Zellzyklus blockieren (Vousden, 2006).

In diesem Teilprojekt der Arbeit wurde untersucht, ob Notch1 und p53 in hämatopoetischen Zellen interagieren und welche Auswirkungen diese Interaktion hat. Dafür standen neben den bisher benutzten FDCP-mix-Zellen, die einen p53<sup>wt</sup> Status besitzen, noch p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen zur Verfügung (Pierce et al., 2000). Die p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen wurden in einer vorherigen Arbeit stabil mit dem NERT-Protein transfiziert (Schroeder, 2001) und es konnte nachgewiesen werden, dass sie kein funktionelles p53 tragen (Heering, 2005). Die Funktionalität des konditionellen Notch1-Signalweges in diesen p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen wurde durch Real-time PCR mit dem bekannten Notch-Zielgen *Hes1* (Jarriault et al., 1995) gezeigt.

FDCP-mix-Zellen differenzieren nach Aktivierung von Notch1 in die myeloide und erythroide Richtung (Schroeder et al., 2003; Heering, 2005). Des Weiteren führt die Aktivierung von Notch1 zu einer Inhibierung der Proliferation der FDCP-mix-Zellen, in dem der Zellzyklus in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase arretiert wird (Schroeder and Just, 2000a; Schroeder et al., 2003). Dies steht im Einklang mit Daten von Walker et al., die zeigen konnten, dass die Aktivierung von Notch1 durch seinen Liganden *Jagged1* in humanen primären hämatopoetischen Vorläuferzellen zu einer Inhibierung der Proliferation führt (Walker et al., 1999). Mit Hilfe der p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen wurde überprüft, ob diese beiden Funktionen von Notch1 an das Vorhandensein von p53<sup>wt</sup> Protein gekoppelt sind. J. Heering und T. Schroeder konnten zeigen, dass Notch1 auch in den p53<sup>null</sup> FDCP-mix-

Zellen die myeloide und erythroide Differenzierung induziert, so dass die Differenzierungsinduktion durch den Notch-Rezeptor p53-unabhängig verläuft (Schroeder, 2001; Heering, 2005).

Um zu untersuchen, welchen Einfluss p53 auf den Notch1-vermittelten Proliferationsstopp in hämatopoetischen Zellen hat, wurde ein Proliferationsassay unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs CFSE durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Aktivierung von Notch1 zu einem Proliferationsstopp in den p53<sup>wt</sup> FDCP-mix-Zellen, nicht aber in den p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen führt. Der CFSE-Assay bestätigt damit die Ergebnisse, die bereits mit Hilfe des <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbaus erhalten wurden (Schroeder, 2001; Heering, 2005).

Nach Transfektion des Plasmides pCAG-3SIP-wtp53, das sowohl das Gen für die Puromycin-Resistenz als auch das Gen für p53 trägt (Heering, 2005), zeigten auch die p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen nach Aktivierung von Notch1 einen Proliferationsstopp. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass der Effekt, den Notch1 auf die Proliferation hat, wirklich von der Anwesenheit des p53-Proteins abhängig ist und dass das Ausbleiben des Proliferationsstopps in p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen nicht auf zusätzliche weitere Mutationen in den Zellen zurückzuführen ist.

Der Proliferationsassay erfolgte dabei zunächst mit p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen, die nur transient mit dem p53-Gen transfiziert wurden. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass der p53<sup>wt</sup> Status in den p53<sup>null</sup> Zellen wieder hergestellt werden kann. Der Proliferationsversuch sollte anschließend mit p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen wiederholt werden, die den Vektor pCAG-3SIP-wtp53 stabil tragen. Dem Medium wurde daher zur Selektion Puromycin zugesetzt. Die Generierung von stabilen Zelllinien erwies sich allerdings als schwierig, da die p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen bei Kultur in Selektionsmedium spontane Resistenzen gegen Puromycin entwickelten. Diese mutierten p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen hatten auf Grund des Fehlens des Zellzyklusregulators p53 einen Wachstumsvorteil gegenüber den mit dem p53-Gen transfizierten p53<sup>null</sup> Zellen, wuchsen schneller und konnten daher die transfizierten Zellen überwachsen. Mit dieser Mischpopulation, die zu einem sehr großen Anteil aus p53<sup>null</sup> Zellen bestand und nur einen geringen Anteil an erfolgreich mit dem p53-Gen transfizierten p53<sup>null</sup> Zellen enthielt, ließ sich jedoch kein aussagekräftiger Proliferationsversuch durchführen. Die Ergebnisse, die mit den p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen erhalten wurden, die das p53-Gen transient trugen, konnten aber zeigen, dass der p53<sup>wt</sup> Phänotyp in diesen Zellen wiederhergestellt werden konnte und es ließ sich damit bestätigen, dass der Notch1-vermittelte Zellzyklusarrest über p53 vermittelt wird.

Es ist bekannt, dass p53 seine Effekte auf den Zellzyklus über das Protein p21<sup>Waf/Cip</sup> vermittelt. Das Protein p21<sup>Waf/Cip</sup> wird auch als WAF1 (wild-type p53 activated fragment 1) bezeichnet und kann den Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase blocken, indem es den aus Cyclin E und CDK2 bestehenden Komplex inhibiert. Dieser Komplex sorgt in seiner aktiven Form für die Phosphorylierung des Proteins Rb, wodurch die Inhibierung von E2F aufgehoben wird, welcher als Transkriptionsfaktor für S-Phase-Gene wirkt und somit den Zellzyklus vorantreibt. Außerdem kann p21<sup>Waf/Cip</sup> mit PCNA, einer Untereinheit der DNA-Polymerase  $\delta$ , interagieren und auf diese Weise die DNA-Replikation inhibieren (Weinberg and Denning, 2002). Daher sollte überprüft werden, ob Notch1 die Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> reguliert.

Mit Hilfe von Western Blots konnte gezeigt werden, dass Notch1 die Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> in p53<sup>wt</sup>, nicht aber in p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen auf Proteinebene erhöht. Bestätigt wurde dieses Ergebnis mittels Luciferase-Assay. Hierfür wurde ein Luciferase-Konstrukt verwendet, das den Promotor des p21-Gens enthielt. Dieses Konstrukt wurde nur in p53<sup>wt</sup>, nicht aber in p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen durch Notch1 aktiviert. Dies zeigt, dass Notch1 die Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> p53-abhängig regulieren kann. Dass Notch1 die Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> in hämatopoetischen Zellen induziert, steht im Einklang mit Ergebnissen, die in anderen Zelltypen erhalten wurden. So konnte in Lungenkrebszellen gezeigt werden, dass die Aktivierung von Notch1 zu einem Zellzyklusarrest führt, der mit einer verstärkten Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> verbunden ist (Sriuranpong et al., 2001). Den gleichen Effekt auf die Proliferation und die Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> hat Notch1 auch in Zungenkarzinomzellen, Epithelzellen, Leberkarzinomzellen und Keratinozyten (Rangarajan et al., 2001; Qi et al., 2003; Duan et al., 2006; Niimi et al., 2007).

Der p21-Promotor enthält sowohl zwei bekannte Bindungsstellen für p53 (el-Deiry et al., 1993; el-Deiry et al., 1995), als auch eine Bindungsstelle für das Notch-Effektormolekül RBP-J (Rangarajan et al., 2001). Um den Mechanismus, durch den Notch1 die Aktivierung von p21<sup>Waf/Cip</sup> bewirkt, genauer zu verstehen, wurden Luciferase-Konstrukte geschaffen, in denen zum einen die Bindungsstelle für RBP-J so mutiert wurde, dass sie nicht mehr funktionell ist (Tun et al., 1994) und denen zum anderen die Bindungsstellen für p53 fehlen. Unter Verwendung dieser Luciferase-Plasmide konnte nachgewiesen werden, dass die Transaktivierung des p21-Promotors durch Notch1 in FDCP-mix-Zellen nicht RBP-J abhängig verläuft.

Auch in Keratinozyten wird der p21-Promotor durch Notch1 aktiviert und es konnte gezeigt werden, dass RBP-J an die Consensus-Bindungsstelle im p21-Promotor bindet

(Rangarajan et al., 2001). Allerdings wurde in dieser Arbeit nicht dargestellt, dass die Bindung von RBP-J an diese Bindungsstelle für die Notch1-vermittelte Transaktivierung des p21-Promotors notwendig ist. Allein die Tatsache, dass RBP-J an den p21-Promotor bindet, muss es nicht zwangsläufig zur Transaktivierung führen. Daher wäre es sehr interessant, das in dieser Arbeit verwendete Luciferasekonstrukt, das den p21-Promotor mit einer nicht-funktionellen RBP-J-Bindungsstelle enthält, ebenfalls in Keratinozyten zu testen. Nur so kann man sicher sagen, ob die Aktivierung des p21-Promotors durch Notch1 in Keratinozyten RBP-J-abhängig verläuft. Andererseits ist es natürlich ferner möglich, dass die Aktivierung von p21<sup>Waf/Cip</sup> durch Notch1 Zellkontext-abhängig reguliert wird und daher die Aktivierung von p21<sup>Waf/Cip</sup> durch Notch1 in Keratinozyten RBP-J-abhängig verläuft, während es in hämatopoetischen Zellen RBPJ-unabhängig verläuft. Dann wäre es spannend zu klären, welche Faktoren an dieser Regulation beteiligt sind. Man könnte untersuchen, welche Faktoren an die RBP-J-Bindungsstelle im p21-Promotor in den jeweiligen Zellen binden, um zu verstehen, welche Proteine einerseits die RBP-J-abhängige Aktivierung des p21-Promotors in Keratinozyten ermöglichen und welche andererseits diese Aktivierung in hämatopoetischen Zellen verhindern.

Im Gegensatz zur Inaktivierung der RBP-J-Bindungsstelle führte die Deletion der ersten oder zweiten p53-Bindungsstelle im p21-Promotor zu einer deutlich verminderten Aktivierung des p21-Promotors durch Notch1. Bei gleichzeitiger Deletion beider p53-Bindungsstellen ließ sich der p21-Promotor durch Notch1 nicht transaktivieren. Dies verdeutlicht, dass Notch1 die Aktivierung von p21<sup>Waf/Cip</sup> über p53 vermittelt. Übereinstimmend mit diesen Experimenten konnte in unserer Arbeitsgruppe in einem ChIP-Assay nachgewiesen werden, dass die Bindung von p53 an den p21-Promotor nach Notch1-Induktion verstärkt wird.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Notch1 die Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen inhibiert und dass dieser Prozess p53-abhängig verläuft. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von Notch1 zu einer Induktion von p21<sup>Waf/Cip</sup>, einem bekannten Zellzyklusinhibitor, führt. Dieser Schritt verläuft nicht über Transaktivierung des Notch1-Effektormoleküls RBP-J, sondern wird über die Bindung von p53 an den p21-Promotor vermittelt.

Über die Tatsache, wie Notch1 und p53 gemeinsam die Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> aktivieren, lassen sich nur Vermutungen anstellen. Eine Möglichkeit ist, dass Notch1 die Expression von p53 induziert, welches daraufhin p21<sup>Waf/Cip</sup> aktiviert. Allerdings konnte mit Hilfe der Real-time PCR gezeigt werden, dass Notch1 die Expression von p53 nicht auf

RNA-Ebene reguliert. Somit scheidet aus, dass Notch1 die Transkription von p53 erhöht. Es ist aber bekannt, dass die Aktivierung von p53 selten über eine Erhöhung der Transkriptionsrate verläuft, sondern eher auf eine erhöhte Proteinstabilität zurückzuführen ist. p53 an sich hat eine sehr geringe Halbwertszeit. Seine Stabilität wird hauptsächlich durch MDM2 reguliert. MDM2 (mouse double minute 2) ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, die p53 für den proteasomalen Abbau markiert. Die Phosphorylierung verschiedener Aminosäurereste führt zur erhöhten Stabilität des p53-Proteins. So ist bekannt, dass die Phosphorylierung von p53 an der Position Serin 20 die Interaktion zwischen p53 und MDM2 behindert, wodurch der Abbau von p53 gestört und die Stabilität erhöht wird (Lavin and Gueven, 2006). Daher ist es denkbar, dass Notch1 - durch Aktivierung einer Kinase - die posttranslationale Modifikation von p53 vermittelt und p53 dadurch z. B. an der Position Serin 20 phosphoryliert wird. Auf diesem Weg könnte die Stabilität des p53-Proteins erhöht werden.

Dies sollte im Western Blot überprüft werden. Leider ist es bisher nicht gelungen, das p53-Protein, das aus FDCP-mix-Zellen isoliert wurde, im Western Blot nachzuweisen. Es wurden sehr große Mengen an Protein im Gel aufgetragen und verschiedene Antikörper, die sowohl natives als auch phosphoryliertes p53 erkennen, ausgetestet, doch es ließ sich keine spezifische Bande für p53 detektieren. Deshalb lässt sich nur darüber spekulieren, ob Notch1 die Proteinstabilität von p53 in hämatopoetischen Zellen erhöht und damit die Aktivierung von p21<sup>Waf/Cip</sup> bewirkt. Unterstützt wird diese Hypothese durch ein Luciferase-Experiment, mit dem gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung von Notch1 zur Aktivierung des MDM2-Promotors führt, der auch zwei Bindungsstellen für p53 besitzt (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass zwei verschiedene Promotoren, die beide Bindungsstellen für p53 besitzen, durch Notch1 aktiviert werden können.

p53 kann nicht nur durch Phosphorylierung, sondern auch durch Acetylierung aktiviert werden. Die Acetylierung des p53-Proteins trägt dabei nicht primär zur Erhöhung der Proteinstabilität bei, sondern verstärkt oft die Bindung von p53 an die DNA. Zu den Histonacetylasen, die p53 modifizieren können, zählen p300/CBP und P/CAF (Lavin and Gueven, 2006). p53 kann an verschiedenen Lysinresten acetyliert werden, wobei die Acetylierung eines bestimmten Lysinrestes auch über die Zellantwort entscheidet, die durch p53-Aktivierung hervorgerufen wird. So führt die Acetylierung an Position Lysin320 zur Inhibierung des Zellzyklus, während die Acetylierung an Position Lysin373 die Apoptose einleitet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Acetylierungen des p53-Proteins notwendig für die Aktivierung des p21-Promotors sind, auch wenn nicht eindeutig

geklärt ist, ob dadurch die Bindung von p53 an die DNA erhöht wird oder ob dadurch die Rekrutierung weiterer Coaktivatoren ermöglicht wird (Barlev et al., 2001; Knights et al., 2006). Daher ist es auch denkbar, dass Notch1 - indirekt über den Zwischenschritt von Acetylasen - das Acetylierungsmuster von p53 beeinflusst und auf diese Weise die Expression von p21<sup>Waf/Cip</sup> erhöht.

Aus diesem Grund wäre es sehr interessant, sich die posttranslationalen Modifikationen des p53-Proteins vor und nach Notch1-Aktivierung genauer anzuschauen. Denkbar ist, dass Notch1 durch Aktivierung von Kinasen z. B. die Phosphorylierung des p53-Proteins an Position Serin20 vermittelt und dadurch die Stabilität von p53 erhöht, da durch diese Modifikation die Interaktion zwischen p53 und MDM2 blockiert wird. Weiterhin ist es möglich, dass die Aktivierung von Notch1 – über den Zwischenschritt der Acetylasen – zur Acetylierung des p53-Proteins an Position Lysin320 führt. Dies ist wahrscheinlich, da erstens gezeigt wurde, dass die Acetylierung des p53-Proteins an dieser Position mit seiner Funktion als Zellzyklusinhibitor in Verbindung steht und zweitens für dessen Aktivierung des p21-Promotors notwendig ist. Der Nachweis von Phosphorylierungen und Acetylierungen einzelner Aminosäuren des p53-Proteins wäre zum Beispiel mit massenspektroskopischen Methoden möglich. Könnte man dadurch zeigen, dass nach Aktivierung von Notch1 das p53-Protein an einer bestimmten Aminosäure acetyliert oder phosphoryliert wird, ließe sich im nächsten Schritt eine p53-Mutante generieren, die an dieser Stelle eine Aminosäure trägt, die nicht modifiziert werden kann. Mit dieser Mutante würde man dann die Experimente zur Rekonstitution des p53<sup>wt</sup>-Phänotyps in p53<sup>null</sup> FDCP-mix-Zellen wiederholen, um zu zeigen, dass die Expression dieser p53-Mutante - im Gegensatz zur Expression des p53<sup>wt</sup> Proteins - nicht den Notch1 vermittelten Proliferationsstopp wiederherstellen kann. Auf diese Weise wäre ein Zusammenhang zwischen einer möglichen posttranslationalen Modifizierung des p53-Proteins, die durch Notch1 vermittelt wird, und der gezeigten p53-Abhängigkeit des Notch1-induzierten Zellzyklusarrestes nachweisbar.

Eine andere Weise, durch die die Aktivität von p53 reguliert werden kann, ist seine Lokalisation. In gesunden Zellen befindet sich p53 im Zytoplasma, während es in transformierten Zellen hauptsächlich im Zellkern nachweisbar ist. Auch während des Zellzyklus ändert sich die Lokalisation von p53. In der G<sub>1</sub>-Phase befindet es sich im Zytoplasma, während es beim Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase in den Zellkern wandert und nach Beginn der S-Phase wieder zurück in das Zytoplasma geht (Liang and Clarke, 2001). Daher ist es vorstellbar, dass Notch1 die Lokalisation des p53-Proteins beeinflusst,

indem es zum Beispiel den Transport in den Zellkern fördert und dadurch zur Aktivierung von p53 beiträgt. Dies könnte mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie gezeigt werden. So könnte man die Lokalisation von p53 vor und nach Notch1-Aktivierung überprüfen und auch nachweisen, ob es zu einer Kolokalisation kommt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es verschiedene Möglichkeiten gibt, über die Notch1 den p53-abhängigen Zellzyklusarrest und die damit verbundene Aktivierung von p21<sup>Waf/Cip</sup> vermittelt, und daher weitere Untersuchungen notwendig sind, um den genauen Mechanismus der Interaktion zwischen p53 und Notch1 zu verstehen.

### 5.3 Notch und Caspasen

Das dritte Projekt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob in hämatopoetischen Zellen Caspasen Notch1-Zielgene sind. Hintergrund dieses Projekts war ein Atlas cDNA-Filter Assay – ein DNA-Array der Firma Clontech (Mountain View, USA), mit dem die Expression von 1176 Genen gleichzeitig untersucht werden kann – mit dessen Hilfe nachgewiesen werden konnte, dass Notch1 die Expression von Caspase-6 erhöht (Rieber, 2004).

Die bekannteste Funktion der Caspasen ist ihre Beteiligung an der Apoptose, dem programmierten Zelltod. Caspasen sind Cysteinproteasen, die als inaktive Vorstufen in der Zelle vorliegen. Diese Procaspasen müssen zur Aktivierung in eine kleine und eine große Untereinheit gespalten werden. Die Untereinheiten, die aus zwei Procaspasen durch Spaltung hervorgehen, lagern sich zu einem Tetramer zusammen und bilden die aktive Caspase (Kumar, 2007).

Zunächst sollte die auf RNA-Ebene gefundene Aktivierung der Expression von Caspase-6 durch Notch1 auf Protein-Ebene bestätigt werden. Dazu wurde ein Western Blot mit einem Antikörper durchgeführt, der die inaktive Vorstufe der Caspase-6 erkennt. Es wurde die Proteinexpression bis zu drei Tage nach Aktivierung von Notch1 verfolgt und es zeigte sich, dass die Expression des Caspase-6-Proteins davon unbeeinflusst blieb. Die nachgewiesenen Proteinmengen an Caspase-6 waren sowohl für die mit OHT behandelten Proben als auch für die unbehandelte Kontrollprobe (d0) gleich. Wie lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse, die im Atlas cDNA-Filter Assay auf RNA-Ebene und im Western Blot auf Protein-Ebene erhalten wurden, erklären? Zunächst muss beachtet werden, dass die Ergebnisse, die im Atlas cDNA-Filter Assay für Caspase-6 erhalten worden sind, nicht noch einmal mit einer zweiten Methode auf RNA-Ebene bestätigt worden sind. DNA-Arrays sind sehr nützlich, um die Expression einer großen Anzahl von

Genen gleichzeitig zu testen. Auf Grund methodischer Fehler können aber auch vereinzelte Proben unterschiedliche Expressionsmuster unter den zu vergleichenden Bedingungen aufweisen, auch wenn diese tatsächlich nicht existieren. Von daher ist es sinnvoll, die in einem DNA-Array erhaltenen Daten noch einmal im Northern Blot oder in einer Real-time PCR zu verifizieren. Da dies in diesem Fall nicht geschehen ist, kann nicht sicher gesagt werden, dass Notch1 die Expression der Caspase-6 auf RNA-Ebene reguliert. Aber auch wenn Notch1 die Expression der Caspase-6 auf RNA-Ebene aktiviert, muss dies auf Grund von translationaler Regulation nicht zu erhöhter Proteinexpression führen.

Notch1 reguliert die Proteinexpression von Caspase-6 nicht. Okuyama et al. konnten aber nachweisen, dass Caspase-3 in Keratinozyten ein Zielgen von Notch1 ist und dass über diesen Weg die Differenzierung von Keratinozyten reguliert wird (Okuyama et al., 2004). Daher sollte auch in FDCP-mix-Zellen überprüft werden, ob Notch1 eine Wirkung auf die Expression der Effektor-Caspasen-3 und -7 hat. Dazu wurde im Western Blot die Expression der Caspase-3 und Caspase-7 vor und nach Notch1-Aktivierung kontrolliert. Für die Detektierung von Caspase-3 stand ein Antikörper zur Verfügung, der sowohl die inaktive Vorstufe als auch die beiden aktiven Caspase-3 Formen, die eine Größe von 17 und 19 kDa haben, erkennt. Es konnte gezeigt werden, dass Caspase-3 in den FDCP-mix-Zellen immer sowohl in aktivierter als auch inaktiver Form vorliegt und Notch1 weder einen Effekt auf die Expression noch auf die Aktivierung von Caspase-3 hat.

Die Expression der Caspase-7 wurde mit einem Antikörper detektiert, der nur die aktivierte Form mit einer Größe von ca. 20 kDa erkennt. Auch hier konnte gezeigt werden, dass aktivierte Caspase-7 in den FDCP-mix-Zellen immer zu finden ist. Im Unterschied zur Caspase-3 erhöht sich die Menge an Caspase-7 allerdings nach Aktivierung von Notch1. Bereits einen Tag nach Zugabe von OHT ist eine erhöhte Menge an aktiver Caspase-7 nachzuweisen, die sich im Laufe der nächsten Tage noch weiter erhöht.

Mit Hilfe von Western Blots konnte gezeigt werden, dass Notch1 die Expression der Caspasen-3 und -6 nicht reguliert, aber die Expression von Caspase-7 erhöht. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass sowohl Caspase-3 als auch Caspase-7 in den FDCP-mix-Zellen immer in einer aktiven Form vorliegen. Nun stellte sich die Frage, welche biologische Funktion die Caspasen in diesen Zellen ausüben. Da die Caspasen entscheidend in die Apoptose involviert sind, wurde ein Apoptoseassay durchgeführt. Mit Hilfe des Apoptoseassay kann man zwei Arten von Zelltod unterscheiden: die Nekrose und die Apoptose. Bei der Nekrose führen äußere Einflüsse zum Schwellen der Zellen, gefolgt vom Platzen der Zellmembran, was zur Freisetzung des Zytoplasmas und der

Zellorganellen führt. Dadurch können Entzündungen hervorgerufen werden. Eine apoptotische Zelle schrumpft dagegen und wird phagozytiert, wodurch keine Nachbarzellen geschädigt werden und auch keine Entzündung hervorgerufen wird. Die Apoptose ist gekennzeichnet durch Kondensation des Zytoplasmas und des Zellkerns, Fragmentierung der DNA und Veränderungen des Zellmembranaufbaus. So befindet sich Phosphatidylserin in apoptotischen Zellen an der Außenseite der Zellmembran und nicht - wie gewöhnlich - auf der Innenseite. Dies wird zum Nachweis von apoptotischen Zellen ausgenutzt, da Phosphatidylserin von Annexin V auf der Zelloberfläche erkannt wird. So sind apoptotische Zellen positiv für Annexin V. Werden die Zellen gleichzeitig mit Propidiumjodid (PI) gefärbt, das mit doppelsträngiger DNA interkaliert, kann man nekrotische Zellen von apoptotischen unterscheiden. Da die Membran nekrotischer Zellen durchlässig ist, können sowohl PI als auch Annexin V in die Zellen eindringen und die Zellen färben. Apoptotische Zellen sind dagegen nur Annexin V positiv. Mit Hilfe dieser Färbung konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von Notch1 nicht zu einer erhöhten Apoptoserate in den FDCP-mix-Zellen führt.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Caspasen nicht nur in den Prozess der Apoptose involviert sind, sondern noch weitere Funktionen haben. So spielen z. B. Caspase-1, -5 und -11 bei der Reifung von Zytokinen eine Rolle. Für Caspase-3 und Caspase-8 konnte nachgewiesen werden, dass sie in die Proliferation von B- und T-Lymphozyten eingreifen. Aber auch an verschiedenen Differenzierungsprozessen sind Caspasen beteiligt. Besonders gut untersucht ist hierbei Caspase-3, die für die Differenzierung von Erythrozyten, Keratinozyten, Makrophagen und Osteoblasten wichtig ist. Es gibt aber noch weitere Beispiele. Caspase-2 spielt eine Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten und Makrophagen, Caspase-6 bei der Differenzierung von Linsenepithelzellen und Caspase-9 ist an der Differenzierung von Epithelzellen beteiligt (Launay et al., 2005; Lamkanfi et al., 2007).

Da den Caspasen wichtige Funktionen in verschiedenen Differenzierungsprozessen zugewiesen werden konnten und Notch1 auch die Differenzierung von FDCP-mix-Zellen fördert (Schroeder and Just, 2000b; Schroeder et al., 2003), wurde vermutet, dass Notch1 die Differenzierung in hämatopoetischen Vorläuferzellen über die Aktivierung von Caspasen vermittelt. Besonders interessant ist dies vor dem Hintergrund, dass Caspase-3 als direktes Zielgen von Notch1 während der Differenzierung von Keratinozyten beschrieben worden ist (Okuyama et al., 2004). Um dies zu klären, wurde der pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk benutzt. zVAD-fmk bindet an das katalytische Zentrum der

Caspasen und inhibiert dieses irreversibel. In den FDCP-mix-Zellen wurde Notch1 aktiviert und zVAD-fmk in verschiedenen Konzentrationen (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 150  $\mu$ M) zugegeben. Nach drei Tagen sollte die myeloide Differenzierung mit Hilfe einer FACS-Analyse der Oberflächenmarker Sca1 und Mac1 untersucht werden. Diese Marker werden von Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Doch bereits ein Tag nach Zugabe des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk waren die meisten Zellen gestorben und nach drei Tagen waren alle Zellen tot, so dass keine FACS-Analyse mehr durchgeführt werden konnte. Der Zelltod trat unabhängig von der Aktivierung von Notch1 allein durch die Gabe von zVAD-fmk auf. Dies war zunächst erstaunlich, da die Inaktivierung von Caspasen die Apoptose und damit auch den Zelltod verhindern sollte. Andererseits haben auch andere Arbeitsgruppen ähnliche Beobachtungen in verschiedenen Zelllinien gemacht, in denen die Inhibierung der Caspasen durch zVAD-fmk den TNF-vermittelten Zelltod verstärkt (Vercammen et al., 1998; Khwaja and Tatton, 1999; Luschen et al., 2000). Auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit zVAD-fmk Mäuse für die letalen Effekte von TNF $\alpha$  sensibilisiert (Cauwels et al., 2003). Diskutiert wird, dass reaktive Sauerstoffspezies an diesem Zelltod beteiligt sind, da die Behandlung mit dem Radikalfänger Butyl-Hydroxyanisol (BHA) den zVAD-fmk vermittelten Zelltod verhinderte (Vercammen et al., 1998; Luschen et al., 2000). Dies konnte in FDCP-mix-Zellen allerdings nicht bestätigt werden, da die gleichzeitige Gabe von BHA und zVAD-fmk den Zelltod in diesen Zellen nicht inhibierte (Daten nicht gezeigt). Da kein weiterer Caspase-Inhibitor zur Verfügung stand, wurde das Experiment an dieser Stelle beendet. Aus diesem Grund kann keine Aussage darüber gemacht werden, welche Auswirkung die Aktivierung von Caspase-7 durch Notch1 in FDCP-mix-Zellen hat.

Die Verwendung synthetischer Caspase-Inhibitoren ist mit einigen Problemen behaftet. So ähnelt die Struktur der Inhibitoren den Substraten, wodurch das aktive Zentrum der Caspasen blockiert wird. Spezifisch sind die meisten der Caspase-Inhibitoren dadurch nicht. Es gibt daher Inhibitoren wie zVAD-fmk, die auf alle Caspasen wirken. Andere Inhibitoren blockieren eine spezifische Caspase bevorzugt, haben aber meist auch Effekte auf andere Caspasen. Daher ist es schwierig, mit einem Caspase-Inhibitor gezielt nur Caspase-7 zu blockieren. Um die Funktion der Caspase-7 in FDCP-mix-Zellen zu untersuchen, wäre daher entweder die Verwendung einer dominant negativen Isoform der Caspase-7 oder der Einsatz von spezieller siRNA, die spezifisch für Caspase-7 ist, empfehlenswert, um gezielt nur Caspase-7 auszuschalten. Möglich wäre auch, Caspase-7 zu überexprimieren, um somit einen Hinweis für ihre Funktion zu bekommen. Auch wäre

es hilfreich, die im Western Blot gefundene Aktivierung der Caspase-7 durch Notch1 noch einmal auf RNA-Ebene mittels Real-time PCR oder mit Hilfe eines Luciferase-Assays zu bestätigen. Es gibt auch Caspase-Assays, mit deren Hilfe man die Aktivität einer Caspase nachweisen kann. Dabei wird ein an ein Substrat gekoppelter Farbstoff durch die Aktivität der Caspase gespalten und kann dann detektiert werden. Allerdings tritt bei diesen Assays wieder das gleiche Problem wie bei den Caspase-Inhibitoren auf, nämlich, dass es kein spezifisches Substrat gibt, das ausschließlich von Caspase-7 erkannt wird. Daher kann man mit diesem Assay nicht die alleinige Aktivität der Caspase-7 bestimmen.

Generell wäre es auch interessant herauszufinden, ob weitere Caspasen durch Notch1 aktiviert werden können. Die Initiator-Caspasen -8 und -9 wurden zum Beispiel bisher noch nicht betrachtet.

Notch1 ist ein Transmembranrezeptor, der Differenzierungsprozesse, Proliferationsvorgänge und die Apoptose Zellkontext-abhängig regulieren kann. Zusammenfassend konnte diese Arbeit dazu beitragen, die Bedeutung des Notch1-Rezeptors während der Hämatopoese besser zu charakterisieren. Es wurde gezeigt, dass Notch1 die Hämatopoese sowohl auf Differenzierungs- als auch auf Proliferationsebene im Zusammenspiel mit anderen Signalmolekülen reguliert, während die Apoptoserate der hämatopoetischen Zellen durch Notch1 unbeeinflusst blieb. Es wurde nicht nur nachgewiesen, dass Notch1 die erythroide Differenzierung fördert und die Expression von  $\beta$ -Globin erhöht, sondern dass es auch die Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen p53-abhängig inhibiert und dabei die Aktivierung des Zellzyklusinhibitors p21<sup>WAF1/CIP</sup> induziert. Weitere Arbeiten sind nötig, um die zugrunde liegenden mechanistischen Prozesse genauer zu verstehen.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADAM	A disintergrin and metalloprotease
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1
AS	Aminosäure
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM-Rad3-related
BAX	Bcl-2-associated X protein
BHA	Butyl-Hydroxyanisol
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
Ca.	circa
CADASIL	Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy
CDK	Cyclin-dependent kinase
CFSE	Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidyl Ester (auch: CFDA-SE)
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CKI	CDK-Inhibitoren
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CSL	<u>C</u> BF-1; <u>S</u> uppressor of hairless; <u>L</u> ag-1
d	Tag
DISC	Death inducing signal complex
DSL	<u>D</u> elta, <u>S</u> errate, <u>L</u> ag2
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced chemiluminescence
EGF	Epidermal growth factor
eIF	eukaryotische Initiationsfaktoren
EKLF	Erythroid krüppel-like factor
engl.	englisch
EPO	Erythropoietin
EpoR	Erythropoietin-Rezeptor
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas associated death domain
FCS	Fetal Calf Serum
FD <sup>+</sup> CP-mix	<u>f</u> actor <u>d</u> ependent <u>c</u> ell from <u>P</u> aterson institute with <u>m</u> ixed differentiation potential
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fog1	Friend of GATA
HD	Heterodimerisierungsdomäne
HES	Hairy and enhancer of split
HS	hypersensitive Stelle
HSP90	Hitzeschockprotein 90
IC	Intracellular
ICE	Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium.
IL	Interleukin
JAK2	Janus Kinase 2

kB	KiloBasen
LCR	Locus-Kontroll-Region
MAML1	Mastermind-like 1
MDM2	Mouse Double Minute 2
miRNA	microRNA
mRNA	messengerRNA
NERT	<u>N</u> <sup>1C</sup> - <u>E</u> strogen <u>R</u> eceptor- <u>T</u> amoxifen Sensitive Variant
NES	Nuclear Export Sequence
NF-E2	Nuclear factor erythroid derived 2
NLS	Nuclear Localization Sequence
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
OHT	4-Hydroxy-Tamoxifen
PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerase
PCR	Polymerase chain reaction
PI	Propidiumjodid
Pu	Purinbase
Py	Pyrimidinbase
RAM	RBP-J-associated molecule
Rb	Retinoblastoma tumor suppressor protein
RBP-J	Recombination signal binding protein Jkappa
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RPA	Replikationsprotein A
S	Sekunde
SCF	Stem cell factor
SH2	Src-homology 2-Domain
siRNA	small interfering RNA
SV40	Simian Vacuolating Virus 40
TAD	Transaktivierungsdomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TGF	Transforming Growth Factor
TRADD	TNFR associated death domain
U	Unit
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
WAF1	Wild-Type p53 Activated Fragment 1, andere Bezeichnung für p21
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7. Literaturverzeichnis

- Andrews, N.C.: The NF-E2 transcription factor. *Int J Biochem Cell Biol* 30 (1998) 429-32.
- Barlev, N.A., Liu, L., Chehab, N.H., Mansfield, K., Harris, K.G., Halazonetis, T.D. and Berger, S.L.: Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8 (2001) 1243-54.
- Benz, E.J., Jr., Murnane, M.J., Tonkonow, B.L., Berman, B.W., Mazur, E.M., Cavallese, C., Jenko, T., Snyder, E.L., Forget, B.G. and Hoffman, R.: Embryonic-fetal erythroid characteristics of a human leukemic cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (1980) 3509-13.
- Blom, B. and Spits, H.: Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* 24 (2006) 287-320.
- Campbell, K. and Gotz, M.: Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 25 (2002) 235-8.
- Cantor, A.B. and Orkin, S.H.: Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 21 (2002) 3368-76.
- Cao, A. and Moi, P.: Regulation of the globin genes. *Pediatr Res* 51 (2002) 415-21.
- Cauwels, A., Janssen, B., Waeytens, A., Cuvelier, C. and Brouckaert, P.: Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2. *Nat Immunol* 4 (2003) 387-93.
- Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F. and Bartel, D.P.: MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303 (2004) 83-6.
- Chipuk, J.E. and Green, D.R.: Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* 13 (2006) 994-1002.
- Crispino, J.D., Lodish, M.B., MacKay, J.P. and Orkin, S.H.: Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. *Mol Cell* 3 (1999) 219-28.
- de Celis, J.F., Garcia-Bellido, A. and Bray, S.J.: Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development* 122 (1996) 359-69.
- Dekoter, R.P., Kamath, M.B. and Houston, I.B.: Analysis of concentration-dependent functions of PU.1 in hematopoiesis using mouse models. *Blood Cells Mol Dis* (2007).

- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S. and Bradley, A.: Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356 (1992) 215-21.
- Duan, L., Yao, J., Wu, X. and Fan, M.: Growth suppression induced by Notch1 activation involves Wnt-beta-catenin down-regulation in human tongue carcinoma cells. *Biol Cell* 98 (2006) 479-90.
- Dulic, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Reed, S.I.: p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76 (1994) 1013-23.
- Dumortier, A., Wilson, A., MacDonald, H.R. and Radtke, F.: Paradigms of notch signaling in mammals. *Int J Hematol* 82 (2005) 277-84.
- Eckhart, L., Declercq, W., Ban, J., Rendl, M., Lengauer, B., Mayer, C., Lippens, S., Vandenabeele, P. and Tschachler, E.: Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *J Invest Dermatol* 115 (2000) 1148-51.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B.: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75 (1993) 817-25.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Waldman, T., Oliner, J.D., Velculescu, V.E., Burrell, M., Hill, D.E., Healy, E., Rees, J.L., Hamilton, S.R. and et al.: Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 55 (1995) 2910-9.
- Eliyahu, D., Goldfinger, N., Pinhasi-Kimhi, O., Shaulsky, G., Skurnik, Y., Arai, N., Rotter, V. and Oren, M.: Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species. *Oncogene* 3 (1988) 313-21.
- Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D. and Sklar, J.: TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66 (1991) 649-61.
- Enver, T., Heyworth, C.M. and Dexter, T.M.: Do stem cells play dice? *Blood* 92 (1998) 348-51; discussion 352.
- Ever, L. and Gaiano, N.: Radial 'glial' progenitors: neurogenesis and signaling. *Curr Opin Neurobiol* 15 (2005) 29-33.
- Ezoe, S., Matsumura, I., Satoh, Y., Tanaka, H. and Kanakura, Y.: Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Cycle* 3 (2004) 314-8.

- Fernando, P., Kelly, J.F., Balazsi, K., Slack, R.S. and Megeney, L.A.: Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 11025-30.
- Fischer, A. and Gessler, M.: Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res* 35 (2007) 4583-96.
- Fischer, U., Janicke, R.U. and Schulze-Osthoff, K.: Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10 (2003) 76-100.
- Fleming, R.J., Gu, Y. and Hukriede, N.A.: Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene fringe in the dorsal compartment of the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* 124 (1997) 2973-81.
- Ford, A.M., Healy, L.E., Bennett, C.A., Navarro, E., Spooncer, E. and Greaves, M.F.: Multilineage phenotypes of interleukin-3-dependent progenitor cells. *Blood* 79 (1992) 1962-71.
- Francis, J.M., Heyworth, C.M., Spooncer, E., Pierce, A., Dexter, T.M. and Whetton, A.D.: Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis independently of p53 and selectively reduces expression of Bcl-2 in multipotent hematopoietic cells. *J Biol Chem* 275 (2000) 39137-45.
- Gaiano, N., Nye, J.S. and Fishell, G.: Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26 (2000) 395-404.
- Giono, L.E. and Manfredi, J.J.: The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J Cell Physiol* 209 (2006) 13-20.
- Greenberger, J.S.: Expression of hematopoietic growth factor receptors on early hematopoietic precursors: detection and regulation. *Curr Opin Hematol* 7 (2000) 161-7.
- Gu, Y., Turck, C.W. and Morgan, D.O.: Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366 (1993) 707-10.
- Hagenaars, C.E., Kawilarang-de Haas, E.W., van der Kraan, A.A., Spooncer, E., Dexter, T.M. and Nijweide, P.J.: Interleukin-3-dependent hematopoietic stem cell lines capable of osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res* 6 (1991) 947-54.
- Harper, J.A., Yuan, J.S., Tan, J.B., Visan, I. and Guidos, C.J.: Notch signaling in development and disease. *Clin Genet* 64 (2003) 461-72.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J.: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75 (1993) 805-16.

- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. and Haupt, Y.: Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* 116 (2003) 4077-85.
- Heering, J.: Die Interaktion von Notch und p53 in hämatopoetischen Stammzellen. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 2005.
- Heyworth, C.M., Alauldin, M., Cross, M.A., Fairbairn, L.J., Dexter, T.M. and Whetton, A.D.: Erythroid development of the FDCP-Mix A4 multipotent cell line is governed by the relative concentrations of erythropoietin and interleukin 3. *Br J Haematol* 91 (1995) 15-22.
- Heyworth, C.M., Hampson, J., Dexter, T.M., Walker, F., Burgess, A.W., Kan, O., Cook, N., Vallance, S.J. and Whetton, A.D.: Development of multipotential haemopoietic stem cells to neutrophils is associated with increased expression of receptors for granulocyte macrophage colony-stimulating factor: altered biological responses to GM-CSF during development. *Growth Factors* 5 (1991) 87-98.
- Hitoshi, S., Alexson, T., Tropepe, V., Donoviel, D., Elia, A.J., Nye, J.S., Conlon, R.A., Mak, T.W., Bernstein, A. and van der Kooy, D.: Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev* 16 (2002) 846-58.
- Hoffman, R., Murnane, M.J., Benz, E.J., Jr., Prohaska, R., Floyd, V., Dainiak, N., Forget, B.G. and Furthmayr, H.: Induction of erythropoietic colonies in a human chronic myelogenous leukemia cell line. *Blood* 54 (1979) 1182-7.
- Hori, K., Fostier, M., Ito, M., Fuwa, T.J., Go, M.J., Okano, H., Baron, M. and Matsuno, K.: *Drosophila* *deltex* mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development* 131 (2004) 5527-37.
- Hu, Q.D., Ang, B.T., Karsak, M., Hu, W.P., Cui, X.Y., Duka, T., Takeda, Y., Chia, W., Sankar, N., Ng, Y.K., Ling, E.A., Maciag, T., Small, D., Trifonova, R., Kopan, R., Okano, H., Nakafuku, M., Chiba, S., Hirai, H., Aster, J.C., Schachner, M., Pallen, C.J., Watanabe, K. and Xiao, Z.C.: F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell* 115 (2003) 163-75.
- Ishiko, E., Matsumura, I., Ezoe, S., Gale, K., Ishiko, J., Satoh, Y., Tanaka, H., Shibayama, H., Mizuki, M., Era, T., Enver, T. and Kanakura, Y.: Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1. *J Biol Chem* 280 (2005) 4929-39.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R. and Israel, A.: Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377 (1995) 355-8.
- Johnson, D.G. and Walker, C.L.: Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39 (1999) 295-312.

- Just, U., Boettiger, D., Kan, O., Dexter, T.M. and Spooncer, E.: Insertional mutagenesis as a route to identifying genes involved in self renewal of haemopoietic stem cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 251 (2000) 27-34.
- Just, U., Stocking, C., Spooncer, E., Dexter, T.M. and Ostertag, W.: Expression of the GM-CSF gene after retroviral transfer in hematopoietic stem cell lines induces synchronous granulocyte-macrophage differentiation. *Cell* 64 (1991) 1163-73.
- Kang, T.B., Ben-Moshe, T., Varfolomeev, E.E., Pewzner-Jung, Y., Yogeve, N., Jurewicz, A., Waisman, A., Brenner, O., Haffner, R., Gustafsson, E., Ramakrishnan, P., Lapidot, T. and Wallach, D.: Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol* 173 (2004) 2976-84.
- Kato, H., Taniguchi, Y., Kurooka, H., Minoguchi, S., Sakai, T., Nomura-Okazaki, S., Tamura, K. and Honjo, T.: Involvement of RBP-J in biological functions of mouse Notch1 and its derivatives. *Development* 124 (1997) 4133-41.
- Keller, G., Lacaud, G. and Robertson, S.: Development of the hematopoietic system in the mouse. *Exp Hematol* 27 (1999) 777-87.
- Khawaja, A. and Tatton, L.: Resistance to the cytotoxic effects of tumor necrosis factor alpha can be overcome by inhibition of a FADD/caspase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 274 (1999) 36817-23.
- Kim, E., Rohaly, G., Heinrichs, S., Gimnopoulos, D., Meissner, H. and Deppert, W.: Influence of promoter DNA topology on sequence-specific DNA binding and transactivation by tumor suppressor p53. *Oncogene* 18 (1999) 7310-8.
- Kim, Y.T. and Zhao, M.: Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J* 46 (2005) 597-613.
- Knights, C.D., Catania, J., Di Giovanni, S., Muratoglu, S., Perez, R., Swartzbeck, A., Quong, A.A., Zhang, X., Beerman, T., Pestell, R.G. and Avantaggiati, M.L.: Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J Cell Biol* 173 (2006) 533-44.
- Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Shutter, J.R., Maguire, M., Sundberg, J.P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., Smith, G.H., Stark, K.L. and Gridley, T.: Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 14 (2000) 1343-52.
- Kumano, K., Chiba, S., Shimizu, K., Yamagata, T., Hosoya, N., Saito, T., Takahashi, T., Hamada, Y. and Hirai, H.: Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression. *Blood* 98 (2001) 3283-9.
- Kumar, S.: Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14 (2007) 32-43.

- Kuroda, K., Tani, S., Tamura, K., Minoguchi, S., Kurooka, H. and Honjo, T.: Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. *J Biol Chem* 274 (1999) 7238-44.
- Lai, E.C.: Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131 (2004) 965-73.
- Laiosa, C.V., Stadtfeld, M. and Graf, T.: Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol* 24 (2006) 705-38.
- Lam, L.T. and Bresnick, E.H.: A novel DNA-binding protein, HS2NF5, interacts with a functionally important sequence of the human beta-globin locus control region. *J Biol Chem* 271 (1996) 32421-9.
- Lam, L.T. and Bresnick, E.H.: Identity of the beta-globin locus control region binding protein HS2NF5 as the mammalian homolog of the notch-regulated transcription factor suppressor of hairless. *J Biol Chem* 273 (1998) 24223-31.
- Lam, L.T., Ronchini, C., Norton, J., Capobianco, A.J. and Bresnick, E.H.: Suppression of erythroid but not megakaryocytic differentiation of human K562 erythroleukemic cells by notch-1. *J Biol Chem* 275 (2000) 19676-84.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T. and Vandenabeele, P.: Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 14 (2007) 44-55.
- Lane, D.P. and Crawford, L.V.: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278 (1979) 261-3.
- Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E. and Garrido, C.: Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* 24 (2005) 5137-48.
- Lavin, M.F. and Gueven, N.: The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 13 (2006) 941-50.
- Le Borgne, R., Bardin, A. and Schweisguth, F.: The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* 132 (2005) 1751-62.
- Levine, A.J.: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88 (1997) 323-31.
- Li, L., Milner, L.A., Deng, Y., Iwata, M., Banta, A., Graf, L., Marcovina, S., Friedman, C., Trask, B.J., Hood, L. and Torok-Storb, B.: The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1. *Immunity* 8 (1998) 43-55.
- Li, Q., Peterson, K.R., Fang, X. and Stamatoyannopoulos, G.: Locus control regions. *Blood* 100 (2002) 3077-86.

- Liang, S.H. and Clarke, M.F.: Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem* 268 (2001) 2779-83.
- Linzer, D.I. and Levine, A.J.: Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17 (1979) 43-52.
- Luschen, S., Ussat, S., Scherer, G., Kabelitz, D. and Adam-Klages, S.: Sensitization to death receptor cytotoxicity by inhibition of fas-associated death domain protein (FADD)/caspase signaling. Requirement of cell cycle progression. *J Biol Chem* 275 (2000) 24670-8.
- MacKenzie, F., Duriez, P., Wong, F., Nosedà, M. and Karsan, A.: Notch4 inhibits endothelial apoptosis via RBP-Jkappa-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 279 (2004) 11657-63.
- Maier, M.M. and Gessler, M.: Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. *Biochem Biophys Res Commun* 275 (2000) 652-60.
- Maillard, I., Fang, T. and Pear, W.S.: Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu Rev Immunol* 23 (2005) 945-74.
- McGill, M.A. and McGlade, C.J.: Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem* 278 (2003) 23196-203.
- McGrath, K.E. and Palis, J.: Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Exp Hematol* 33 (2005) 1021-8.
- Mercer, W.E., Amin, M., Sauve, G.J., Appella, E., Ullrich, S.J. and Romano, J.W.: Wild type human p53 is antiproliferative in SV40-transformed hamster cells. *Oncogene* 5 (1990a) 973-80.
- Mercer, W.E., Shields, M.T., Amin, M., Sauve, G.J., Appella, E., Romano, J.W. and Ullrich, S.J.: Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990b) 6166-70.
- Metcalf, D.: Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation. *Blood* 92 (1998) 345-7; discussion 352.
- Milner, L.A., Bigas, A., Kopan, R., Brashem-Stein, C., Bernstein, I.D. and Martin, D.I.: Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 13014-9.

- Mizutani, K., Matsubayashi, T., Iwase, S., Doi, T.S., Kasai, K., Yazaki, M., Wada, Y., Takahashi, T. and Obata, Y.: Murine Delta homologue, mDelta1, expressed on feeder cells controls cellular differentiation. *Cell Struct Funct* 25 (2000) 21-31.
- Mohr, O.L.: Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics* 4 (1919) 275-82.
- Moloney, D.J., Panin, V.M., Johnston, S.H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K.D., Haltiwanger, R.S. and Vogt, T.F.: Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* 406 (2000a) 369-75.
- Moloney, D.J., Shair, L.H., Lu, F.M., Xia, J., Locke, R., Matta, K.L. and Haltiwanger, R.S.: Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. *J Biol Chem* 275 (2000b) 9604-11.
- Momand, J., Wu, H.H. and Dasgupta, G.: MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242 (2000) 15-29.
- Morrison, S.J., Perez, S.E., Qiao, Z., Verdi, J.M., Hicks, C., Weinmaster, G. and Anderson, D.J.: Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* 101 (2000) 499-510.
- Murtaugh, L.C., Stanger, B.Z., Kwan, K.M. and Melton, D.A.: Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 14920-5.
- Neves, H., Weerkamp, F., Gomes, A.C., Naber, B.A., Gameiro, P., Becker, J.D., Lucio, P., Clode, N., van Dongen, J.J., Staal, F.J. and Parreira, L.: Effects of Delta1 and Jagged1 on early human hematopoiesis: correlation with expression of notch signaling-related genes in CD34+ cells. *Stem Cells* 24 (2006) 1328-37.
- Niimi, H., Pardali, K., Vanlandewijck, M., Heldin, C.H. and Moustakas, A.: Notch signaling is necessary for epithelial growth arrest by TGF-beta. *J Cell Biol* 176 (2007) 695-707.
- Noseda, M., Chang, L., McLean, G., Grim, J.E., Clurman, B.E., Smith, L.L. and Karsan, A.: Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol* 24 (2004) 8813-22.
- Nuez, B., Michalovich, D., Bygrave, A., Ploemacher, R. and Grosveld, F.: Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature* 375 (1995) 316-8.
- Ogawa, M.: Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81 (1993) 2844-53.

- Ohishi, K., Katayama, N., Shiku, H., Varnum-Finney, B. and Bernstein, I.D.: Notch signalling in hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol* 14 (2003) 143-50.
- Okuyama, R., Nguyen, B.C., Talora, C., Ogawa, E., Tommasi di Vignano, A., Lioumi, M., Chiorino, G., Tagami, H., Woo, M. and Dotto, G.P.: High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. *Dev Cell* 6 (2004) 551-62.
- Olson, N.E., Graves, J.D., Shu, G.L., Ryan, E.J. and Clark, E.A.: Caspase activity is required for stimulated B lymphocytes to enter the cell cycle. *J Immunol* 170 (2003) 6065-72.
- Ordentlich, P., Lin, A., Shen, C.P., Blaumueller, C., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S. and Kadesch, T.: Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Mol Cell Biol* 18 (1998) 2230-9.
- Osborne, B.A. and Minter, L.M.: Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat Rev Immunol* 7 (2007) 64-75.
- Palaga, T., Miele, L., Golde, T.E. and Osborne, B.A.: TCR-mediated Notch signaling regulates proliferation and IFN-gamma production in peripheral T cells. *J Immunol* 171 (2003) 3019-24.
- Palis, J. and Yoder, M.C.: Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol* 29 (2001) 927-36.
- Panin, V.M., Papayannopoulos, V., Wilson, R. and Irvine, K.D.: Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* 387 (1997) 908-12.
- Parks, A.L., Klueg, K.M., Stout, J.R. and Muskavitch, M.A.: Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127 (2000) 1373-85.
- Pece, S., Serresi, M., Santolini, E., Capra, M., Hulleman, E., Galimberti, V., Zurrada, S., Maisonneuve, P., Viale, G. and Di Fiore, P.P.: Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol* 167 (2004) 215-21.
- Perkins, A.C., Sharpe, A.H. and Orkin, S.H.: Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* 375 (1995) 318-22.
- Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H. and Costantini, F.: Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349 (1991) 257-60.

- Pierce, A., Spooncer, E., Wooley, S., Dive, C., Francis, J.M., Miyan, J., Owen-Lynch, P.J., Dexter, T.M. and Whetton, A.D.: Bcr-Abl protein tyrosine kinase activity induces a loss of p53 protein that mediates a delay in myeloid differentiation. *Oncogene* 19 (2000) 5487-97.
- Portin, P.: General outlines of the molecular genetics of the Notch signalling pathway in *Drosophila melanogaster*: a review. *Hereditas* 136 (2002) 89-96.
- Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C. and Pear, W.S.: Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11 (1999) 299-308.
- Purow, B.W., Haque, R.M., Noel, M.W., Su, Q., Burdick, M.J., Lee, J., Sundaresan, T., Pastorino, S., Park, J.K., Mikolaenko, I., Maric, D., Eberhart, C.G. and Fine, H.A.: Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res* 65 (2005) 2353-63.
- Qi, R., An, H., Yu, Y., Zhang, M., Liu, S., Xu, H., Guo, Z., Cheng, T. and Cao, X.: Notch1 signaling inhibits growth of human hepatocellular carcinoma through induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Res* 63 (2003) 8323-9.
- Radtke, F., Wilson, A. and MacDonald, H.R.: Notch signaling in T- and B-cell development. *Curr Opin Immunol* 16 (2004) 174-9.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R. and Aguet, M.: Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10 (1999) 547-58.
- Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J.C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P., Miele, L., Aguet, M., Radtke, F. and Dotto, G.P.: Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *Embo J* 20 (2001) 3427-36.
- Redmond, L., Oh, S.R., Hicks, C., Weinmaster, G. and Ghosh, A.: Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development. *Nat Neurosci* 3 (2000) 30-40.
- Ribeil, J.A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Coulon, S., Moura, I.C., Zeuner, A., Kirkegaard-Sorensen, T., Varet, B., Solary, E., Garrido, C. and Hermine, O.: Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 445 (2007) 102-5.
- Richmond, T.D., Chohan, M. and Barber, D.L.: Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 15 (2005) 146-55.

- Rieber, N.P.: Analyse der Zielgene von Notch bei der Regulation von Proliferation und Differenzierung myeloischer Stamm- und Vorläuferzellen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2004.
- Robey, E., Chang, D., Itano, A., Cado, D., Alexander, H., Lans, D., Weinmaster, G. and Salmon, P.: An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell* 87 (1996) 483-92.
- Rosmarin, A.G., Yang, Z. and Resendes, K.K.: Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp Hematol* 33 (2005) 131-43.
- Rupinder, S.K., Gurpreet, A.K. and Manjeet, S.: Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol* 46 (2007) 383-93.
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., Nakagami-Yamaguchi, E., Hamada, Y., Aizawa, S. and Hirai, H.: Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18 (2003) 675-85.
- Samuel, T., Weber, H.O. and Funk, J.O.: Linking DNA damage to cell cycle checkpoints. *Cell Cycle* 1 (2002) 162-8.
- Santambrogio, L., Potoicchio, I., Fessler, S.P., Wong, S.H., Raposo, G. and Strominger, J.L.: Involvement of caspase-cleaved and intact adaptor protein 1 complex in endosomal remodeling in maturing dendritic cells. *Nat Immunol* 6 (2005) 1020-8.
- Santos, M.A., Sarmiento, L.M., Rebelo, M., Doce, A.A., Maillard, I., Dumortier, A., Neves, H., Radtke, F., Pear, W.S., Parreira, L. and Demengeot, J.: Notch1 engagement by Delta-like-1 promotes differentiation of B lymphocytes to antibody-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007).
- Schafer, K.A.: The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 35 (1998) 461-78.
- Schroeder, T.: Untersuchung der Funktion von aktiviertem Notch bei der Regulation von Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen. Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg, 2001.
- Schroeder, T. and Just, U.: mNotch1 signaling reduces proliferation of myeloid progenitor cells by altering cell-cycle kinetics. *Exp Hematol* 28 (2000a) 1206-13.
- Schroeder, T. and Just, U.: Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. *Embo J* 19 (2000b) 2558-68.
- Schroeder, T., Kohlhof, H., Rieber, N. and Just, U.: Notch signaling induces multilineage myeloid differentiation and up-regulates PU.1 expression. *J Immunol* 170 (2003) 5538-48.

- Schroeder, T., Lange, C., Strehl, J. and Just, U.: Generation of functionally mature dendritic cells from the multipotential stem cell line FDCP-mix. *Br J Haematol* 111 (2000) 890-7.
- Schuldt, A.J. and Brand, A.H.: Mastermind acts downstream of notch to specify neuronal cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Dev Biol* 205 (1999) 287-95.
- Siegel, R.M.: Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* 6 (2006) 308-17.
- Sordet, O., Rebe, C., Plenchette, S., Zermati, Y., Hermine, O., Vainchenker, W., Garrido, C., Solary, E. and Dubrez-Daloz, L.: Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* 100 (2002) 4446-53.
- Sponcer, E., Boettiger, D. and Dexter, T.M.: Continuous in vitro generation of multipotential stem cell clones from src-infected cultures. *Nature* 310 (1984) 228-30.
- Sponcer, E., Heyworth, C.M., Dunn, A. and Dexter, T.M.: Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Differentiation* 31 (1986) 111-8.
- Sriuranpong, V., Borges, M.W., Ravi, R.K., Arnold, D.R., Nelkin, B.D., Baylin, S.B. and Ball, D.W.: Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 61 (2001) 3200-5.
- Stamatoyannopoulos, G.: Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp Hematol* 33 (2005) 259-71.
- Sugimoto, A., Yamamoto, M., Suzuki, M., Inoue, T., Nakamura, S., Motoda, R., Yamasaki, F. and Orita, K.: Delta-4 Notch ligand promotes erythroid differentiation of human umbilical cord blood CD34+ cells. *Exp Hematol* 34 (2006) 424-32.
- Sweeney, C., Morrow, D., Birney, Y.A., Coyle, S., Hennessy, C., Scheller, A., Cummins, P.M., Walls, D., Redmond, E.M. and Cahill, P.A.: Notch 1 and 3 receptor signaling modulates vascular smooth muscle cell growth, apoptosis, and migration via a CBF-1/RBP-Jk dependent pathway. *Faseb J* 18 (2004) 1421-3.
- Talbot, D. and Grosveld, F.: The 5'HS2 of the globin locus control region enhances transcription through the interaction of a multimeric complex binding at two functionally distinct NF-E2 binding sites. *Embo J* 10 (1991) 1391-8.
- Testa, U.: Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia* 18 (2004) 1176-99.

- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J. and et al.: A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356 (1992) 768-74.
- Todd, R., Hinds, P.W., Munger, K., Rustgi, A.K., Opitz, O.G., Suliman, Y. and Wong, D.T.: Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 13 (2002) 51-61.
- Tsai, S.F., Martin, D.I., Zon, L.I., D'Andrea, A.D., Wong, G.G. and Orkin, S.H.: Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 339 (1989) 446-51.
- Tun, T., Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Furukawa, T., Honjo, T. and Kawaichi, M.: Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res* 22 (1994) 965-71.
- Valtieri, M., Tweardy, D.J., Caracciolo, D., Johnson, K., Mavilio, F., Altmann, S., Santoli, D. and Rovera, G.: Cytokine-dependent granulocytic differentiation. Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line. *J Immunol* 138 (1987) 3829-35.
- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W. and Vandenabeele, P.: Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 187 (1998) 1477-85.
- Vousden, K.H.: Outcomes of p53 activation--spoilt for choice. *J Cell Sci* 119 (2006) 5015-20.
- Walker, L., Lynch, M., Silverman, S., Fraser, J., Boulter, J., Weinmaster, G. and Gasson, J.C.: The Notch/Jagged pathway inhibits proliferation of human hematopoietic progenitors in vitro. *Stem Cells* 17 (1999) 162-71.
- Wang, Z., Zhang, Y., Li, Y., Banerjee, S., Liao, J. and Sarkar, F.H.: Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5 (2006) 483-93.
- Washburn, T., Schweighoffer, E., Gridley, T., Chang, D., Fowlkes, B.J., Cado, D. and Robey, E.: Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell* 88 (1997) 833-43.
- Weijzen, S., Zlobin, A., Braid, M., Miele, L. and Kast, W.M.: HPV16 E6 and E7 oncoproteins regulate Notch-1 expression and cooperate to induce transformation. *J Cell Physiol* 194 (2003) 356-62.
- Weinberg, W.C. and Denning, M.F.: P21Waf1 control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit Rev Oral Biol Med* 13 (2002) 453-64.

- Wolfer, A., Bakker, T., Wilson, A., Nicolas, M., Ioannidis, V., Littman, D.R., Lee, P.P., Wilson, C.B., Held, W., MacDonald, H.R. and Radtke, F.: Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development. *Nat Immunol* 2 (2001) 235-41.
- Woo, M., Hakem, R., Furlonger, C., Hakem, A., Duncan, G.S., Sasaki, T., Bouchard, D., Lu, L., Wu, G.E., Paige, C.J. and Mak, T.W.: Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nat Immunol* 4 (2003) 1016-22.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R. and Lodish, H.F.: Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83 (1995) 59-67.
- Wu, L., Aster, J.C., Blacklow, S.C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S. and Griffin, J.D.: MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet* 26 (2000) 484-9.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D.: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366 (1993) 701-4.
- Yamamoto, N., Yamamoto, S., Inagaki, F., Kawaichi, M., Fukamizu, A., Kishi, N., Matsuno, K., Nakamura, K., Weinmaster, G., Okano, H. and Nakafuku, M.: Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J Biol Chem* 276 (2001) 45031-40.
- Yang, X., Klein, R., Tian, X., Cheng, H.T., Kopan, R. and Shen, J.: Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway. *Dev Biol* 269 (2004) 81-94.
- Yu, X., Alder, J.K., Chun, J.H., Friedman, A.D., Heimfeld, S., Cheng, L. and Civin, C.I.: HES1 inhibits cycling of hematopoietic progenitor cells via DNA binding. *Stem Cells* 24 (2006) 876-88.
- Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E. and Hermine, O.: Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 193 (2001) 247-54.
- Zhong, W., Feder, J.N., Jiang, M.M., Jan, L.Y. and Jan, Y.N.: Asymmetric localization of a mammalian numb homolog during mouse cortical neurogenesis. *Neuron* 17 (1996) 43-53.
- Zimber-Strobl, U. and Strobl, L.J.: EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin Cancer Biol* 11 (2001) 423-34.
- Zweidler-McKay, P.A., He, Y., Xu, L., Rodriguez, C.G., Karnell, F.G., Carpenter, A.C., Aster, J.C., Allman, D. and Pear, W.S.: Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. *Blood* 106 (2005) 3898-906.

## 8. Eigene Veröffentlichungen

Henning, K.; Schroeder, T.; Schwanbeck, R.; Rieber, N.; Bresnick, E.; Just, U.  
mNotch1 signaling and erythropoietin cooperate in erythroid differentiation of multipotent progenitor cells and upregulate  $\beta$ -globin.

*Experimental Hematology, Volume 35, Issue 9, September 2007, Pages 1321-1332*

Henning, K.; Heering, J.; Schwanbeck, R.; Schroeder, T.; Helmbold, H.; Kim, E.; Deppert, W.; Schäfer, H.; Just, U.

Notch1 activation reduces proliferation in multipotent hematopoietic progenitor cells through a p53-dependent pathway but Notch1 effects on myeloid and erythroid differentiation are independent of p53.

*Cell Death & Differentiation, in Revision*

Schwanbeck, R.; Schroeder T.; Henning, K.; Kohlhof, H.; Rieber, N.; Erfurth, M.-L.; Just, U.

Notch signaling in embryonic and adult myelopoiesis.

*Cell Tissues Organs, in Revision*

## 9. Lebenslauf

Name: Konstanze Henning  
Geburtsdatum: 30. März 1980  
Geburtsort: Bernburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch

- Oktober 2004 – September 2007 Anfertigung der vorliegenden Arbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Just, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität, Kiel
- Oktober 2003 – September 2004 Anfertigung der Diplomarbeit bei der Jenapharm GmbH und Co. KG, Jena  
„Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen dem Androgenrezeptor und dem Transkriptionsfaktor FoxG1“
- Oktober 1999 – September 2004 Studium der Biochemie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
- August 1998 – Juni 1999 Soziales Jahr, Camphill Community Kyle, Callan, Irland
- August 1991 - Juli 1998 Gymnasium Carolinum, Bernburg  
Abschluss: Abitur

## 10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich in den letzten drei Jahren auf unterschiedliche Weise unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt hierbei Frau Prof. Dr. U. Just für die Betreuung und Unterstützung der Arbeit sowie für die hilfreichen Diskussionen.

Für die Übernahme des Referats und der damit verbundenen Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. S. Rose-John recht herzlich.

Herrn Prof. Dr. Dr. T. Bosch danke ich für die Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Bei Herrn Dr. R. Schwanbeck bedanke ich mich für die große Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Hinweise. Herrn Dr. T. Höfken danke ich für den einen oder anderen nützlichen Tipp im Laboralltag.

Ein großes Dankeschön geht an Frau S. Horn für ihre Hilfsbereitschaft und die vielfältige Unterstützung, nicht nur bei technischen Fragen.

Bei allen anderen Mitarbeitern der AG Just möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Für die Möglichkeit der Nutzung und die freundliche Reservierung des Luminometers danke ich Frau PD Dr. S. Sebens aus der Klinik für Allgemeine Innere Medizin und für die Möglichkeit der Nutzung des Real-time PCR Gerätes Herrn Dr. R. Häsler vom Institut für Klinische Molekularbiologie.

## **11. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Konstanze Henning, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Quellen und Hilfsmittel unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt habe.

Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Fakultät zur Begutachtung vorgelegt.

Ich erkläre hiermit, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Kiel, den 24. September 2007

Konstanze Henning