

Identifizierung und differentielle Expression von  
Notch1-Zielgenen in murinen embryonalen Stammzellen  
und während der frühen mesodermalen Differenzierung



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Franziska Meier-Stiegen

Kiel,

Dezember 2007



Referent: Prof. Dr. Rose-John

Korreferent/in:.....

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Zum Druck genehmigt: Kiel,.....

Der Dekan

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Signaltransduktion mittels Notch .....	1
1.1.1 Struktureller Aufbau der Notch-Rezeptoren und ihrer Liganden.....	1
1.1.1.1 Notch .....	2
1.1.1.2 Die Liganden Jagged und Delta-like .....	3
1.1.2 Der Notch-Signalweg .....	3
1.1.3 Effekte von Notch auf Differenzierung, Proliferation und Apoptose .....	5
1.1.3.1 Unterschiedliche Mechanismen der Aktivierung von Notch .....	6
1.1.3.1.1 Laterale Inhibition .....	6
1.1.3.1.2 Asymmetrische Zellteilung .....	6
1.1.3.1.3 Interaktion zwischen Zellen verschiedener Populationen .....	7
1.1.3.2 Einfluss von Notch auf die ektodermale Differenzierung.....	7
1.1.3.3 Einfluss von Notch auf die endodermale Differenzierung .....	8
1.1.3.4 Einfluss von Notch auf die mesodermale Differenzierung .....	8
1.1.4 Auswirkungen der Mutationen von Notch <i>in vivo</i> .....	10
1.1.4.1 Mutationen von Notch bedingen Krankheitsbilder beim Menschen.....	10
1.1.4.2 Phänotypen transgener Mäuse mit inaktivierenden Mutationen im Notch-Signalweg .....	11
1.1.5 Regulation des Notch-Signalweges.....	11
1.1.5.1 Ligandenverfügbarkeit.....	11
1.1.5.2 Glykosylierung von Notch .....	11
1.1.5.3 Rezeptor- und Ligandenendozytose .....	12
1.1.5.4 Intrazelluläre Antagonisten von Notch.....	13
1.1.5.5 Zielgene von Notch .....	13
1.1.5.6 Regulation der differentiellen Expression der Zielgene .....	14
1.1.6 Das Tamoxifen-System zur konditionellen Induktion von Notch.....	16
1.2 Parakrine Signaltransduktionswege.....	18
1.2.1 Die Wnt-Signaltransduktionswege .....	18
1.2.2 Die Familie der Hedgehog-Proteine .....	19
1.2.3 <i>Fibroblast Growth Factors</i> .....	20
1.2.4 Die TGF- $\beta$ Superfamilie.....	21
1.3 Embryonalentwicklung der Maus.....	22

1.3.1 Die Entwicklung pluripotenter Stammzellen .....	23
1.3.2 Entstehung spezifischer Gewebetypen in den drei Keimblättern.....	24
1.3.2.1 Ektodermale Zell- und Gewebetypen .....	24
1.3.2.2 Endodermale Zell- und Gewebetypen .....	25
1.3.2.3 Mesodermale Zell- und Gewebetypen.....	25
1.4 Fragestellung .....	28
2. Material.....	30
2.1 Zelllinien.....	30
2.1.1 Murine embryonale Stammzellen.....	30
2.1.2 Murine adulte Stammzellen.....	30
2.1.3 Murine Stromazellen .....	30
2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	31
2.2.1 Geräte .....	31
2.2.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien .....	32
2.3 Chemikalien.....	32
2.4 Seren .....	33
2.4.1 Fötale Kälberseren.....	33
2.4.2 Pferdeserum .....	33
2.4.3 Serumersatz .....	34
2.5 Medien .....	34
2.6 Antikörper.....	34
2.7 <i>Real-Time RT-PCR</i> -Sonden.....	34
2.8 siRNA .....	35
2.9 Testkits .....	36
2.10 Puffer, Lösungen und Medien .....	36
2.10.1 Zusammensetzungen .....	36
2.10.2 Fertige Puffer und Reagenzien .....	39
2.11 Software zur statistischen Analyse und Dokumentation von Resultaten .....	39
3. Methoden .....	40
3.1 Zellkulturmethoden .....	40
3.1.1 Kultivierung von Zellen .....	40
3.1.1.1 Halten undifferenzierter embryonaler Stammzellen.....	40
3.1.1.2 Halten von OP9-Stromazellen.....	40
3.1.1.3 Halten von FDCP-mix Zellen.....	41

3.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien.....	41
3.1.3 Kontrolle der Zellen auf Kontamination durch Mycoplasmen.....	41
3.1.4 Transfektion von Zellen mit siRNA .....	42
3.1.5 Differenzierung embryonaler Stammzellen.....	42
3.1.5.1 Kokultur mit OP9-Stromazellen.....	42
3.1.5.2 Inkubation auf Kollagen IV.....	43
3.1.6 Untersuchung embryonaler Stammzellen in verschiedenen Kulturbedingungen .....	43
3.2 Durchflusszytometrie .....	44
3.2.1 Durchführung .....	44
3.2.2 Auswertung.....	45
3.3 RNA-Methoden .....	46
3.3.1 Isolierung von RNA .....	46
3.3.2 Konzentrationsbestimmung von RNA .....	46
3.3.3 Kontrolle der RNA auf Degradation .....	46
3.3.4 Langzeitlagerung der RNA.....	47
3.4 Synthese einzelsträngiger cDNA.....	47
3.5 <i>Real-Time RT-PCR</i> .....	47
3.5.1 PCR.....	48
3.5.2 Auswertung.....	48
3.6 <i>Microarrays</i> .....	49
3.6.1 Überprüfung von RNA und cRNA mittels Gelelektrophorese.....	50
3.6.2 Synthese doppelsträngiger cDNA .....	50
3.6.3 <i>In vitro</i> Transkription doppelsträngiger cDNA .....	50
3.6.4 Fragmentierung der cRNA .....	51
3.6.5 Hybridisierung, Färben und Scannen der <i>Microarrays</i> .....	51
3.6.6 Auswertung.....	51
3.7 Statistik.....	52
4. Ergebnisse.....	53
4.1 Überblick .....	53
4.2 Einfluss von Notch1 auf die initialen Schritte der mesodermalen Differenzierung..	54
4.2.1 Die Aktivierung von Notch1 blockiert die Bildung mesodermaler Vorläuferzellen .....	55
4.2.2 Kinetik der Expression von Flk-1 während der mesodermalen Differenzierung	57

4.2.3 Die zeitweilige Aktivierung von Notch1 inhibiert die Bildung Flk-1 <sup>+</sup> Zellen...	59
4.3 Identifikation von Notch1-Zielgenen .....	62
4.3.1 Experimenteller Aufbau der Suche nach Zielgenen von Notch1 .....	63
4.3.2 Die Aktivierung von Notch1 induziert die Expression bekannter Notch-Zielgene .....	65
4.3.3 Auswertung der Rohdaten der <i>Microarrays</i> zur Identifizierung und zur Zellkontextabhängigkeit von Notch1-Zielgenen.....	67
4.3.4 Auswahl potentieller Notch1-Zielgene zur weiteren Analyse.....	70
4.4 Analyse der differentiellen Expression potentieller Notch1-Zielgene .....	74
4.4.1 Differentielle Expression verschiedener <i>Hes</i> - und <i>Hey</i> -Gene nach Aktivierung von Notch1 .....	76
4.4.2 Differentielle Expression der <i>Id</i> -Gene nach Aktivierung von Notch1 .....	86
4.4.3 Differentielle Expression von <i>Myf5</i> , <i>Pax6</i> , <i>Runx1</i> und <i>Sox9</i> nach Aktivierung von Notch1 .....	94
4.5 Etablierung eines Systems zur Untersuchung der biologischen Relevanz der Notch1-Zielgene während der mesodermalen Differenzierung .....	101
5. Diskussion .....	107
6. Zusammenfassung.....	130
7. Summary.....	131
8. Literaturverzeichnis .....	132
Appendix A: Liste der in den <i>Microarrays</i> durch Notch1 regulierten Gene und ESTs....	147
Appendix B: Abkürzungsverzeichnis.....	160
Appendix C: Publikation .....	163
Lebenslauf.....	164
Danksagung .....	165
Eidesstattliche Erklärung.....	166

# 1. Einleitung

## 1.1 Signaltransduktion mittels Notch

Die Entwicklung eines komplexen Organismus aus einer totipotenten Zelle bedarf einer Vielzahl miteinander verknüpfter und einander bedingender Signale, welche die koordinierte Proliferation und Differenzierung der Zellen initiieren und kontrollieren. Durch extrinsische und intrinsische Signale erfolgt die zeitliche und räumliche Koordinierung der Differenzierung. Die Signale können sowohl aktivierende als auch inhibierende Wirkung haben und nehmen auch auf die Apoptose und die Regulation des Zellzyklus Einfluss. So entstehen in den verschiedenen Zell- und Gewebetypen des Organismus einerseits terminal differenzierte Zellen, andererseits multipotente adulte Stammzellen. Um die molekularen Mechanismen von Zelllinienentscheidungen zu verstehen, ist die Untersuchung der Signaltransduktion von entscheidender Bedeutung.

Die Übermittlung von Signalen zwischen Zellen kann auf verschiedene Arten erfolgen. Neben den endokrinen Faktoren, den Hormonen, deren Wirkung sich auch auf weit entfernte Zielzellen erstrecken kann, wirken parakrin sezernierte Faktoren auf Zellen in näherer Umgebung. Der direkte Kontakt zwischen zwei Zellen durch die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor, der das Signal aufnimmt und ins Innere der Zelle weiterleitet, ist eine weitere Möglichkeit der Signalübertragung. Sie wird als juxtakrin bezeichnet.

### 1.1.1 Struktureller Aufbau der Notch-Rezeptoren und ihrer Liganden

Der Notch-Signalweg gehört zur Gruppe der Letztgenannten, wobei Notch den Rezeptor der signalempfangenden Zelle darstellt. Notch wurde ursprünglich in *Drosophila melanogaster* entdeckt und nach dem Phänotyp benannt, der bei Haploinsuffizienz von Notch durch Einkerbungen an den Flügeln gekennzeichnet ist (Mohr, 1919; Übersichten bei Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Bolos *et al.*, 2007; Lefevre *et al.*, 1953). Der Notch-Signalweg stellt einen im Bereich der Vielzeller stark konservierten Mechanismus der Signalübertragung dar, welcher kontextabhängig eine Vielzahl von Zelllinienentscheidungen in Zellen aller drei Keimblätter beeinflusst (Artavanis-Tsakonas



*et al.*, 1999). Dieser Einfluss reicht dabei von der Embryonalentwicklung bis hin zu adulten Zellen.

#### 1.1.1.1 Notch

Die vier homologen Proteine in Säugetieren, Notch1-4, unterscheiden sich in ihrem Aufbau nur geringfügig und besitzen konservierte Domänen (Lubman *et al.*, 2004). Die Funktion dieser vier Homologe in verschiedenen Zellen ist z. T. potentiell redundant. Eine vollständige Redundanz ist auszuschließen, nachdem die Deletion einzelner Notch-Gene (Notch1 und Notch2) zur Letalität von Mäusen während der Embryonalentwicklung führt (s. 1.1.4.2). In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich die Auswirkungen von murinem Notch1 untersucht. Notch, ein Typ-I-Transmembranprotein mit einer Größe von ca. 300 kDa (Übersicht bei Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999), wird im trans-Golgi-Netzwerk durch eine Furin-ähnliche Konvertase gespalten und an der Zellmembran als Heterodimer präsentiert, wobei extra- und intrazellulärer Teil nicht kovalent aneinander gebunden sind (Blaumueller *et al.*, 1997; Logeat *et al.*, 1998; Rand *et al.*, 2000).

Der extrazelluläre Teil aller vier Notch-Rezeptoren (s. Abbildung 1.1) besteht zunächst aus einer Abfolge EGF-ähnlicher Motive (*Epidermal Growth Factor*), deren Zahl zwischen 29 und 36 variiert. Sie sind für die Bindung der Liganden zuständig und können, ebenfalls im trans-Golgi-Netzwerk, durch die Glykosyltransferasen Radical Fringe, Maniac Fringe und Lunatic Fringe modifiziert werden. Drei daran anschließende LIN12/Notch-Wiederholungen (LNR) verhindern die Signaltransduktion in Abwesenheit eines Liganden. Der intrazelluläre Teil ist über eine Transmembrandomäne und ein kurzes extrazelluläres Stück mit der Heterodimerisierungsdomäne des extrazellulären Teils nicht kovalent verbunden (Rand *et al.*, 2000). Neben diesem kurzen extrazellulären Stück und der Transmembrandomäne zählen zum intrazellulären Teil von Notch zunächst eine mRAM23-Domäne und sechs Ankyrin/Cdc10-Wiederholungen, wobei die letzteren von zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS) flankiert werden. Die Transaktivierungsdomäne TAD konnte bisher nur in Notch1 und Notch2 nachgewiesen werden. Im C-terminalen Bereich des intrazellulären Teils von Notch finden sich eine OPA- und eine PEST-Sequenz, welche das Protein für die Degradierung markieren (Übersichten bei Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Bolos *et al.*, 2007; Bray, 2006; Radtke *et al.*, 2005).

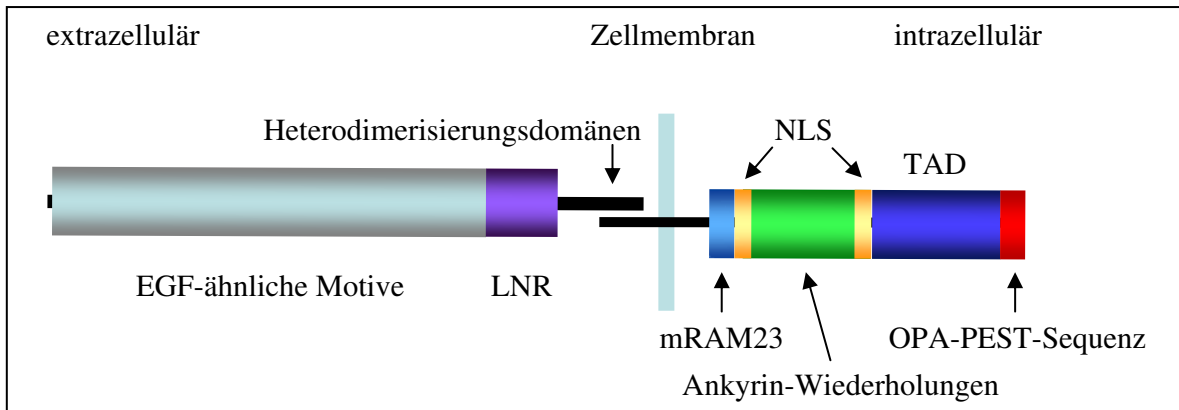


Abb. 1.1: Struktureller Aufbau von Notch1. Schematische Darstellung der einzelnen Domänen von murinem Notch1. LNR: LIN12/Notch-Wiederholungen; NLS: Kernlokalisationssequenz; TAD: Transaktivierungsdomäne.

#### 1.1.1.2 Die Liganden Jagged und Delta-like

Die in Säugetieren bekannten Liganden gehören zwei Untergruppierungen an: Jagged1 und Jagged2 sind Homologe des Liganden Serrate aus *D. melanogaster*, Delta-like 1,3 und 4 dagegen Homologe des Liganden Delta aus *D. melanogaster*. Alle sind ebenfalls Typ-I-Transmembranproteine und besitzen am N-terminalen Ende eine DSL-Domäne, gefolgt von EGF-ähnlichen Motiven, deren Anzahl zwischen den einzelnen Liganden variiert. Jagged1 und 2 besitzen darüber hinaus ebenfalls im extrazellulären Teil des Liganden eine Cystein-reiche Domäne (Übersichten bei Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Bolos *et al.*, 2007; Bray, 2006; Radtke *et al.*, 2005). In *D. melanogaster* wird die potentielle Bindungsfähigkeit eines Liganden an den Rezeptor durch die Glykosylierung des Rezeptors mit beeinflusst (Übersicht bei Bray, 2006; siehe auch 1.1.6.2).

#### 1.1.2 Der Notch-Signalweg

Die Bindung zwischen dem Liganden und dem extrazellulären Teil von Notch führt zu dessen Internalisierung in die signalgebende Zelle. Die daraus resultierende Änderung der Konformation löst zwei aufeinander folgende Spaltungsreaktionen aus (s. Abbildung 1.2): in einem ersten Schritt schneidet die ADAM-Protease TACE (*tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting-enzyme*) im extrazellulären Bereich des intrazellulären Teils von Notch und ermöglicht dadurch eine weitere Spaltung im Bereich der Transmembrandomäne. Dieser zweite Schritt wird durch einen  $\gamma$ -Sekretase-Komplex katalysiert, der u. a. aus Presenilin

und Nicastrin besteht. Er resultiert in der vollständigen Abspaltung des intrazellulären Teils von Notch, welcher daraufhin in den Kern transloziert (Übersicht u. a. bei Bolos *et al.*, 2007).

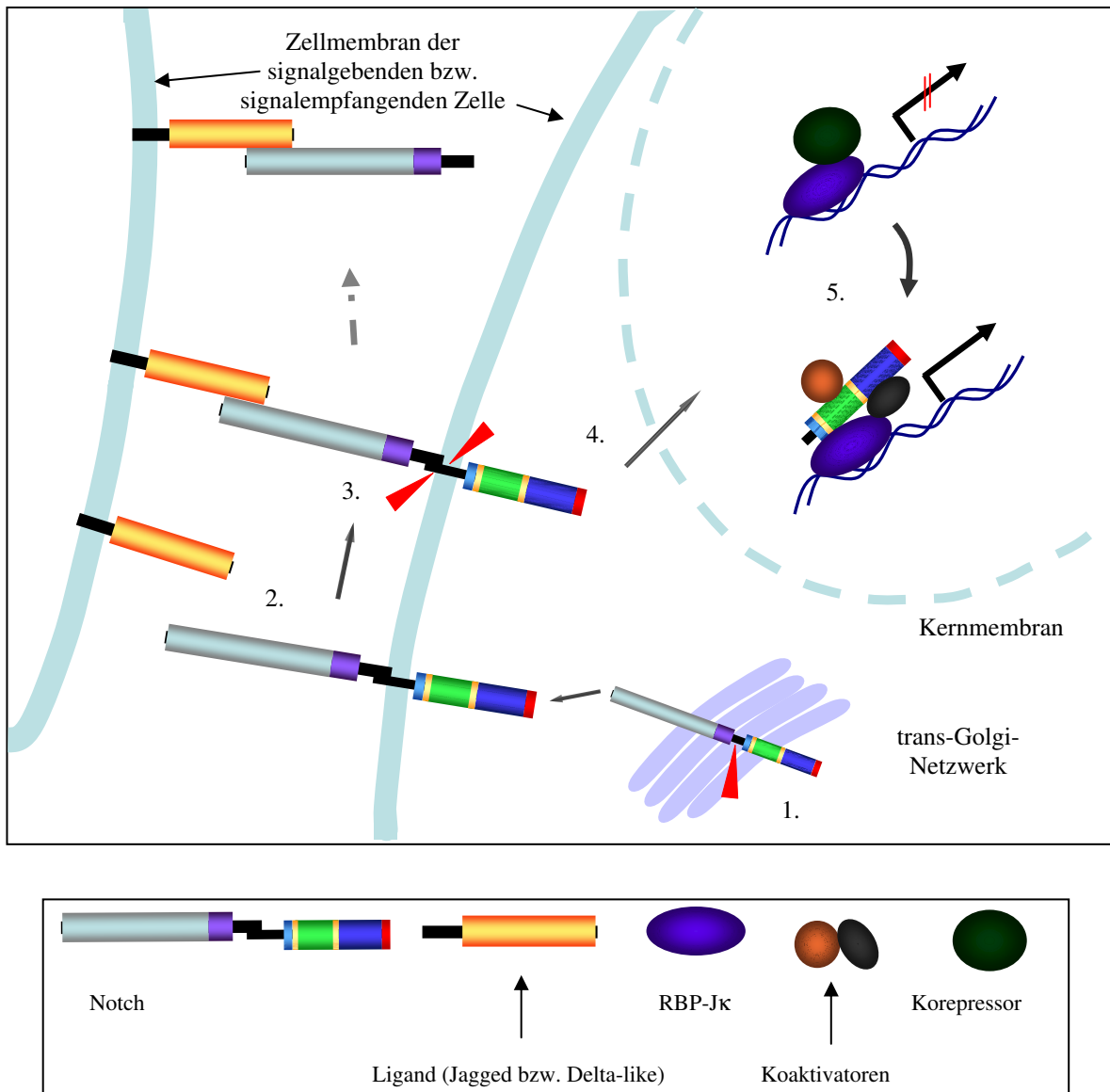


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des kanonischen Notch-Signalwegs. Die Ziffern innerhalb der Abbildung bezeichnen die folgenden Schritte des Notch-Signalwegs; rote Pfeile die Spaltungsreaktionen:

1. Spaltung von Notch durch eine Furin-ähnliche Konvertase im trans-Golgi-Netzwerk.
2. Präsentation von Notch als Heterodimer und darauf folgende Bindung des Liganden.
3. Bindung des Liganden löst die Internalisierung des extrazellulären Teils in die signalgebende Zelle und daraus resultierend zwei Spaltungsreaktionen durch TACE und  $\gamma$ -Sekretase-Komplex aus.
4. Translokation des intrazellulären Teils von Notch.
5. Bindung von Notch an RBP-J $\kappa$  führt zu dessen Umwandlung vom transkriptionellen Repressor zum transkriptionellen Aktivator. In Verbindung mit Koaktivatoren erfolgt die Transkription von Zielgenen.

Dort bindet die mRAM23-Domäne an RBP-J $\kappa$ , das auch CSL genannt wird (CBF1 beim Menschen, Supressor of Hairless in *D. melanogaster* bzw. LAG in *C. elegans*) (Tamura *et al.*, 1995). Infolgedessen wird RBP-J $\kappa$  vom transkriptionellen Repressor zum transkriptionellen Aktivator umgewandelt und initiiert in Verbindung mit Koaktivatoren die Expression von Zielgenen. Solange der intrazelluläre Teil von Notch nicht im Zellkern vorliegt, bildet RBP-J $\kappa$  einen Komplex mit verschiedenen Korepressoren (Übersicht bei Bolos *et al.*, 2007; Mumm und Kopan, 2000). Der intrazelluläre Teil von Notch verfügt zwar über eine Domäne zur Aktivierung der Transkription, jedoch nicht über eine Domäne zur Bindung von DNA. Infolgedessen ist die Interaktion mit weiteren Faktoren wie RBP-J $\kappa$  essentiell, um die Expression von Zielgenen zu induzieren (Pedrazzini, 2007).

Neben diesem kanonischen Signaltransduktionsweg, der die Bindung von RBP-J $\kappa$  mit einschließt, gibt es Hinweise auf die RBP-J $\kappa$ -unabhängige Aktivierung des Notch-Signalwegs. In *D. melanogaster* wird dies wahrscheinlich über die Ubiquitin-Ligase Deltex vermittelt. In Säugetieren sind vier verschiedene Homologe von Deltex bekannt (Übersicht bei Le Borgne *et al.*, 2005), der genaue Mechanismus ist bisher unbekannt (Hori *et al.*, 2004; Wilkin *et al.*, 2004).

### 1.1.3 Effekte von Notch auf Differenzierung, Proliferation und Apoptose

Trotz des einfachen Aufbaus der Signaltransduktion innerhalb der Zelle, die keinen sekundären Botenstoff benötigt, ist Notch für eine Vielzahl verschiedener Effekte in unterschiedlichen Zellen verantwortlich. Die Auswirkungen von Notch sind äußerst vielfältig und reichen von der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustands von Zellen über die Induktion der Differenzierung bis hin zur Apoptose. Notch kann in Zellen von pluripotenten embryonalen Stammzellen bis hin zu adulten Zellen aller drei Keimblätter aktiviert werden, was im Folgenden kurz dargestellt werden soll. Dabei kann sowohl zwischen der Art der durch Notch bewirkten Effekte unterschieden werden als auch zwischen den Zell- und Gewebetypen, an deren Differenzierung Notch maßgeblich beteiligt ist. Die Entstehung dieser Gewebetypen im Zuge der Embryonalentwicklung wird unter 1.3.2 genauer behandelt werden.

### 1.1.3.1 Unterschiedliche Mechanismen der Aktivierung von Notch

#### 1.1.3.1.1 Laterale Inhibition

Bei der Charakterisierung von Notch beeinflusster Effekte kann die Signaltransduktion zwischen Zellen der gleichen oder aus unterschiedlichen Populationen stattfinden. Gehören sowohl die signalgebende Zelle als auch die signalempfangende Zelle der gleichen Population an, exprimieren beide zunächst sowohl Liganden als auch Rezeptoren in annähernd gleicher Konzentration. Die Aktivierung des Notch-Signalwegs bewirkt eine Verstärkung dieser geringen Unterschiede im Verhältnis von Rezeptor zu Ligand. Die Zelle, die die höhere Zahl an Liganden aufweist, bewirkt, dass die ihr benachbarten Zellen die Expression und damit die Synthetisierung von Liganden reprimieren. Dieser Vorgang, der durch negative Rückkopplung gesteuert wird, resultiert darin, dass Zellen aus ehemals einer Population gleicher Zellen verschiedene Differenzierungsrichtungen einschlagen (Übersichten bei Bolos *et al.*, 2007; Bray, 2006).

Der Mechanismus der lateralen Inhibition spielt sowohl bei der frühen Neurogenese in *D. melanogaster* als auch bei der Entwicklung bestimmter Zellen des Innenohrs von Vertebraten eine Rolle. Wodurch die anfänglichen Konzentrationsunterschiede von Rezeptor und Ligand auf den einzelnen Zellen herrühren, ist bisher nicht bekannt (Übersichten bei Bolos *et al.*, 2007; Bray, 2006).

#### 1.1.3.1.2 Asymmetrische Zellteilung

Zellen, die ursprünglich einer Population angehörten, können nicht nur durch laterale Inhibition in unterschiedliche Zielzellen differenzieren. Auch durch polares Wachstum und daraus resultierende asymmetrische Zellteilungen entstehen zwei Tochterzellen, von denen zumindest eine nicht demselben Zelltyp wie die Mutterzelle entspricht. Bezogen auf den Notch-Signalweg handelt es sich hierbei um die polare Expression verschiedener Regulatoren wie z. B. Numb (s. 1.1.5.4). Dieser Mechanismus bewirkt die ungleichmäßige Verteilung des entsprechenden Regulators während der Zellteilung auf die beiden Tochterzellen. Eine der beiden entstehenden Zellen entspricht phänotypisch der Ausgangszelle, die andere nicht. Nachgewiesen werden konnte dieser Mechanismus bei der Differenzierung von Zellen des *SOP* (Sensory Organ Precursor) in *D. melanogaster* (Jan und Jan, 1998; Übersichten bei Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Bray, 2006). In Säugern bewirkt beispielsweise ACBD3, welches im Verlauf des Zellzyklus aus dem Golgiapparat in das Zytoplasma freigesetzt wird, die Regulation der Signalübermittlung

durch Numb und somit die asymmetrische Zellteilung neuronaler Vorläuferzellen in ein Neuron und eine neuronale Vorläuferzelle (Zhou *et al.*, 2007). Bei der Teilung von T-Zellen in Effektorzellen und Gedächtniszellen während einer adaptiven Immunantwort wird Numb asymmetrisch in den Tochterzellen exprimiert (Chang *et al.*, 2007).

#### 1.1.3.1.3 Interaktion zwischen Zellen verschiedener Populationen

Die differentielle Expression verschiedener Komponenten des Notch-Signalwegs in benachbarten Zellen unterschiedlichen Typus kann deren gezielte Differenzierung bewirken. Die differentielle Expression wird dabei durch extrinsische Signale beeinflusst. In *D. melanogaster* beispielsweise bewirkt ein durch den Wnt-Signalweg übermitteltes Signal die Induktion der Expression des Liganden Delta in den R3-Vorläuferzellen des sich entwickelnden Auges. Diese Induktion bewirkt eine Aktivierung von Notch in den benachbarten R4-Vorläuferzellen und damit deren weitere Differenzierung (Übersicht bei Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Die differentielle Expression der Fringe-Glykosyltransferasen in bestimmten Zelltypen kann ebenso wie deren positive oder negative Rückkopplung die Aktivierung von Notch in angrenzenden Zellen regulieren. Derartige kontextabhängige Effekte können eine Abgrenzung zwischen Zellen definieren, wie z. B. an der Organanlage des Flügels bei *D. melanogaster*. Auch Effekte zwischen Stamm- und Stromazellen der jeweiligen Nische sind möglich wie beispielsweise zwischen Stromazellen des Knochenmarks und hämatopoetischen Stammzellen (Übersichten bei Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Bray, 2006).

#### 1.1.3.2 Einfluss von Notch auf die ektodermale Differenzierung

Der Einfluss von Notch auf die ektodermale Differenzierung von Vertebraten ist äußerst vielfältig und soll hier nur kurz umrissen werden. Aus dem Ektoderm entstehen sowohl das Nervensystem, die Epidermis und das Auge. Die Aktivierung von Notch1 in embryonalen Stammzellen begünstigt bereits die Induktion der ektodermalen Differenzierung (Lowell *et al.*, 2006; Nemir *et al.*, 2006). Auch im weiteren Verlauf der ektodermalen Differenzierung kann Notch aktivierend wie auch inhibierend auf Zelllinienentscheidungen einwirken. Vereinfacht dargestellt lässt sich sagen, dass Notch in Stammzellen die Entwicklung von Neuroblasten inhibiert, diejenige von Glioblasten hingegen aktivierend beeinflusst. Im weiteren Verlauf der Neurogenese fördert Notch die Selbsterhaltung von Neuroblasten und adulten neuronalen Stammzellen, inhibiert die Differenzierung zu neuronalen Vorläuferzellen

sowohl in der embryonalen als auch in der adulten Neurogenese und induziert im Gegenzug die terminale Differenzierung dieser Zellen zu reifen und funktionellen Neuronen. Während der Gliogenese wirkt Notch inhibierend bei der Differenzierung von Oligodendrozyten und aktivierend bei der Differenzierung von Astrozyten (Übersicht bei Bolos *et al.*, 2007).

#### 1.1.3.3 Einfluss von Notch auf die endodermale Differenzierung

Auch auf Vorgänge während der endodermalen Differenzierung nimmt Notch Einfluss. Dieser erstreckt sich auf verschiedene Teilgebiete. Sowohl Teile des Darms, Leber, Gallenblase und Pankreas als auch Teile des respiratorischen Systems entstehen während der endodermalen Differenzierung. Während der Entwicklung des Pankreas verhindert Notch die vorzeitige Differenzierung pankreatischer Vorläuferzellen in endokrine Zellen (Fujikura *et al.*, 2006). Die Daten weiterer Studien legen nahe, dass Notch die Differenzierung endo- bzw. exokriner Zellen aus gemeinsamen Vorläuferzellen reguliert und damit eine wichtige Rolle während der frühen Pankreasentwicklung spielt. Die Wirkung von Notch bei der Entwicklung des Pankreas beruht u. a. auf dem Mechanismus der lateralen Inhibition (Übersicht bei Bolos *et al.*, 2007). Bei der Entwicklung des Darmtraktes nimmt Notch beispielsweise auf die Differenzierung von Vorläuferzellen in Enterozyten oder enteroendokrine Zellen Einfluss: die Deletion eines Zielgens von Notch, *Hes1*, resultierte in einem Anstieg enteroendokriner Zellen zu Ungunsten der Anzahl der Enterozyten (Übersicht bei Bolos *et al.*, 2007). Die Proliferation endotheler Zellen in Dünn- und Dickdarm wird durch konditionelle Deletion von RBP-Jk gestoppt (Übersicht bei Bolos *et al.*, 2007).

#### 1.1.3.4 Einfluss von Notch auf die mesodermale Differenzierung

Aus dem Keimblatt des Mesoderm differenzieren im Laufe der Embryonalentwicklung u. a. sowohl Herz- als auch Skelettmuskeln, Blutzellen, Endothelzellen, Chondrozyten, Knochen und das Urogenitalsystem. Die von Notch ausgelösten bzw. regulierten Effekte beziehen sich auf sehr viele verschiedene Aspekte der mesodermalen Differenzierung und sollen deshalb hier nur beispielhaft dargestellt werden.

Besondere Bedeutung für die mesodermale Differenzierung und die Embryonalentwicklung im Allgemeinen hat die Rolle des Notch-Signalwegs während der Segmentierung des präsomitischen Mesoderm. Durch die zeitlich und räumlich regulierte

oszillierende Expression verschiedener Gene erfolgt die Abschnürung der Somiten vom paraxialen Mesoderm. Dieser *clock and wave* genannte Mechanismus wird sowohl durch den Notch- als auch den Wnt-Signalweg reguliert. Sie kontrollieren die oszillierenden Signale, wohingegen die Grenzen der Somiten durch FGF-vermittelte Signale definiert werden (Übersicht bei Cinquin, 2007; Kageyama *et al.*, 2007). Die Ausbildung der Abgrenzung der Somiten erfolgt am Übergang zwischen Zellen, in denen Notch aktiv ist, und solchen, in denen Notch reprimiert ist (Morimoto *et al.*, 2005). Die bereits bekannten Zielgene von Notch, *Hes1* und *Hes7*, sowie die Glykosyltransferase *Lfng* sind durch ihre durch Notch induzierte oszillierende Expression maßgeblich an der Somitogenese beteiligt (Übersicht bei Cinquin, 2007).

Die Aktivierung des kanonischen Notch-Signalwegs reprimiert die Generierung von Kardiomyozyten (Nemir *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2006). Im Bereich der Skelettmuskeln blockiert aktiviertes Notch den essentiellen Transkriptionsfaktor MyoD und damit die Muskeldifferenzierung (Kopan *et al.*, 1994). Die Effekte von Notch im Bereich der Hämatopoese sind äußerst vielfältig. Notch nimmt sowohl Einfluss auf die lymphoide als auch auf die myeloide Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen. Die Aktivierung von Notch in hämatopoetischen Stammzellen durch den Liganden Jagged1 auf den Stromazellen der Nische im Knochenmark führt zu verstärkter Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzellen (Calvi *et al.*, 2003). Die Aktivierung von Notch inhibiert die Differenzierung von B-Zellen und induziert die Differenzierung von T-Zellen (Übersicht bei Zuniga-Pflucker, 2004). Hier unterstützt Notch die Bildung von  $\alpha\beta$ -T-Zellen, beeinflusst die Zelllinienentscheidung zwischen  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ - T-Zellen und begünstigt die Reifung  $CD4^+$   $T_{H2}$ -Zellen (Übersichten bei Maillard *et al.*, 2005; Radtke *et al.*, 2004; Zuniga-Pflucker, 2004).

Die Aktivierung von Notch1 in mesodermalen Vorläuferzellen reduziert *in vitro* die Bildung von Endothelzellen, nicht aber von muralen Zellen (Schroeder *et al.*, 2006). Auch während der Angiogenese reguliert die Aktivierung von Notch im Zusammenspiel mit VEGF und cAMP die Entwicklung arterieller Endothelzellen aus vaskulären Vorläuferzellen (Yurugi-Kobayashi *et al.*, 2006). Notch übt sowohl auf die Angiogenese als auch auf die Vaskulogenese Einfluss aus (Übersicht bei Bolos *et al.*, 2007; Hofmann und Iruela-Arispe, 2007); die Aktivierung von Notch induziert die Differenzierung arterieller, nicht aber venöser Zellen (Übersichten bei Gridley, 2007; Hofmann und Iruela-Arispe, 2007; Niessen und Karsan, 2007). Im Bereich der Chondrogenese scheint Notch eine wichtige Rolle während früher Differenzierungsschritte von mesenchymalen Zellen zu



Chondrozyten zu spielen (Übersicht bei Hardingham *et al.*, 2006). Bei der Entwicklung der Nieren führt die konditionelle Deletion von *Notch2* in Mäusen zum Verlust der proximalen Tubuli und Glomeruli. Dieser Effekt kann durch Notch1, welches in diesen Zellen aktiv ist, nicht aufgefangen werden (Cheng *et al.*, 2007).

#### 1.1.4 Auswirkungen der Mutationen von Notch *in vivo*

Im vorangegangenen Abschnitt wurde ein kleiner Ausschnitt der durch Notch vermittelten Effekte auf die Embryonalentwicklung und auf Differenzierungsvorgänge im adulten Organismus aufgezeigt. Sowohl die Vielzahl dieser kontextabhängigen Effekte als auch deren z. T. essentielle Bedeutung belegen die immense Wichtigkeit, die die durch Notch vermittelte Signaltransduktion auf die Entwicklung von Organismen hat. Im Folgenden sollen kurz die Folgen verschiedener Mutationen des Notch-Signaltransduktionsweges zum einen als Manifestation verschiedener Krankheitsbilder beim Menschen, zum anderen als Beschreibung des Phänotyps transgener Mäuse dargestellt werden.

##### 1.1.4.1 Mutationen von Notch bedingen Krankheitsbilder beim Menschen

Mutationen verschiedener Komponenten des Notch-Signalwegs können zu Krankheiten führen. Die Haploinsuffizienz des Liganden *Jagged1* ruft das dominant vererbte Alagille-Syndrom hervor, welches u. a. vaskuläre Defekte verursacht. Mutationen im Rezeptor Notch3 führen zu CADASIL (*cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarction and leukoencephalopathy*), welches durch Schlaganfälle und vaskuläre Demenz gekennzeichnet ist (Übersicht bei Bolos *et al.*, 2007).

Notch kann sowohl als Onkogen als auch als Tumorsuppressoren fungieren. Tumore können bedingt sein durch Mutationen ein oder mehrerer Komponenten des Notch-Signalwegs. Die konstitutive Expression von Notch1 führt beispielsweise zur humanen akuten lymphoblastischen Leukämie von T-Zellen (T-ALL). Auch bei der Entstehung von B-Zell-Leukämien und verschiedenen soliden Tumoren, beispielsweise in Brust, Darm oder Haut, spielen Komponenten des Notch-Signalwegs eine entscheidende Rolle (Übersicht bei Bolos *et al.*, 2007). In der Epidermis sowie in Keratinozyten wirkt Notch als Tumorsuppressoren (Nicolas *et al.*, 2003; Übersicht bei Lefort und Dotto, 2004).

#### 1.1.4.2 Phänotypen transgener Mäuse mit inaktivierenden Mutationen im Notch-Signalweg

Die homozygote Deletion einiger Bestandteile des Notch-Signalwegs führt zu embryonaler Letalität. Mäuse, welche homozygot negativ für *Notch1* oder *Notch2* sind, sterben vor Tag 11,5 der Embryonalentwicklung. Die Deletion von *RBP-Jκ* führt bereits einen Tag früher zum Tod der Embryonen. Während die *Notch3<sup>-/-</sup>*- bzw. *Notch4<sup>-/-</sup>*-Mäuse phänotypisch nicht auffällig sind, sterben ebenso die Mäuse, die homozygot negativ für *Jagged1* oder *2*, *Delta-like 1* oder heterozygot negativ für *Delta-like 4* sind entweder während der Embryonalentwicklung oder kurz nach der Geburt. Auch Mäuse, die das Zielgen *Hes1* nicht exprimieren, sind nicht lebensfähig (Übersicht bei Maillard *et al.*, 2005).

#### 1.1.5 Regulation des Notch-Signalweges

Die durch die Aktivierung der vier verschiedenen Notch-Homologe in Säugetieren ausgelösten Effekte stehen in ihrer Vielzahl und Vielfalt im Gegensatz zum relativ einfachen Aufbau dieses Signaltransduktionsweges. Zur zeitlichen und räumlichen Kontrolle der kontextabhängigen Aktivierung von Notch bedarf es verschiedener Regulationsmöglichkeiten. Sie sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

##### 1.1.5.1 Ligandenverfügbarkeit

Die Ligandenverfügbarkeit als essentielle Voraussetzung zur Aktivierung des Notch-Signalweges ist gleichzeitig ein wichtiger Punkt seiner Regulation. Dabei spielt nicht nur die generelle Expression der verschiedenen Liganden eine Rolle, sondern auch ihre Konzentration. Sie ist bei Mechanismen wie z. B. der lateralen Inhibition (s. 1.1.3.1.1) von entscheidender Bedeutung zur unterschiedlichen Differenzierung von Zellen aus der gleichen Ausgangspopulation. Ob eine Zelle als Liganden ein Homolog von Delta oder von Serrate exprimiert, hat Einfluss auf die Interaktion z. B. zwischen Stromazellen und Stammzellen und daraus resultierend auf die Differenzierung der Letztgenannten (s. 1.1.3.1.3).

##### 1.1.5.2 Glykosylierung von Notch

Die Bindungsaffinität zwischen Rezeptor und Ligand kann durch die Glykosylierung von Notch beeinflusst werden. Essentiell für die Bindung zwischen Notch und den

Liganden ist die Addition eines Fucose-Moleküls im Bereich der EGF-ähnlichen Motive durch das Enzym O-Fucosyltransferase. Mutanten, in denen diese Transferase deletiert wurde, haben ähnliche Phänotypen wie Tiere, die beispielsweise kein Presenilin exprimieren. Die O-Fucosyltransferase besitzt darüber hinaus auch eine Funktion als Chaperon. Durch diese wird sowohl die Faltung als auch der Transport von Notch zwischen endoplasmatischem Reticulum und Zellmembran unterstützt. An diese erste Fucose können gegebenenfalls durch verschiedene Glykosyltransferasen wie *Lunatic Fringe*, *Maniac Fringe* und *Radical Fringe* weitere Zuckerreste angefügt werden. Sie entscheiden nicht mehr über die grundsätzliche Bindung zwischen Notch und einem Liganden, sondern spezifizieren, welcher Ligand mit welcher Affinität gebunden werden kann (Übersicht bei Bray, 2006).

#### 1.1.5.3 Rezeptor- und Ligandenendozytose

Eine weitere Möglichkeit der Regulation des Notch-Signalweges ist die Endozytose des Rezeptors und seines Liganden in die signalgebende Zelle. Diese rezeptorvermittelte Endozytose unterstützt die Aktivierung des Notch-Signalwegs. Die beginnende Endozytose des extrazellulären Teils von Notch soll einem Modell zufolge die potentielle Schnittstelle der ADAM-Protease dieser erst zugänglich machen (Übersicht bei Le Borgne *et al.*, 2005). Gestützt wird dieses Modell durch Studien, in denen Notch durch Entzug des Kalziums im Kulturmedium aktiviert wurde. Dadurch erfolgte die ligandenunabhängige Lösung des extrazellulären Teils von Notch (Rand *et al.*, 2000). Durch Experimente mit löslichen Liganden konnte gezeigt werden, dass diese zwar an den Rezeptor binden (Hicks *et al.*, 2002), ihn jedoch nicht wie zellgebundene Liganden aktivieren konnten und dadurch die durch gebundene Liganden vermittelte Notch-Signaltransduktion bei der Proliferation hämatopoetischer Stammzellen inhibierten (Vas *et al.*, 2004).

Der Großteil der Studien zu diesem Aspekt wurde in *D. melanogaster* durchgeführt. Auch in Säugetieren ist die Endozytose ein essentieller Bestandteil zur Aktivierung des Notch-Signalwegs (Nichols *et al.*, 2007). Die konditionelle homozygote Deletion des Gens *Mind Bomb-1*, welches als E3 Ubiquitin Ligase an der Endozytose von Notch-Liganden beteiligt ist, führt in der Maus in unterschiedlichen Gewebetypen zu Phänotypen, welche charakteristisch für die Deletion verschiedener Notch-Liganden ist (Koo *et al.*, 2007). Zu untersuchen bleibt, ob beispielsweise die Aktivierung von Notch regulierend auf die Mechanismen der Endozytose einwirkt und welchen Einfluss die Modifizierung der

einzelnen Rezeptoren durch Glykosylierung auf die Endozytose nimmt (Übersicht bei Le Borgne *et al.*, 2005).

#### 1.1.5.4 Intrazelluläre Antagonisten von Notch

Durch in der Zelle vorkommende Antagonisten von Notch kann die Signaltransduktion weiter reguliert werden. An erster Stelle ist hier Numb zu nennen. Numb ist ein membranassoziertes Protein, welches als Antagonist von Notch fungiert und in Säugetieren in vier verschiedenen Isoformen vorliegt, welche abhängig vom Zelltyp exprimiert werden (Dho *et al.*, 1999). Durch Ubiquitinierung des membrangebundenen intrazellulären Teils von Notch und der daraus resultierenden anschließenden Degradation dieses Teils von Notch nach dessen Aktivierung wird dessen Translokation verhindert und so die Signaltransduktion gestoppt. Dabei interagiert Numb mit der E3 Ubiquitin Ligase Itch (McGill und McGlade, 2003).

Durch die Inhibition von Notch beeinflusst Numb sowohl Proliferation als auch Differenzierung von Zellen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass zwei der vier Isoformen von humanem Numb, die durch die verkürzte Form der PRR-Domäne (Prolin-reiche Region) gekennzeichnet sind, die Differenzierung von Zellen der Neuralleiste unterstützt, nicht aber deren Proliferation (Verdi *et al.*, 1999). Die beiden Isoformen von Numb, die die längere Form der PRR-Domäne exprimieren, induzierten die Proliferation der Vorläuferzellen aus der Neuralleiste, aber nicht deren Differenzierung (Verdi *et al.*, 1999). Diese Auswirkungen zeigten sich auch in Zellen des larvalen Gehirns von *D. melanogaster*, die die verschiedenen Isoformen des humanen Numb exprimierten (Toriya *et al.*, 2006).

Auch die Expression von Numb unterliegt der Regulation: zum einen reprimiert ein hohes Niveau der Aktivierung von Notch die Konzentration von Numb als Protein im Zytoplasma (Chapman *et al.*, 2006). Darüber hinaus wird Numb durch den intrinsischen Faktor Siah-1, welcher für die Degradation von Numb verantwortlich ist, negativ reguliert (Susini *et al.*, 2001).

#### 1.1.5.5 Zielgene von Notch

Die vier verschiedenen Homologe Notch1 bis Notch4 in Säugetieren sind für eine Vielzahl verschiedener Effekte während Differenzierungs- und Proliferationsvorgängen sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus

verantwortlich. Dabei sind die Effekte stark kontextabhängig: Notch kann sowohl die Induktion als auch die Inhibition der Differenzierung, der Apoptose und der Proliferation bewirken (Übersicht bei Bray, 2006).

Die Zahl der bereits bekannten Zielgene, deren Expression durch Notch direkt reguliert wird, ist verglichen mit der Vielzahl der Effekte vergleichsweise gering. Zu den bereits bekannten Zielgenen von Notch zählen Mitglieder der *Hes*- und *Hey*-Gene, deren Produkte zu den Transkriptionsfaktoren der basischen Helix-Loop-Helix-Proteine (bHLH) zählen. Direkt durch Notch induziert wird die Expression der Gene *Hes1*, *Hes5*, *Hes7*, *Hey1*, *Hey2* und *HeyL* (Übersicht bei Fischer und Gessler, 2007). Ebenfalls zu den bekannten Zielgenen von Notch zählt *Deltex1*, welches im nicht-kanonischen Signalweg eine Rolle spielt (Übersicht bei Katoh, 2007a). Des Weiteren werden zwei Zellzyklusregulatoren, *p21* und *Cdkn1a*, sowie *Ptcra* und *Nrarp* (*Notch-regulated ankyrin-repeat protein*) als Zielgene von Notch beschrieben (Übersichten bei Bolos *et al.*, 2007; Radtke *et al.*, 2004).

Die Vielfalt der durch Notch induzierten Effekte kann z. T. durch die beschriebenen Möglichkeiten der Regulation des Notch-Signalweges erklärt werden. Auch die Verfügbarkeit unterschiedlicher Enhancer in den verschiedenen Zelltypen zur Expression der Zielgene vermag eine Rolle bei dieser Kontextabhängigkeit spielen (Übersicht bei Bray, 2006). Zudem kann durch das Interagieren von Notch mit anderen Signaltransduktionswegen (s. 1.2) das Verhältnis der hohen Anzahl von Effekten zur niedrigen Anzahl bereits bekannter Zielgene z. T. erklärt werden. Eine weitere plausible Möglichkeit, die Vielfalt der durch Notch vermittelten Effekte zu erklären, ist, dass nicht alle generellen oder kontextabhängigen Zielgene von Notch bereits bekannt sind. Deshalb ist die Identifizierung bisher nicht bekannter Zielgene ebenso von Bedeutung für das Verständnis der durch Notch vermittelten Effekte wie die Analyse, welche Zielgene über die bereits bekannten direkt bzw. indirekt durch die oben genannten Mechanismen durch Notch reguliert werden.

#### 1.1.5.6 Regulation der differentiellen Expression der Zielgene

Die Kontextabhängigkeit der von Notch induzierten Effekte beruht u. a. auf der differentiellen Expression verschiedener Zielgene. Einige der bereits bekannten Zielgene werden in mehreren verschiedenen Geweben durch Notch induziert, andere wiederum sehr spezifisch und abhängig vom Zell- bzw. Gewebetyp. Lediglich Mäuse, die homozygot negativ für *Hes1* sind, sterben während der Embryonalentwicklung (Übersicht bei Maillard *et al.*, 2005). Neben Defekten in der Neurogenese weisen diese Tiere Auffälligkeiten des

Innenohrs und des Auges sowie fehlerhafte endokrine Differenzierung auf (Übersichten bei Fischer und Gessler, 2007; Maillard *et al.*, 2005). Mäuse, die im Gegenzug kein *Hes5* exprimieren, weisen zwar auch Defekte am Innenohr auf, sind aber lebensfähig und fertil (Übersicht bei Fischer und Gessler, 2007). Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass, falls die Expression dieser Gene nur durch Notch induziert werden kann, *Hes1* in einer größeren Zahl von Zelltypen als Zielgen von Notch fungiert als *Hes5*. *Hes7* zählt zu den Genen, die wahrscheinlich nur in spezifischen Zelltypen als Zielgen von Notch fungieren. Die Deletion von *Hes7* in Mäusen führt zu Defekten in deren Somitogenese. *Hes7* wird im präsomitischen Mesoderm oszillierend exprimiert und kontrolliert die Expression von *Lunatic Fringe (Lfng)* durch negative Rückkopplung. Weder *Hes1*- noch *Hes5*-defiziente Mäuse zeigen Störungen in der Somitogenese (Bessho *et al.*, 2001a; Bessho *et al.*, 2001b; Übersicht bei Bolos *et al.*, 2007).

Die Regulation der differentiellen Expression von Genen erfolgt durch unterschiedliche Mechanismen, von denen in diesem Rahmen nur die epigenetische Modifizierung des Chromatins kurz hervorgehoben werden soll. Der Status des Chromatins bedingt die generelle „Verfügbarkeit“ der Gene. Durch verschiedene Modifizierungen des Chromatins werden Gene der Transkription zugänglich gemacht oder aber deren Expression reprimiert. Das epigenetische Profil pluripotenter Stammzellen unterscheidet sich dabei von dem adulter Stammzellen oder embryonaler Karzinomzellen (Azuara *et al.*, 2006). Die Promotoren einiger für die Embryonalentwicklung essentieller Gene zeigen eine Kombination verschiedener Histonmodifizierungen, die für sich gesehen entweder für die Repression der Transkription charakteristisch sind oder aber die Zugänglichkeit der derart markierten Gene für die Transkription anzeigen. Die so markierten Gene werden in pluripotenten embryonalen Stammzellen im Verlauf des Zellzyklus früher repliziert als in gewebsspezifischen Stammzellen oder differenzierten Zellen (Azuara *et al.*, 2006). Die Kombination dieser Markierungen legt nahe, dass diese Gene exprimiert werden können, sobald weitere Signale zur Differenzierung der Zellen erfolgen (Azuara *et al.*, 2006; Übersicht bei Spivakov und Fisher, 2007). Eine Möglichkeit wäre, dass die Aktivierung von Notch ein derartiges Signal zur Differenzierung darstellen könnte und so die Expression einiger für die Embryonalentwicklung essentieller Gene induzieren kann.

### 1.1.6 Das Tamoxifen-System zur konditionellen Induktion von Notch

Die unter 1.1.4 erläuterten Auswirkungen der konstitutiven Deletion bzw. Überexpression von Notch sowie die Kontextabhängigkeit der bereits bekannten, durch Notch regulierten Effekte legen die Notwendigkeit konditionell aktivierbarer Versuchssysteme zur Untersuchung Notch-vermittelter Effekte nahe. Verschiedene Techniken entweder zur konditionellen Induktion von Genen oder zur konditionellen Aktivierung von Proteinen stehen zur Verfügung. Zur ersten Gruppe gehört beispielsweise die gezielte Nutzung der Rekombination. Durch den Einsatz des viralen Enzyms cre-Rekombinase kann das gewünschte Gen gezielt induziert oder auch deletiert werden (Übersicht bei Kwan, 2002). Auch das Tet-System reguliert in direkter Weise die Expression des gewünschten Gens. Je nach Aufbau des Konstrukts bewirkt oder verhindert die Zugabe des Antibiotikums Tetracyclin zum Kulturmedium die Expression des jeweiligen Gens (Gossen und Bujard, 1992).

Die beiden erläuterten Systeme bergen sowohl Vor- als auch Nachteile: einerseits erlaubt der direkte Zugriff auf die Transkription eine sehr strikte Kontrolle der Expression, andererseits bewirkt die Regulation auf Transkriptionsebene eine Zeitspanne zwischen Induktion und Verfügbarkeit des funktionellen Proteins. Besonders bei der Untersuchung von Zelllinienentscheidungen in Stammzellen bzw. während der Embryonalentwicklung, welche in besonderem Maße von der zeitlichen Koordination der verschiedensten Signale abhängt, bedeutet diese Verzögerung einen Nachteil.

Ein anderes Versuchssystem, welches im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kam, bietet im Vergleich zu den im Vorfeld beschriebenen Systemen Vorteile und soll anhand des in dieser Arbeit benutzten Konstrukts erläutert werden. Zur Untersuchung der von Notch1 vermittelten Effekte wurde ein induzierbares System benötigt, welches die zeitnahe Überexpression von aktiviertem Notch1 ermöglicht. Die Bildung eines Fusionsproteins aus dem intrazellulären Teil von Notch1, welcher konstitutiv aktiv ist, und der Hormonbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors stellt die Grundlage dieses Versuchssystems dar (s. Abbildung 1.3). Die Zugabe bestimmter Östrogenivate zum Kulturmedium ermöglicht ein konditionell aktivierbares Versuchssystem, welches nicht auf Ebene der Transkription reguliert wird und deshalb unmittelbarer wirkt. Die Verwendung einer Mutante, welche den synthetischen Östrogenantagonisten 4-Hydroxytamoxifen (OHT) bindet, spezifiziert dabei die Effekte (Feil *et al.*, 1997; Littlewood *et al.*, 1995). Werden die Zellen in Abwesenheit von OHT gehalten, wird das Fusionsprotein zwar überexprimiert, liegt jedoch an das Hitzeschockprotein Hsp90

gebunden im Cytoplasma und damit in inaktivem Zustand vor. Die Zugabe von OHT bewirkt, dass sich das Hsp90 von dem Fusionsprotein ablöst und letzteres in den Zellkern transloziert (Littlewood *et al.*, 1995). Im Kern bindet das in dieser Arbeit eingesetzte Fusionsprotein an RBP-J $\kappa$  und aktiviert somit den kanonischen Notch1-Signalweg.

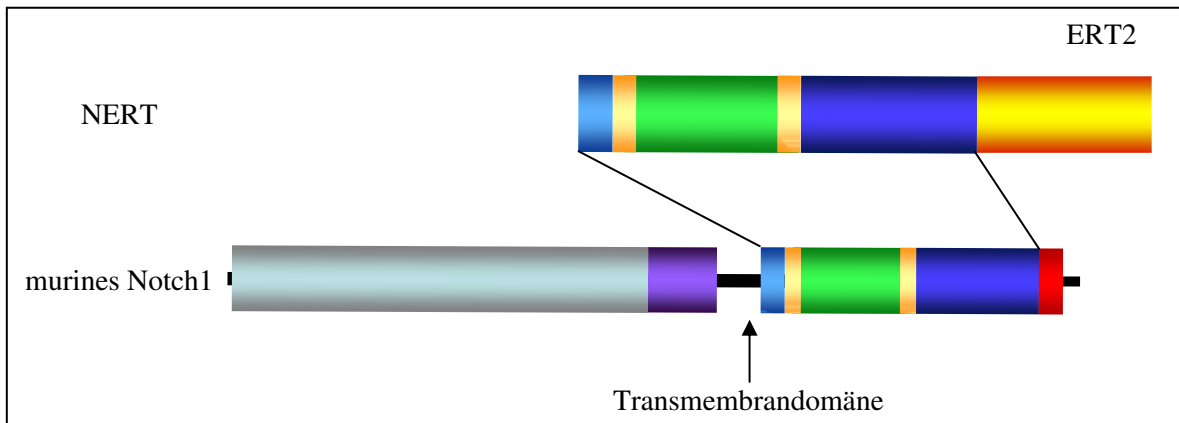


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Domänen von Notch1 und des durch OHT induzierbaren Fusionsproteins NERT. Das Fusionsprotein setzt sich zusammen aus dem intrazellulären Teil des murinen Notch1-Rezeptors mit Ausnahme der in rot gekennzeichneten OPA-PEST-Sequenz und der Hormonbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors  $\alpha$  in der OHT-sensitiven Mutante (ERT2). Zur Erläuterung der Domänen von Notch1 siehe Abbildung 1.1.

Die embryonale Stammzelllinie EB5 wurde von Timm Schroeder im Rahmen seiner Doktorarbeit stabil mit Konstrukten für dieses Fusionsprotein, genannt NERT, transfiziert (Schroeder *et al.*, 2006). Die Funktionalität von NERT im Vergleich zum intrazellulären Teil von Notch1 war bereits im Vorfeld auf mehrere Arten überprüft worden (Schroeder und Just, 2000). Dabei wurde auch kontrolliert, dass die Verwendung einer trunkierten Form des intrazellulären Teils von Notch1, welche nicht die OPA- und PEST-Sequenzen beinhaltet, keinen signifikanten Einfluss auf die mesodermale Differenzierung hat (Schroeder *et al.*, 2006). Das Fehlen der für die Degradation des Proteins bestimmten Sequenzen sollte die Stabilität des Fusionsproteins NERT erhöhen. Zellen, die NERT exprimierten, welches die trunkierte Form des intrazellulären Teils von Notch1 beinhaltet, wurden für die Experimente dieser Arbeit eingesetzt.

Die Induzierbarkeit des Systems aufgrund der Translokation des Fusionsproteins bewirkt die Aktivierung von Notch1 unmittelbarer als andere Versuchssysteme. Dadurch wird eine Untersuchung Notch1-bedingter Effekte in embryonalen Stammzellen bzw.



frühen Stadien von Vorläuferzellen, welche stark von der zeitlichen Koordination der verschiedenen Signale abhängen, ermöglicht.

## 1.2 Parakrine Signaltransduktionswege

Notch stellt einen der wichtigsten Signaltransduktionswege in vielzelligen Organismen dar. Seine Aktivität ist während der Embryonalentwicklung essentiell; auch Vorgänge der Regeneration in adulten Organismen werden durch ihn induziert und reguliert. Sowohl die Vielzahl als auch die Vielfältigkeit der durch die vier verschiedenen Homologe von Notch induzierten Effekte kann z. T., neben den bereits beschriebenen Mechanismen der Regulation (s. 1.1.5), durch die Interaktion mit anderen essentiellen Signaltransduktionswegen erklärt werden. Diese Interaktion konnte bereits in mehreren Fällen nachgewiesen werden (Übersicht bei Hurlbut *et al.*, 2007). Die Embryonalentwicklung vielzelliger Organismen wird dabei nur von wenigen Signaltransduktionswegen gesteuert, zu denen Notch zählt. Notch nimmt in dieser Gruppe allerdings eine Sonderstellung ein, nachdem dies einer der wenigen juxtakrinen Signaltransduktionswege von essentieller Bedeutung für die Embryonalentwicklung ist. Den größten Teil der übrigen Mitglieder dieser Gruppe stellen parakrine Signaltransduktionswege dar. Die Interaktion der verschiedenen Signaltransduktionswege trägt mit dazu bei, die Vielzahl aller Zelllinienentscheidungen durch eine relativ geringe Zahl von Effektoren zu regulieren.

Im Gegensatz zum Notch-Signalweg, dessen Aktivierung durch den direkten Zellkontakt zwischen Liganden- und Rezeptoren-exprimierender Zelle erfolgt, stellen parakrine Faktoren lösliche Moleküle dar, die sezerniert werden und auf diese Weise Signaltransduktionswege in den Zellen der näheren Umgebung aktivieren.

### 1.2.1 Die Wnt-Signaltransduktionswege

Zur Gruppe der für die Embryonalentwicklung wichtigsten parakrinen Faktoren gehört die Gruppe der Wnt-Proteine, die die gleichnamigen Signaltransduktionswege auslösen und hier nur kurz umrissen werden sollen. Durch Bindung von Wnt an den Rezeptor Frizzled können verschiedene Signaltransduktionswege ausgelöst werden. Der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg, in dem durch die Aktivierung von gelöstem Disheveled die

Translokation von  $\beta$ -Catenin und damit die Transkription von Zielgenen induziert wird, kontrolliert Effekte, die für die Determinierung von Zelllinienentscheidungen verantwortlich sind (Übersicht bei Katoh, 2007b).

Neben diesem Signaltransduktionsweg existieren zwei weitere bekannte Reaktionswege, die durch die Bindung von Wnt an Frizzled ausgelöst werden. Sie werden als „nicht kanonisch“ bezeichnet; durch sie werden Polarität oder Bewegungen der Zellen induziert. In einer Form der nicht kanonischen Wnt-Signaltransduktionswege induziert die Bindung des Liganden an den Rezeptor die Aktivierung von Disheveled und daraus resultierend Rho-Proteine, welche sowohl auf das Zytoskelett als auch auf die Expression von Zielgenen einwirken. Ein weiterer nicht kanonischer Wnt-Signaltransduktionsweg beinhaltet die Aktivierung der Effektormoleküle NLK (*Nemo like kinase*) und NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) durch die Ausschüttung von Kalzium und daraus resultierend die Regulation der Expression von Zielgenen (Übersicht bei Katoh, 2007b).

Die kontextabhängige Regulation dieser Signaltransduktionswege erfolgt durch intrazelluläre Regulatoren und durch die Expression der verschiedenen Komponenten. Die Vielfalt der durch Wnt ausgelösten und regulierten Effekte kann darüber hinaus dadurch erklärt werden, dass im Menschen 19 verschiedene Gene Proteine der Wnt-Familie kodieren (Übersicht bei Katoh, 2007b). Die Aktivität der Proteine wird dabei durch kovalent gebundene Lipide beeinflusst (Willert *et al.*, 2003).

Neben der Interaktion mit anderen Signaltransduktionswegen (Carmena *et al.*, 2006; Cinquin, 2007; Duncan *et al.*, 2005) ist Wnt an einer Vielzahl von Differenzierungsschritten während der Embryonalentwicklung entscheidend beteiligt (Park *et al.*, 2007). Die Deletion verschiedener Wnt-Gene in der Maus führt zu Defekten in der Entwicklung von Niere, Gehirn, Plazenta und Extremitäten (Übersicht bei Wodarz und Nusse, 1998).

### 1.2.2 Die Familie der Hedgehog-Proteine

Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg ist ebenfalls von essentieller Bedeutung für Differenzierungsvorgänge während der Embryonalentwicklung und in adulten Organismen. Wie auch die Wnt-Proteine, müssen die als parakrinen Faktoren wirkenden Proteine der Hedgehog-Familie modifiziert werden. Die Addition eines Cholesterolrestes bewirkt die Assoziation des Proteins mit der extrazellulären Seite der Membran. In Säugetieren kommen die drei verschiedenen Homologe Sonic Hedgehog, Desert Hedgehog

und Indian Hedgehog vor. Nach der Ablösung von Hedgehog durch das Protein Dispatched erfolgt die Bindung an den Rezeptor Ptc. Dadurch wird zunächst die Inhibition des Proteins Smoothened aufgehoben und daraus resultierend die Translokation von Ci induziert, das als transkriptioneller Aktivator verschiedener Zielgene fungiert. Diese Darstellung des Signaltransduktionsweges ist stark vereinfacht, da zum einen nur die Hauptkomponenten genannt wurden, und zum anderen darüber hinaus multiple Regulationsmöglichkeiten existieren (Übersicht bei Varjosalo und Taipale, 2007).

Während der neuronalen Differenzierung sowie während der Ausbildung der Extremitäten spielt der Hedgehog-Signaltransduktionsweg eine entscheidende Rolle (Übersicht bei McMahon *et al.*, 2003). Sonic Hedgehog und verschiedene Mitglieder der Wnt-Familie interagieren bei der Ausbildung von Myotomen während der Embryonalentwicklung (Munsterberg *et al.*, 1995). In murinen multipotenten mesodermalen Vorläuferzellen fungierte das als Zielgen von Notch bekannte *Hes1* als Zielgen von Sonic Hedgehog nach dessen Aktivierung unabhängig von RBP-Jκ (Ingram *et al.*, 2007).

### 1.2.3 Fibroblast Growth Factors

Die Mitglieder der Gruppe der *Fibroblast Growth Factors* (FGF) wirken als parakrine Faktoren aktivierend auf zwei verschiedene Signaltransduktionswege, den RTK-Weg (Rezeptor Tyrosin Kinase) und den JAK-STAT-Weg. Beide sollen hier nur kurz in ihrem Mechanismus erläutert werden und beide können außerdem von einer Vielzahl weiterer Faktoren aktiviert werden.

Beim JAK-STAT-Weg werden durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor sowohl der Rezeptor als auch die an ihn assoziierten Janus-Kinasen (JAK) durch diese phosphoryliert. Die auf diese Weise aktivierten Rezeptoren phosphorylieren STAT-Proteine (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). Das phosphorylierte STAT-Protein dimerisiert, transloziert in den Zellkern und wirkt dort als transkriptioneller Aktivator (Übersicht bei Schindler und Darnell, 1995).

Beim RTK-Weg induziert die Bindung des Liganden die Dimerisierung des Rezeptors, einer Rezeptor Tyrosin Kinase (RTK) und bewirkt dadurch dessen Autophosphorylierung. Mit Hilfe eines Adapterproteins erfolgt die Aktivierung eines G-Proteins; durch mehrere weitere Zwischenschritte mündet der Signaltransduktionsweg schließlich in der Phosphorylierung und damit der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Die Aktivierung

des RTK-Wegs unabhängig von der Bindung von Liganden ist ebenfalls bekannt (Übersicht bei Weiss *et al.*, 1997).

Die FGFs, welche sowohl den RTK-Weg als auch den JAK-STAT-Weg aktivieren können, haben bedeutenden Einfluss auf die Embryonalentwicklung und interagieren dabei auch mit anderen Signaltransduktionswegen. Während der Somitogenese in der Maus bewirkt das Zusammenspiel von FGF-, Notch- und Wnt-Signaltransduktion die Kontrolle der oszillierenden Genexpression (Wahl *et al.*, 2007; Übersicht bei Cinquin, 2007). Fgf1 und Fgf2 erhalten in serumfreien *in vitro*-Kulturen die Selbsterneuerung hämatopoetischer Stammzellen in Langzeitkulturen (de Haan *et al.*, 2003; Yeoh *et al.*, 2006). Fgf5 ist an der Gastrulation der Maus und damit an sehr frühen Schritten der Embryonalentwicklung beteiligt (Hebert *et al.*, 1991; Rathjen *et al.*, 1999). Weitere parakrine Faktoren wie z. B. die *Epidermal Growth Factors* (EGFs) aktivieren ebenfalls durch Bindung der Rezeptoren (EGFR) den RTK-Weg (Übersicht bei Weiss *et al.*, 1997).

#### 1.2.4 Die TGF- $\beta$ Superfamilie

Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie, zu der auch die BMPs (*Bone morphogenetic protein*) sowie die Activine und Nodal zählen, sind an vielen verschiedenen Zelllinienentscheidungen und Vorgängen während der Embryonalentwicklung beteiligt (Übersichten bei Hogan, 1996; Mishra *et al.*, 2005; Rahimi und Leof, 2007). Die Signaltransduktion erfolgt dabei durch Aktivierung des SMAD-Weges. Die Bindung des parakrinen Liganden resultiert in der Bildung eines Komplexes aus zwei Homodimeren, die jeweils aus Typ I- bzw. Typ II-Rezeptoren bestehen. Die Typ II-Rezeptoren phosphorylieren daraufhin die Typ I-Rezeptoren, welche wiederum Smad-Proteine phosphorylieren und dadurch aktivieren. Durch Komplexierung dieser Proteine mit anderen Smad-Proteinen entstehen aktive Transkriptionsfaktoren, die in den Kern translozieren und dort die Expression bestimmter Zielgene induzieren bzw. reprimieren (Übersichten bei Massague, 1996; Shi und Massague, 2003). Neben dem SMAD-abhängigen Signaltransduktionsweg existieren weitere kontextabhängige Reaktionswege, die die Antworten der Zellen auf Signale durch Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie vermitteln (Übersicht bei Rahimi und Leof, 2007).

Ein essentieller Punkt während der Embryonalentwicklung ist die Formierung einer Achse, welche die linke und rechte Seite des Embryos definiert. Diese axiale Ausrichtung wird durch Nodal, ein Mitglied der TGF- $\beta$  Superfamilie, entscheidend beeinflusst

(Übersichten bei Shen, 2007; Shiratori und Hamada, 2006). Der Notch-Signalweg beeinflusst dabei die Expression von Nodal mittels RBP-J $\kappa$ -Bindestellen sowohl innerhalb des Promotors als auch innerhalb eines Enhancers von Nodal (Krebs *et al.*, 2003; Raya *et al.*, 2003). Interaktionen von Notch und Mitgliedern der TGF- $\beta$  Superfamilie erfolgen auch in Endothelzellen. Dort bewirkt die gleichzeitige Aktivierung des Notch- und des BMP-Signalweges die gesteigerte Induktion von *Hey1*. Daraus resultierend wird die Migration der Zellen inhibiert (Itoh *et al.*, 2004).

Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie sind an Differenzierungsvorgängen in allen drei Keimblättern beteiligt und spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Hepatozyten, hämatopoetischen Vorläuferzellen und auch während Neurogenese und Gliogenese (Übersicht bei Mishra *et al.*, 2005).

### 1.3 Embryonalentwicklung der Maus

Die Signaltransduktion zwischen Zellen über die verschiedenen, bereits dargestellten Wege und deren Interaktion ist unabdingbar für die Entwicklung eines vielzelligen Organismus. Die Induktion von Zelllinienentscheidungen und anderen Differenzierungsvorgängen ist dabei stets davon abhängig, welches Differenzierungspotenzial die jeweilige Zelle besitzt. Im Verlauf der Embryonalentwicklung, die mit den ersten Zellteilungen totipotenter Zellen beginnt, entstehen pluripotente embryonale Stammzellen, aus denen sich die verschiedenen Organe entwickeln. Im adulten Organismus existieren neben reifen differenzierten Zelltypen multipotente Zellen wie z. B. hämatopoetische Stammzellen und unipotente Zellen wie z. B. Spermatogonien.

Inzwischen ist die Reprogrammierung, d. h. die gezielte Anreicherung undifferenzierter, so genannter induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS) aus differenzierten Ausgangszellen sowohl aus murinen (Hochedlinger und Jaenisch, 2006; Takahashi und Yamanaka, 2006; Wernig *et al.*, 2007) als auch aus humanen Zellen (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007) *in vitro* möglich. Die Generierung patientenspezifischer pluripotenter Stammzellen könnte so ermöglicht werden (Übersicht bei Zaehres und Scholer, 2007).

### 1.3.1 Die Entwicklung pluripotenter Stammzellen

Während der murinen Embryonalentwicklung nimmt die Fähigkeit der Zellen zu differenzieren stufenweise ab. Zellen im Entwicklungsstadium zwischen Zygote und frühem Blastomer sind totipotent, d. h. aus ihnen können alle verschiedenen Zelltypen inklusive der Zellen des Trophoblasten entstehen. Zwischen dem 8- und dem 16-Zell-Stadium erfolgt die erste Aufteilung in innere und äußere Zellen. Transkriptionsfaktoren wie Oct4 und Cdx2, die in totipotenten Zellen parallel exprimiert werden, werden daraufhin nur in der inneren (Oct4) bzw. äußeren (Cdx2) Zellschicht gebildet (Übersicht bei Surani *et al.*, 2007).

Die Zellen der inneren Zellmasse (ICM) des Blastozysten unterteilen sich in die Vorläuferzellen des primitiven Ektoderm und die des primitiven Endoderm. Erstgenannte stellen die Population pluripotenter embryonaler Stammzellen, aus denen Zelllinien mit pluripotentem Charakter gewonnen werden können. Aus murinen embryonalen Stammzellen können auch *in vitro* Zellen aller drei Keimblätter, aber nicht des Trophoblasten differenzieren (Übersicht bei Surani *et al.*, 2007). Die Pluripotenz dieser Zellen lässt sich anhand der Expression verschiedener intrazellulärer Marker charakterisieren, zu denen Oct4, Nanog und Sox2 zählen (Übersicht bei Boiani und Scholer, 2005). Diese Transkriptionsfaktoren wurden wie c-Myc und Klf4 dazu verwendet, murine Fibroblasten in einen undifferenzierten, pluripotenten Zustand zurückzusetzen (Wernig *et al.*, 2007). Neben der Expression dieser Transkriptionsfaktoren ist auch die epigenetische Markierung der DNA von besonderer Bedeutung, die Pluripotenz aufrecht zu erhalten (Übersichten bei Gan *et al.*, 2007; Surani *et al.*, 2007).

Die Pluripotenz muriner embryonaler Stammzellen lässt sich *in vivo* durch zwei verschiedene Ansätze verfolgen: die Fähigkeit, Teratome zu induzieren sowie nach Injektion in eine andere Blastozyste in den Embryo chimärer Mäuse integriert zu werden und dort zur Bildung von Zellen aller drei Keimblätter beizutragen. *In vitro* sind pluripotente embryonale Stammzellen in der Lage, entweder auf speziellen Matrices wie z. B. Kollagenen, auf Stromazellen oder in so genannten *Embryoid Bodies* in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Während die Erstgenannten die gerichtete Differenzierung bzw. Anreicherung bestimmter Zelltypen erlauben, ermöglichen *Embryoid Bodies* die gleichzeitige Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen verschiedener Keimblätter. Dabei ähnelt der Aufbau der *Embryoid Bodies* dem des Embryo, ist aber weit weniger organisiert (Übersicht bei Nishikawa *et al.*, 2007).

Während *in vitro* embryonale Stammzellen über Jahre undifferenziert und damit pluripotent gehalten werden können, stellt dieser Status *in vivo* lediglich einen Übergangszustand dar (Übersicht bei Surani *et al.*, 2007).

### 1.3.2 Entstehung spezifischer Gewebetypen in den drei Keimblättern

Nach der Entstehung pluripotenter embryonaler Stammzellen im inneren Bereich des Blastozysten erfolgt in der Embryonalentwicklung die Entstehung des Epiblasten. Aus dieser Struktur heraus entwickeln sich über eine Vielzahl von Zwischenschritten die drei Keimblätter des Ektoderm, Endoderm und Mesoderm. Die ehemals pluripotenten Zellen werden zunächst multipotent und schließlich unipotent, wenn aus ihnen nur noch ein weiterer reifer Zelltyp differenzieren kann. Welche Strukturen bzw. Gewebetypen sich im Zuge der Embryonalentwicklung aus den drei Keimblättern entwickeln, soll im Folgenden kurz dargestellt werden.

#### 1.3.2.1 Ektodermale Zell- und Gewebetypen

Aus dem Keimblatt des Ektoderm entstehen vier Untergruppen, die Epidermis, die Plakoden, das Neuralrohr und die Neuralleiste. Die ektodermale Differenzierung ist äußerst komplex und kann hier deshalb nur in ihren Grundzügen dargestellt werden.

Aus den Plakoden entwickeln sich u. a. das Riechepithel, Linse und Hornhaut des Auges sowie das Epithel des Mundes. Die Epidermis stellt den ventralen Teil des Ektoderms dar, während sich das neurale Gewebe aus dem dorsalen Teil des Ektoderm entwickelt (Übersicht bei Sasai und De Robertis, 1997). Bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems aus diesem dorsalen Teil entstehen sowohl Neuronen als auch gliale Zellen, die wiederum in Oligodendrozyten sowie in Astrozyten differenzieren (Übersicht bei Bolos *et al.*, 2007). Auf die räumliche Entwicklung und den Aufbau von zentralem und peripherem Nervensystem soll an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden.

Für die Differenzierung ektodermaler Zellen wichtige Signaltransduktionswege sind neben Notch Sonic Hedgehog (Übersicht bei Sasai und De Robertis, 1997) und Mitglieder der FGF-Familie (Yoon *et al.*, 2004). Wichtige Transkriptionsfaktoren während der ektodermalen Differenzierung sind beispielsweise Mitglieder der Pax-Familie (Übersicht bei Chi und Epstein, 2002), von denen Pax6 besonders hervorzuheben ist. Neben verschiedenen Funktionen bei der Entstehung des Prosenzephalon (Mastick *et al.*, 1997) ist

Pax6 essentiell bei der Entwicklung des Auges (Übersicht bei Chi und Epstein, 2002). Das durch EGF induzierte *REN* wird in frühen neuronalen Zellen exprimiert und fungiert dort als Regulator neuronaler Differenzierung (Gallo *et al.*, 2002).

Eine Übersicht über die vielfältigen Effekte des Notch-Signalweges auf die ektodermale Differenzierung wurde bereits unter 1.1.3.2 gegeben.

#### 1.3.2.2 Endodermale Zell- und Gewebetypen

Das Keimblatt des Endoderm stellt jenes Teilgebiet der Embryonalentwicklung dar, über das bisher weitaus weniger bekannt ist als über Ekto- bzw. Mesoderm. Aus ihm entwickeln sich die Auskleidung sowohl des respiratorischen Systems als auch des Verdauungstraktes inklusive der Bildung von Leber, Galle und Pankreas. Am Treffpunkt von Speise- und Luftröhre entwickelt sich der Pharynx und daraus Thymus, Mandeln, Schilddrüse und Nebenschilddrüse (Übersicht bei Lewis und Tam, 2006).

Der Wnt-Signaltransduktionsweg ist für die Differenzierung in Zellen des endodermen Keimblatts von besonderer Bedeutung (Übersicht bei Lewis und Tam, 2006). Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie sind an der Regulation endodermaler Stammzellen sowie an der Differenzierung von Hepatozyten beteiligt (Übersicht bei Mishra *et al.*, 2005). Die Überexpression von *Nodal* in embryonalen Stammzellen führt zur Induktion von sowohl endodermalen als auch mesodermalen Genen; je höher das Expressionsniveau entweder von *Nodal* oder von *Activin* ist, desto stärker wird die Induktion endodermaler Differenzierung gegenüber der mesodermalen begünstigt (Übersicht bei Lewis und Tam, 2006).

Bei der Entwicklung des Pankreas spielt der Notch-Signalweg eine wichtige Rolle (s. 1.1.3.3). Im Pankreas entwickeln sich sowohl exokrine als auch endokrine Zellen, zu denen die Glucagon-sezernierenden  $\alpha$ -Zellen sowie die Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen zählen. Das Gewebe des Pankreas entsteht aus Zellen, die *Pdx1* exprimieren; die endokrinen Inselzellen, zu denen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen zählen, sind darüber hinaus  $\text{Ngn3}^+$  (Gu *et al.*, 2002). Wie bereits erläutert, inhibiert die Aktivierung des Notch-Signalweges die weitere Differenzierung pankreatischer Vorläuferzellen (Fujikura *et al.*, 2006).

#### 1.3.2.3 Mesodermale Zell- und Gewebetypen

Während der Embryonalentwicklung erfolgt die frühe Unterteilung der mesodermalen Zellen in verschiedene Subpopulationen, aus denen die weitere Differenzierung in die



verschiedenen mesodermalen Gewebe erfolgt. Die wichtigsten dieser Subpopulationen sind das paraxiale Mesoderm, das Seitenplattenmesoderm und das intermediäre Mesoderm (Übersicht bei Christ und Ordahl, 1995).

Der größte Teil des paraxialen Mesoderm wird im Zuge der Somitogenese segmentiert (Übersicht bei Cinquin, 2007). Die Induktion der Abtrennung einzelner Somiten vom präsomitischen Mesoderm (PSM) durch die Interaktion verschiedener Signaltransduktionswege (v. a. Notch und Wnt) sowie die daran maßgeblich beteiligten Gene wurden bereits erläutert (s. 1.1.3.4). Aus den Somiten entstehen, vereinfacht dargestellt, die Skelettmuskulatur (Cossu *et al.*, 1996; Dietrich *et al.*, 1998), ein Teil des Knorpelgewebe (Übersicht bei Goldring *et al.*, 2006) und die Dermis des Rückens (Übersicht bei Olivera-Martinez *et al.*, 2004). Bei der Entwicklung der Skelettmuskulatur ist das Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren, insbesondere Myf5 und MyoD, von entscheidender Bedeutung (Übersicht bei Pownall *et al.*, 2002). Die Chondrogenese hingegen wird neben anderen Transkriptionsfaktoren von Sox9 und Runx2 beeinflusst. Sowohl Notch als auch der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg spielen eine Rolle bei der Generierung von Knorpelzellen (Übersichten bei Goldring *et al.*, 2006; Hardingham *et al.*, 2006).

Das intermediäre Mesoderm stellt die Grundstruktur für die Entwicklung des Urogenitalsystems dar, wobei zur Induktion und Modulation von Zellen des intermediären Mesoderm im Huhn Signale sowohl des paraxialen als auch des Seitenplattenmesoderm eine Rolle spielen (James und Schultheiss, 2003). Um die Differenzierung des Pronephros einzuleiten, werden wiederum Signale des paraxialen Mesoderm benötigt (Mauch *et al.*, 2000). Während der weiteren Differenzierung der Nieren reguliert der kanonische Wnt-Signalweg und in diesem Zusammenhang die parakrinen Faktoren Wnt4 und Wnt9 die Formierung renaler Vesikel (Park *et al.*, 2007). Notch2 ist für die Bildung der Glomeruli und der proximalen Tubuli erforderlich (Cheng *et al.*, 2007).

Aus dem Seitenplattenmesoderm differenzieren Blutzellen, Endothelzellen, murale Zellen und Herzmuskelzellen (s. Abbildung 1.4). Vorläuferzellen des Seitenplattenmesoderm sind durch Expression der fötalen Leberkinase Flk-1 gekennzeichnet. Flk-1<sup>+</sup> sind darüber hinaus auch glatte Muskelzellen (Yamashita *et al.*, 2000), Teile der Somiten und extraembryonale mesodermale Zellen (Ema *et al.*, 2006) Die Expression von Flk-1 ist für die Entwicklung von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen unabdingbar (Kataoka *et al.*, 1997; Nishikawa *et al.*, 1998; Shalaby *et al.*, 1997; Shalaby *et al.*, 1995). Eine wichtige Rolle bei der Zelllinienentscheidung zwischen

Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen spielt der Transkriptionsfaktor Runx1 (Hirai *et al.*, 2005; Lacaud *et al.*, 2002). Ein Zusammenhang zwischen dem Notch-Signaltransduktionsweg und der Expression von *Runx1* konnte im Zebrafisch *Danio rerio* hergestellt werden (Burns *et al.*, 2005).

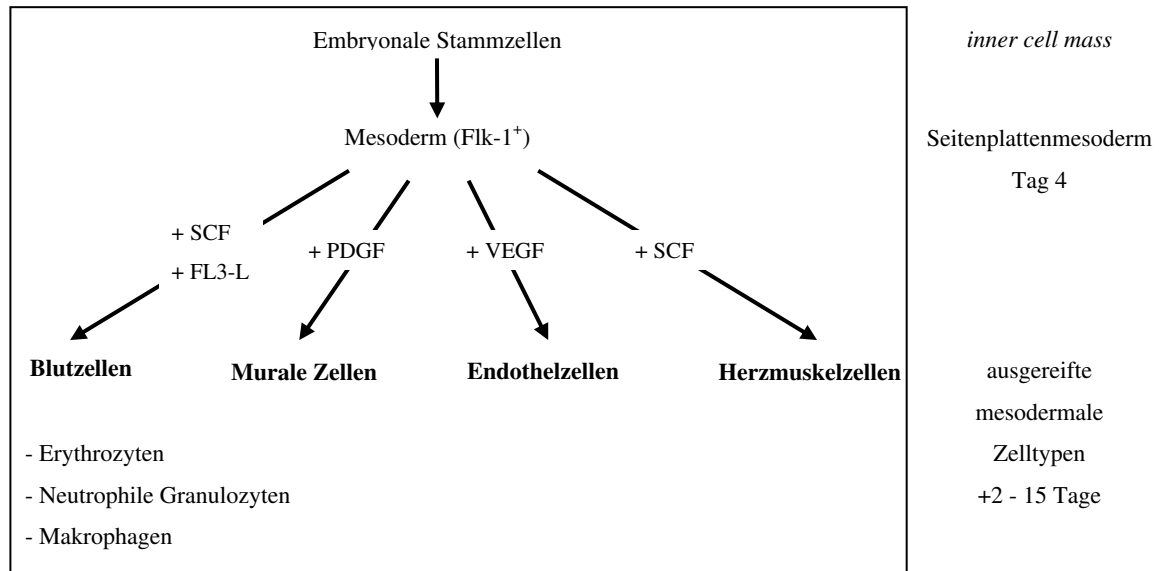


Abb. 1.4: Die Entstehung verschiedener reifer Zelltypen aus dem Seitenplattenmesoderm. Im Zuge der Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen *in vitro* entweder auf OP9-Stromazellen oder auf Kollagen IV unter Kulturbedingungen, welche die mesodermale Differenzierung begünstigen, entstehen Flk-1<sup>+</sup> mesodermale Vorläuferzellen des Seitenplattenmesoderm. Durch Zugabe der angegebenen Wachstumsfaktoren erfolgt die weitere Differenzierung der Zellen zu Herzmuskelzellen, Endothelzellen, muralen Zellen oder verschiedenen Subpopulationen von Blutzellen.

Während der weiteren Differenzierung der Flk-1<sup>+</sup> Vorläuferzellen zu Blutzellen können die verschiedenen Subpopulationen durch die differentielle Expression verschiedener Marker wie z. B. E-Cadherin (embryonale Stammzellen), VE-Cadherin (Endothelzellen), CD45 (hämatopoetische Zellen) und Ter119 (erythroide Zellen) charakterisiert werden (Nishikawa *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zu den Skelettmuskeln des Rumpfes, die aus dem paraxialen Mesoderm entstehen, werden Herzmuskelzellen aus Zellen des Seitenplattenmesoderm entwickelt. Eine Aktivierung des Notch-Signalweges inhibiert die Differenzierung in reife Herzmuskelzellen (Nemir *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2006).

Die gezielte Differenzierung reifer Zelltypen des Seitenplattenmesoderm *in vitro* hängt von der Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren wie z. B. SCF (*stem cell factor*) oder VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ab (s. Abbildung 1.4; Schroeder *et al.*, 2006).

Das in dieser Arbeit verwendete Versuchssystem zur Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen in mesodermale Zellen ermöglicht die Differenzierung sowohl von Zellen des paraxialen Mesoderm als auch des Seitenplattenmesoderm (Sakurai *et al.*, 2006). Die Grundlage zur mesodermalen Differenzierung beruht entweder auf der Kokultur der embryonalen Stammzellen mit OP9-Stromazellen (Kodama *et al.*, 1994) oder aber auf der Kultivierung der Zellen auf einer Kollagen IV-Matrix. (Nishikawa *et al.*, 1998). In beiden Fällen erfolgt eine Anreicherung mesodermaler Vorläuferzellen.

Durch die Auswahl des fötalen Kälberserums, welches als Medienbestandteil für die mesodermale Differenzierung benötigt wird, wurde in der vorliegenden Arbeit in den jeweiligen Experimenten eine weitere Anreicherung von Zellen des Seitenplattenmesoderm durchgeführt. Das verwendete Serum wurde nicht daraufhin untersucht, inwieweit es die Differenzierung von Zellen des paraxialen Mesoderm unterstützt. Subpopulationen dieser Zellen können in diesen Kulturen auftreten, da die Zellen bis zu einem gewissen Grad der Differenzierung in ihrem Phänotyp zwischen paraxialem Mesoderm und Seitenplattenmesoderm reversibel sind (Sakurai *et al.*, 2006).

## 1.4 Fragestellung

Die Aktivierung des Notch-Signalweges hat vielfältige kontextabhängige Auswirkungen auf die Embryonalentwicklung mehrzelliger Organismen von *D. melanogaster* bis hin zum Menschen. Diese Vielfältigkeit der Auswirkungen spiegelt sich sowohl in der reinen Anzahl der Effekte in den verschiedenen Zell- und Gewebetypen, die der Notch-Signalweg beeinflusst, als auch in der Art der Effekte, die von der Induktion oder der Inhibition von Differenzierung, Proliferation oder Apoptose reicht, wider. Durch welche molekularen Mechanismen diese kontextabhängigen Effekte im Einzelnen reguliert werden, ist bisher nur in Grundzügen bekannt. Ein wichtiger Punkt bei der Untersuchung dieser Mechanismen ist die Identifizierung kontextabhängiger Zielgene der Notch-Aktivierung in verschiedenen Zelltypen. Diese Zielgene sind zum einen wahrscheinlich entscheidend an der Interaktion des Notch-Signalweges mit anderen Signaltransduktionswegen beteiligt. Zum anderen kann ihre Identifizierung maßgeblichen Aufschluss über die Regulation des Notch-Signalweges an sich sowie Rückschlüsse über Effekte auf die Differenzierung geben.

Die Aktivierung von Notch1 in embryonalen Stammzellen resultiert in der Inhibition der Bildung Flk-1<sup>+</sup> mesodermaler Vorläuferzellen, wenn die Zellen unter Bedingungen gehalten wurden, welche die mesodermale Differenzierung förderten. Ausgangspunkt dieser Arbeit war die detaillierte Analyse der Wirkung von aktiviertem Notch1 auf die Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen in Zellen des Seitenplattenmesoderms. Davon ausgehend war das Ziel dieser Arbeit die Identifizierung der Zielgene von Notch1 in murinen embryonalen Stammzellen unter verschiedenen Kulturbedingungen sowie in mesodermalen Vorläuferzellen. Diese Fragestellung sollte mittels genomweiter Transkriptionsanalysen durch *Microarray*-Experimente bearbeitet werden und potentielle Vermittler des molekularen Mechanismus zellkontextabhängiger Effekte von Notch1 aufzeigen.

Die anschließende Untersuchung der differentiellen Expression der potentiellen Zielgene in verschiedenen Zelltypen und unter verschiedenen Kulturbedingungen mittels *Real-Time RT-PCR* sollte zum einen klären, ob die Effekte von Notch1 auf die Expression der identifizierten Gene direkt oder indirekt vermittelt wurde. Zum anderen sollte durch den Einsatz unterschiedlicher Kulturbedingungen sowohl die Kontextabhängigkeit der Induktionen analysiert werden, sowie durch den Vergleich dieser verschiedenen Kulturbedingungen deren Einfluss auf die *in vitro*-Kultur von Notch1-bedingten Effekten abgegrenzt werden.

Abschließend sollte ein Versuchssystem entwickelt und etabliert werden, mit dessen Hilfe die biologische Funktion der einzelnen Zielgene auf die Differenzierung untersucht werden kann. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei darauf, allein die Auswirkungen des zu untersuchenden Parameters – der Aktivierung von Notch1 - im Hinblick auf die Differenzierung, welche von einer Vielzahl von Parametern beeinflusst wird, abzugrenzen.

## 2. Material

### 2.1 Zelllinien

#### 2.1.1 Murine embryonale Stammzellen

EB5	embryonale Stammzellen (Subtyp der Linie E14tg2a), die das Gen für Blasticidinresistenz unter der Kontrolle des <i>Oct4</i> -Promotors exprimieren Referenz: Hooper <i>et al.</i> , 1987; Niwa <i>et al.</i> , 2000
EB5 Nert (EB5-122-1#7)	EB5, die stabil mit pCAG-NERT <sup>ΔOP</sup> -IP transfiziert wurden, im folgenden EB5 Nert genannt Referenz: Schroeder <i>et al.</i> , 2006
EB5 Kontrolle (EB5-121-II-1#6)	EB5, die stabil mit pCAG-IP transfiziert wurden, im folgenden EB5 Kontrolle genannt Referenz: Schroeder <i>et al.</i> , 2006

#### 2.1.2 Murine adulte Stammzellen

FDCP-mix	Durch retrovirale Insertionsmutagenese generierte multipotente faktorabhängige myeloische Vorläuferzelllinie aus Knochenmarkslangzeitkulturen Referenz: Spooncer <i>et al.</i> , 1984; Spooncer <i>et al.</i> , 1986
----------	---

#### 2.1.3 Murine Stromazellen

OP9	Murine Stromazellen Referenz: Kodama <i>et al.</i> , 1994
-----	--

## 2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

### 2.2.1 Geräte

Analysenwaage	Kern, Balingen-Frommern
Durchflusszytometer: BD FACSCanto	BD Biosciences, Heidelberg
Gelkammer für Agarosegele	Peqlab, Erlangen
Gelelektrophorese: <i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i>	Agilent, Böblingen
Inkubator: - CO <sub>2</sub> HERACell 150	Kendro, Langenselbold
- Heraeus	Kendro, Langenselbold
Kryoboxen: Nalgene Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, Rochester, USA
Mikroskop: inverses Phasenkontrastmikroskop CKX41	Olympus, Hamburg
→ zugehörige Digitalkamera DP71	Olympus, Hamburg
Netzteil (Gelelektrophorese)	Bio-Rad, München
Neubauer-Zählkammer (0,1mm x 0,0025mm <sup>2</sup> )	OptikLabor
Orbitalmixer, beheizbar	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Mettler Toledo, Giessen
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten: - elektronische Einkanalpipette	Biohit, Rosbach v. d. Höhe
- mechanische Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer: accu-jet	Brand, Wertheim
<i>Real-Time PCR-Gerät 7900HT Fast Real-Time-PCR</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
Reinstwasseraufbereitung MilliQ Plus	Millipore, Schwalbach
Sterilbank: Heraeus HERAsafe Sicherheitswerkbank	
Klasse II, Typ HS12	Kendro, Langenselbold
UV-Tisch (Agarosegele)	Intas, Göttingen
Vakuumpzentrifuge	Bachofer, Reutlingen
Vortex: REAXtop	Heidolph, Schwabach
Waage	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen: - Heraeus Multifuge 3 S-R	
Rotor: Sorvall 75006445	Kendro, Langenselbold
- Sarstedt MC6 Zentrifuge	Sarstedt, Nümbrecht

- Eppendorf 5417R

Eppendorf, Hamburg

## 2.2.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

384-PCR-Platten	ABgene, Epsom, UK
Einfrierröhrchen: MicroSchraubröhre 2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegpipetten 5ml und 10ml	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegspritzen : Omnifix 1ml, 5ml und 10ml	Braun, Wertheim
FACS-Röhrchen BD Falcon	BD Biosciences, Heidelberg
Filterröhrchen FACS (Porengröße 40µm)	BD Biosciences, Heidelberg
Folie Real-Time Platten	ABgene, Epsom, UK
Gewebekulturflasche 12,5 cm <sup>2</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
Gewebekulturflasche 25 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturplatte (6-Loch)	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen: Sterican 19G und 27G	Braun, Wertheim
<i>Microarrays:</i>	
Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0	Affymetrix, Santa Clara, USA
Pipettenspitzen: mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenz- und Zentrifugenröhre (15ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter (Ø 0,2µm)	SIGMA-Aldrich, München
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg

## 2.3 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von den Firmen Fluka (Seelze), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und SIGMA-Aldrich (München) bezogen.

4-Hydroxytamoxifen (OHT)	SIGMA-Aldrich, München
7-AAD (7-Amino-Actinomycin D; BD ViaProbe)	BD Pharmingen, Heidelberg
Agarose	VWR, Darmstadt

βME	SIGMA-Aldrich, München
BSA	SIGMA-Aldrich, München
Cycloheximid	SIGMA-Aldrich, München
DEPC	Roth, Karlsruhe
DMSO	SIGMA-Aldrich, München
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ficoll	Amersham, Little Chalfont, UK
Gelatine	SIGMA-Aldrich, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kollagen IV	BD Biosciences, Heidelberg
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Fluka, Seelze
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Non Essential Amino Acids</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblaulösung 0,4%	SIGMA-Aldrich, München
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.4 Seren

### 2.4.1 Fötale Kälberseren

zur Kultivierung undifferenzierter EB5:	Cambrex, East Rutherford, USA
zur mesodermalen Differenzierung von EB5:	PAN, Aidenbach
zur Kultivierung von OP9:	PAN, Aidenbach

### 2.4.2 Pferdeserum

zur Kultivierung von FDCP-mix:	WKS Biological Industries, Frankfurt a. Main
--------------------------------	---



## 2.4.3 Serumersatz

zur Kultivierung undifferenzierter EB5:

KnockOut Serum Replacement (KSR)                      Invitrogen, Karlsruhe

## 2.5 Medien

 $\alpha$ -MEM                      Invitrogen, Karlsruhe

G-MEM                      Invitrogen, Karlsruhe

IMDM                      PAN, Aidenbach

Knockout-DMEM (KO-DMEM)                      Invitrogen, Karlsruhe

## 2.6 Antikörper

 $\alpha$ -Maus Flk-1 PE [Avas 12  $\alpha$  1]                      BD Pharmingen, Heidelberg $\alpha$ -Maus Mac1 (CD11b) PE [M1/70]                      BD Pharmingen, HeidelbergFc-Block ( $\alpha$ -Maus CD16/CD32) [2.4G2]                      BD Pharmingen, Heidelberg2.7 *Real-Time RT-PCR*-SondenTaqMan Gene Expression Assay-on-Demand                      Applied Biosystems, Foster City,  
USA

Adrenomedullin                      Mm00437438\_g1

Efna1                      Mm00438660\_m1

Efnb1                      Mm00438666\_m1

Epha4                      Mm00433056\_m1

Epha7                      Mm00833876\_m1

Fgf5                      Mm00438919\_m1

GAPDH                      Mm99999915\_g1, Part Number 4352932E

Hes1                      Mm00468601\_m1

---

Hes5	Mm00439311_g1
Hes7	Mm00473576_m1
Hey1	Mm00468865_m1
Hey2	Mm004692 80_m1
HeyL	Mm00516555_m1
Hmgn3	Mm00518151_m1
Hsp8	Mm00446103_m1
Id1	Mm00775963_g1
Id2	Mm00711781_m1
Id3	Mm00492575_m1
Id4	Mm00499701_m1
KitL	Mm00442972_m1
Lfng	Mm00456128_m1
Mnt	Mm00487729_m1
Myf5	Mm00435125_m1
Nanog	Mm02384862_g1
Nestin	Mm00450205_m1
Nodal	Mm00443040_m1
Oct4	Mm00658129_gH
Pax6	Mm00443072_m1
Polr2f	Mm01300222_m1
Prom1	Mm00477115_m1
Runx1	Mm00486762_m1
Sox9	Mm00448840_m1
Vcam1	Mm00449197_m1
Wisp1	Mm00457574_m1
Wnt4	Mm00437341_m1

## 2.8 siRNA

OnTarget PLUS Non-targeting pool	Dharmacon, Bonn
OnTarget PLUS mouse GAPDH pool	Dharmacon, Bonn
OnTarget PLUS mouse Id1 smart pool	Dharmacon, Bonn

OnTarget PLUS mouse Id2 smart pool	Dharmacon, Bonn
OnTarget PLUS mouse Id3 smart pool	Dharmacon, Bonn
OnTarget PLUS mouse Id4 smart pool	Dharmacon, Bonn

## 2.9 Testkits

### Isolierung von RNA:

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNase free DNase Set	Qiagen, Hilden

### Synthese einzelsträngiger cDNA:

1st strand cDNA synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Roth
-------------------------------	--------------------------

### Probenvor- bzw. -aufbereitung für Affymetrix *Microarrays*:

Agilent RNA 6000 Nano Reagents and Supplies	Agilent, Böblingen
Poly-A RNA Control Kit	Qiagen, Hilden
One Cycle cDNA Synthesis Kit	Qiagen, Hilden
Sample Cleanup Module	Qiagen, Hilden
IVT Labeling Kit	Qiagen, Hilden
Hybridization Control Kit	Qiagen, Hilden

## 2.10 Puffer, Lösungen und Medien

### 2.10.1 Zusammensetzungen

Differenzierungsmedium ektodermal	G-MEM
10%	KSR
1mM	Natrium-Pyruvat
0,1mM	$\beta$ ME

Differenzierungsmedium mesodermal		$\alpha$ -MEM
	15%	FCS
	2mM	L-Glutamin
	0,1mM	$\beta$ ME
Differenzierungsmedium „Mesoderm begünstigend“		
		KO-DMEM
	10%	KSR
	1%	FCS
	2mM	L-Glutamin
	1%	<i>Non Essential Amino Acids</i>
	0,1mM	$\beta$ ME
Einfriermedium EB5		
	50%	FCS
	40%	Erhaltungsmedium EB5
	10%	DMSO
Einfriermedium FDCP-mix		
	90%	Pferdeserum
	10%	DMSO
Einfriermedium OP9		
	90%	FCS
	10%	DMSO
Erhaltungsmedium EB5		
		KO-DMEM
	10%	KSR
	1%	FCS
	2mM	L-Glutamin
	1%	<i>Non Essential Amino Acids</i>
	10ng/ml	LIF
	0,1mM	$\beta$ ME

Erhaltungsmedium FDCP-mix		IMDM
	20%	Pferdeserum
	10%	IL-3 <i>conditioned medium</i>
FACS-Puffer, pH 7,2-7,4	2,74M	NaCl
	0,05M	KCl
	0,16M	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	0,04M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,03M	Natriumazid
OP9-Medium		α-MEM
	20%	FCS
	2mM	L-Glutamin
	0,1mM	βME
Serumfreies Medium		KO-DMEM
	2mM	L-Glutamin
	1%	<i>Non Essential Amino Acids</i>
	10ng/ml	LIF
	0,1mM	βME
TAE-Puffer 50x, pH 7,7	1,54M	Tris
	0,06M	EDTA
Transfektionsmedium		KO-DMEM
	12,5%	KSR
	1,25%	FCS
	2mM	L-Glutamin
	1%	<i>Non Essential Amino Acids</i>
	10ng/ml	LIF
	0,1mM	βME

Trypsin	10%	Trypsin/EDTA
	90%	1x PBS

### 2.10.2 Fertige Puffer und Reagenzien

5x siRNA-Puffer	Dharmacon, Bonn
6x Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Roth
10x PBS –MgCl <sub>2</sub> –CaCl <sub>2</sub>	Invitrogen, Karlsruhe
Cell Dissociation Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
TaqMan 2xPCR Universal MasterMix NoAmpErase UNG	Applied Biosystems, Foster City, USA
Transfektionsreagenz: DharmaFECT 1	Dharmacon, Bonn

### 2.11 Software zur statistischen Analyse und Dokumentation von Resultaten

Adobe Photoshop Version 6.0	Adobe Systems, München
Affymetrix <sup>®</sup> Microarray Suite (MAS), Version 5	Affymetrix, Santa Clara, USA
Cell B	Olympus, Hamburg
FACSDiva	BD Biosciences, Heidelberg
Microsoft Excel 2000	Microsoft, Unterschleißheim
Microsoft PowerPoint 2000	Microsoft, Unterschleißheim
SDS 2.2.2 (7900HT, Version 2.2.2)	Applied Biosystems, Foster City, USA
TM4 Microarray Software Suite	<a href="http://www.tm4.org">http://www.tm4.org</a>

## 3. Methoden

### 3.1 Zellkulturmethoden

#### 3.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zellzahlen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt; der Ausschluß toter Zellen erfolgte durch Färbung mit 0,4% Trypanblaulösung in einer Verdünnung der Zellen von 1:2.

##### 3.1.1.1 Halten undifferenzierter embryonaler Stammzellen

Undifferenzierte EB5 Nert und EB5 Kontrolle wurden in Erhaltungsmedium ausschließlich in Gewebekulturflaschen gehalten, die mit 0,1% Gelatinelösung beschichtet waren. Die Beschichtung erfolgte mindestens 30 min vor dem Aussäen der Zellen, überschüssige Gelatine wurde unmittelbar davor entfernt. Die Zellen wurden alle zwei Tage durch Behandlung mit Trypsin abgelöst und je nach Dichte in Verhältnissen bis 1:8 neu ausgesät. Bis zu einer Verdünnung von 1:3 wurde dabei das verbleibende Trypsin im Erhaltungsmedium inaktiviert und durch Waschen (1000 Upm, 5 min, 20 °C) entfernt, bevor die Zellen ausgesät wurden. 10 ng/ml LIF und 1 µM OHT wurden jeweils frisch zum Erhaltungsmedium zugegeben.

##### 3.1.1.2 Halten von OP9-Stromazellen

OP9-Stromazellen wurden in OP9-Medium gehalten und bei Konfluenz, spätestens aber nach 3 Tagen, mit Trypsin abgelöst, gewaschen (1000 Upm, 5 min, 20 °C) und je nach Dichte in Verhältnissen bis 1:3 in OP9-Medium neu ausgesät. 1 µM OHT wurde jeweils frisch zum Medium zugegeben.

### 3.1.1.3 Halten von FDCP-mix Zellen

FDCP-mix Zellen wurden in einer Dichte zwischen  $6 \times 10^4$  Zellen/ml und  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in Suspensionskultur in Erhaltungsmedium für FDCP-mix Zellen gehalten.

### 3.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zelllinien wurden bei 37 °C aufgetaut. Zur Verdünnung des im Einfriermedium enthaltenen DMSO wurde bei EB5 Nert und EB5 Kontrolle 5 ml temperiertes Erhaltungsmedium über einen Zeitraum von 5 min zugegeben. Korrelierend zur Menge der eingefrorenen Zellen wurden die Zellen in Erhaltungsmedium aufgenommen und ausgesät. Größere Anteile toter Zellen wurden, falls vorhanden, frühestens 24 h später durch Medienwechsel entfernt. Zu OP9 und FDCP-mix wurden nach dem Auftauen über einen Zeitraum von 10 min je 10 ml des jeweiligen Mediums zugegeben. Nach einmaligem Waschen (1000 Upm, 5 min, 20 °C) wurden die Zellen in entsprechender Dichte ausgesät. Tote Zellen wurden in OP9 durch Medienwechsel entfernt, in FDCP-mix mittels Dichtegradientenzentrifugation auf Ficoll mit einer Dichte von 1,081 g/ml (800 x g ohne Bremse, 15 min, 4 °C).

Zum Einfrieren wurden die Zellen gewaschen (1000 Upm, 10 min, 20 °C), im jeweiligen Einfriermedium aufgenommen und in Aliquots à 1 ml in Einfrierröhrchen überführt. Diese wurden zunächst in Kryogefäßen, welche mit Isopropanol gefüllt waren, auf -80 °C gekühlt. Pro Minute wurden die Zellen von Raumtemperatur beginnend 1 °C abgekühlt. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

### 3.1.3 Kontrolle der Zellen auf Kontamination durch Mycoplasmen

Alle Zellen des Labors wurden regelmäßig mittels PCR auf Kontamination durch Mycoplasmen überprüft. Die PCR wurde als sogenannte „*nested PCR*“ mit Mischungen aus Primern, die spezifisch gegen verschiedene Mycoplasmenstämme gerichtet waren, als Abfolge zweier ineinander verzahnter PCRs durchgeführt (siehe Lindl T., „Zell- und Gewebekultur“, 4. Auflage, Spektrum, 2000, S. 64-66).



### 3.1.4 Transfektion von Zellen mit siRNA

Zur Transfektion embryonaler Stammzellen mit siRNA wurde die lyophilisierte siRNA nach Angaben des Herstellers (Dharmacon, „*Basic siRNA Resuspension*“) in 1x siRNA-Puffer gelöst. Die Transfektion der Zellen mit einer Konzentration von 100 nM siRNA erfolgte nach dem Protokoll „*DharmaFECT General Transfection Protocol*“; für die Transfektion mit 50 nM siRNA wurde dieses modifiziert. Undifferenziert gehaltene EB5 Nert wurden am Tag -1 in Gewebekulturflaschen mit einer Fläche von 12,5 cm<sup>2</sup> in Erhaltungsmedium ausgesät. Die siRNA wurde in siRNA-Puffer auf eine Endkonzentration von 2 µM verdünnt. Pro Transfektion wurden in verschiedenen Reaktionsgefäßen einerseits 62,5 µl siRNA mit 187,5 µl Serum-freiem Medium, andererseits 5 µl der Transfektionsreagenz „DharmaFECT 1“ mit 245 µl Serum-freiem Medium versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden beide Lösungen vermischt und für weitere zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dem gesamten Ansatz wurden 2 ml Transfektionsmedium zugefügt und nach Entfernen des Erhaltungsmediums wurden die Zellen in insgesamt 2,5 ml Transfektionsansatz inkubiert. An den indizierten Zeitpunkten wurde die gesamte RNA der Zellen isoliert (s. 3.3.1). Für die Isolation nach 48 h wurden die Zellen nach 30 h abgelöst und in Erhaltungsmedium auf entsprechend expandierter Fläche erneut ausgesät.

### 3.1.5 Differenzierung embryonaler Stammzellen

Zur Haltung embryonaler Stammzellen unter Bedingungen, die die mesodermale Differenzierung begünstigten, wurden unterschiedliche Methoden angewandt. Differenzierungsversuche, deren Ergebnis in der Durchflusszytometrie überprüft wurde, wurden als Kokultur der embryonalen Stammzellen mit OP9-Stromazellen realisiert. Differenzierungsversuche zur Isolierung von RNA wurden auf Kollagen IV durchgeführt, um eine Kokultur mit anderen Zellen, die die Notwendigkeit einer Aufreinigung nach sich gezogen hätte, zu vermeiden.

#### 3.1.5.1 Kokultur mit OP9-Stromazellen

Die OP9-Stromazellen wurden zwei bis drei Tage vor Beginn des Versuchs in 6-Lochplatten ausgesät, so dass die Zellen an Tag 0 konfluent waren. Undifferenziert

gehaltene EB5 Nert oder EB5 Kontrolle wurden durch Behandlung mit Trypsin abgelöst und zur Inaktivierung des Trypsins in eiskaltem Erhaltungsmedium aufgenommen. Die gewaschenen Zellen (1000 Upm, 10 min, 4 °C) wurden in mesodermalem Differenzierungsmedium aufgenommen; je Napf (9,6 cm<sup>2</sup>) konfluenter OP9-Stromazellen wurden 1x10<sup>4</sup> embryonale Stammzellen in 3 ml Medium ausgesät. In den entsprechenden Proben erfolgte die Zugabe von 1 µM OHT zu den jeweiligen Zeitpunkten. Zur Entfernung des Tamoxifens wurden die Kokulturen fünf Mal mit mesodermalem Differenzierungsmedium gewaschen und dabei jeweils für 15 min bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Wurde Notch für lediglich fünf Minuten aktiviert, geschah dies vor der Kokultivierung mit den Stammzellen in mesodermalem Differenzierungsmedium. Das Auswaschen von OHT geschah hierbei durch zweimaliges Sedimentieren der Zellen (1000 Upm, 5 min, 4 °C); danach erfolgte die Kokultivierung mit den Stromazellen. Nach vier bis fünf Tagen Inkubationszeit wurde der Anteil mesodermaler Vorläuferzellen mittels FACS bestimmt.

#### 3.1.5.2 Inkubation auf Kollagen IV

6-Lochplatten wurden nach Angaben des Herstellers für 1 h mit 5,2 µg/cm<sup>2</sup> Kollagen IV, welches in sterilem 0,05 M HCl gelöst worden war, beschichtet. Die Konzentration der Kollagenlösung betrug 50 µg/ml, jedes Reaktionsgefäß wurde mit 1 ml Lösung beschichtet. Nach Entfernen der überschüssigen Lösung und einmaligem Waschen der Näpfe mit PBS wurden diese an der Luft getrocknet und steril bei 4 °C bis zur Benutzung gelagert. Die embryonalen Stammzellen wurden wie unter 3.1.5.1 beschrieben gelöst und gewaschen. Pro Napf wurden 5x10<sup>4</sup> Zellen in 3 ml mesodermalem Differenzierungsmedium ausgesät. Falls indiziert, wurde Notch durch Zugabe von 1 µM OHT aktiviert. Nach vier bis 4,5 Tagen Inkubationszeit wurde die gesamte RNA aller Zellen isoliert (s. 3.3.1).

#### 3.1.6 Untersuchung embryonaler Stammzellen in verschiedenen Kulturbedingungen

Um das Transkriptom von Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien untersuchen zu können, wurden EB5 Nert bzw. Kontrolle unter unterschiedlichen Kulturbedingungen gehalten. Ein Überblick hierüber findet sich in Abbildung 4.7. In den Bedingungen „Undifferenziert“ und „Ektoderm bzw. Mesoderm begünstigend“ wurden die

Zellen an Tag -1 in Gewebekulturflaschen in Erhaltungsmedium ausgesät. Für Zellen der Kulturbedingung „Undifferenziert“ wurden die Zellen am nächsten Tag mit +/-1µM OHT induziert; zu den entsprechenden Proben war 30 min vorher Cycloheximid in einer Konzentration von 50 µg/ml zur Blockade der Proteinbiosynthese zugegeben worden. Nach einer Inkubationszeit des Tamoxifens von 4 h wurde die gesamte RNA der Zellen isoliert (s. 3.3.1).

Für die jeweiligen Proben aus den Kulturbedingungen „Ektoderm bzw. Mesoderm begünstigend“, deren Proteinsynthese inhibiert werden sollte, erfolgte die Zugabe von Cycloheximid in derselben Konzentration im Erhaltungsmedium. 30 min später wurden die Zellen zunächst für jeweils ca. 20 s zweimal mit dem Medium, in das sie aufgenommen werden sollten, gewaschen. Zeitgleich mit der Aufnahme der Zellen in ektodermalem Differenzierungsmedium bzw. Differenzierungsmedium „Mesoderm begünstigend“ erfolgte die Zugabe von +/- 1 µM OHT und gegebenenfalls weiteren 50 µg/ml Cycloheximid. Nach vierstündiger Inkubation wurde die gesamte RNA isoliert (s. 3.3.1).

Zellen der Bedingung „Mesoderm“ wurden zunächst für vier bzw. 4,5 Tage auf Kollagen IV in mesodermalem Differenzierungsmedium gehalten (s. 3.1.5.2). 30 min vor der Zugabe von +/- 1 µM OHT erfolgte gegebenenfalls die Blockade der Proteinsynthese durch 50 µg/ml Cycloheximid. Nach insgesamt vierstündiger Inkubation in Gegenwart von Tamoxifen wurde die gesamte RNA der Zellen isoliert (s. 3.3.1).

## 3.2 Durchflusszytometrie

### 3.2.1 Durchführung

Der Anteil mesodermaler Vorläuferzellen in Kokulturen aus EB5 und OP9-Stromazellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie, auch FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) genannt, bestimmt. Die Markierung des für die mesodermalen Vorläuferzellen spezifischen Oberflächenmarkers Flk-1 erfolgte mittels fluoreszierender Antikörper. Die adhärenenten Zellen wurden in den Näpfen zwei Mal mit je 2 ml PBS gewaschen, was zusätzlich das Entfernen eines Großteils der toten Zellen ermöglichte. Die Zellen wurden mit je 1 ml *Cell Dissociation Buffer* (Invitrogen) für 10 min bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> abgelöst und in mesodermales Differenzierungsmedium überführt. Die sedimentierten Zellen (1000 Upm, 10 min, 4 °C) wurden in 2 ml 0,5% BSA/PBS aufgenommen und in

FACS-Röhrchen überführt. Ein für die ungefärbte Negativkontrolle bestimmtes Aliquot wurde separiert. Die wiederum pelletierten Zellen (1000 Upm, 5 min, 4 °C) wurden in je 50 µl 0,5% BSA/PBS inklusive 0,5 µl Antikörper gegen CD16/CD32 (Fc-Block) aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde in die entsprechenden Proben je 1,5 µl spezifischer fluoreszierender Antikörper gegeben und die Proben für 1 h bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen der Zellen mit je 3 ml PBS entfernt (1000 Upm, 10 min, 4 °C). Die pelletierten Zellen wurden in je 500 µl 0,5% BSA/PBS aufgenommen und bis zur Analyse lichtgeschützt auf Eis gelagert. Bei einigen Experimenten wurde zusätzlich 20 µl 7-AAD (7-Amino-Actinomycin D) zur Abgrenzung toter Zellen zugegeben. Zur Entfernung toter verklumpter Zellen aus den Proben wurden die Zellsuspensionen vor der Messung gefiltert (Porengröße 40 µm). Die Messungen wurden an einem FACSCanto (Becton Dickinson) vorgenommen. Durch die unterschiedliche Größe und Granularität von Stromazellen und Stammzellen konnten die jeweiligen Populationen unterschieden werden; es wurden zwischen  $3 \times 10^4$  und  $5 \times 10^4$  lebende EB5 analysiert. Bei Experimenten, in denen den Proben 7-AAD zugegeben worden war, erfolgte die Kompensation anstelle von fluoreszierend markierten Mikropartikeln aus Polystyrol, so genannten *Beads*, mittels FDCP-mix-Zellen, die z. T. mit einem spezifisch gegen Mac-1 gerichteten Antikörper gefärbt worden waren. Mac-1 ist auf undifferenzierten FDCP-mix in geringer Stärke exprimiert (Schroeder *et al.*, 2003). 7-AAD ist als Farbstoff, der mit DNA interkaliert, zur Kompensation mit *Beads* ungeeignet.

### 3.2.2 Auswertung

FACS-Analysen wurden mit Hilfe des Programms *FACSDiva* (Becton Dickinson) ausgewertet. Die Quantifizierung der fluoreszierenden Zellen erfolgte durch den Vergleich ungefärbter und gefärbter Zellen im Histogramm. Vor dieser Arbeit durchgeführte Analysen mit Isotypkontrollen hatten gezeigt, dass der verwendete Antikörper keinen Einfluss auf die Autofluoreszenz der Zellen hatte (Persönliche Mitteilung Prof. Dr. U. Just). Zur verbesserten graphischen Darstellung wurden diese Histogramme mit Hilfe von *Adobe Photoshop Version 6.0* übereinander gelegt.

### 3.3 RNA-Methoden

Im direkten Umgang mit RNA wurden sowohl RNase-freie Lösungen wie z. B. DEPC-behandeltes Wasser als auch Filterspitzen verwendet.

#### 3.3.1 Isolierung von RNA

Die gesamte RNA der Zellen wurde mit dem „RNeasy Mini Kit“ nach Angaben des Herstellers zur Isolierung von RNA aus Zellkulturmaterial mittels Zentrifugation extrahiert. Die Lyse der Zellen erfolgte direkt in der Gewebekulturflasche, um Änderungen des Transkriptoms so gering wie möglich zu halten. Ohne nochmaliges Waschen erfolgte die Lyse durch Zugabe von 40  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  Puffer RLT nach Entfernen des Mediums. Die weitere Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei eventuelle Reste genomischer DNA durch einen zusätzlichen Verdau der Probe mit DNase I („RNase free DNase Set“) entfernt wurden.

#### 3.3.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration der isolierten, in DEPC-H<sub>2</sub>O gelösten RNA wurde durch Messung der Absorption in UV-Küvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer bestimmt; der Umrechnungsfaktor betrug OD 1 = 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Die Messung der Absorption bei 320 nm gab Aufschluss über die Trübung der Probe durch verunreinigende Partikel. Der Quotient aus den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm sollte für RNA bei 1,9 liegen. Er wurde ebenfalls bestimmt.

#### 3.3.3 Kontrolle der RNA auf Degradation

Bevor die isolierte RNA z.B. in der Synthese von cDNA eingesetzt wurde, wurde eine evtl. Degradierung durch Kontamination mit RNasen ausgeschlossen. Dazu wurde 1  $\mu\text{g}$  RNA in einem Agarosegel durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die RNA wurde in Ladepuffer in einem Gesamtvolumen von 12  $\mu\text{l}$  aufgenommen; 1% Agarose wurde in TAE-Puffer gelöst und das Gel vor dem Erkalten mit 4  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid (10 mg/ml) in

50 ml Endvolumen versetzt. Die RNA wurde bei 105 V für 40 min aufgetrennt. Bei nicht degradiertes RNA waren die Banden der 28s und 18s rRNA im Verhältnis 2:1 sichtbar.

### 3.3.4 Langzeitlagerung der RNA

Zur langfristigen Lagerung wurde die RNA gefällt. Dazu wurde die in RNase-freiem Wasser gelöste RNA mit 2,5 Volumen 100% Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat versetzt und bei -80 °C gelagert.

Um die gefällte RNA erneut zu lösen, wurde sie zunächst pelletiert (14000 Upm, 10 min, 4 °C) und mit je 200 µl 80% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (14000 Upm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet entweder unter dem Abzug oder in der Vakuumentrifuge getrocknet. Die RNA wurde anschließend in RNase-freiem Wasser gelöst, quantifiziert (s. 3.3.2) und erneut auf eventuelle Degradation hin überprüft (s. 3.3.3).

## 3.4 Synthese einzelsträngiger cDNA

Die Synthese einzelsträngiger cDNA erfolgte mit Hilfe des „First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Fermentas) nach Angaben des Herstellers. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Reaktionsschritte auf Eis durchgeführt. Bis zu 2 µg RNA wurden mit 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer (0,5 µg/µl) und DEPC-behandeltem Wasser in einem Gesamtvolumen von 11 µl für fünf Minuten bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl Ribonuklease Inhibitor (20 U/µl) und 2 µl 10mM dNTP wurde der Ansatz für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die reverse Transkription wurde durch 2 µl m-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µl) gestartet und für 60 min bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch zehnmütigen Erhitzen des Ansatzes bei 70 °C gestoppt; die auf Eis abgekühlte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

## 3.5 Real-Time RT-PCR

Die relative Genexpression der untersuchten Zielgene wurde mittels *Real-Time RT-PCR* ermittelt. Die cDNA wurde dabei durch Bindung von TaqMan Sonden markiert.

## 3.5.1 PCR

Das Volumen eines Ansatzes zur Synthese einzelsträngiger cDNA betrug 20  $\mu\text{l}$  (s. 3.4). Je nach Menge der eingesetzten RNA (1 bzw. 2  $\mu\text{g}$ ) wurde dieser Ansatz 1:2 (1  $\mu\text{g}$ ) bzw. 1:4 (2  $\mu\text{g}$ ) in *MilliQ*-H<sub>2</sub>O verdünnt. Die PCR wurde in 384-PCR-Platten in einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  je Napf in Duplikaten durchgeführt. Pro Ansatz wurden 0,5  $\mu\text{l}$  verdünnter cDNA und 4,5  $\mu\text{l}$  *TaqMan 2x Universal PCR MasterMix NoAmpEraseUNG* sowie 0,5  $\mu\text{l}$  des jeweiligen spezifischen *TaqMan Gene Expression Assay-on-Demand* (s. 2.7) und 4,5  $\mu\text{l}$  *MilliQ*-H<sub>2</sub>O gemischt. Nach Versiegelung der PCR-Platte mit Folie wurde die 40 Zyklen dauernde PCR in einem *7900HT Fast Real-Time-PCR* System mit folgendem Protokoll durchgeführt:

1. 2 min	50 °C
2. 10 min	95 °C
3. 15 s	95 °C
4. 1 min	60 °C – Schritt 3 und 4 je 40x

## 3.5.2 Auswertung

Die primäre Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms *SDS 2.2.2* (7900HT Version 2.2.2 Sequence Detection Systems). Die relative Expression der Gene wurde dabei mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet. Zur Normalisierung der Daten wurde bei jeder PCR die Expression des konstitutiv exprimierten Gens *GAPDH* gemessen; bei Experimenten mit spezifisch gegen *GAPDH* gerichteter siRNA wurde zusätzlich die Expression von *Polr2f* bestimmt und die Normalisierung erfolgte über alle untersuchten Gene. Zur Berechnung von Induktionen wurde die Einstellung „Automatic Ct“ genutzt, zur Ermittlung relativer Expressionen die Einstellung „Automatic Baseline – Threshold = 0,2“. Die weitere Auswertung erfolgte in *Microsoft Excel*. Berücksichtigt wurden lediglich Ct-Werte, die kleiner als 35 waren. Zur Berechnung von Induktionen wurden größere Werte durch den Wert „35“ ersetzt, um trotzdem eine Berechnung von Induktionen über dem Hintergrundrauschen durchführen zu können. Von allen Duplikaten wurde der Mittelwert errechnet. Der Mittelwert der Probe „GAPDH“ wurde daraufhin vom Mittelwert der anderen Proben subtrahiert; dies ergab den Wert  $\Delta\text{Ct}$ .  $\Delta\Delta\text{Ct}$  ergab sich aus der Subtraktion des  $\Delta\text{Ct}$ -Wertes der induzierten Probe vom  $\Delta\text{Ct}$ -Wert der nicht induzierten Probe. Die Induktionsstärke wurde mit der Formel

$$\text{Induktion} = (\text{Effizienz} + 1)^{\Delta\Delta\text{Ct}}$$

berechnet. Die graphische Darstellung dieser Werte erfolgte als Logarithmus zur Basis zwei. Die Effizienz des jeweiligen Assays wurde mittels einer Standardkurve aus seriellen Verdünnungen einer Mischung verwendeter cDNAs aus folgender Formel berechnet:

$$(\text{Effizienz} + 1) = 10^{-1/-(\text{Steigung der Standardkurve})}$$

Zur Bestimmung der relativen Expression wurden Cts, deren Wert größer als 35 war, nicht in die Berechnung miteinbezogen. Die Ermittlung von  $\Delta\text{Ct}$  erfolgte wie bei der Berechnung der Induktion. Der Wert der relativen Expression als Prozentsatz der Expression von GAPDH ergab sich dabei aus der Formel

$$\text{Relative Expression} = (\text{Effizienz} + 1)^{-\Delta\text{Ct}} \times 100.$$

Bei der Berechnung der Repression durch den Einsatz von siRNA wurden ebenfalls nur Ct-Werte <35 gewertet. Der Mittelwert der Duplikate der jeweiligen transfizierten Probe wurde vom Mittelwert der Duplikate der jeweiligen untransfizierten Probe subtrahiert. Die relative, noch nicht normalisierte Repression ergab sich dann aus

$$\text{Relative Repression} = (\text{Effizienz} + 1)^{\text{Mittelwert untransfiziert} - \text{Mittelwert transfiziert}}$$

Die Normalisierung dieser Daten erfolgte über alle untersuchten Gene, d. h. in einem nächsten Schritt wurde für jede Probe der Mittelwert aller gemessenen Repressionen mit Ausnahme der spezifischen Repression berechnet. Der Quotient aus relativer Repression und diesem Mittelwert ergab die normalisierte relative Repression; dieser Wert war für untransfizierte Proben 1, so dass die Werte der übrigen Proben den Faktor zwischen transfizierten und nicht transfizierten Proben bezifferten.

Die Darstellung der Induktionen ausgewählter Gene in einer Heat-Map wurde mit dem *Multi Experiment Viewer (MeV) Version 4.0*, einem Teilprogramm der *TM4 Microarray Software Suite* ([www.tm4.org](http://www.tm4.org)) erstellt. Sowohl die Proben als auch die Gene wurden dabei nach einem hierarchischen Algorithmus geordnet.

### 3.6 Microarrays

Zur Untersuchung der Transkriptome von EB5 Nert und EB5 Kontrolle in verschiedenen Kulturbedingungen wurden „Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0“ *Microarrays* verwendet. Alle Telexperimente wurden an der RWTH Aachen durchgeführt; Hybridisierung, Färben und Scannen der *Arrays* erfolgte in der „Chip-Facility des IZKF ‚BIOMAT‘“ der RWTH Aachen.



### 3.6.1 Überprüfung von RNA und cRNA mittels Gelelektrophorese

Um die Qualität der RNA als Ausgangsmaterial für die *Microarrays* sowie verschiedener Zwischenprodukte der Synthese wie fragmentierter bzw. unfragmentierter cRNA zu überprüfen, wurde jeweils Größe und Zusammensetzung eines Aliquots jeder Probe mittels Gelelektrophorese ermittelt. Dies geschah unter Verwendung eines *Agilent 2100 Bioanalyzer* und des dazugehörigen Kits *Agilent RNA 6000 Nano Reagents and Supplies*. 550 µl der Gelmatrix RNA 6000 Nano wurden in einer Filtersäule für 10 min bei 4000 Upm zentrifugiert. 65 µl des gefilterten Gels wurden mit 1 µl des zugehörigen konzentrierten Farbstoffs versetzt und 10 min bei 14000 Upm abzentrifugiert. Der Größenmarker sowie jeweils 1,5 µl jeder, gegebenenfalls verdünnten, RNA-Probe wurden für 2 min bei 70 °C inkubiert. Die Beladung des Chips sowie die Durchführung der Elektrophorese erfolgten nach Angaben des Herstellers.

### 3.6.2 Synthese doppelsträngiger cDNA

Nach dem Lösen der gefällten RNA (s. 3.3.4), der Bestimmung ihrer Konzentration (s. 3.3.2) und dem Ausschluß eventueller Degradation (s. 3.6.1) wurden jeweils 4 µg Gesamt-RNA jeder Probe zur Synthese doppelsträngiger cDNA eingesetzt. Dies geschah nach Angaben des Herstellers mit dem „Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit“ und dem „One-Cycle cDNA Synthesis Kit“ (s. *GeneChip® Expression Analysis Technical Manual* S. 2.1.13-2.1.18). Die Poly-A Kontrollen, die während der Synthese einzelsträngiger cDNA zugegeben wurden, bestanden aus definierten Mengen *in vitro* synthetisierter bakterieller RNA zur Überwachung der Effizienz der verschiedenen Syntheseschritte. Anschließend erfolgte die Synthese doppelsträngiger cDNA.

### 3.6.3 *In vitro* Transkription doppelsträngiger cDNA

Die doppelsträngige cDNA wurde zunächst mit dem „GeneChip Sample Cleanup Module“ gereinigt (s. *GeneChip® Expression Analysis Technical Manual* S. 2.1.32-2.1.33), bevor in einer *in vitro* Transkription (IVT) durch die Verwendung biotinylierter Ribonucleotide markierte cRNA aus der Hälfte des Ansatzes der doppelsträngigen cDNA synthetisiert wurde. Die IVT wurde mit dem „GeneChip IVT Labeling Kit“ für 16 h nach

Angaben des Herstellers durchgeführt (s. *GeneChip<sup>®</sup> Expression Analysis Technical Manual* S. 2.1.34-2.1.35).

#### 3.6.4 Fragmentierung der cRNA

Die biotinylierte cRNA wurde mit Hilfe des „GeneChip Sample Cleanup Module“ gereinigt (s. *GeneChip<sup>®</sup> Expression Analysis Technical Manual* S. 2.1.36-2.1.38). Nach der Messung der Konzentration der Proben im Photometer erfolgte eine weitere Überprüfung der RNA auf eventuelle Degradation (s. 3.6.1). Um eine optimale spezifische Bindung der cRNA an den *Array* zu ermöglichen, wurde in einem nächsten Schritt die cRNA mittels durch Metall induzierter Hydrolyse in Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe zwischen 35 und 200 Basenpaaren gespalten. Das Endvolumen des Fragmentierungsansatzes betrug dabei 40 µl, es wurde ebenfalls das „GeneChip Sample Cleanup Module“ benötigt (s. *GeneChip<sup>®</sup> Expression Analysis Technical Manual* S. 2.1.39-2.1.40). Ein Aliquot der fragmentierten cRNA wurde ebenfalls sowohl zum Ausschluß von Degradation als auch zur Kontrolle der Fragmentierung durch Gelelektrophorese im *Agilent Bioanalyzer* überprüft (s. 3.6.1).

#### 3.6.5 Hybridisierung, Färben und Scannen der *Microarrays*

Sowohl die Hybridisierung als auch Färben und Scannen der *Microarrays* wurden in der „Chip-Facility des IZKF ‚BIOMAT‘“ der RWTH Aachen durchgeführt. Protokolle der jeweiligen Arbeitsschritte finden sich in den Abschnitten 2.2 und 2.3 des *GeneChip<sup>®</sup> Expression Analysis Technical Manual*.

#### 3.6.6 Auswertung

Die primäre Auswertung der Rohdaten erfolgte im Computerprogramm „Affymetrix<sup>®</sup> Microarray Suite (MAS)“ in der Version 5. Nach Überprüfung verschiedener Parameter, die die Qualität von Synthese, IVT und Hybridisierung anzeigen, wie z. B. dem Prozentsatz aller exprimierten Gene, der Expression der Poly-A- und Hybridisierungskontrollen, der Stärke des Hintergrundsignals und dem *Scaling Factor*, wurden die normalisierten Datensätze zweier *Arrays* ( $\pm$ OHT) miteinander verglichen. Die

Datensätze eines *Arrays* (-OHT) dienten dabei als Basis, zu der der korrespondierende Datensatz in Relation gestellt wurde.

Dieser Vergleich konnte auch in Form eines *Scatterplots* dargestellt werden. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte in *Microsoft Excel*. Zu jeder Probe lagen Daten zur Signalstärke, zur Spezifität der Bindung (p-Wert) und zur Relation der Signalstärke zu der des korrelierenden *Arrays* vor. Um als exprimiert zu gelten, musste die Signalstärke mehr als doppelt so groß sein wie das Hintergrundsignal. Des Weiteren wurde ein Höchstwert des p-Wertes von 0,02 für exprimierte Gene angesetzt. Beim Vergleich der Expression in zwei verschiedenen Kulturbedingungen mussten diese Kriterien in mindestens einer Kulturbedingung erfüllt sein. Damit ein Gen als positiv bzw. negativ durch Notch reguliert gewertet wurde, musste eine mindestens zweifache Regulation vorliegen; diese *Signal Log Ratio* (SLR) wurde als Logarithmus zur Basis zwei angegeben.

Die Darstellung der Induktionen ausgewählter Gene in einer Heat-Map wurde mit dem *Multi Experiment Viewer (MeV) Version 4.0*, einem Teilprogramm der *TM4 Microarray Software Suite* ([www.tm4.org](http://www.tm4.org)) erstellt. Sowohl die Proben als auch die Gene wurden dabei nach einem hierarchischen Algorithmus geordnet.

### 3.7 Statistik

Die statistische Signifikanz von Ergebnissen wurde entweder mit Hilfe des gepaarten oder des heteroskedastischen Student'schen t-Tests ermittelt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Überblick

Ziel dieser Arbeit war es, Notch1-bedingte Effekte auf initiale Zelllinienentscheidungen in murinen embryonalen Stammzellen und in mesodermalen Vorläuferzellen zu charakterisieren. Dabei wurde ein bereits etabliertes, induzierbares *in vitro*-System genutzt, welches die gezielte Aktivierung von Notch1 ermöglicht.

Ausgangspunkt der hier dargestellten Experimente war die nach Aktivierung von Notch1 reduzierte Generierung mesodermaler Vorläuferzellen. Der Nachweis mesodermaler Vorläuferzellen erfolgte durch die Quantifizierung des Anteils Flk-1<sup>+</sup> Zellen. Diese Repression der mesodermalen Differenzierung wurde im ersten Teil der Arbeit genauer analysiert. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass die Aktivierung von Notch1 in embryonalen Stammzellen die ektodermale Differenzierung begünstigt (Unveröffentlichtes Ergebnis Prof. Dr. U. Just, Lowell *et al.*, 2006; Nemir *et al.*, 2006). Um den molekularen Mechanismus sowohl der Repression Flk-1<sup>+</sup> Zellen durch Notch1 als auch der Wirkung von Notch1 auf embryonale Stammzellen und mesodermale Vorläuferzellen zu charakterisieren, wurden im zweiten Teil mit Hilfe von *Microarrays* Zielgene von Notch1 unter verschiedenen Kulturbedingungen und in Zellen verschiedener Differenzierungsstadien identifiziert. Eine Auswahl dieser Zielgene wurde anschließend mittels *Real-Time RT-PCR* auf Induktion durch Notch1 überprüft. Dabei wurde die differentielle Expression verschiedener, sowohl in dieser Arbeit neu identifizierter als auch bekannter Zielgene von Notch1 in undifferenzierten bzw. verschiedenen differenzierenden Zelltypen analysiert. Abschließend wurde mit der Etablierung eines Systems begonnen, durch gleichzeitige Repression der Expression bestimmter Zielgene mittels siRNA und Aktivierung von Notch1 den Einfluss dieser Gene auf die initiale Zelllinienentscheidung in Bezug auf die Bildung Flk-1<sup>+</sup> mesodermaler Vorläuferzellen zu untersuchen.

## 4.2 Einfluss von Notch1 auf die initialen Schritte der mesodermalen Differenzierung

Embryonale Stammzellen sind pluripotent und besitzen daher die Fähigkeit, zu reifen Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Diese Differenzierungsschritte lassen sich *in vitro* mittels unterschiedlicher Methoden nachvollziehen, welche sowohl den Einsatz von Seren und Stoffen der extrazellulären Matrix als auch die Verwendung genau definierter synthetischer Wachstumszusätze verlangen. Dabei werden diese *in vitro*-Differenzierungen nach drei Protokollen durchgeführt: der Bildung von *Embryoid Bodies*, der Kokultur der Stammzellen mit Stromazellen oder der Kultivierung auf speziellen Matrixproteinen, z. B. Kollagen (Übersicht bei Nishikawa *et al.*, 2007). Die beiden letzteren Methoden kamen in dieser Arbeit zum Einsatz. Dabei wurden die Zellen unter Bedingungen gehalten, welche die Entwicklung mesodermaler Zellen begünstigen und diese dadurch anreichern.

Die Kokultur der embryonalen Stammzellen mit den in dieser Arbeit verwendeten OP9-Stromazellen ermöglicht genau wie die Inkubation der Stammzellen auf Kollagen IV die Entwicklung der Zellen zu reifen mesodermalen Zelltypen wie Endothelzellen, Herzmuskelzellen, Makrophagen, Granulozyten und B-Zellen (Übersicht s. Abb. 1.4). Der erste Schritt dieser Differenzierung ist dabei die Entstehung mesodermaler Vorläuferzellen, die durch die Expression der fötalen Leberkinase Flk-1 gekennzeichnet sind (Shalaby *et al.*, 1997; Shalaby *et al.*, 1995). Das OP9-System ist hierbei technisch einfacher zu realisieren und ermöglicht die effizientere *in vitro*-Differenzierung der Zellen, d. h. mit einem größeren Anteil überlebender Zellen; andererseits impliziert diese Form der Kokultur die Notwendigkeit, bei allen folgenden Applikationen, welche z. B. eine RNA-Isolierung aus den Stammzellen erfordern, ein Aufreinigen der entsprechenden Zellpopulation. Dies bedeutet zusätzlichen Stress für die Zellen und damit bereits einen möglichen Einfluss auf das Transkriptom.

Grundlage aller Experimente war die Verwendung stabiler Zelllinien, die das konditionell aktivierbare Notch1-Fusionsprotein NERT enthalten. Sie wurden wie die Kontrollzelllinien, die lediglich mit dem leeren Expressionsplasmid transfiziert worden waren, von Timm Schroeder im Rahmen seiner Promotionsarbeit hergestellt. Zwei dieser Zelllinien, beide aus Zellen der murinen embryonalen Stammzelllinie EB5 hergestellt und im Folgenden kurz EB5 Nert bzw. Kontrolle genannt, wurden entweder auf

OP9-Stromazellen oder auf Kollagen IV in mesodermale Vorläuferzellen differenziert. Durch Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (OHT) konnte nun Notch1 in EB5 Nert zu beliebigen Zeitpunkten während der Differenzierung aktiviert werden.

#### 4.2.1 Die Aktivierung von Notch1 blockiert die Bildung mesodermaler Vorläuferzellen

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Feststellung, dass die Aktivierung von Notch1 die Bildung Flk-1<sup>+</sup> mesodermaler Vorläuferzellen inhibiert (Prof. Dr. U. Just, Dr. T. Schroeder, persönliche Mitteilung). Dazu wurde in undifferenzierten EB5 Nert bzw. Kontrolle gleichzeitig mit ihrer Kokultivierung auf OP9 durch Zugabe von OHT Notch1 aktiviert. Als Maß der mesodermalen Differenzierung diente die Quantifizierung der Flk-1<sup>+</sup> Zellen im FACS am Tag 4,5.

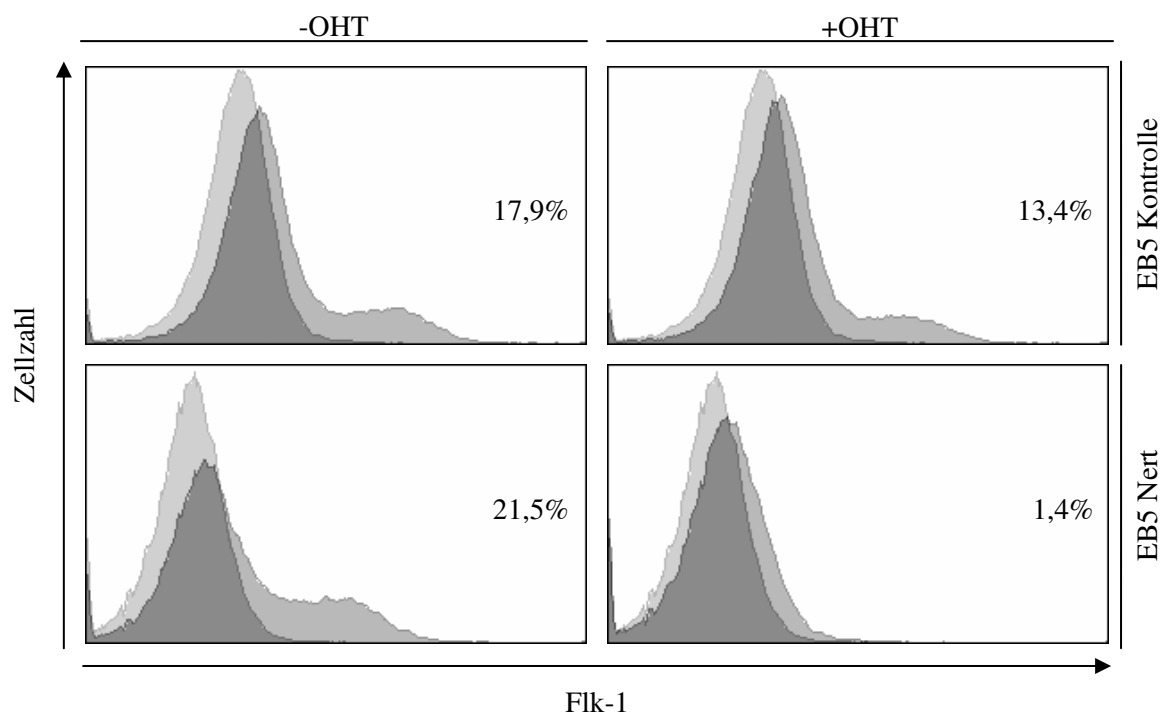


Abb. 4.1: Die Induktion von Notch1 inhibiert die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Flk-1<sup>+</sup> mesodermalen Vorläuferzellen. Je  $1 \times 10^4$  EB5 Kontrolle bzw. EB5 Nert wurden auf konfluenten OP9-Stromazellen in 6-Loch-Platten unter Bedingungen gehalten, welche die mesodermale Differenzierung förderten. Die Aktivierung von Notch1 wurde am Tag 0 durch Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  OHT induziert. Am Tag 4,5 wurden die Zellen geerntet und der Anteil der Flk-1<sup>+</sup> Zellen mittels FACS bestimmt. Dunkelgraue Flächen zeigen gefärbte Zellen, hellgraue Flächen ungefärbte. Die Werte zeigen den Prozentsatz Flk-1<sup>+</sup> Zellen. Das Ergebnis ist repräsentativ für elf (EB5 Nert) bzw. vier (EB5 Kontrolle) unabhängige Experimente; die Blockierung der Flk-1-Expression ist statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ).

Abbildung 4.1 zeigt, dass die Zugabe von OHT in EB5 Kontrolle die Bildung mesodermaler Vorläuferzellen quantitativ nicht beeinträchtigte. In EB5 Nert hingegen führte die durch OHT induzierte Aktivierung von Notch1 zu einer signifikanten Reduzierung der Flk-1<sup>+</sup> Zellen, was für eine Blockierung der mesodermalen Differenzierung spricht.

Die gleiche Repression der Bildung Flk-1<sup>+</sup> Zellen erfolgte auch durch die Aktivierung von Notch1 während der Differenzierung der embryonalen Stammzelllinien in mit Kollagen IV beschichteten Gewebekulturschalen (Prof. Dr. U. Just, Dr. T. Schroeder, persönliche Mitteilung).

Eine Beeinflussung der initialen Differenzierungsschritte zeigte sich auch in der Morphologie der Zellen. Abbildung 4.2 zeigt eindeutige Unterschiede sowohl in der Gestalt der einzelnen Zellen als auch in ihrer Positionierung innerhalb der Kolonien, die wiederum in ihrer Größe und Form deutlich voneinander abweichen.

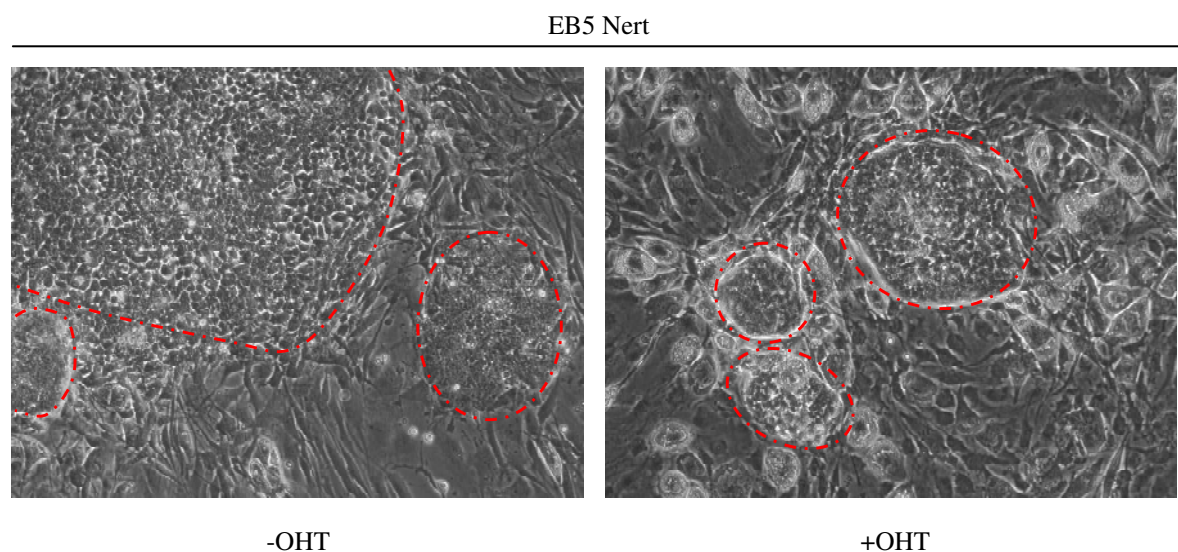


Abb. 4.2: Die Aktivierung von Notch1 beeinflusst die Morphologie der differenzierenden Zellen. Je  $1 \times 10^4$  EB5 Kontrolle bzw. EB5 Nert wurden auf konfluenten OP9-Stromazellen in 6-Loch-Plattten unter Bedingungen gehalten, welche die mesodermale Differenzierung förderten. Die Aktivierung von Notch1 wurde am Tag 0 durch Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  OHT induziert. Am Tag 4,5 wurden Phasenkontrastbilder typischer Koloniefornen in ursprünglich 100facher Vergrößerung aufgenommen. Die Aufnahmen sind repräsentativ für elf unabhängige Experimente. In Abwesenheit von OHT sind im linken oberen Bereich des Bildes eine große Kolonie und am rechten Rand des Bildes eine kleine Kolonie mesodermaler Vorläuferzellen zu erkennen. Eine Kolonie undifferenzierter Zellen befindet sich im linken unteren Abschnitt; bei den restlichen Zellen handelt es sich um OP9-Stromazellen. In Anwesenheit von OHT zeigen einige OP9-Zellen Fetteinschlüsse; zu sehen sind außerdem drei Kolonien von EB5 Nert in der Mitte des Bildes. Bei der oberen linken Kolonie handelt es sich um undifferenzierte Zellen, die beiden anderen Kolonien bestehen aus

unterschiedlich differenzierten Zellen; sie zeigen jedoch keinerlei Ähnlichkeit mit mesodermalen Vorläuferzellen.

EB5 Nert wiesen in Abwesenheit von OHT in einem Teil der Kolonien typische Merkmale mesodermaler Vorläuferzellen auf. Differenzierte Kolonien dieser Form und Größe traten in Anwesenheit von OHT nur in Einzelfällen auf (s. Abb. 4.2). Die Zellen wiesen in Anwesenheit von OHT keine typischen morphologischen Merkmale auf Gelatine gehaltener undifferenzierter embryonaler Stammzellen auf; vielmehr fanden sich differenzierende Kolonien ohne typisch mesodermale Merkmale. Bei der mesodermalen Differenzierung von EB5 Kontrolle wurden keine morphologischen Unterschiede durch die An- bzw. Abwesenheit von OHT festgestellt. Die dort auftretenden Kolonieformen entsprachen denen in EB5 Nert -OHT (Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.2 Kinetik der Expression von Flk-1 während der mesodermalen Differenzierung

Die fötale Leberkinase-1 (Flk-1), auch *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor-2* genannt, ist essentiell für die Differenzierung hämatopoetischer Zellen und Endothelzellen und kann ab dem Stadium mesodermaler Vorläuferzellen bis hin zu Endothelzellen nachgewiesen werden (Kataoka *et al.*, 1997; Nishikawa *et al.*, 1998; Shalaby *et al.*, 1997; Shalaby *et al.*, 1995). Sie dient als Marker mesodermaler Vorläuferzellen des Seitenplattenmesoderm, da ihre Expression im weiteren Verlauf der Differenzierung abnimmt und nur noch auf Teilpopulationen nachzuweisen ist (Hirai *et al.*, 2005). Der größte Anteil Flk-1<sup>+</sup> Zellen ist dabei zwischen Tag 4,5 und Tag 6,5 nachweisbar (Kabrun *et al.*, 1997; Nishikawa *et al.*, 1998).

Um die durch die Aktivierung von Notch1 verursachte Blockierung der Bildung mesodermaler Vorläuferzellen genauer untersuchen zu können, wurde in einem weiteren Experiment die Kinetik der Flk-1-Expression eingehender analysiert. EB5 Kontrolle und EB5 Nert wurden in An- bzw. Abwesenheit von OHT auf OP9-Stromazellen unter Bedingungen gehalten, die eine mesodermale Differenzierung förderten. Am Tag 4, Tag 4,5 und Tag 5 wurde der Anteil Flk-1<sup>+</sup> Zellen mittels FACS bestimmt. Abbildung 4.3 zeigt, dass eine deutliche Population Flk-1<sup>+</sup> Zellen in EB5 Kontrolle erst ab Tag 4,5 zu sehen war. Die Bildung mesodermaler Vorläuferzellen wurde durch die Anwesenheit von OHT dabei in EB5 Kontrolle in allen drei Proben nicht beeinträchtigt.



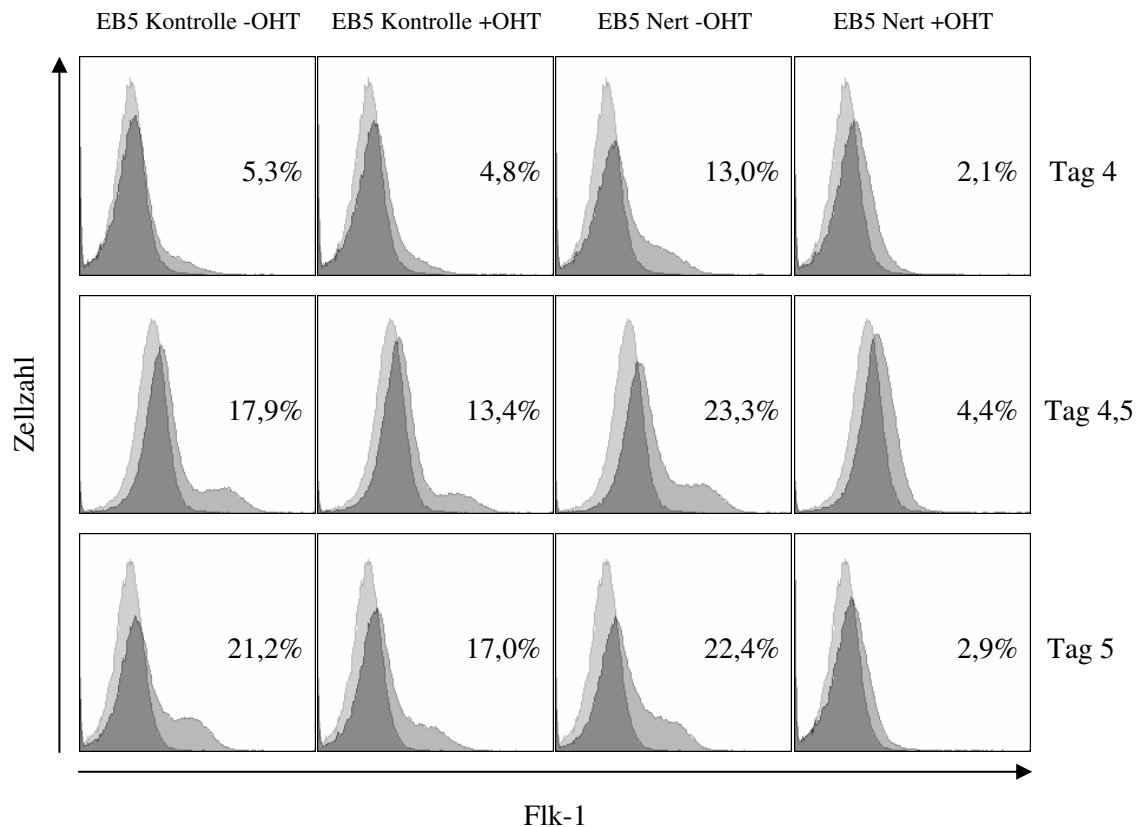


Abb. 4.3: Der größte Anteil Flk-1<sup>+</sup> Zellen ist während der mesodermalen Differenzierung zwischen Tag 4,5 und Tag 5 nachweisbar. Je  $1 \times 10^4$  EB5 Kontrolle bzw. EB5 Nert wurden auf konfluenten OP9-Stromazellen in 6-Loch-Platten unter Bedingungen gehalten, welche die mesodermale Differenzierung förderten. Die Aktivierung von Notch1 wurde am Tag 0 durch Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  OHT induziert. Die Zellen wurden am Tag 4, Tag 4,5 bzw. am Tag 5 geerntet und der Anteil der Flk-1<sup>+</sup> Zellen mittels FACS bestimmt. Dunkelgraue Flächen zeigen gefärbte Zellen, hellgraue Flächen ungefärbte. Die Werte zeigen den Prozentsatz Flk-1<sup>+</sup> Zellen. Dargestellt ist ein Wert von Duplikaten eines Experiments.

Im Gegensatz dazu war in EB5 Nert in Abwesenheit von OHT bereits am Tag 4 eine Population mesodermaler Vorläuferzellen nachweisbar. Ihr Anteil stieg von 13% am Tag 4 auf 23,3% am Tag 4,5 bzw. 22,4% am Tag 5. An allen drei Zeitpunkten wurde dieser Anteil Flk-1<sup>+</sup> Zellen durch Aktivierung von Notch1 deutlich reduziert.

Das Experiment zeigt, dass die Expression von Flk-1 auf mesodermalen Vorläuferzellen zwischen Tag 4,5 und Tag 5 der Differenzierung am höchsten war; dennoch zeigt es auch Unterschiede zwischen EB5 Nert und EB5 Kontrolle in der Kinetik der Expression. Im Vergleich mit weiteren durchgeführten Differenzierungsexperimenten konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass das ermittelte Zeitfenster zwischen Tag 4,5 und Tag 5 als Anhaltspunkt für den Zeitpunkt der Messung von Flk-1 dienen konnte. In Abhängigkeit von der Morphologie der differenzierenden Zellen wurde der Großteil der

Messungen am Tag 4,5 durchgeführt, einige jedoch auch am Tag 4 (s. Abb. 4.6) bzw. am Tag 5 (Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.3 Die zeitweilige Aktivierung von Notch1 inhibiert die Bildung Flk-1<sup>+</sup> Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine fortdauernde Aktivierung von Notch1 während der Differenzierung embryonaler Stammzellen die Bildung Flk-1<sup>+</sup> mesodermaler Vorläuferzellen inhibiert, sollte diese Repression in Bezug auf Zeitpunkt und Dauer der benötigten Aktivierung von Notch1 genauer untersucht werden. Zunächst wurde Notch1 an verschiedenen Zeitpunkten während der Differenzierung in EB5 Nert durch Zugabe von OHT aktiviert, um zu überprüfen, inwieweit die Blockierung der Bildung Flk-1<sup>+</sup> Zellen diesbezüglich abhängig ist.

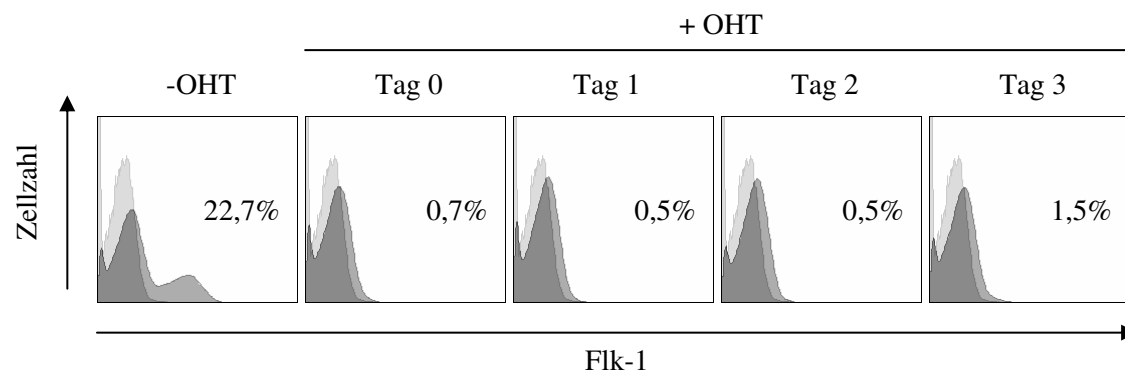


Abb. 4.4: Die durch Notch1 induzierte Blockierung Flk-1<sup>+</sup> Zellen während der mesodermalen Differenzierung ist unabhängig vom Zeitpunkt der Induktion. Je  $1 \times 10^4$  EB5 Nert wurden auf konfluenten OP9-Stromazellen in 6-Loch-Plattten unter Bedingungen gehalten, welche die mesodermale Differenzierung förderten. Am Tag 0, Tag 1, Tag 2 oder Tag 3 wurde Notch1 durch Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  OHT induziert. Die Zellen wurden am Tag 4,5 geerntet und der Anteil der Flk-1<sup>+</sup> Zellen im FACS bestimmt; tote Zellen wurden dabei durch Färbung mit 7-AAD ausgeschlossen. Dunkelgraue Flächen zeigen gefärbte Zellen, hellgraue Flächen ungefärbte. Die Werte zeigen den Prozentsatz Flk-1<sup>+</sup> Zellen. Dargestellt ist ein Wert von Quadruplikaten eines Experiments; das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Abbildung 4.4 zeigt, dass die durch die Zugabe von OHT induzierte Aktivierung von Notch1, unabhängig vom Beginn der Aktivierung, die Bildung Flk-1<sup>+</sup> Zellen nahezu vollständig inhibierte. Die Blockierung der Generierung Flk-1<sup>+</sup> Zellen erfolgte, selbst wenn die Zellen bis zu drei Tage in Abwesenheit von OHT unter Bedingungen gehalten wurden, die eine mesodermale Differenzierung förderten.

Notch1 muss demnach nicht von Beginn der Differenzierung an aktiviert sein, um die Bildung Flk-1<sup>+</sup> Zellen zu inhibieren.

In einem weiteren Experiment sollten die Auswirkungen einer zeitweiligen Aktivierung von Notch1 während der mesodermalen Differenzierung auf diese untersucht werden. Dazu wurde in EB5 Nert auf OP9-Stromazellen am Tag 0 Notch1 durch die Zugabe von OHT aktiviert; das OHT wurde am Tag 1, Tag 2 bzw. Tag 3 durch Waschen der Zellen aus dem Medium entfernt. Abbildung 4.5 zeigt, dass eine 24-stündige Aktivierung von Notch1 ausreichend war, um die Bildung Flk-1<sup>+</sup> Zellen zu inhibieren. Dabei hatte das Waschen der Zellen an sich keinen Einfluss auf die Bildung Flk-1<sup>+</sup> Zellen (Daten nicht gezeigt). Unabhängig davon, wann OHT aus dem Medium heraus gewaschen worden war, wurde der Anteil Flk-1<sup>+</sup> mesodermaler Vorläuferzellen nahezu vollständig reduziert.

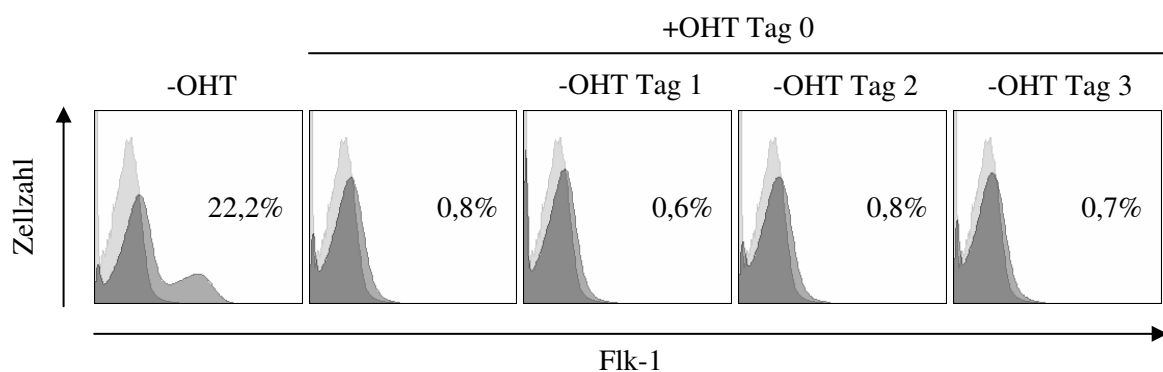


Abb. 4.5: Auch die zeitweilige Aktivierung von Notch1 inhibiert die Bildung Flk-1<sup>+</sup> Zellen. Je  $1 \times 10^4$  EB5 Nert wurden auf konfluenten OP9-Stromazellen in 6-Loch-Platten unter Bedingungen gehalten, welche die mesodermale Differenzierung förderten. Am Tag 0 wurde Notch1 durch Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  OHT induziert; am Tag 1, Tag 2 oder Tag 3 wurde OHT durch Waschen aus dem Medium entfernt. Die Zellen wurden am Tag 4,5 geerntet und der Anteil der Flk-1<sup>+</sup> Zellen mittels FACS bestimmt; dabei wurden tote Zellen durch Färbung mit 7-AAD ausgeschlossen. Dunkelgraue Flächen zeigen gefärbte Zellen, hellgraue Flächen ungefärbte. Die Werte zeigen den Prozentsatz Flk-1<sup>+</sup> Zellen. Dargestellt ist ein Wert von Quadruplikaten eines Experiments; das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Es konnte gezeigt werden, dass der Notch1-Signalweg nicht über die gesamte Dauer der Differenzierung aktiviert sein muss, um die Bildung Flk-1<sup>+</sup> mesodermaler Vorläuferzellen zu unterdrücken. Diese beiden Experimente (s. Abb. 4.4 und Abb. 4.5) wurden teilweise in Kooperation mit Dr. T. Schroeder (GSF Neuherberg) durchgeführt.

Durch die vorangegangenen Experimente konnte deutlich gemacht werden, dass eine 24-stündige Aktivierung des Notch1-Signalwegs ausreichend ist, um die Bildung Flk-1<sup>+</sup> mesodermaler Vorläuferzellen zu inhibieren. Um genauere Aussagen über die benötigte Dauer der Aktivierung von Notch1 treffen zu können, wurde in einem weiteren Experiment in EB5 Nert auf OP9-Stromazellen am Tag 0 durch Zugabe von OHT Notch1 aktiviert. Nach fünf Minuten bzw. vier Stunden wurde das verbleibende OHT durch Waschen aus dem Medium entfernt.

Abbildung 4.6 zeigt, dass ohne Zugabe von OHT der Anteil mesodermaler Vorläuferzellen bei ungefähr 40% lag. Wurde Notch1 für nur fünf Minuten aktiviert, wurde der Prozentsatz der Flk-1<sup>+</sup> Zellen nicht gesenkt. Eine vierstündige Inkubation der Zellen in Gegenwart von OHT mit anschließender Fortsetzung der viertägigen Differenzierung in Abwesenheit von OHT hingegen vermochte die Bildung Flk-1<sup>+</sup> Zellen ebenso stark zu reduzieren wie EB5 Nert, in denen das OHT nicht entfernt worden war.

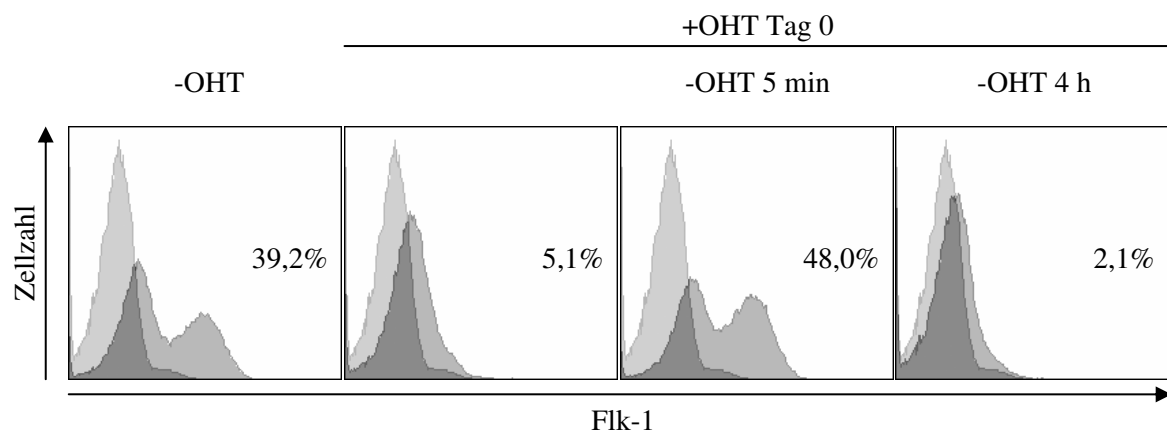


Abb. 4.6: Die vierstündige Induktion von Notch1 ist ausreichend für die Blockierung der mesodermalen Differenzierung. Je  $1 \times 10^4$  EB5 Nert wurden auf konfluenten OP9-Stromazellen in 6-Loch-Platten unter Bedingungen gehalten, welche die mesodermale Differenzierung förderten. Notch1 wurde am Tag 0 durch Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  OHT aktiviert; nach 5 min bzw. 4 h wurde OHT durch Waschen aus dem Medium entfernt. Die Zellen wurden am Tag 4 geerntet und der Anteil der Flk-1<sup>+</sup> Zellen mittels FACS bestimmt; dabei wurden tote Zellen durch Färbung mit 7-AAD ausgeschlossen. Dunkelgraue Flächen zeigen gefärbte Zellen, hellgraue Flächen ungefärbte. Die Werte zeigen den Prozentsatz Flk-1<sup>+</sup> Zellen. Dargestellt ist ein Wert von Quadruplikaten eines Experiments.

Durch die in Bezug auf Zeitpunkt und Dauer der Aktivierung von Notch1 variierenden, in EB5 Nert durchgeführten Differenzierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Notch-Signalweges die Bildung mesodermaler Vorläuferzellen inhibiert.

Dabei war es nicht von Bedeutung, ob diese Aktivierung zu Beginn oder zum Ende der vier- bis fünftägigen Differenzierung erfolgte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bereits eine vierstündige Induktion von NERT am Tag 0 ausreichend war, um die Bildung Flk-1<sup>+</sup> Zellen zu reprimieren.

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass aktiviertes Notch1 durch die Inhibition Flk-1<sup>+</sup> Zellen eine wichtige Rolle während initialer Differenzierungsschritte und Zelllinienentscheidungen in murinen embryonalen Stammzellen spielt und die Differenzierung in Zellen des mesodermalen Keimblatts blockiert.

### 4.3 Identifikation von Notch1-Zielgenen

Die Signaltransduktion mittels Notch ist an sehr vielen unterschiedlichen Differenzierungsentscheidungen während der embryonalen Entwicklung in allen drei Keimblättern maßgeblich beteiligt. Dabei kann Notch sowohl induzierend als auch inhibierend wirken (Übersicht bei Bray, 2006). Bisher sind lediglich eine sehr begrenzte Anzahl direkter Zielgene und Interaktionspartner von Notch bekannt. An erster Stelle sind hierbei verschiedene Mitglieder der *Hes/Hey*-Familie zu nennen. Zu untersuchen bleibt, inwieweit diese geringe Zahl bereits bekannter Zielgene ausreichend ist, die Vielfalt der durch Notch vermittelten Effekte vollständig zu erklären, oder ob weitere generelle und kontextabhängige Zielgene von Notch existieren.

Wie bereits gezeigt werden konnte, nimmt Notch1 Einfluss auf initiale Zelllinienentscheidungen und inhibiert in diesem Zusammenhang die Induktion der mesodermalen Differenzierung (s. Abschnitt 4.2). Mehrere Ergebnisse sprechen für eine Induktion der ektodermalen Differenzierung durch Notch1. Auf Kollagen IV differenzierte EB5 Nert zeigten nach Aktivierung von Notch1 morphologische Merkmale radialer Gliazellen (unveröffentlichtes Ergebnis Prof. Dr. U. Just). Ebenso konnte zeitgleich von zwei weiteren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Aktivierung von Notch1 die Differenzierung embryonaler Stammzellen zugunsten der ektodermalen Differenzierung beeinflusst (Lowell *et al.*, 2006; Nemir *et al.*, 2006). Um zu untersuchen, wie Notch1 initiale Zelllinienentscheidungen während der frühen Differenzierung embryonaler Stammzellen sowie in mesodermalen Vorläuferzellen beeinflusst, sollten Zielgene von Notch1 identifiziert und deren differentielle Expression analysiert werden, die den molekularen Mechanismus dieser Zelllinienentscheidung offen legen. Das gesamte

Transkriptom der Zellen wurde vor und nach Aktivierung von Notch1 mittels *Microarray*-Experimenten untersucht, um daraus Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen der durch Notch1 vermittelten Zelllinienentscheidungen zu ziehen. Diese Suche erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Zenke (RWTH Aachen).

#### 4.3.1 Experimenteller Aufbau der Suche nach Zielgenen von Notch1

Die Differenzierung von Zellen ist ein Prozess, der sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durch sehr viele verschiedene Parameter beeinflusst wird. *In vitro* wird dabei durch verschiedene Medienzusätze wie z. B. FCS oder Zytokine wie auch z. B. durch die Kokultur auf Stromazellen, die die natürliche Nische der Stammzellen nachbilden, die gerichtete Differenzierung der embryonalen Stammzellen in Zellen eines bestimmten Keimblatts induziert. Um die Auswirkungen der zellkontextabhängigen Signale von Notch1 auf die Zelllinienentscheidung in undifferenzierten embryonalen Stammzellen zu untersuchen, wurden deshalb verschiedene *Microarray*-Analysen durchgeführt. Die RNA wurde aus Zellen isoliert, die unter verschiedenen Bedingungen gehalten worden waren. Die Verwendung unterschiedlicher Kulturbedingungen sollte dabei u. a. ermöglichen, die Auswirkungen dieser Kulturbedingungen auf die Notch1-vermittelten Effekte deutlich zu machen. Darüber hinaus können externe Kulturbedingungen unter Umständen die Expression kontextabhängiger Zielgene erst möglich machen. Wie Abbildung 4.7 zeigt, wurde die Anzahl der untersuchten Bedingungen dabei für weiterführende *Real-Time RT-PCR*-Analysen um die Bedingung „Undifferenziert“ noch erhöht; zusätzlich wurden für diese Experimente die Zellen in An- bzw. Abwesenheit von Cycloheximid gehalten, um zwischen direkten und indirekten Zielgenen zu unterscheiden.

Grundlage aller Experimente (s. Abb. 4.7) waren hierbei EB5 Nert bzw. EB5 Kontrolle, die entweder auf Kollagen IV in mesodermale Vorläuferzellen differenziert worden waren oder auf Gelatine undifferenziert gehalten worden waren. In den Bedingungen „Mesoderm“ und „Undifferenziert“ wurde für die Dauer von vier Stunden Notch1 durch Zugabe von OHT aktiviert. Daraufhin wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. In den auf Gelatine gehaltenen Zellen, die unter mesodermale bzw. ektodermale Differenzierung begünstigenden Kulturbedingungen gehalten wurden, wurde zunächst durch Waschen der Zellen LIF entfernt.

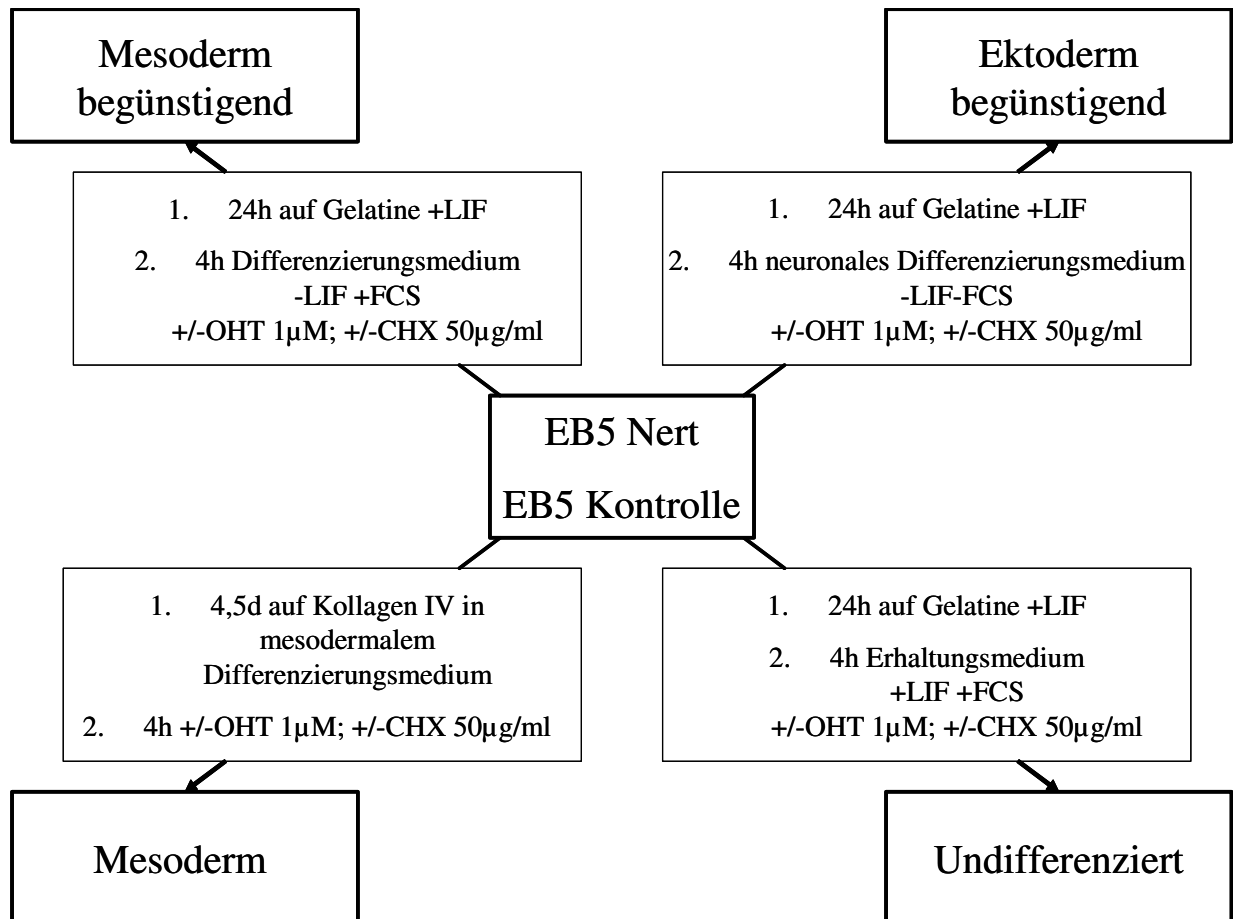


Abb. 4.7: Kulturbedingungen für die Identifizierung von Notch1-Zielgenen aus verschiedenen Differenzierungsstufen. EB5 Nert bzw. EB5 Kontrolle wurden in Gewebekulturflaschen auf Gelatine bzw. Kollagen IV unter den angegebenen Bedingungen gehalten. Erfolgte zeitgleich mit der Induktion von Notch1 ein Medienwechsel, wurden die Zellen zunächst zweimal mit diesem Medium gewaschen. Nach vierstündiger Induktion erfolgte die Lyse der Zellen und Isolierung der RNA. In *Microarray*-Experimenten wurden Proben der Bedingungen „Ektoderm begünstigend“, „Mesoderm begünstigend“ und „Mesoderm“ in Abwesenheit von Cycloheximid untersucht. Die übrigen Proben wurden im weiteren Verlauf mittels *Real-time RT-PCR* analysiert.

LIF ist für murine embryonale Stammzellen essentiell, um die Zellen undifferenziert halten zu können. Da das in der Bedingung „Mesoderm begünstigend“ verwendete Medium FCS enthielt, wurden die Zellen „Ektoderm begünstigend“ in neuronalem Differenzierungsmedium ohne FCS gehalten. Zeitgleich mit dem Medienwechsel wurden auch diese Zellen für vier Stunden in An- bzw. Abwesenheit von OHT gehalten, um den Notch1-Signalweg zu aktivieren.

#### 4.3.2 Die Aktivierung von Notch1 induziert die Expression bekannter Notch-Zielgene

Um sicherzustellen, dass die eingesetzten Stammzellen potentiell zur Differenzierung fähig waren, wurde jeweils zeitgleich mit der RNA-Isolierung ein Aliquot der Zellen auf OP9-Stromazellen differenziert und der Anteil der Flk-1<sup>+</sup> Zellen sowie deren durch Notch1 verursachte Blockierung mittels FACS untersucht (s. Abb. 4.1). Nach der Isolierung der gesamten RNA der Zellen (s. Abb. 4.7) wurde zusätzlich zur Überprüfung der Integrität der RNA die Effizienz der Notch1-Aktivierung untersucht. Zu diesem Zweck wurde mittels *Real-Time RT-PCR* die Expression der bekannten Notch-Zielgene *Hes1*, *Hey1* und *Hey2* in An- und Abwesenheit von OHT analysiert. Zusätzlich wurde auch das Expressionsniveau des Pluripotenzmarkers *Oct4* gemessen. Dabei stand nicht eine mögliche Regulation von *Oct4* durch Notch1 im Vordergrund, sondern die Beantwortung der Frage, ob die Zellen, die unter der Bedingung „Mesoderm“ gehalten worden waren, deutliche Zeichen der Differenzierung aufweisen würden.

Wie Abbildung 4.8 zeigt, beeinflusste die Zugabe von OHT nicht die Expression der untersuchten Gene in EB5 Kontrolle. Sowohl in EB5 Kontrolle als auch in EB5 Nert änderte sich nach Aktivierung von Notch1 nicht die Expression von *Oct4*. In EB5 Nert stiegen *Hey1* und *Hey2* in allen untersuchten Bedingungen nach Aktivierung des Notch/RBP-J $\kappa$ -Signalwegs auf das vier- bis sechsfache der ursprünglichen Expression. Diese beiden bereits bekannten Zielgene von Notch zeigen damit die erfolgreiche Aktivierung von Notch1 durch das induzierbare NERT-System an.

Das ebenfalls bekannte Zielgen von Notch1 *Hes1* wurde dagegen zwar in embryonalen Stammzellen in den Bedingungen „Mesoderm begünstigend“ und „Ektoderm begünstigend“ ca. zweifach hochreguliert, in den mesodermalen Vorläuferzellen hingegen wurde die Expression von *Hes1* nach Aktivierung von Notch1 nicht beeinflusst (s. Abbildung 4.8). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass *Hes1* ein Zielgen von Notch1 ist, dies aber nicht in mesodermalen Vorläuferzellen; auf diesen Aspekt wird im weiteren Verlauf der Arbeit noch eingegangen werden.

Wie gezeigt wurde, hat Notch1 keinen Einfluss auf die Expression des Pluripotenzmarkers *Oct4*. Zur Beantwortung der Frage, inwieweit die zu mesodermalen Vorläuferzellen differenzierten EB5 Nert bzw. Kontrolle Zeichen der Undifferenziertheit aufweisen würden, wurde die Expressionsstärke des Gens in Relation zur Expression des konstitutiv exprimierten Gens *GAPDH* gesetzt und daraufhin miteinander verglichen.



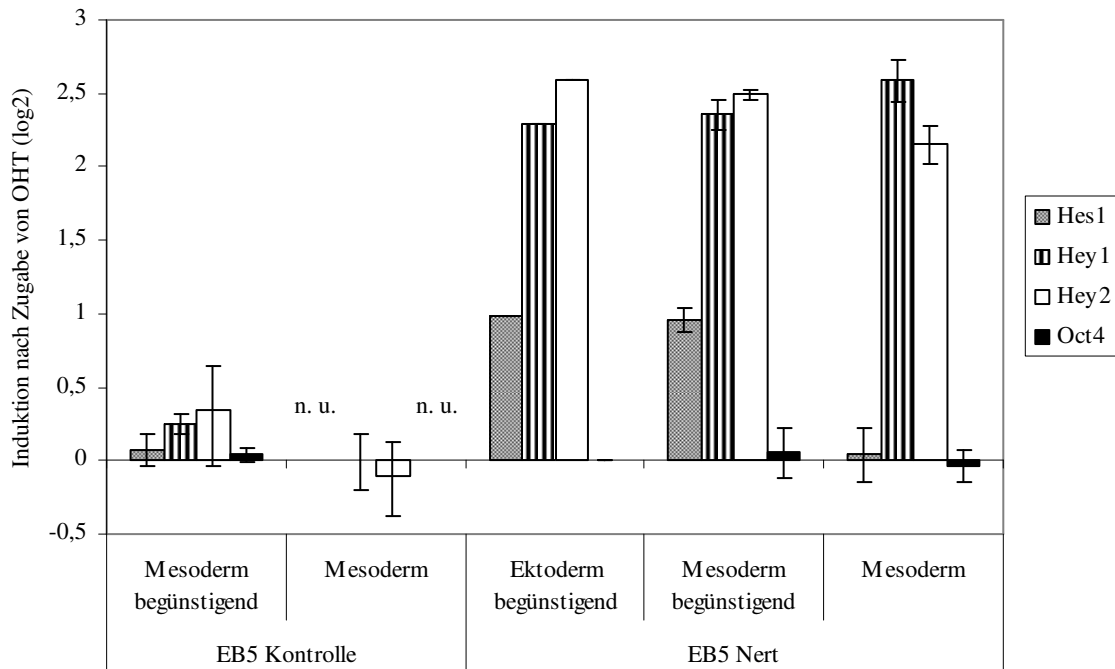


Abb. 4.8: Die Aktivierung von Notch1 induziert die Expression von *Hes1*, *Hey1* und *Hey2* abhängig vom Grad der Differenzierung. EB5 Nert bzw. Kontrolle wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen +/- 1  $\mu$ M OHT gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression der angegebenen Gene mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht. Gezeigt ist die durch Notch1 bedingte Induktion der Genexpression. Abgebildet sind die Mittelwerte von fünf (EB5 Kontrolle bzw. Nert „Mesoderm begünstigend“), acht (EB5 Kontrolle „Mesoderm“) bzw. zehn (EB5 Nert „Mesoderm“) unabhängigen Experimenten; die Werte von EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ stellen Einzelwerte dar. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

Wie Abbildung 4.9 zeigt, sank die Expression von *Oct4* in den mesodermalen Vorläuferzellen um ungefähr 60%. Damit stieg der Anteil differenzierender Zellen und sank der Anteil undifferenzierter Zellen, in denen *Oct4* exprimiert wurde, signifikant. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die verwendeten Kulturbedingungen geeignet waren, Zellen in unterschiedlichen Stadien der mesodermalen Differenzierung zu untersuchen.

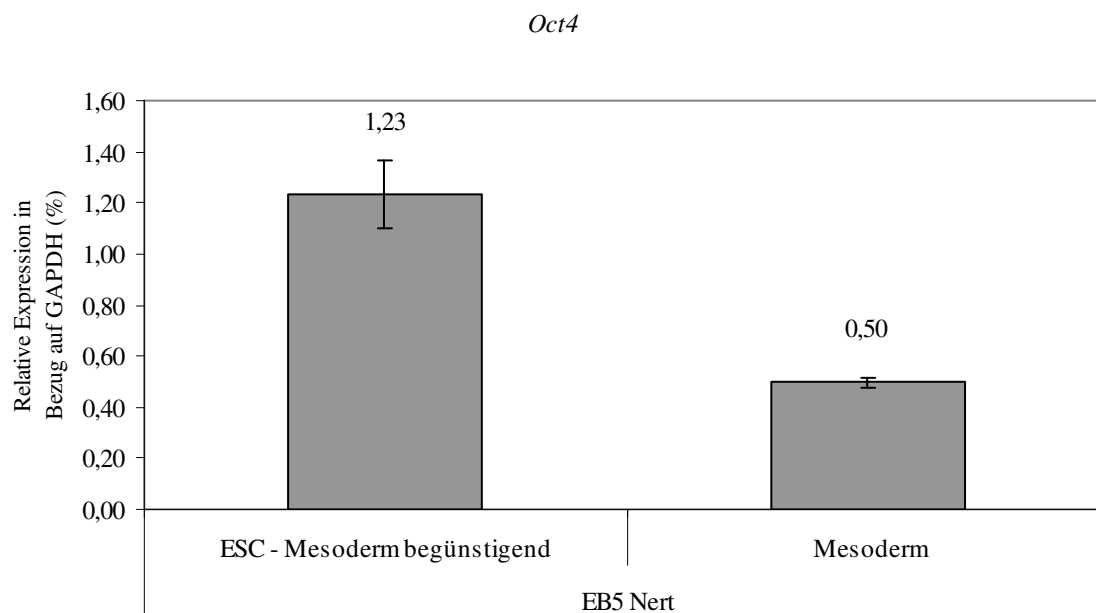


Abb. 4.9: Die Expression von *Oct4* wird während der mesodermalen Differenzierung signifikant herunterreguliert. EB5 Nert wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression von *Oct4* mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht. Gezeigt ist die relative Genexpression in Bezug auf *GAPDH*. Abgebildet sind die Mittelwerte von vier (EB5 Nert „Mesoderm“) bzw. neun (EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“) unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung; die Änderung der Expression ist statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ).

#### 4.3.3 Auswertung der Rohdaten der *Microarrays* zur Identifizierung und zur Zellkontextabhängigkeit von Notch1-Zielgenen

Nachdem mittels *Real-time RT-PCR* die Effizienz der Aktivierung von Notch1 durch das NERT-System demonstriert werden konnte, wurden in mehreren *Microarray*-Experimenten die Transkriptome der Zellen EB5 Nert bzw. Kontrolle in den beschriebenen Kulturbedingungen in An- bzw. Abwesenheit von OHT untersucht. Da diese *Microarray*-Versuche lediglich als Anhalts- und Ausgangspunkt für weitere Experimente zur Charakterisierung des durch Notch1 gesteuerten Netzwerks zur Regulation der Differenzierung dienten, wurde jeweils nur ein Experiment pro Zellsorte und Kulturbedingung durchgeführt. Nur EB5 Nert „Mesoderm“ wurde als Duplikat gemessen, da die Varianz der Genexpression in diesen Mischpopulationen deutlich höher zu erwarten war als in den übrigen Zellen.

Um die isolierte RNA in Verbindung mit den „Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Mouse Genome 430 2.0“ *Arrays* untersuchen zu können, wurde über den Zwischenschritt der Synthese doppelsträngiger cDNA biotinylierte cRNA hergestellt, die in fragmentierter Form auf dem *Array* hybridisiert und dort gefärbt wurde. An mehreren Punkten dieser Syntheseschritte wurde dabei die RNA mittels Gelelektrophorese auf eventuelle Degradierung sowie auf die Größenverhältnisse von cRNA und fragmentierter cRNA überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Hybridisierung der cRNA sowie das Färben und Scannen der *Microarrays* erfolgte in der „Chip-Facility des IZKF ‚BIOMAT‘“ der RWTH Aachen.

Nach der Überprüfung der internen Kontrollen wie z.B. Hybridisierungskontrollen und konstitutiv exprimierten Genen wurden die normalisierten Daten anhand verschiedener Kriterien ausgewertet. Als exprimiert galten Gene mit einer Signalstärke, deren Fluoreszenzintensität mindestens doppelt so groß war wie das Hintergrundsignal. Durch die Verwendung von jeweils elf „*perfect match*“- bzw. „*mismatch*“-Sequenzen für jede Probe auf den *Arrays* wurde durch die verwendete Auswertungssoftware für jede Probe ein p-Wert errechnet, der die Wahrscheinlichkeit einer spezifischen Bindung der RNA an die Probe bezifferte. Dieser p-Wert musste bei exprimierten Genen unterhalb von 0,02 liegen. Beim direkten Vergleich zweier *Arrays*, also der Analyse von Transkriptomen in An- bzw. Abwesenheit von OHT, musste das untersuchte Gen zumindest auf einem *Array* in Bezug auf diese Kriterien als exprimiert gelten. Beim Vergleich der Expression eines Gens in An- bzw. Abwesenheit von OHT wurde die sogenannte „*Signal Log Ratio*“ (SLR) ermittelt; sie entspricht dem Logarithmus der Induktion zur Basis Zwei. Damit ein Gen als reguliert gewertet wurde, musste die SLR entweder  $\geq 1$  oder  $\leq -1$  sein, was einer positiven bzw. negativen zweifachen Regulation entsprach. Die Auswertung der *Microarrays* ergab in der Summe 484 bekannte Gene und 89 „*Expressed Sequence Tags*“ (EST), die in mindestens einer der untersuchten Kulturbedingungen in EB5 Nert mindestens zweifach reguliert worden waren. Alle diese Gene wurden in EB5 Kontrolle nicht reguliert; als reguliert in „Mesoderm“ galten nur solche Gene, die in beiden *Arrays* dieser Bedingung mindestens zweifach reguliert worden waren. Deren Auflistung ist im Anhang enthalten (Appendix A). In dieser Liste sind Mehrfachnennungen enthalten, da einige Gene durch verschiedene Proben auf den *Arrays* detektiert wurden.

Alle diese Gene lassen sich nach ihrer differentiellen Expression in den drei untersuchten Bedingungen unterteilen. Eine rein quantitative Verteilung der Gene auf diese Bedingungen und ihre Schnittmengen untereinander zeigt Abbildung 4.10. Dabei zeigt sich in der Darstellung des Venn-Diagramms, dass 55 Gene in allen drei Bedingungen nach

Aktivierung von Notch1 in ihrer Expression reguliert werden. Die größte Zahl an Genen gehört zur Gruppe „Ektoderm begünstigend“; allerdings sind hierbei auch die größten Schnittmengen zu anderen Gruppen zu erkennen. Ca. 43% dieser Gruppe sind auch in der Bedingung „Mesoderm begünstigend“ reguliert, ca. 23% auch in „Mesoderm“. Die Überschneidung der Mengen „Mesoderm“ und „Mesoderm begünstigend“ beträgt ca. 22% der Gene aus „Mesoderm“ bzw. knapp 32% der Gene aus „Mesoderm begünstigend“.

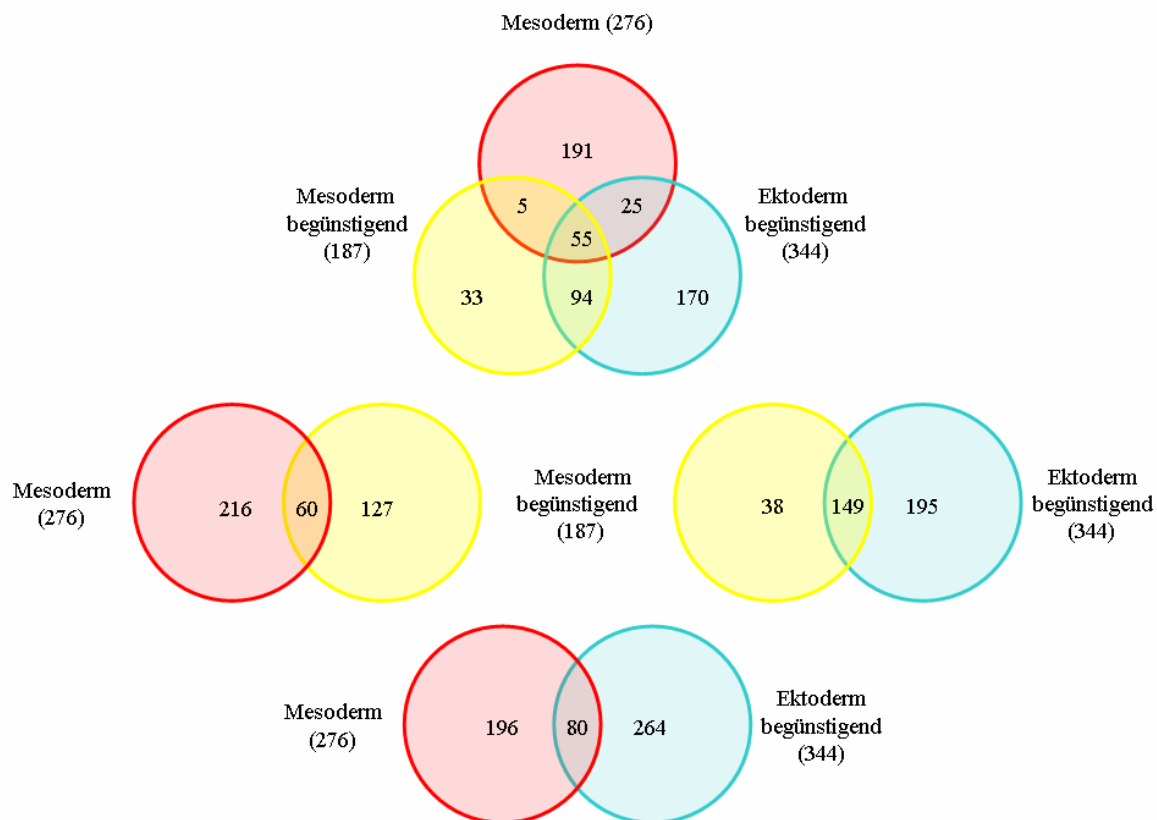


Abb. 4.10: Verteilung der in den *Microarrays* ermittelten potentiellen Zielgene von Notch1 in den drei untersuchten Differenzierungsbedingungen. Darstellung der in der Tabelle 1 des Anhangs aufgelisteten Gene im Venn-Diagramm. Die Gene wurden nach ihrer Regulation in den drei unterschiedlichen untersuchten Kulturbedingungen geordnet und die verschiedenen Schnittmengen einander gegenübergestellt.

Zusätzlich zu dieser Auswertung wurden die Datensätze der *Arrays* auf unterschiedliche Art miteinander verglichen, um zum einen die Qualität ihrer Aussagekraft zu überprüfen und zum anderen Rückschlüsse auf Übereinstimmungen und Differenzen zwischen den Transkriptomen der unterschiedlichen Kulturbedingungen schließen zu können. Der Vergleich zweier *Arrays* (wie z.B. EB5 Nert ± OHT oder EB5 Nert und EB5 Kontrolle

jeweils in einer Kulturbedingung) in einem *Scatterplot* ermöglichten dabei nicht nur die schnelle Identifikation besonders stark regulierter Gene. In der vergleichenden Auftragung der Signalstärken aller Proben zweier *Arrays* in einem Diagramm bilden nicht regulierte Gene idealerweise eine Ursprungsgerade. Aus dem Abstand zu dieser Geraden ermittelt sich die Stärke der Regulation. Dabei ist die Streuung indirekt proportional zur Signalstärke. In einer stichprobenartigen Darstellung der Datensätze von EB5 Kontrolle „Mesoderm begünstigend“  $\pm$  OHT konnte zusätzlich bestätigt werden, dass die Zugabe von OHT keine signifikanten Auswirkungen auf das Transkriptom der Zellen hatte (Daten nicht gezeigt). Lediglich zwanzig Proben, davon neun ESTs, zeigten Regulation anhand der verwendeten Kriterien. Nur eines dieser Gene und ein EST wurden jedoch auch in EB5 Nert durch Zugabe von OHT reguliert; sie wurden nicht zur Liste der 573 regulierten Gene und ESTs hinzugezählt. In EB5 Kontrolle „Mesoderm“ wurden fünf Proben nach den angelegten Kriterien durch Zugabe von OHT reguliert; keines dieser Gene erschien in EB5 Nert reguliert.

#### 4.3.4 Auswahl potentieller Notch1-Zielgene zur weiteren Analyse

Aus der Liste der 573 nach Aktivierung von Notch1 in den untersuchten Kulturbedingungen regulierten Gene und ESTs wurden 32 Gene zur genaueren Untersuchung ausgewählt. Hierbei handelte es sich sowohl um bereits bekannte Notch-Zielgene der *Hes/Hey*-Familie, deren differentielle Expression analysiert werden sollte, als auch um Gene, die z. T. in anderen Signaltransduktionswegen wie dem Wnt-Signalweg eine Rolle spielen und bisher nicht als Interaktionspartner von Notch1 an diesen Punkten der Differenzierung bekannt waren. Die Auswahl erfolgte nach dem Gesichtspunkt, die Gene zu untersuchen, deren Effekte zu bereits bekannten biologischen Funktionen von Notch passen. Eine Auflistung dieser Gene findet sich in Tabelle 4.1.

Tabelle 4.1: Aktiviertes Notch1 beeinflusst die Expression von Zielgenen abhängig vom Grad der Differenzierung: Auflistung der zur Überprüfung ausgewählten Zielgene und Angabe der Kulturbedingungen, in denen in den *Microarrays* eine Regulation der Expression durch Notch1 gezeigt wurde.

	Ektoderm begünstigend	Mesoderm begünstigend	Mesoderm
<i>Adm</i>	-	-	+
<i>Efna1</i>	-	+	+
<i>Efnb1</i>	+	+	+
<i>Epha4</i>	-	-	+
<i>Epha7</i>	-	-	+
<i>Fgf5</i>	-	-	+
<i>Hes1</i>	+	+	-
<i>Hes5</i>	+	+	+
<i>Hes7</i>	-	-	+
<i>Hey1</i>	+	+	+
<i>Hey2</i>	-	-	+
<i>HeyL</i>	-	-	+
<i>Hmgn3</i>	+	-	-
<i>Hsp8</i>	+	+	+
<i>Id1</i>	+	+	+
<i>Id2</i>	-	-	+
<i>Id3</i>	+	+	-
<i>Id4</i>	+	+	+
<i>KitL</i>	+	+	+
<i>Lfng</i>	-	-	+
<i>Mnt</i>	-	-	+
<i>Myf5</i>	-	-	+
<i>Nanog</i>	+	-	-
<i>Nes</i>	-	-	+
<i>Nodal</i>	-	-	+
<i>Pax6</i>	+	+	-
<i>Prom1</i>	+	-	-
<i>Runx1</i>	-	-	+
<i>Sox9</i>	-	-	+
<i>Vcam1</i>	-	-	+
<i>Wisp1</i>	+	+	+
<i>Wnt4</i>	+	-	+

Dargestellt sind die Gene, deren durch Notch1 geändertes Expressionsniveau mittels *Real-time RT-PCR* überprüft wurde; in EB5 Kontrolle erfolgte keine Expressionsänderung in Anwesenheit von OHT. Ein „+“ markiert, dass die Expression des Gens durch Notch1 im *Array* signifikant herauf- bzw. herunterreguliert wurde, ein „-“ markiert fehlende signifikante Regulation aufgrund der im Text näher erläuterten Kriterien.

In Tabelle 4.1 sind jedem der potentiellen Zielgene die Kulturbedingungen zugeordnet, in denen es anhand der für die Auswertung der *Arrays* benutzten Kriterien signifikant reguliert wurde. Dabei wird deutlich, dass die zur Auswertung angelegten Kriterien in ihrer Stringenz eher dazu tendierten, bereits bekannte Notch-Zielgene wie z. B. *Hey2* aufgrund ihrer Signalstärke als nicht reguliert erscheinen zu lassen. Die Verteilungsmuster der differentiellen Expression der ausgewählten Gene nach Aktivierung von Notch1 lassen sich anschaulich in einer so genannten *Heat-Map* darstellen. Wie Abbildung 4.11 zeigt, wurden sowohl die Proben als auch die Gene einem hierarchischen Algorithmus folgend in Clustern zusammengestellt, um so Ähnlichkeiten im Transkriptionsmuster deutlicher machen zu können.

*Hes5* nimmt dabei, wie Abbildung 4.11 zeigt, sowohl aufgrund der Stärke der Induktion, die nach Aktivierung von Notch1 auf das bis zu 128-fache der ursprünglichen Expression stieg, als auch aufgrund der gleichmäßig starken Induktion in allen Proben, eine Sonderstellung ein. Lediglich eine kleine Gruppe von Genen wurde nach Aktivierung von Notch1 herunterreguliert; außerdem erfolgte Repression nur in Zellen der Kulturbedingung „Mesoderm“. Insgesamt wurden in den *Microarray*-Experimenten 47 Gene und acht ESTs in „Mesoderm“ und zwei Gene in „Mesoderm begünstigend“ herunterreguliert. Die ausgewählten Gene enthalten bis auf die alleinige Induktion der Expression eines Gens in „Mesoderm begünstigend“ Beispiele für alle kombinatorischen Möglichkeiten der differentiellen Expression in den untersuchten Bedingungen. Ihre Auswahl erfolgte jedoch nicht nach dem Gesichtspunkt, die statistische Verteilung der differentiellen Expression im *Microarray* annähernd maßstabsgetreu mittels *Real-Time RT-PCR* genauer zu untersuchen, sondern nach bereits bekannten Funktionen der Gene während der Differenzierung muriner Zellen. Die Liste der ausgewählten Gene enthält Beispiele sowohl für ektodermale Differenzierung wie z. B. *Pax6* (Chi und Epstein, 2002) als auch für mesodermale Differenzierung wie z. B. *Runx1* (Hirai *et al.*, 2005).

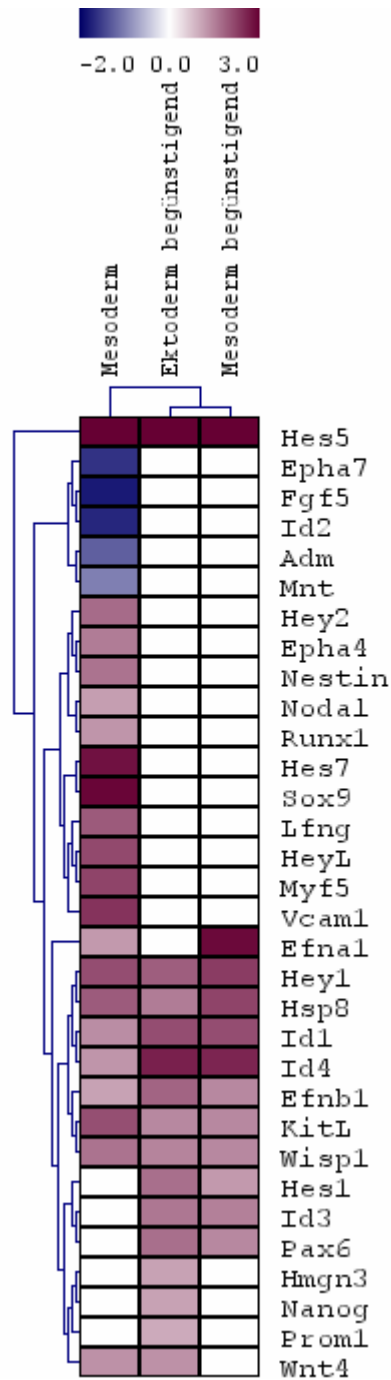


Abb. 4.11: Heatmap der im *Microarray* gemessenen Induktionen ausgewählter Zielgene. Angegeben ist die Induktion der Genexpression als Logarithmus zur Basis zwei. Sowohl die Induktionswerte der zur genaueren Untersuchung ausgewählten Gene in den einzelnen Proben als auch die Expressionsmuster der gesamten Proben wurden mittels eines hierarchischen Algorithmus miteinander verglichen. Die Induktion von Genen, die auf Grund der im Text erläuterten Kriterien als nicht signifikant reguliert eingestuft worden waren, wurde in dieser Darstellung ungeachtet der gemessenen Induktion gleich null gesetzt.



#### 4.4 Analyse der differentiellen Expression potentieller Notch1-Zielgene

Wie aus Abbildung 4.7 ersichtlich, wurde die Expression der ausgewählten potentiellen Zielgene von Notch1 in der *Real-Time RT-PCR* zusätzlich zu den in den *Microarrays* untersuchten Kulturbedingungen zum einen in undifferenzierten embryonalen Stammzellen und zum anderen unter Einfluss von Cycloheximid (CHX) analysiert. Durch die Inhibition der Proteinsynthese konnte zwischen direkten und indirekten Zielgenen unterschieden werden; durch die zusätzliche Kulturbedingung sollte die Kontextabhängigkeit der Zelllinienentscheidungen deutlicher charakterisiert werden. Nachdem die in den *Microarrays* erzielten Ergebnisse zum größten Teil Einzelergebnisse darstellten, wurde mittels *Real-Time RT-PCR* ebenso die statistische Relevanz der Daten dieser Gruppe potentieller Zielgene überprüft. Dabei wurden sämtliche in den *Microarrays* analysierten Proben nochmals in der *Real-Time RT-PCR* gemessen, um einen direkten Vergleich zwischen beiden Techniken zu ermöglichen.

Eine Übersicht über die Induktion der Genexpression nach Aktivierung von Notch1 ist in Abbildung 4.12 gezeigt. Um einen besseren Vergleich zu den in den *Microarrays* ermittelten SLRs zu haben, wurden die Werte der Induktionen als Logarithmus zur Basis zwei dargestellt. Wie bereits bei der Auswertung der *Microarrays* wurde als Schwellenwert für eine positive bzw. negative Regulation mindestens eine Verdopplung bzw. Halbierung der Expression angesetzt. Dieser Schwellenwert beruht auf einem Erfahrungswert; ein biologischer Effekt, der aus Expressionsänderungen unterhalb dieses Schwellenwertes resultiert, kann dennoch nicht ausgeschlossen werden. Beim direkten Vergleich zwischen den Techniken der *Microarrays* und der *Real-Time RT-PCR* muss die unterschiedliche Sensitivität beider Verfahren berücksichtigt werden. So galten Gene in der *Real-Time RT-PCR* als reguliert, die in den *Microarrays* noch wegen zu geringer Signalstärke als nicht exprimiert eingestuft worden waren wie z. B. *Hey2* in einigen Kulturbedingungen. Aus Abbildung 4.12 wird ersichtlich, dass 62,5% der untersuchten Gene dasselbe Expressionsmuster wie in den *Microarrays* zeigten bzw. in zusätzlichen Kulturbedingungen als Zielgenen von Notch1 identifiziert werden konnten. Bei weiteren 28% wurde der Schwellenwert der zweifachen Regulation z. T. nur sehr knapp unterschritten. Lediglich die Induktion dreier der in den *Arrays* ermittelten potentiellen Zielgene von Notch1, nämlich *Hmgn3*, *Nanog* und *Prom1*, konnte nicht bestätigt werden.

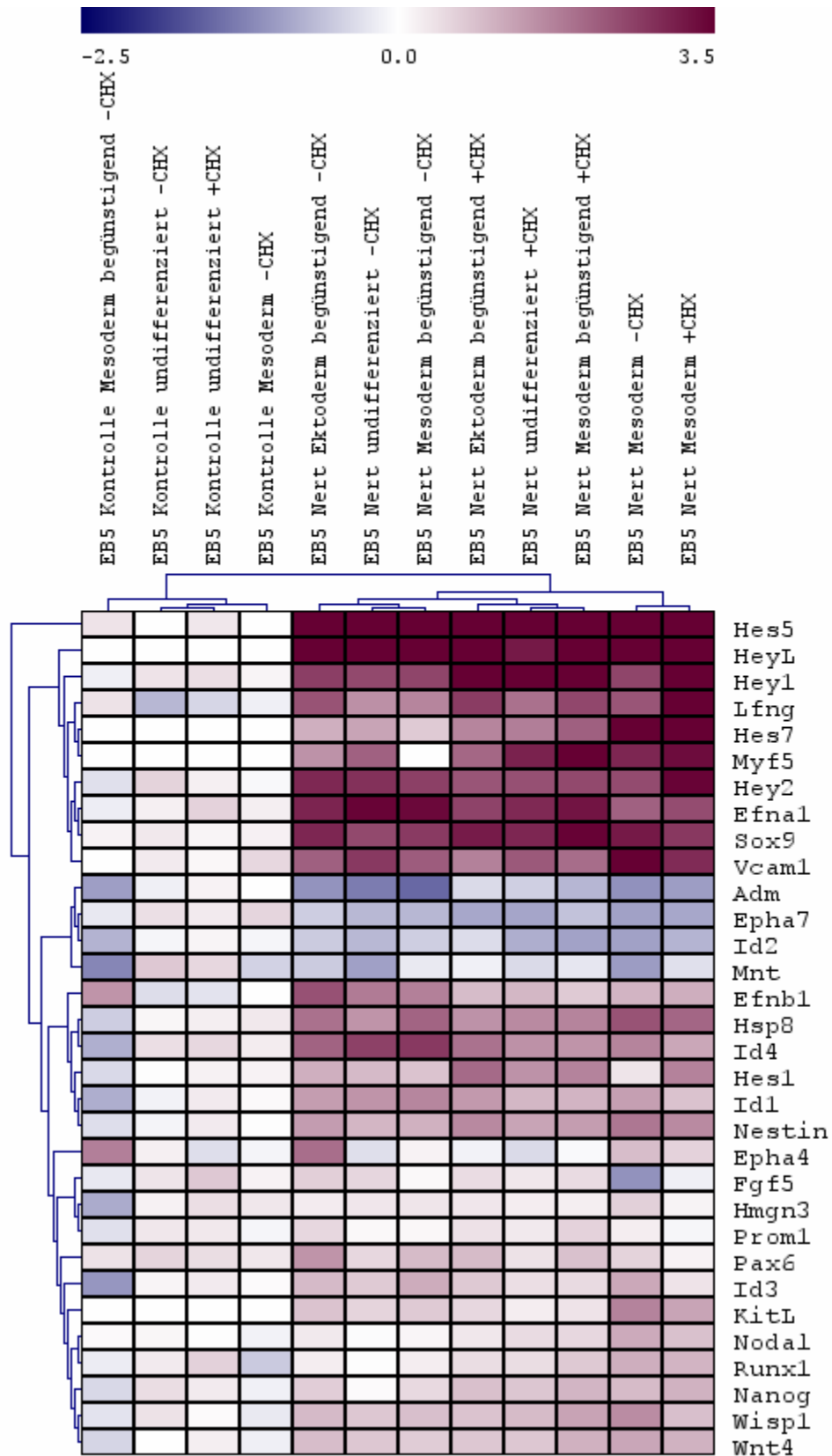


Abb. 4.12: Heatmap der in der *Real-time RT-PCR* gemessenen Induktionen ausgewählter Zielgene. Sowohl die Induktionswerte in den einzelnen Proben, die als Logarithmus zur Basis zwei angegeben wurden, als auch die Expressionsmuster der gesamten Proben wurden mittels eines hierarchischen Algorithmus

miteinander verglichen. Abgebildet sind die Mittelwerte der in zwei (EB5 Nert „undifferenziert“, EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ +CHX, EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ +CHX), drei (EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ -CHX), vier (EB5 Nert „Mesoderm“ +CHX), fünf (EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ -CHX) bzw. sechs (EB5 Nert „Mesoderm“ -CHX) unabhängigen Experimenten ermittelten Induktion der Genexpression nach Aktivierung von Notch1 durch 1  $\mu$ M OHT; die Daten von EB5 Kontrolle stellen Einzelwerte dar.

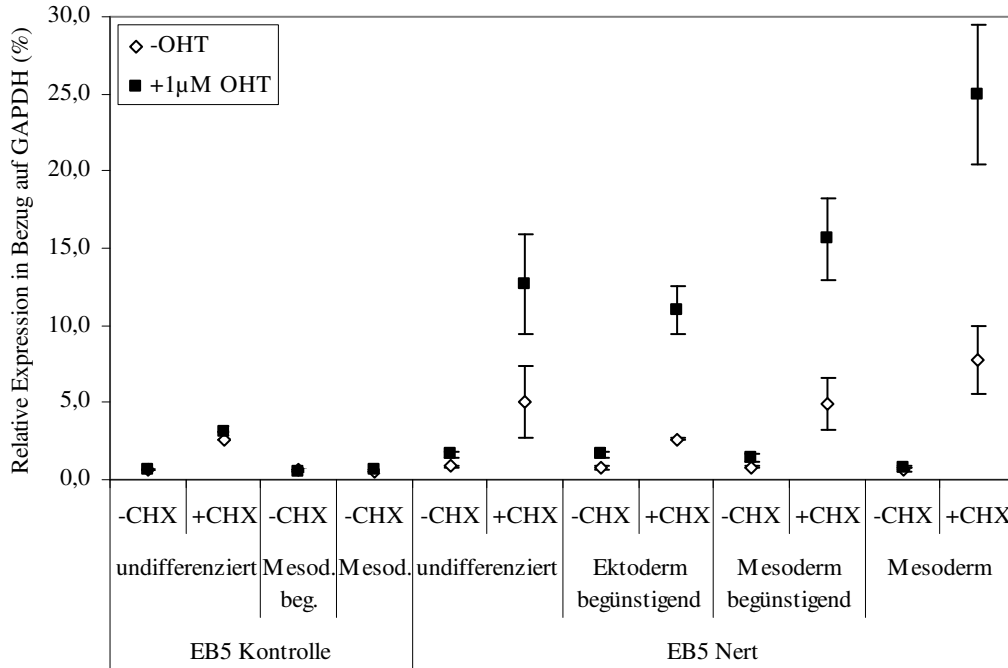
Im Folgenden soll nun auf die differentielle Expression einiger untersuchter Gene in unterschiedlichen Kulturbedingungen näher eingegangen werden. Dabei sollte sowohl die Induktion der Expression nach Aktivierung von Notch1 als auch die relative Expressionsstärke der Gene wie auch der Einfluss von Cycloheximid genauer analysiert werden.

#### 4.4.1 Differentielle Expression verschiedener *Hes*- und *Hey*-Gene nach Aktivierung von Notch1

Mitglieder der Familie der *Hes*- und *Hey*-Gene, die für bHLH-Proteine kodieren, zählen zu den bereits bekannten Zielgenen von Notch. Die Untersuchung ihrer differentiellen kontextabhängigen Expression während verschiedener Stadien der Differenzierung embryonaler Stammzellen stand deshalb im Vordergrund. Abbildung 4.13 zeigt, dass die Expression von *Hes1* in mesodermalen Vorläuferzellen als Folge der Aktivierung von Notch1 nicht induziert wurde. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass *Hes1* in mesodermalen Vorläuferzellen kein Zielgen von Notch1 darstellt. Das relative Niveau der Expression von *Hes1* war, wie in Abbildung 4.13 A zu sehen ist, in den verschiedenen untersuchten Stadien der Differenzierung keinen großen Schwankungen unterlegen. Wie Abbildung 4.13 B zeigt, wurde die Expression von *Hes1* unter unterschiedlichen Kulturbedingungen nach Aktivierung von Notch1 in EB5 Kontrolle nicht beeinflusst. EB5 Nert, welche unter den Bedingungen „undifferenziert“ und „Ektoderm bzw. Mesoderm begünstigend“ gehalten worden waren, zeigten nach vierstündiger Zugabe von OHT eine ungefähre Verdopplung der Expression von *Hes1*. Vor allem in „Mesoderm begünstigend“ ist die Induktion mit einem Wert von 1,78 geringer als der zuvor angelegte Richtwert des Faktors zwei für positive Regulation. Die Aktivierung von Notch1 in mesodermalen Vorläuferzellen hatte, wie in den Vorversuchen gezeigt, keine signifikante Auswirkung auf die Expression von *Hes1*. Nach Zugabe von Cycloheximid jedoch stieg sowohl die relative

Expression als auch die Stärke der Induktion leicht an. Darüber hinaus wurde nach Zugabe von Cycloheximid auch in mesodermalen Vorläuferzellen die Expression von *Hes1* als Antwort auf die Aktivierung von Notch1 induziert.

A)



B)

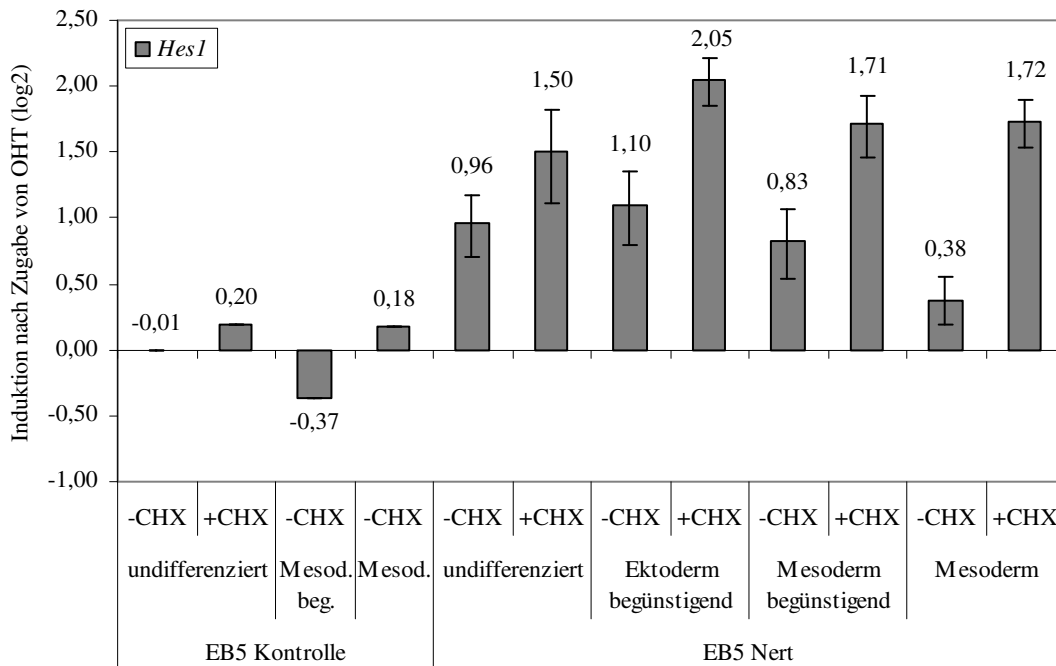
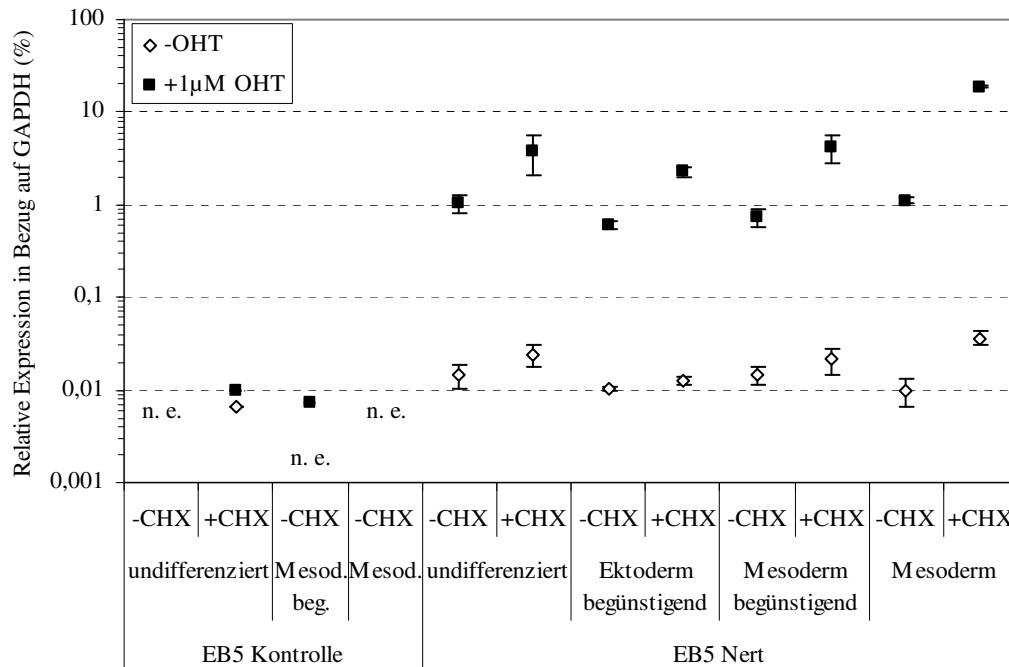


Abb. 4.13: *Hes1* wird in mesodermalen Vorläuferzellen durch Notch1 nur während gleichzeitiger Inhibition der Proteinsynthese induziert. EB5 Nert bzw. Kontrolle wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen +/- 1  $\mu$ M OHT und +/- 50  $\mu$ g/ml Cycloheximid gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression von *Hes1* mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht. In A) sind die einzelnen relativen Expressionen von *Hes1*, bezogen auf die *GAPDH*-Expression, dargestellt; B) zeigt die durch Notch1 bedingte Induktion der Genexpression als Logarithmus zur Basis zwei. Abgebildet sind die Mittelwerte von zwei (EB5 Nert „undifferenziert“, EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ +CHX, EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ +CHX), drei (EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ -CHX), vier (EB5 Nert „Mesoderm“ +CHX), fünf (EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ -CHX) bzw. sechs (EB5 Nert „Mesoderm“ -CHX) unabhängigen Experimenten; die Daten von EB5 Kontrolle stellen Einzelwerte dar. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

*Hes5*, das bereits als Zielgen von Notch1 bekannt war, wurde in allen untersuchten Kulturbedingungen nach Aktivierung von Notch1 induziert. Die Stärke dieser Regulation war dabei die höchste aller untersuchten Zielgene. Die relative Expression von *Hes5* (s. Abb. 4.14 A) war in allen untersuchten Kulturbedingungen sehr niedrig und lag in EB5 Kontrolle z. T. unterhalb der Nachweisgrenze.

A)



B)

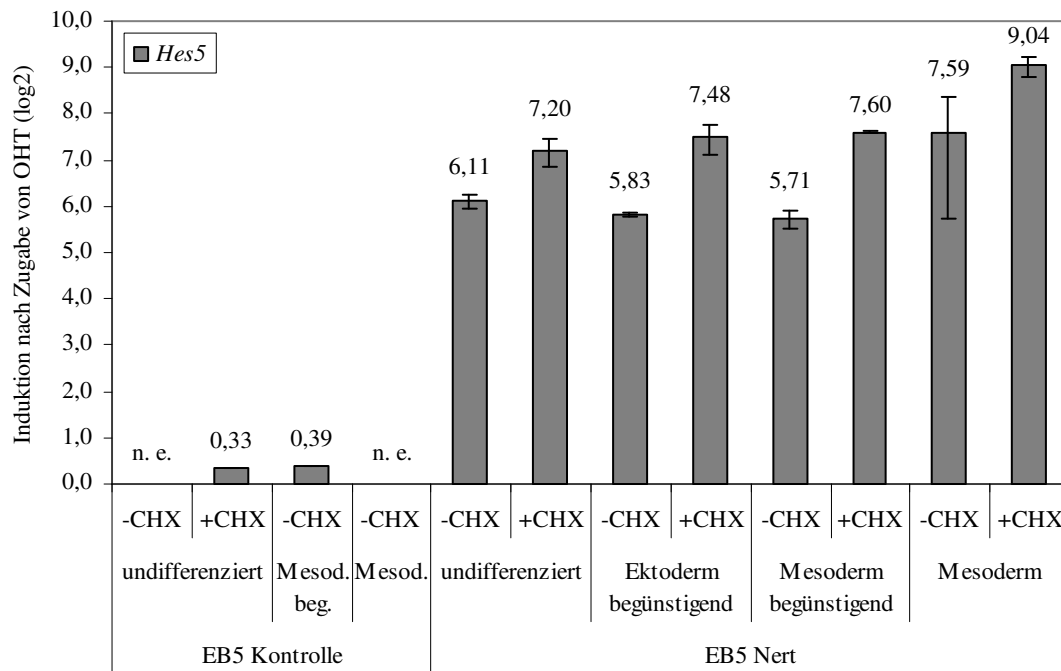
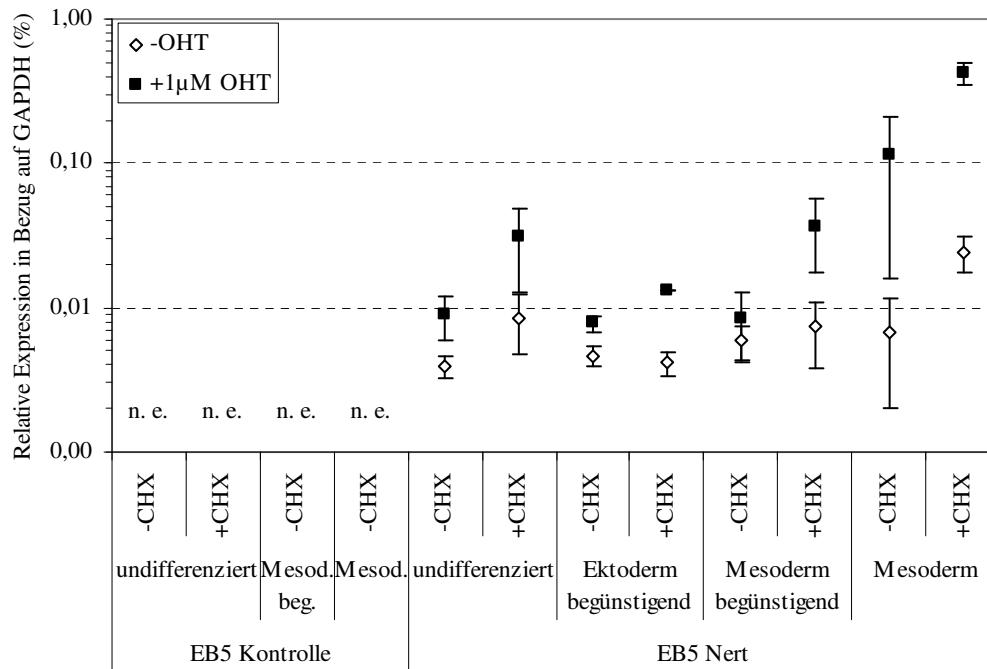


Abb. 4.14: Die Aktivierung von Notch1 bewirkt in allen untersuchten Differenzierungsstadien eine Hochregulation der Expression von *Hes5*. EB5 Nert bzw. Kontrolle wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen +/- 1  $\mu$ M OHT und +/- 50  $\mu$ g/ml Cycloheximid gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression von *Hes5* mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht. In A) sind die einzelnen relativen Expressionen von *Hes5*, bezogen auf die *GAPDH*-Expression, dargestellt; B) zeigt die durch Notch1 bedingte Induktion der Genexpression als Logarithmus zur Basis zwei. Abgebildet sind die Mittelwerte von zwei (EB5 Nert „undifferenziert“, EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ +CHX, EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ +CHX), drei (EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ -CHX), vier (EB5 Nert „Mesoderm“ +CHX), fünf (EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ -CHX) bzw. sechs (EB5 Nert „Mesoderm“ -CHX) unabhängigen Experimenten; die Daten von EB5 Kontrolle stellen Einzelwerte dar. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

Wie Abbildung 4.14 B zeigt, wurde die relative Expression von *Hes5* in den Kontrollzellen in keiner Kulturbedingung durch Zugabe von OHT beeinflusst. In EB5 Nert hingegen führte die Aktivierung von Notch1 zu einer in allen Kulturbedingungen sehr starken Induktion von *Hes5*, in mesodermalen Vorläuferzellen auf das 150fache der ursprünglichen Expression. Die Blockade der Proteinsynthese verstärkte die Induktion in allen Kulturbedingungen, in mesodermalen Vorläuferzellen auf das mehr als 500fache. Die Zugabe von Cycloheximid hatte dabei, anders als bei *Hes1*, nur sehr geringen Einfluss auf das relative Expressionsniveau des Gens (s. Abb. 4.14 A), das lediglich in mesodermalen Vorläuferzellen von 0,01% auf 0,04% der Expression von *GAPDH* anstieg.

A)



B)

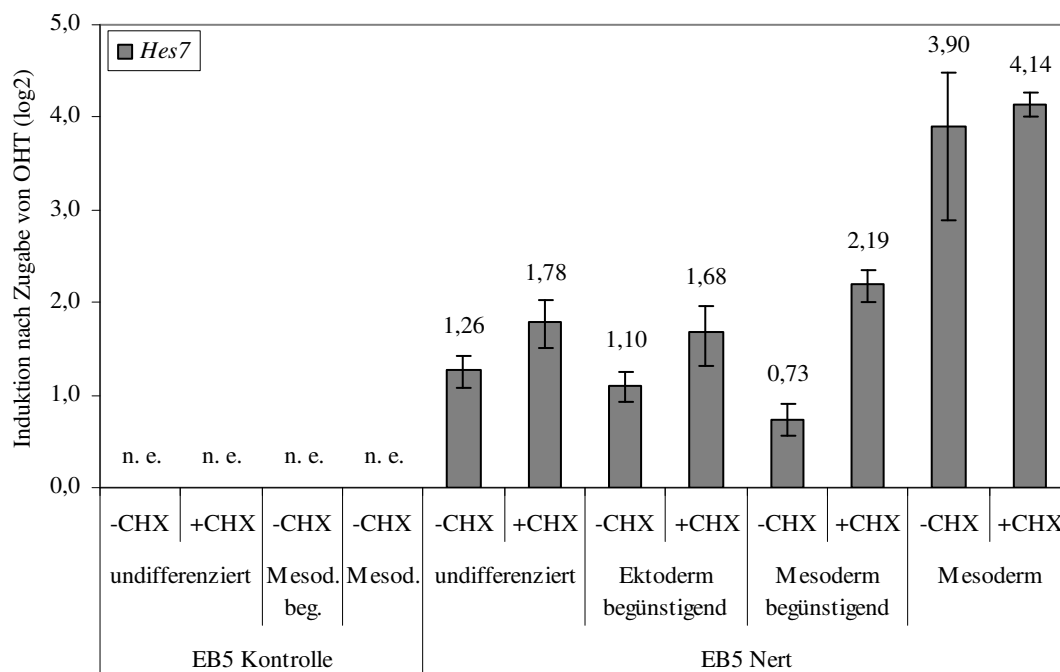


Abb. 4.15: *Hes7* wird sehr schwach exprimiert und durch aktiviertes Notch1 am stärksten in mesodermalen Vorläuferzellen induziert. EB5 Nert bzw. Kontrolle wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen +/- 1 µM OHT und +/- 50 µg/ml Cycloheximid gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression von *Hes7* mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht. In A) sind die einzelnen relativen Expressionen von *Hes7*, bezogen auf die

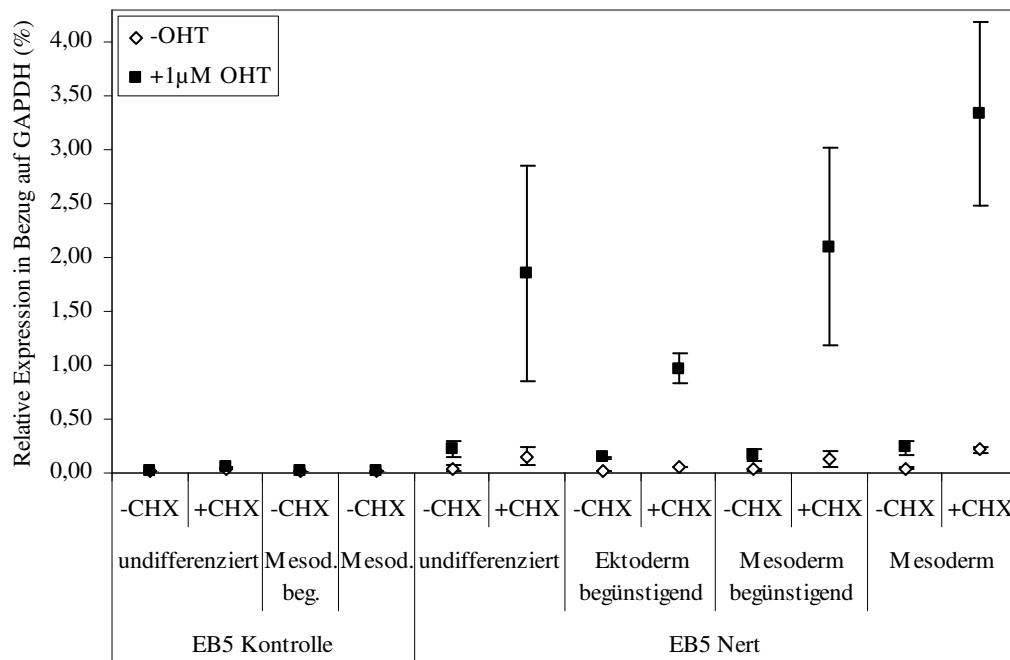
*GAPDH*-Expression, dargestellt; B) zeigt die durch Notch1 bedingte Induktion der Genexpression als Logarithmus zur Basis zwei. Abgebildet sind die Mittelwerte von zwei (EB5 Nert „undifferenziert“, EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ +CHX, EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ +CHX), drei (EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ -CHX), vier (EB5 Nert „Mesoderm“ +CHX, EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ -CHX) bzw. sechs (EB5 Nert „Mesoderm“ -CHX) unabhängigen Experimenten; die Daten von EB5 Kontrolle stellen Einzelwerte dar. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

*Hes7* erschien in den *Microarrays* allein in mesodermalen Vorläuferzellen als positiv durch Notch1 reguliert. Die Auswertung der *Real-Time RT-PCR* zeigte hingegen die Induktion von *Hes7* nach Zugabe von OHT in EB5 Nert in allen untersuchten Kulturbedingungen außer „Mesoderm begünstigend“. Die relative Expression von *Hes7* war jedoch, wie in Abbildung 4.15 A zu sehen ist, in Abwesenheit von OHT vor allem in undifferenzierten Zellen sehr gering und stieg während der frühen mesodermalen Differenzierung an. Die Expression von *Hes7* war in EB5 Kontrolle weder in An- noch in Abwesenheit von OHT nachweisbar. Nach Zugabe von Cycloheximid stiegen die Induktionsstärken in EB5 Nert, wie Abbildung 4.15 B zeigt, in undifferenzierten Zellen, nicht aber in mesodermalen Vorläuferzellen.

Ebenfalls zur Gruppe der basischen HLHs gehören die Gene *Hey1*, *Hey2* und *HeyL*. Wie Abb. 4.16 zeigt, wurde die Expression von *Hey1* in allen untersuchten Kulturbedingungen durch die Aktivierung von Notch1 in EB5 Nert induziert. Die Expression von *Hey1* war in EB5 Nert und EB5 Kontrolle nachweisbar. In EB5 Kontrolle wurde sie weder durch die Anwesenheit von OHT noch von Cycloheximid reguliert. Die Induktion von *Hey1* in EB5 Nert durch Notch1 war in allen untersuchten Kulturbedingungen von vergleichbarer Stärke. Die Zugabe von Cycloheximid verstärkte diesen Effekt zusätzlich. Auch das Niveau der relativen Expression wurde durch die Blockade der Proteinsynthese besonders in mesodermalen Vorläuferzellen leicht angehoben. Die unterschiedlichen Kulturbedingungen bei den embryonalen Stammzellen hatten dagegen keinen Einfluss auf das relative Expressionsniveau von *Hey1*.



A)



B)

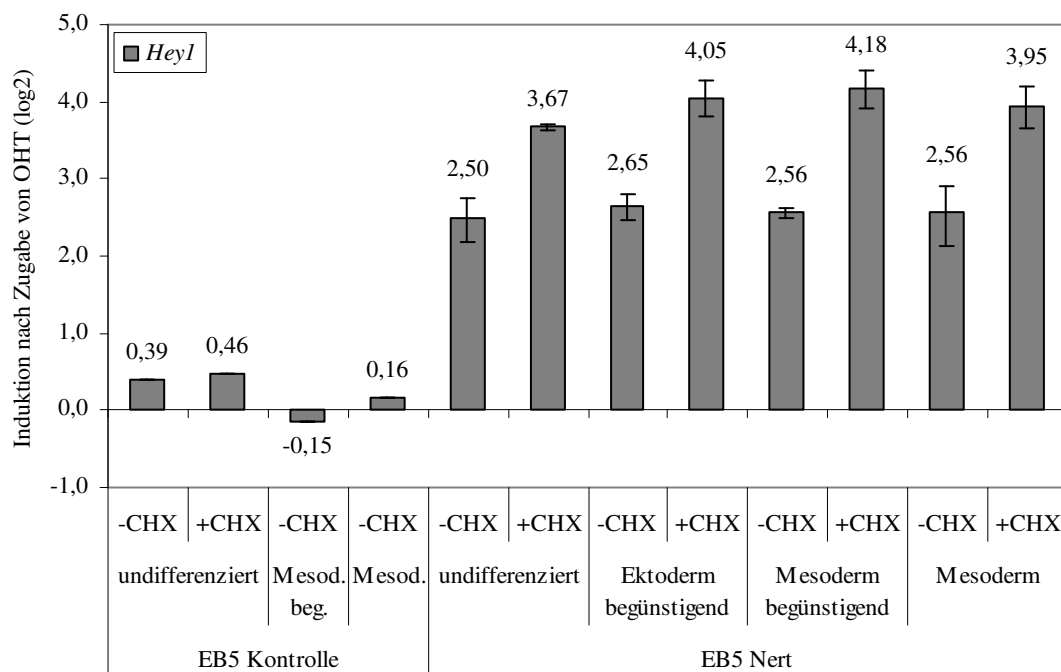
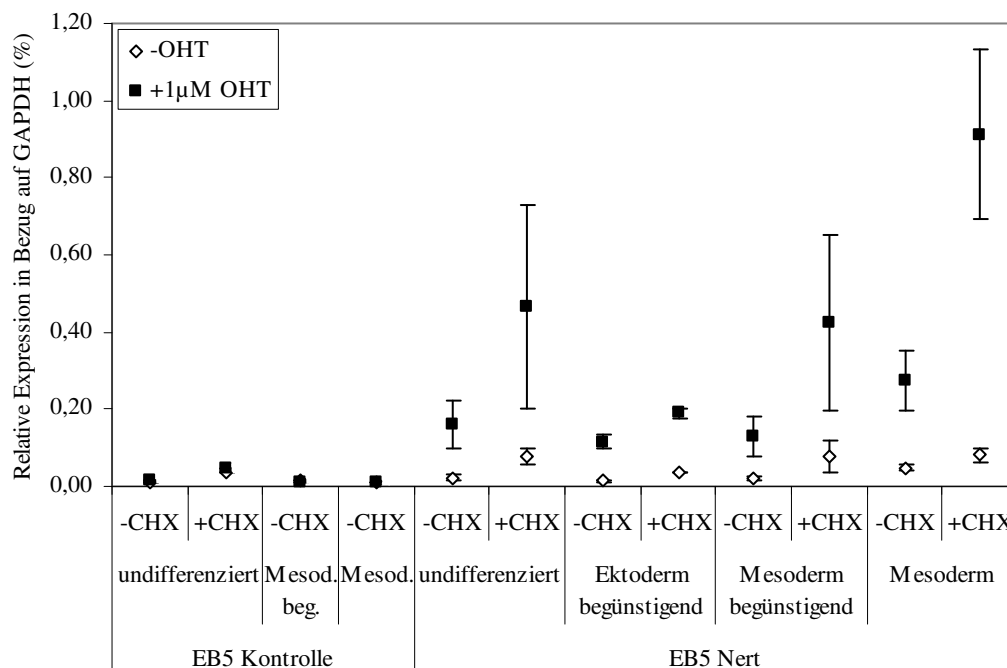


Abb. 4.16: Die Inhibition der Proteinsynthese beeinflusst die Stärke der durch aktiviertes Notch1 verursachten Induktion von *Heyl*. EB5 Nert bzw. Kontrolle wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen +/- 1 µM OHT und +/- 50 µg/ml Cycloheximid gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression von *Heyl* mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht. In A) sind die einzelnen relativen Expressionen von *Heyl*, bezogen auf die *GAPDH*-Expression,

dargestellt, B) zeigt die durch Notch1 bedingte Induktion der Genexpression als Logarithmus zur Basis zwei. Abgebildet sind die Mittelwerte von zwei (EB5 Nert „undifferenziert“, EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ +CHX, EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ +CHX), drei (EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ -CHX), vier (EB5 Nert „Mesoderm“ +CHX), fünf (EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ -CHX) bzw. sechs (EB5 Nert „Mesoderm“ -CHX) unabhängigen Experimenten; die Daten von EB5 Kontrolle stellen Einzelwerte dar. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

Nachdem *Hey2* in den *Microarrays* aufgrund geringer Signalstärken nur in mesodermalen Vorläuferzellen als signifikant reguliert eingestuft worden war, konnte mittels *Real-Time RT-PCR* wie bereits in den Vorversuchen (s. Abb. 4.8) gezeigt werden, dass die Aktivierung von Notch1 die Induktion von *Hey2* in EB5 Nert in allen untersuchten Kulturbedingungen bewirkt. Wie Abb. 4.17 zeigt, hatte die Zugabe von OHT keine Auswirkung auf die Expression in EB5 Kontrolle. Die Inkubation in Gegenwart von Cycloheximid erhöhte die Stärke der Induktion nur in mesodermalen Vorläuferzellen; die relative Expression wurde jedoch in allen untersuchten Kulturbedingungen geringfügig erhöht.

A)



B)

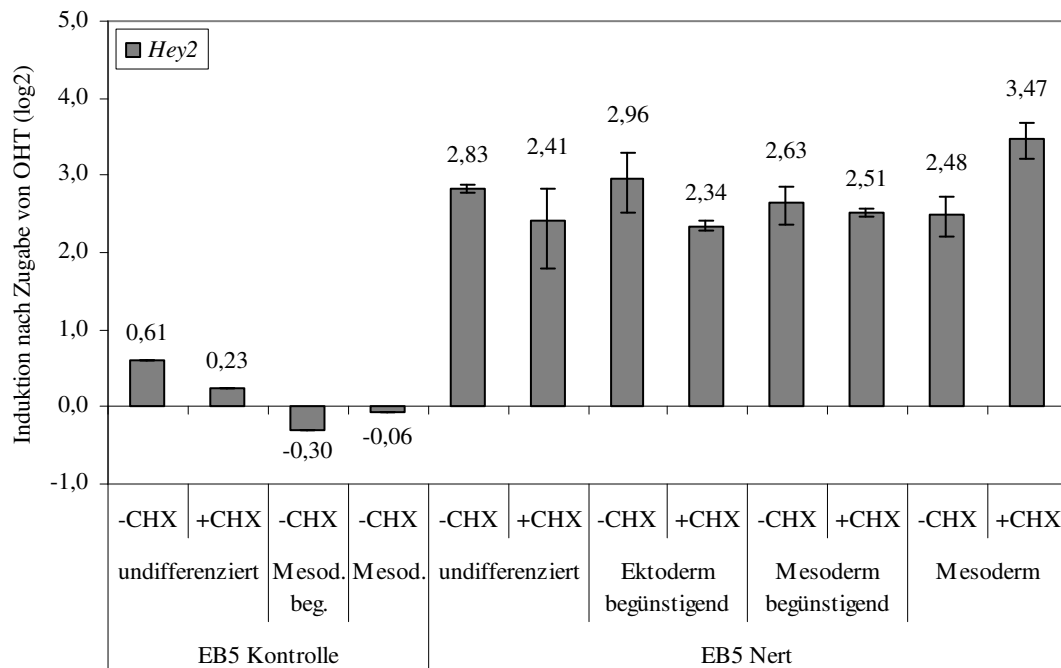


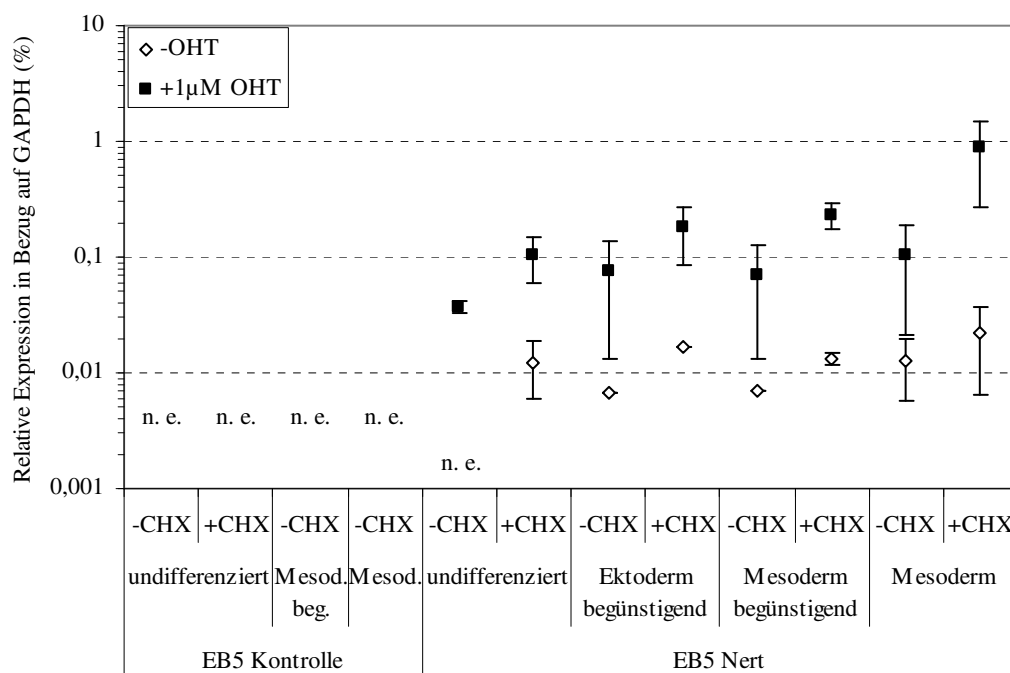
Abb. 4.17: Die Aktivierung von Notch induziert in allen untersuchten Differenzierungsstadien die Expression von *Hey2*. EB5 Nert bzw. Kontrolle wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen +/- 1  $\mu$ M OHT und +/- 50  $\mu$ g/ml Cycloheximid gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression von *Hey2* mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht. In A) sind die einzelnen relativen Expressionen von *Hey2*, bezogen auf die *GAPDH*-Expression, dargestellt; B) zeigt die durch Notch1 bedingte Induktion der Genexpression als Logarithmus zur Basis zwei. Abgebildet sind die Mittelwerte von zwei (EB5 Nert „undifferenziert“, EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ +CHX), EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ +CHX), drei (EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ -CHX), vier (EB5 Nert „Mesoderm“ +CHX), fünf (EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ -CHX) bzw. sechs (EB5 Nert „Mesoderm“ -CHX) unabhängigen Experimenten; die Daten von EB5 Kontrolle stellen Einzelwerte dar. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

Auch *HeyL* wurde in den *Microarrays* allein in mesodermalen Vorläuferzellen signifikant durch Notch1 reguliert. In der *Real-Time RT-PCR* konnte gezeigt werden, dass nach Aktivierung von Notch1 in EB5 Nert in allen untersuchten Bedingungen die Induktion von *HeyL* in annähernd gleicher Stärke erfolgte. Wie in Abbildung 4.18 A zu sehen ist, war die Expression von *HeyL* in EB5 Kontrolle weder in An- noch in Abwesenheit von OHT nachweisbar. In undifferenzierten EB5 Nert ohne Cycloheximid war die relative Expression von *HeyL* nur in Anwesenheit von OHT möglich. Die gleichzeitige Inkubation von EB5 Nert im Stadium mesodermaler Vorläuferzellen mit OHT und besonders mit Cycloheximid führte zu großer Varianz in der Expression von

*HeyL*. Die Stärke der daraus resultierenden Induktion wurde jedoch nicht beeinflusst, wie in Abbildung 4.18 B zu sehen ist. Die Zugabe von Cycloheximid steigerte die Expression von *HeyL* in allen untersuchten Kulturbedingungen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von OHT.

Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation der Expression von *Hes1* und *Hes7* nach Aktivierung von Notch1 differentiell erfolgte. *Hes1* fungierte in mesodermalen Vorläuferzellen nicht als Zielgen von Notch1. Die Expression von *Hes7* wurde in der Kulturbedingung „Mesoderm begünstigend“ nach Aktivierung von Notch1 nicht reguliert. Die Expression von *Hes5*, *Hey1* und *Hey2* wurde in allen untersuchten Kulturbedingungen nach Aktivierung von Notch1 induziert.

A)



B)

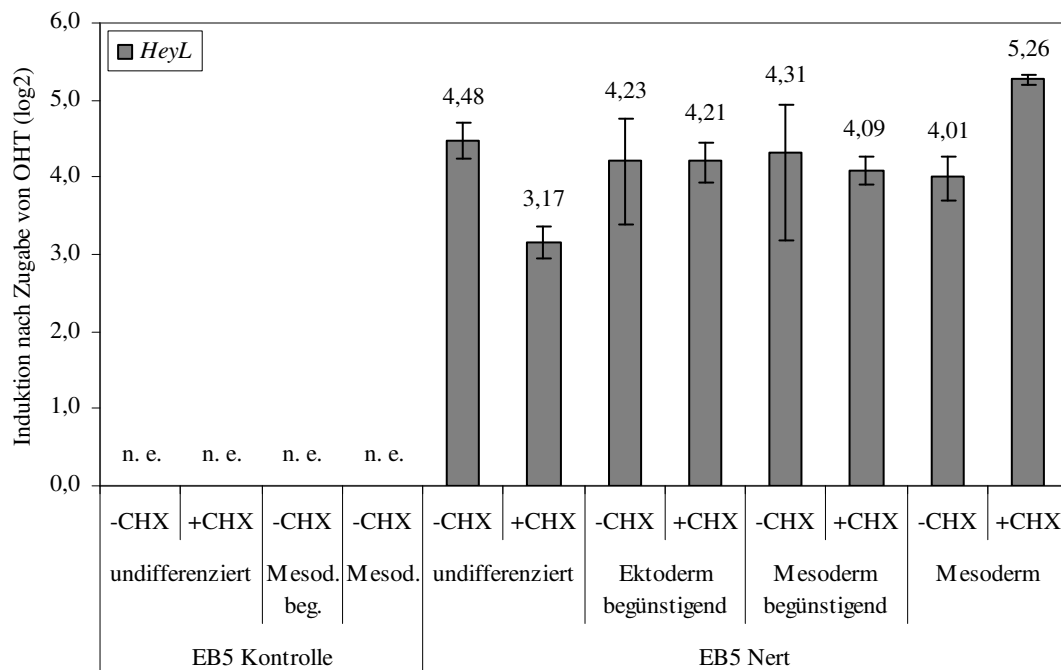


Abb. 4.18: *HeyL* wird in allen untersuchten Differenzierungsstadien sehr schwach exprimiert und durch Notch1 induziert. EB5 Nert bzw. Kontrolle wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen +/- 1  $\mu$ M OHT und +/- 50 $\mu$ g/ml Cycloheximid gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression von *HeyL* mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht. In A) sind die einzelnen relativen Expressionen von *HeyL*, bezogen auf die *GAPDH*-Expression, dargestellt; B) zeigt die durch Notch1 bedingte Induktion der Genexpression als Logarithmus zur Basis zwei. Abgebildet sind die Mittelwerte von zwei (EB5 Nert „undifferenziert“, EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ +CHX), drei (EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ +CHX), vier (EB5 Nert „Mesoderm“ +CHX), fünf (EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ -CHX) bzw. sechs (EB5 Nert „Mesoderm“ -CHX) unabhängigen Experimenten; die Daten von EB5 Kontrolle stellen Einzelwerte dar. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

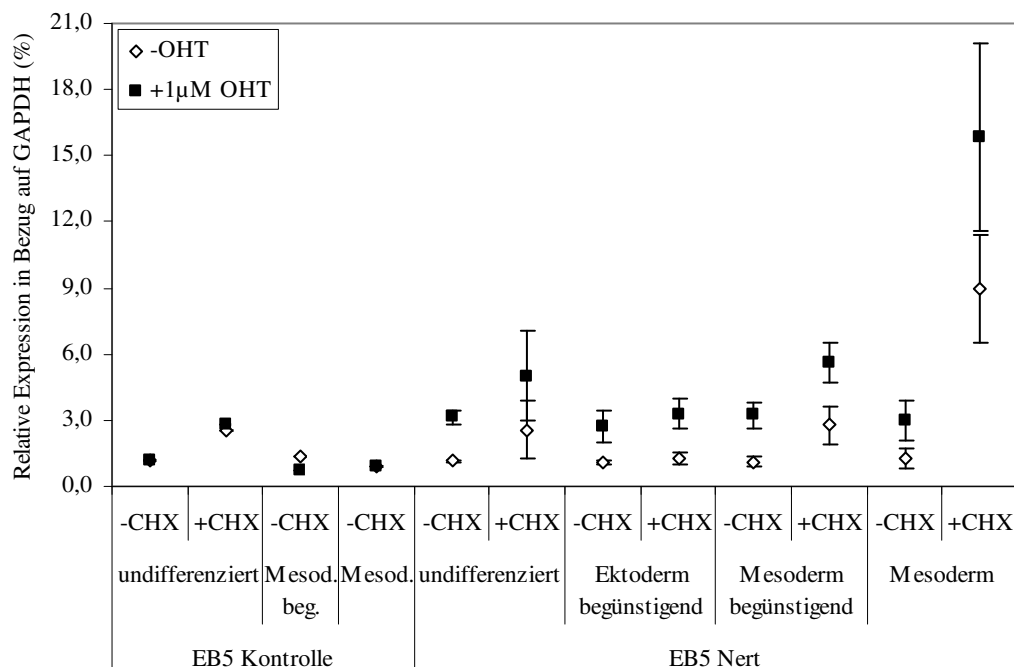
#### 4.4.2 Differentielle Expression der *Id*-Gene nach Aktivierung von Notch1

Die ebenfalls zur Gruppe der basischen HLH Proteine gehörenden Ids, deren Abkürzung sowohl „Inhibitor of DNA-binding“ als auch „Inhibitor of differentiation“ bedeutet, bilden mit anderen Vertretern der HLHs Heterodimere und inhibieren so deren Bindung an DNA und damit deren Wirkung (Massari und Murre, 2000). Das Expressionsmuster der verschiedenen Gene *Id1* bis *Id4* variiert dabei je nach Zell- bzw. Gewebetyp; Einfluss auf die Differenzierung in unterschiedlichen Keimblättern konnte

ebenso für einzelne Id-Proteine wie auch für unterschiedliche Kombinationen verschiedener Proteine gezeigt werden (Übersicht bei Yokota, 2001). Die Ergebnisse der *Microarrays* ließen auf eine differentielle Funktion der verschiedenen Gene als Zielgene von Notch1 in den unterschiedlichen Kulturbedingungen schließen.

Wie Abbildung 4.19 zeigt, wurde *Id1* durch Notch1 in allen untersuchten Kulturbedingungen induziert. Die relative Expression variierte dabei nicht zwischen den einzelnen Kulturbedingungen. Die Zugabe von OHT hatte keine relevante Auswirkung auf die Expression von *Id1* in EB5 Kontrolle. In EB5 Nert hingegen bewirkte die Aktivierung von Notch1 eine Induktion, die in den unterschiedlichen Kulturbedingungen zwischen Faktor 2,1 und 2,8 lag. Ein eindeutiger Einfluss von Cycloheximid auf die Stärke der Induktion in allen Proben konnte dabei nicht festgestellt werden. Die Blockade der Proteinsynthese bewirkte jedoch in allen Zellen bis auf EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ eine Steigerung des Niveaus der relativen Expression von *Id1*. Dieser Effekt konnte auch in EB5 Kontrolle beobachtet werden.

A)



B)

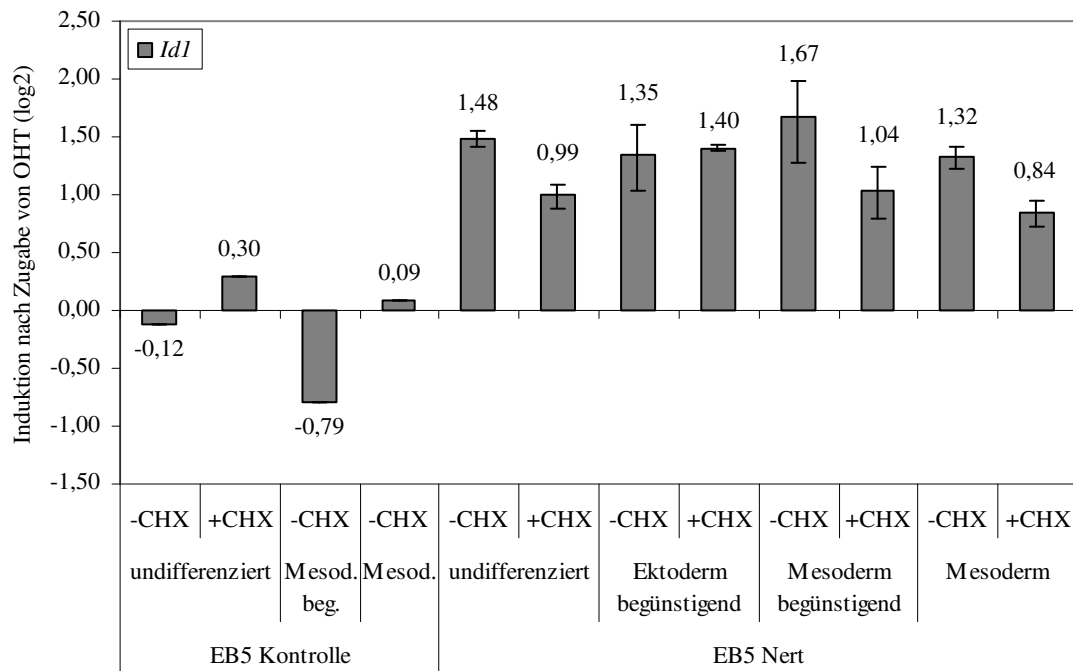
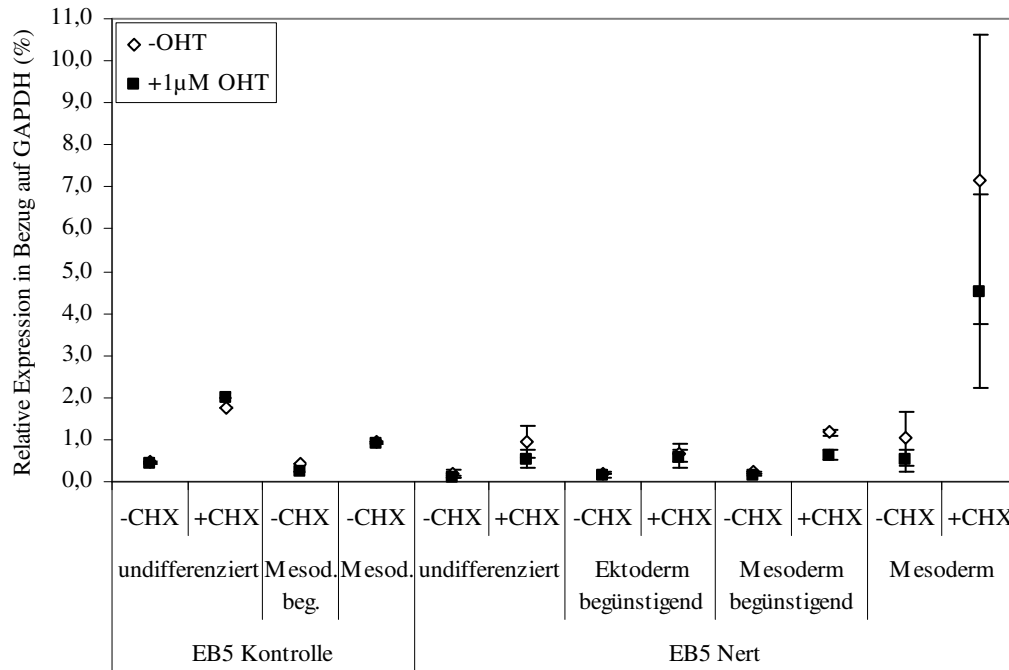


Abb. 4.19: Die Expression von *Id1* wird in allen untersuchten Differenzierungsstadien durch die Aktivierung von Notch1 gesteigert. EB5 Nert bzw. Kontrolle wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen +/- 1  $\mu$ M OHT und +/- 50  $\mu$ g/ml Cycloheximid gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression von *Id1* mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht. In A) sind die einzelnen relativen Expressionen von *Id1*, bezogen auf die *GAPDH*-Expression, dargestellt; B) zeigt die durch Notch1 bedingte Induktion der Genexpression als Logarithmus zur Basis zwei. Abgebildet sind die Mittelwerte von zwei (EB5 Nert „undifferenziert“, EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ +CHX, EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ +CHX), drei (EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ -CHX), vier (EB5 Nert „Mesoderm“ +CHX), fünf (EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ -CHX) bzw. sechs (EB5 Nert „Mesoderm“ -CHX) unabhängigen Experimenten; die Daten von EB5 Kontrolle stellen Einzelwerte dar. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

*Id2* nimmt in der Gruppe dieser vier Gene eine Sonderstellung ein; als einziges erfolgte hier eine Reduktion der Expression nach Aktivierung von Notch1 (s. Abb. 4.20). Diese Repression lag dabei in EB5 Nert unter dem Schwellenwert der zweifachen Änderung. Die relative Expression von *Id2* stieg, wie in Abbildung 4.20 A zu sehen ist, durch Blockade der Proteinsynthese sowohl in EB5 Nert als auch in EB5 Kontrolle, besonders stark in mesodermalen Vorläuferzellen. In Letzteren und in EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ in Anwesenheit von Cycloheximid erfolgte durch Aktivierung von Notch1 eine ähnlich starke Repression; letztere unterlag allerdings starken Schwankungen. Eine tendenziell gleich gerichtete Auswirkung von Cycloheximid auf die Repression von *Id2* konnte nicht

festgestellt werden. Die Zugabe von OHT in EB5 Kontrolle führte außer in „Mesoderm begünstigend“ zu keiner relevanten Repression von *Id2*; diese war stärker als der korrespondierende Wert in EB5 Nert.

A)



B)

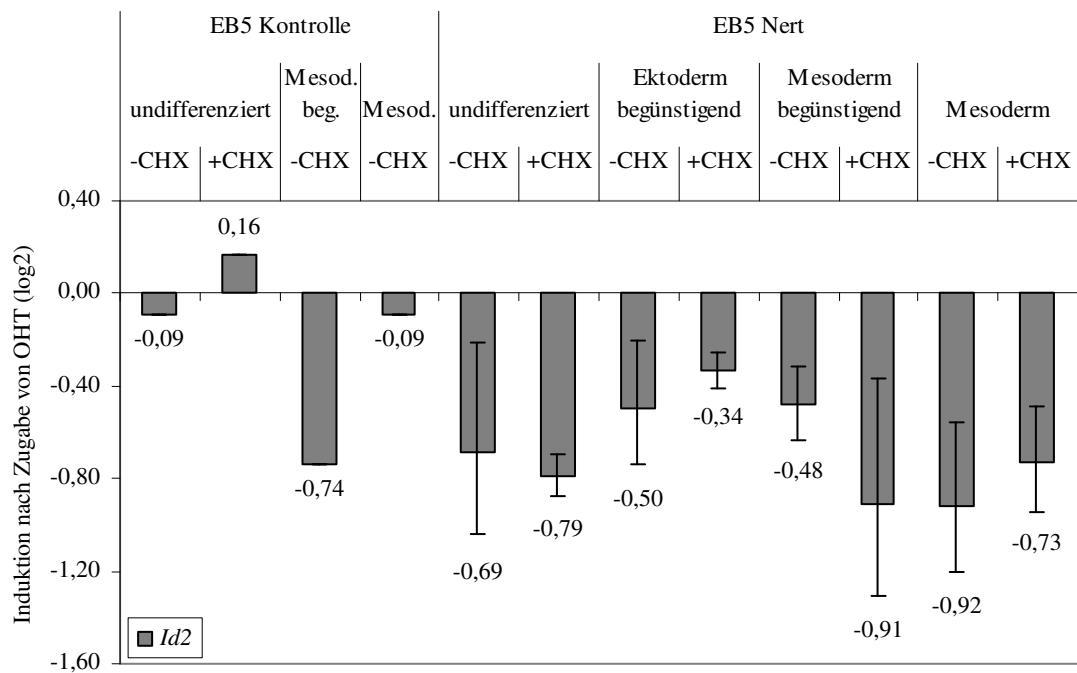
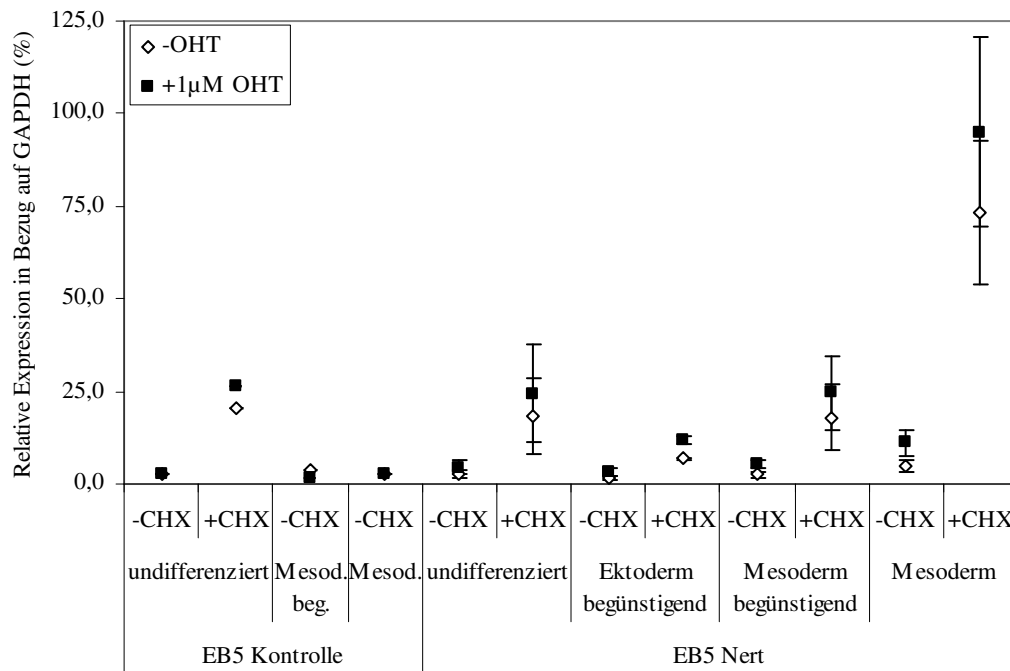




Abb. 4.20: *Id2* wird durch Notch1 schwach reprimiert. EB5 Nert bzw. Kontrolle wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen +/- 1  $\mu$ M OHT und +/- 50  $\mu$ g/ml Cycloheximid gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression von *Id2* mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht. In A) sind die einzelnen relativen Expressionen von *Id2*, bezogen auf die *GAPDH*-Expression, dargestellt; B) zeigt die durch Notch1 bedingte Repression der Genexpression als Logarithmus zur Basis zwei. Abgebildet sind die Mittelwerte von zwei (EB5 Nert „undifferenziert“, EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ +CHX, EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ +CHX), drei (EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ -CHX), vier (EB5 Nert „Mesoderm“ +CHX), fünf (EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ -CHX) bzw. sechs (EB5 Nert „Mesoderm“ -CHX) unabhängigen Experimenten; die Daten von EB5 Kontrolle stellen Einzelwerte dar. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

Die Aktivierung von Notch1 in EB5 Nert führte, gemäß der Definition eines Schwellenwertes der Expressionsänderung um den Faktor zwei, zur Induktion der Expression von *Id3* in den Bedingungen „Mesoderm begünstigend“ und „Mesoderm“. Wie Abbildung 4.21 A zeigt, war die relative Expression von *Id3* besonders in Gegenwart von Cycloheximid sehr hoch und lag in mesodermalen Vorläuferzellen teilweise über dem Wert des konstitutiv exprimierten *GAPDH*, anhand dessen die relative Expression normalisiert wurde. In EB5 Kontrolle wurde nach Zugabe von OHT in „Mesoderm begünstigend“ eine relevante Änderung der Expression festgestellt; allerdings handelte es sich hier um eine Repression. Die übrigen in EB5 Kontrolle gemessenen Expressionen wurden durch die Anwesenheit von OHT nicht beeinflusst. Die Induktion von *Id3* durch Notch1 in der Bedingung „Ektoderm begünstigend“ lag nur geringfügig unter dem angesetzten Schwellenwert. Die zusätzliche Blockade der Proteinsynthese durch Cycloheximid verursachte in EB5 Nert einerseits eine leichte Verringerung der Induktionsstärke, andererseits einen starken Anstieg der relativen Expression von *Id3*. Sie stieg in mesodermalen Vorläuferzellen von durchschnittlich 4,9% auf durchschnittlich 73,3% der korrespondierenden Expression von *GAPDH*. Sowohl dieser Anstieg als auch das generelle Niveau war in den übrigen Kulturbedingungen schwächer ausgeprägt; der Anstieg war auch in EB5 Kontrolle zu beobachten.

A)



B)

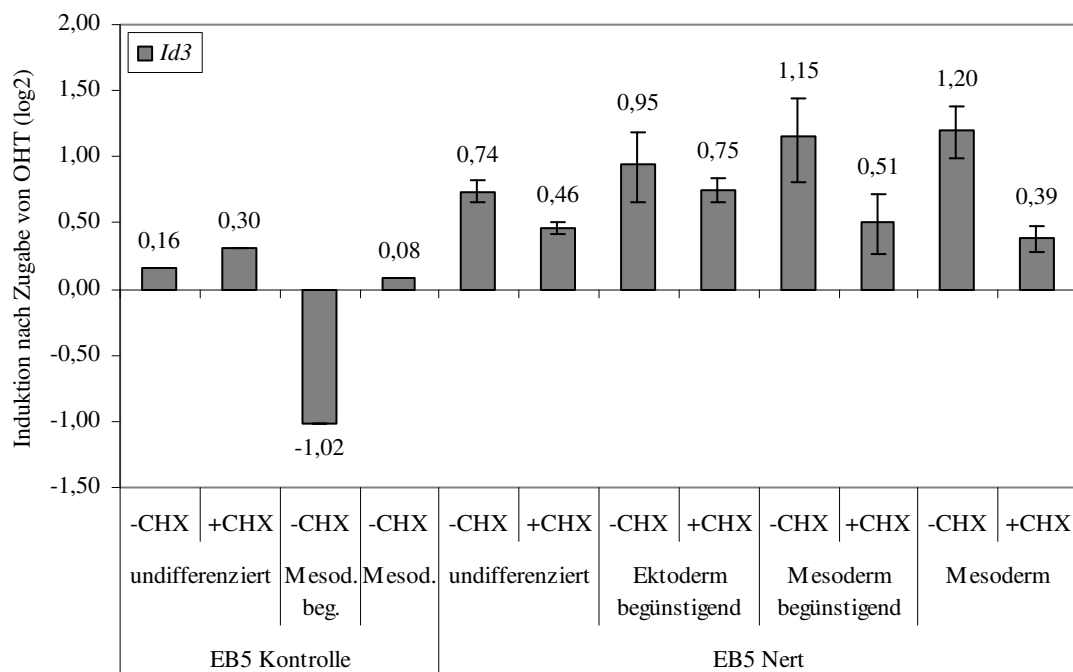
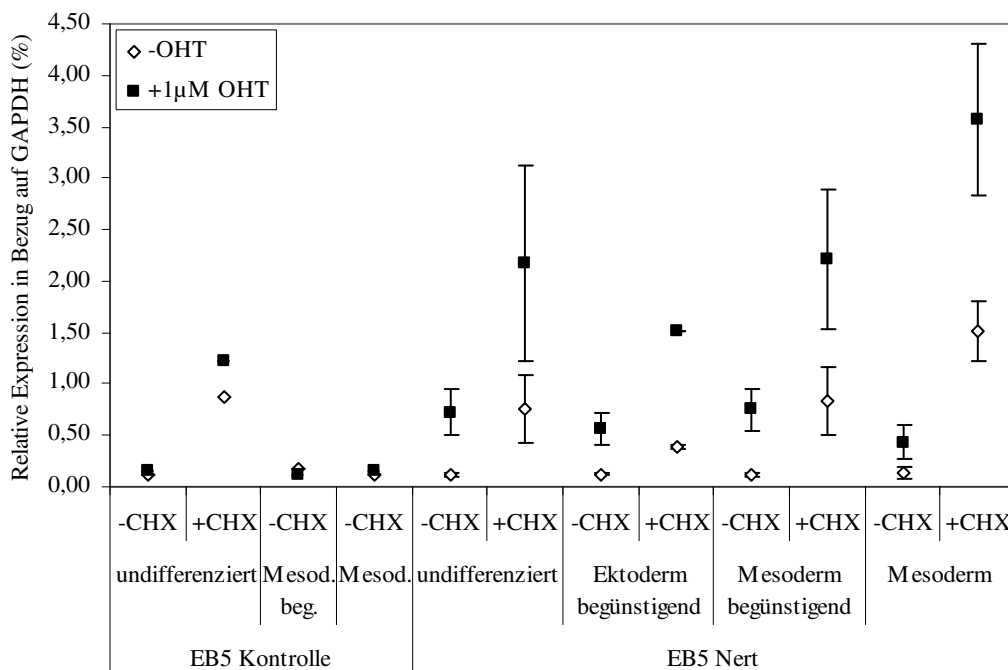


Abb. 4.21: Die Induktion von *Id3* durch Notch1 wird v. a. in mesodermalen Vorläuferzellen durch Inhibition der Proteinsynthese reduziert. EB5 Nert bzw. Kontrolle wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen +/- 1 µM OHT und +/- 50 µg/ml Cycloheximid gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression von *Id3* mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht. In A) sind die einzelnen relativen Expressionen von *Id3*, bezogen auf die *GAPDH*-Expression,

dargestellt; B) zeigt die durch Notch1 bedingte Induktion der Genexpression als Logarithmus zur Basis zwei. Abgebildet sind die Mittelwerte von zwei (EB5 Nert „undifferenziert“, EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ +CHX, EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ +CHX), drei (EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ -CHX), vier (EB5 Nert „Mesoderm“ +CHX), fünf (EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ -CHX) bzw. sechs (EB5 Nert „Mesoderm“ -CHX) unabhängigen Experimenten; die Daten von EB5 Kontrolle stellen Einzelwerte dar. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

In EB5 Nert führte die Anwesenheit von OHT, wie Abbildung 4.22 zeigt, zur Induktion von *Id4* in allen untersuchten Kulturbedingungen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Cycloheximid. Die relative Expression von *Id4* wurde durch die unterschiedlichen Kulturbedingungen nicht beeinflusst. Die Zugabe von Cycloheximid verstärkte jedoch die relative Expression von *Id4* unabhängig von den Kulturbedingungen. Den geringsten Einfluss auf Induktion und relative Expression hatte Cycloheximid in „Ektoderm begünstigend“. Die Expression von *Id4* wurde durch die Zugabe von OHT in EB5 Kontrolle nicht relevant induziert oder reprimiert. In EB5 Nert erfolgte die Induktion von *Id4* nach Zugabe von OHT in allen untersuchten Kulturbedingungen. Die Blockade der Proteinsynthese verursachte dabei in allen Kulturbedingungen eine Verringerung der Induktion.

A)



B)

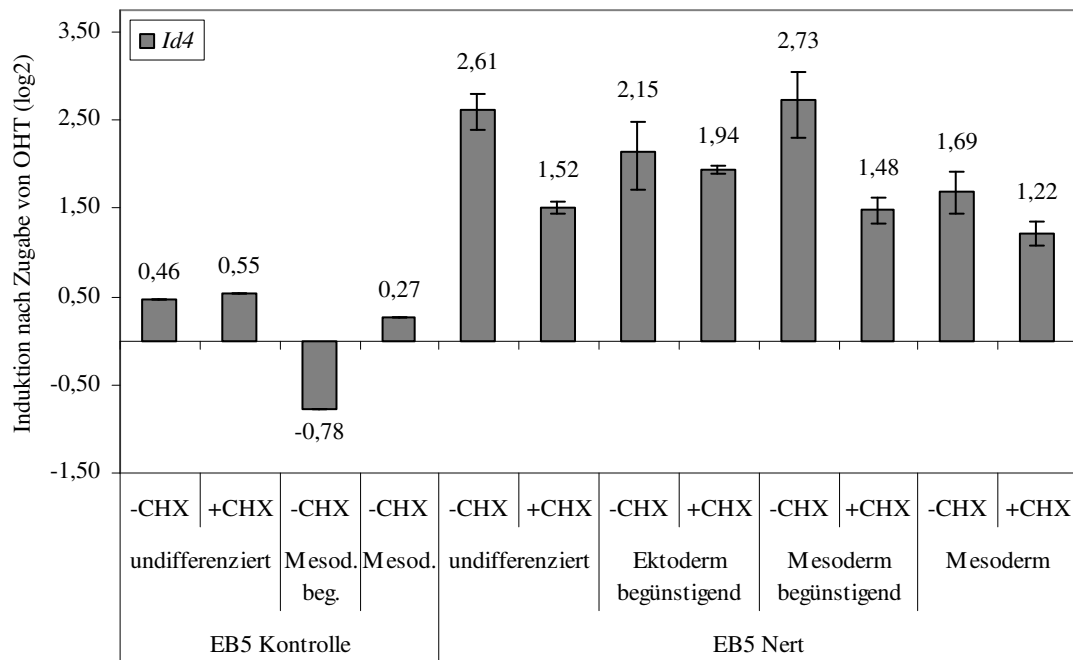


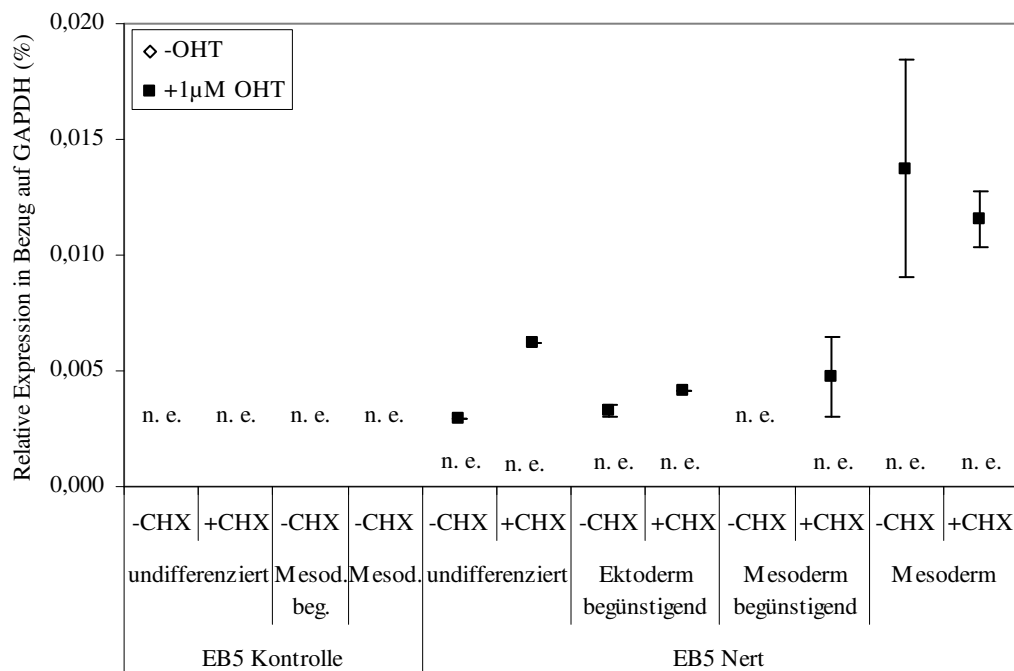
Abb. 4.22: *Id4* ist in allen untersuchten Kulturbedingungen Zielgen von Notch1. EB5 Nert bzw. Kontrolle wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen +/- 1  $\mu$ M OHT und +/- 50  $\mu$ g/ml Cycloheximid gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression von *Id4* mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht. In A) sind die einzelnen relativen Expressionen von *Id4*, bezogen auf die *GAPDH*-Expression, dargestellt; B) zeigt die durch Notch1 bedingte Induktion der Genexpression als Logarithmus zur Basis zwei. Abgebildet sind die Mittelwerte von zwei (EB5 Nert „undifferenziert“, EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ +CHX), drei (EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ -CHX), vier (EB5 Nert „Mesoderm“ +CHX), fünf (EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ -CHX) bzw. sechs (EB5 Nert „Mesoderm“ -CHX) unabhängigen Experimenten; die Daten von EB5 Kontrolle stellen Einzelwerte dar. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

Bei der Untersuchung der differentiellen Expression der vier *Ids* als Reaktion auf die Aktivierung von Notch1 konnte gezeigt werden, dass sowohl *Id1* als auch *Id4* in allen untersuchten Kulturbedingungen ein Zielgen von Notch1 darstellten. *Id3* wurde nur in mesodermalen Vorläuferzellen und in der Bedingung „Mesoderm begünstigend“ durch Notch induziert; *Id2* wurde als einziges Gen reprimiert, am stärksten in mesodermalen Vorläuferzellen.

#### 4.4.3 Differentielle Expression von *Myf5*, *Pax6*, *Runx1* und *Sox9* nach Aktivierung von Notch1

Der Transkriptionsfaktor *Myf5* ist zusammen mit *MyoD* von entscheidender Bedeutung bei der Bildung mesodermaler Skelettmuskeln (Übersicht bei Arnold und Braun, 1996). Das relative Niveau der Expression von *Myf5* ist während der murinen Embryonalentwicklung erst ab Tag 8 durch *in situ*-Hybridisierung nachweisbar (Ott *et al.*, 1991). Wie in Abbildung 4.23 zu sehen ist, war in EB5 Nert und Kontrolle in Abwesenheit von OHT keine Expression von *Myf5* detektierbar. Die relative Expression von *Myf5* in EB5 Nert war in mesodermalen Vorläuferzellen im Vergleich zu den übrigen Proben nach Aktivierung von Notch1 deutlich erhöht. Die Zugabe von Cycloheximid hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die relative Expression von *Myf5*. In EB5 Nert führte die Aktivierung von Notch1 in allen Kulturbedingungen bis auf „Mesoderm begünstigend -CHX“, wo auch in Anwesenheit von OHT keine Expression nachweisbar war, zu Induktionsstärken zwischen 2,8 und 10,1. In EB5 Kontrolle erfolgte keine Detektion von *Myf5*. Die Zugabe von Cycloheximid beeinflusste nicht die Stärke der Induktion von *Myf5* in EB5 Nert.

A)



B)

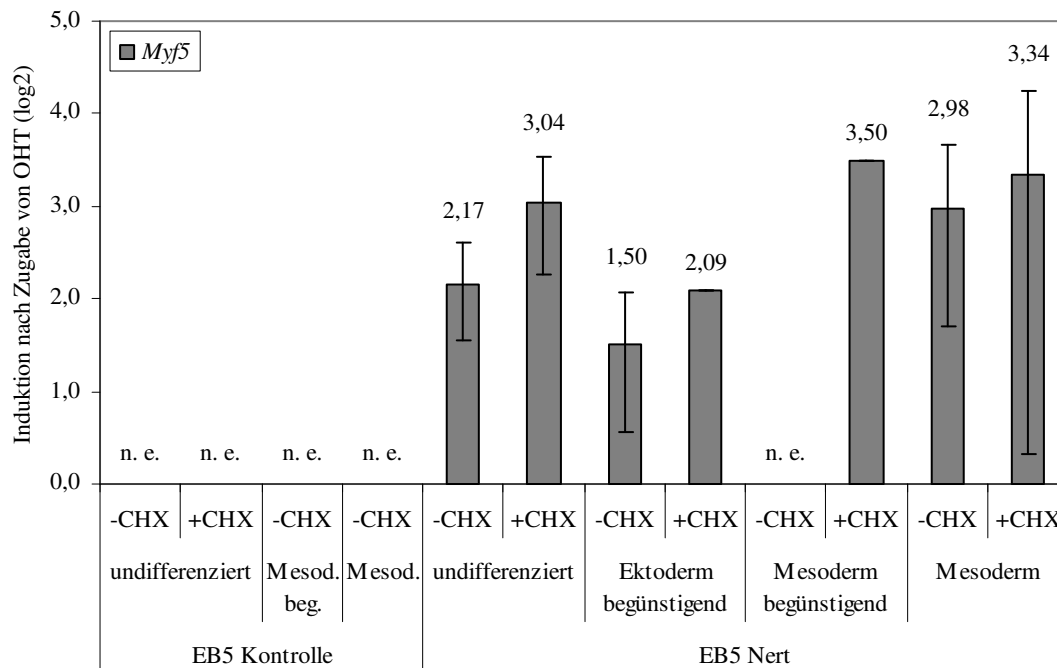
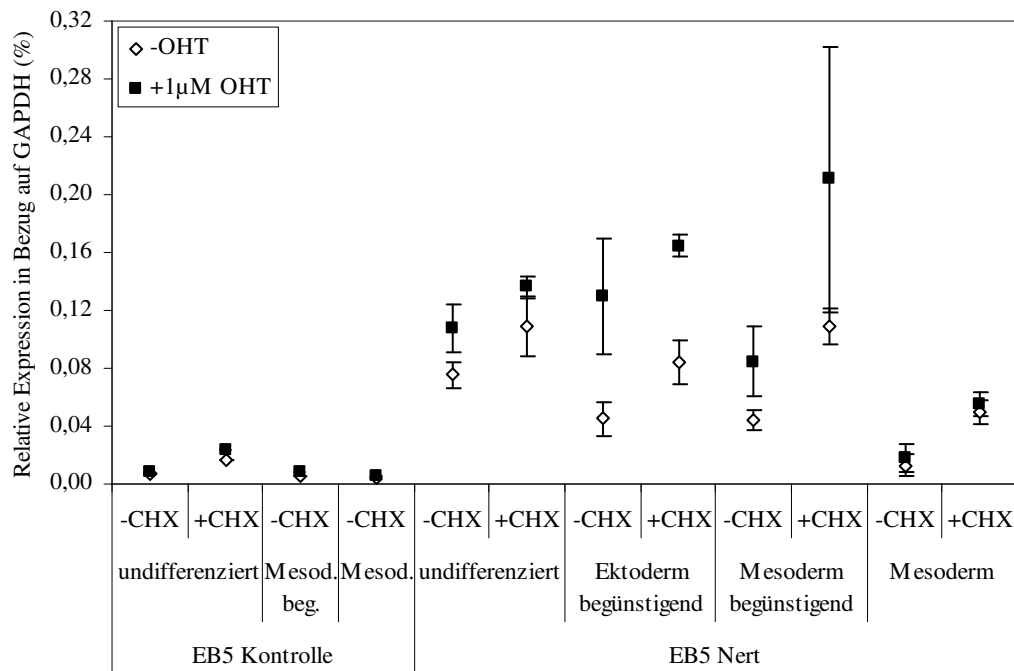


Abb. 4.23: Die relative Expression von *Myf5*, von funktioneller Relevanz für die mesodermale Skelettmuskelbildung, ist nur nach Induktion durch Notch1 nachweisbar. EB5 Nert bzw. Kontrolle wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen +/- 1  $\mu$ M OHT und +/- 50  $\mu$ g/ml Cycloheximid gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression von *Myf5* mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht. In A) sind die einzelnen relativen Expressionen von *Myf5*, bezogen auf die *GAPDH*-Expression, dargestellt, B) zeigt die durch Notch1 bedingte Induktion der Genexpression als Logarithmus zur Basis zwei. Abgebildet sind die Mittelwerte von zwei (EB5 Nert „undifferenziert“, EB5 Nert „Mesoderm bzw. Ektoderm begünstigend“ +CHX), drei (EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ -CHX), vier (EB5 Nert „Mesoderm“ +CHX), fünf (EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ -CHX) bzw. sechs (EB5 Nert „Mesoderm“ -CHX) unabhängigen Experimenten; die Daten von EB5 Kontrolle stellen Einzelwerte dar. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

Ein wichtiger Transkriptionsfaktor während der ektodermalen Differenzierung ist *Pax6* (Übersicht bei Chi und Epstein, 2002). War in den *Microarrays* noch *Pax6* als potentielles Zielgen von Notch in „Mesoderm begünstigend“ und „Ektoderm begünstigend“ gewertet worden, konnte in der *Real-Time RT-PCR* gezeigt werden, dass *Pax6* nur in „Ektoderm begünstigend“ nach Aktivierung von Notch1 über den Schwellenwert hinaus reguliert wird. Die relative Expression von *Pax6* in EB5 Nert war, wie Abbildung 4.24 A zeigt, in undifferenzierten Zellen am größten, lag bei „Ektoderm begünstigend“ und „Mesoderm begünstigend“ auf einem ungefähr gleich hohen, niedrigeren Niveau und war in mesodermalen Vorläuferzellen am geringsten.

A)



B)

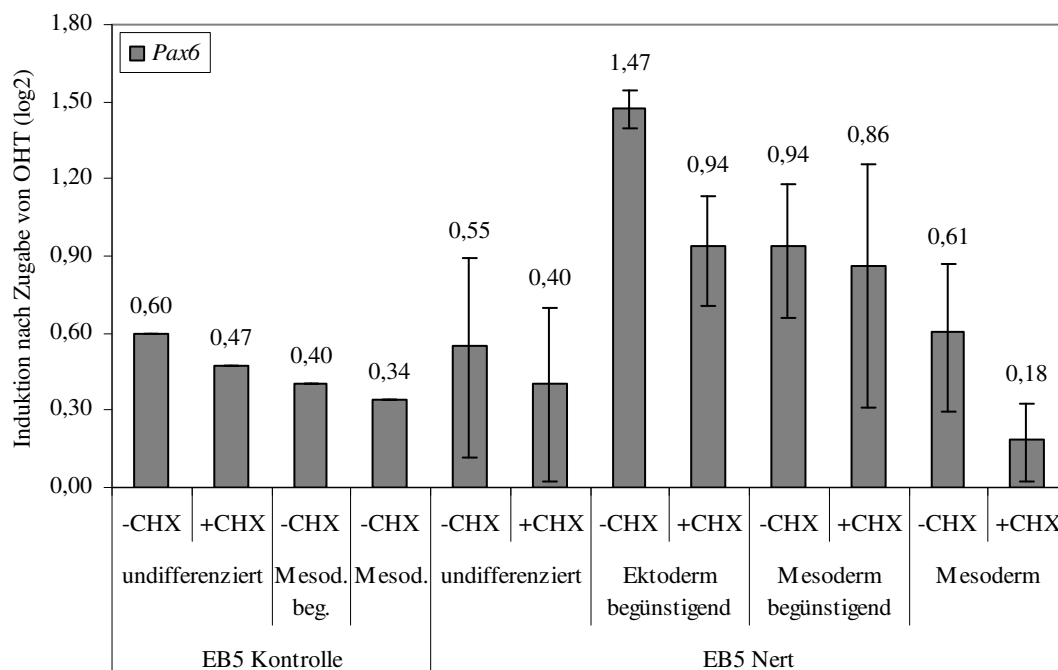


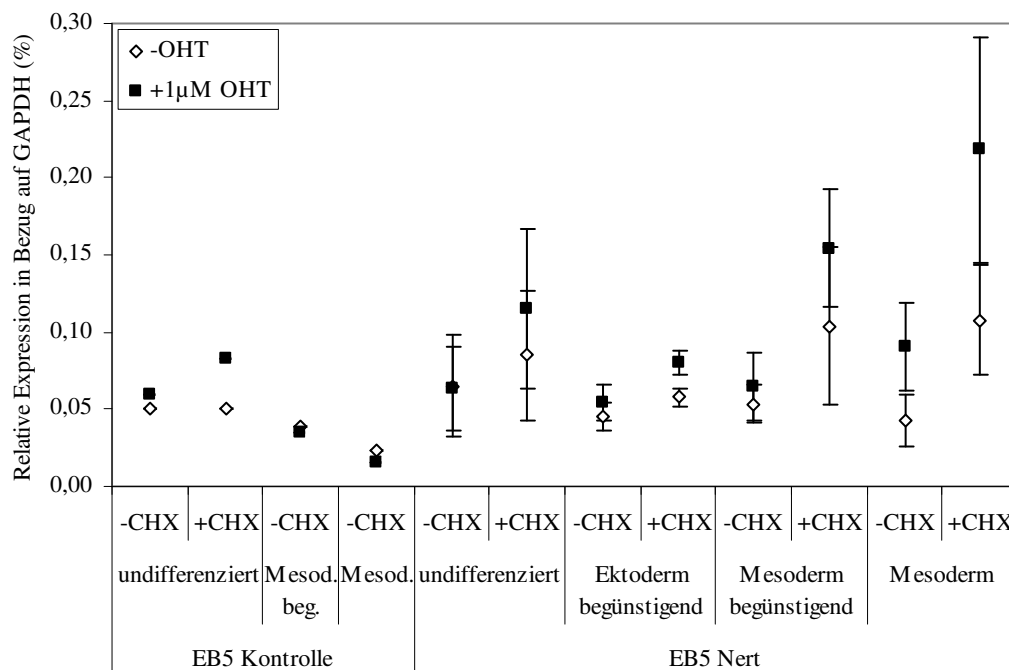
Abb. 4.24: *Pax6* wird in allen untersuchten Differenzierungsstadien exprimiert, aber nur in ES „Ektoderm begünstigend“ wird die Expression durch Notch1 über den Schwellenwert hinaus reguliert. EB5 Nert bzw. Kontrolle wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen +/- 1  $\mu$ M OHT und +/- 50  $\mu$ g/ml Cycloheximid gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression von *Pax6* mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht. In A) sind die

einzelnen relativen Expressionen von *Pax6*, bezogen auf die *GAPDH*-Expression, dargestellt, B) zeigt die durch Notch1 bedingte Induktion der Genexpression als Logarithmus zur Basis zwei. Abgebildet sind die Mittelwerte von zwei (EB5 Nert „undifferenziert“, EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ +CHX, EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ +CHX), drei (EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ -CHX), vier (EB5 Nert „Mesoderm“ +CHX), fünf (EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ -CHX) bzw. sechs (EB5 Nert „Mesoderm“ -CHX) unabhängigen Experimenten; die Daten von EB5 Kontrolle stellen Einzelwerte dar. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

Die Zugabe von OHT zu den Kulturen hatte keine relevante Auswirkung auf die Expression von *Pax6* in EB5 Kontrolle (s. Abb. 4.24). Dasselbe galt für EB5 Nert unter den Bedingungen „undifferenziert“ und „Mesoderm“. Die Induktion von *Pax6* in EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ lag mit einem Wert von 1,9 nur knapp unter dem Schwellenwert der zweifachen Regulation. Die Blockade der Proteinsynthese senkte die Stärke der Induktion in allen Kulturbedingungen geringfügig, steigerte jedoch die relative Expression in EB5 Nert in allen Kulturbedingungen.

*Runx1* spielt während der mesodermalen Differenzierung und auch bei der Bildung Flk-1<sup>+</sup> mesodermaler Vorläuferzellen eine wichtige Rolle (Hirai *et al.*, 2005).

A)





B)

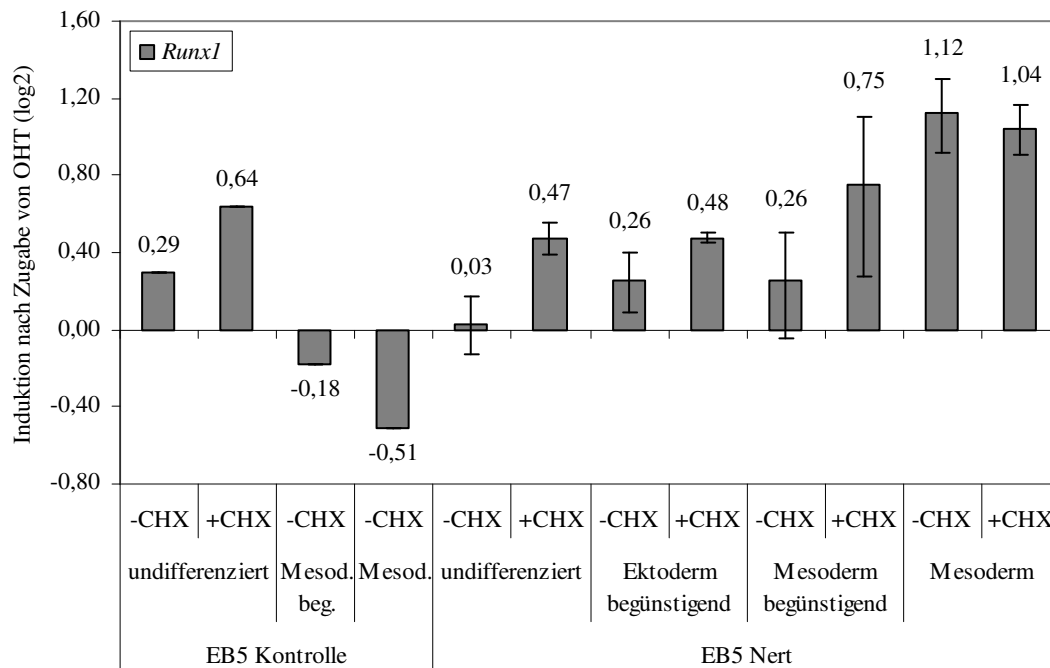
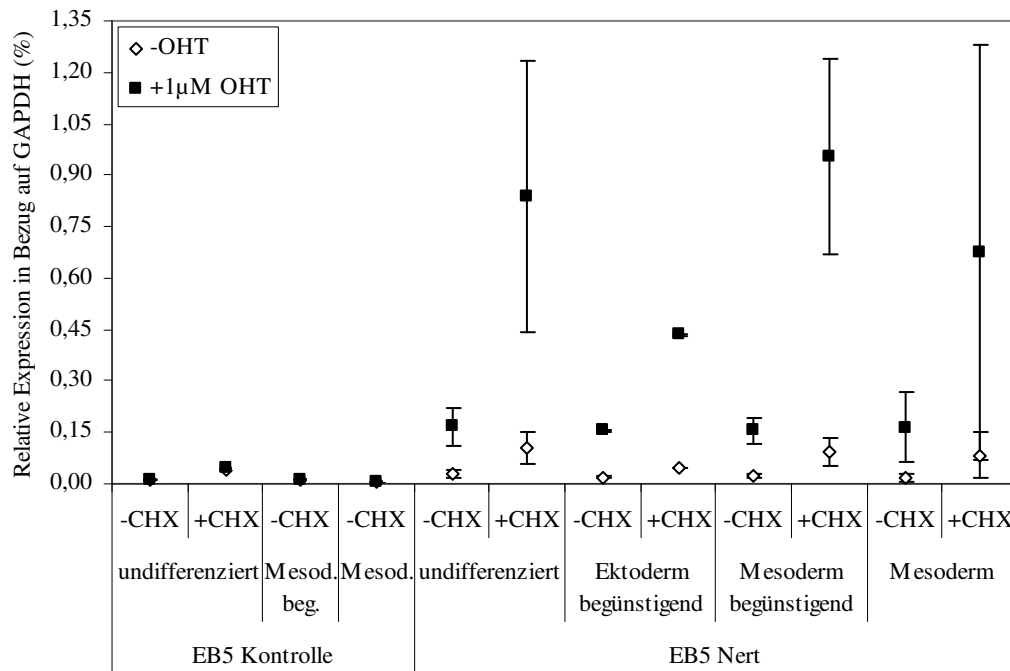


Abb. 4.25: *Runx1* wird in mesodermalen Vorläuferzellen unabhängig von der Proteinsynthese durch Aktivierung von Notch1 heraufreguliert. EB5 Nert bzw. Kontrolle wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen +/- 1  $\mu$ M OHT und +/- 50  $\mu$ g/ml Cycloheximid gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression von *Runx1* mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht. In A) sind die einzelnen relativen Expressionen von *Runx1*, bezogen auf die *GAPDH*-Expression, dargestellt; B) zeigt die durch Notch1 bedingte Induktion der Genexpression als Logarithmus zur Basis zwei. Abgebildet sind die Mittelwerte von zwei (EB5 Nert „undifferenziert“, EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ +CHX, EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ +CHX), drei (EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ -CHX), vier (EB5 Nert „Mesoderm“ +CHX), fünf (EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ -CHX) bzw. sechs (EB5 Nert „Mesoderm“ -CHX) unabhängigen Experimenten; die Daten von EB5 Kontrolle stellen Einzelwerte dar. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

Eine Regulierung von *Runx1* durch Notch1 zeigte sich in den *Microarrays* in der Bedingung „Mesoderm“. Dies konnte mittels *Real-Time RT-PCR* bestätigt werden (s. Abb. 4.25). Weder die Blockade der Proteinsynthese noch die unterschiedlichen Differenzierungsstufen zeigten Auswirkungen auf die relative Expression von *Runx1* in EB5 Nert und EB5 Kontrolle. Darüber hinaus hatte die Zugabe von OHT keinen relevanten Einfluss auf die Expression von *Runx1* sowohl in EB5 Kontrolle als auch in EB5 Nert „undifferenziert“ und „Ektoderm bzw. Mesoderm begünstigend“. Die Induktion in mesodermalen Vorläuferzellen wurde durch die Anwesenheit von Cycloheximid nicht beeinflusst.

A)



B)

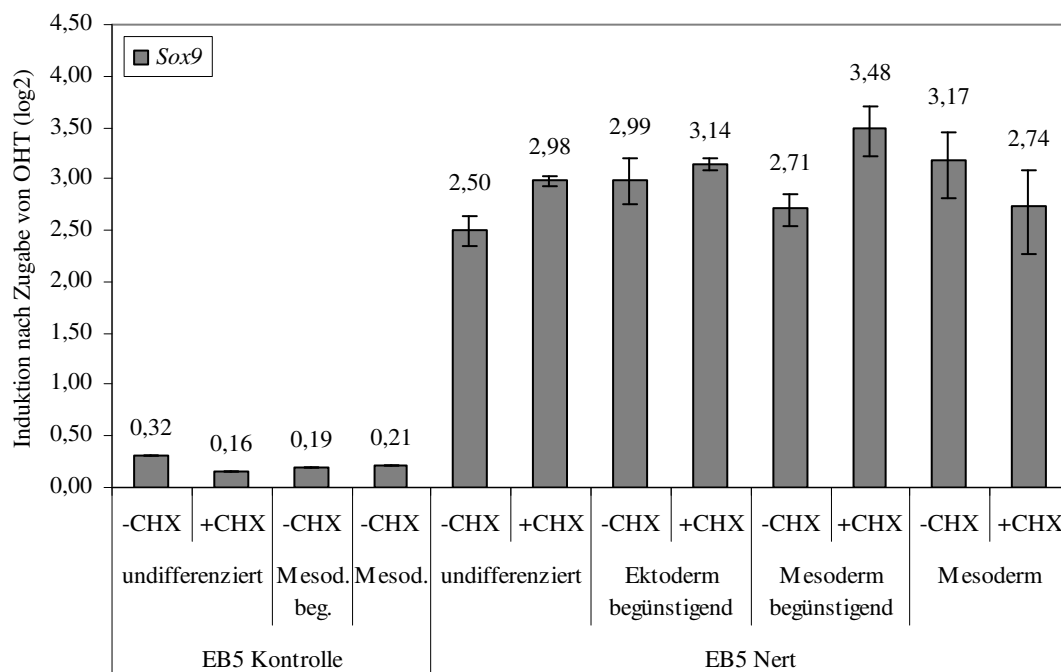


Abb. 4.26: Die Expression von *Sox9*, welche in EB5 Nert in allen untersuchten Differenzierungsstadien durch Notch1 hochreguliert wird, wird durch Inhibition der Proteinsynthese gesteigert. EB5 Nert bzw. Kontrolle wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen +/- 1 µM OHT und +/- 50 µg/ml Cycloheximid gehalten. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde die Expression von *Sox9* mittels *Real-Time RT-PCR* untersucht.

In A) sind die einzelnen relativen Expressionen von *Sox9*, bezogen auf die *GAPDH*-Expression, dargestellt; B) zeigt die durch Notch1 bedingte Induktion der Genexpression als Logarithmus zur Basis zwei. Abgebildet sind die Mittelwerte von zwei (EB5 Nert „undifferenziert“, EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ +CHX, EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ +CHX), drei (EB5 Nert „Ektoderm begünstigend“ -CHX), vier (EB5 Nert „Mesoderm“ +CHX), fünf (EB5 Nert „Mesoderm begünstigend“ -CHX) bzw. sechs (EB5 Nert „Mesoderm“ -CHX) unabhängigen Experimenten; die Daten von EB5 Kontrolle stellen Einzelwerte dar. Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

Auch *Sox9* wurde in den *Microarrays* nur in mesodermalen Vorläuferzellen positiv durch Notch1 reguliert. Die Ergebnisse der *Real-Time RT-PCR* zeigten nun, dass die Aktivierung von Notch1 zu einer Induktion der Expression von *Sox9* in allen untersuchten Kulturbedingungen führte (s. Abb. 4.26). Die relative Expression von *Sox9* wurde durch verschiedene Differenzierungsstadien oder Cycloheximid in Abwesenheit von OHT nicht beeinflusst. Die Werte der relativen Expression in EB5 Nert in Gegenwart von OHT und Cycloheximid zeigten meist große Varianz. Die Zugabe von OHT in EB5 Kontrolle führten nicht zur Induktion von *Sox9*. Die in EB5 Nert gemessenen Induktionen wurden durch Cycloheximid nicht beeinflusst und zeigten auch keine größeren Schwankungen zwischen den einzelnen Kulturbedingungen.

Die Untersuchung vier verschiedener potentieller Zielgene von Notch1, die essentielle Funktionen während der Differenzierung in verschiedenen Keimblättern haben (Übersichten bei Arnold und Braun, 1996; Chi und Epstein, 2002; Hardingham *et al.*, 2006; Hirai *et al.*, 2005; Seymour *et al.*, 2007), zeigte, dass, wie im Fall von *Runx1* und *Pax6*, die Gene in den jeweiligen Differenzierungsstadien als Zielgenen von Notch1 fungierten. Die Expression von *Myf5* wurde zwar nach Aktivierung von Notch1 in fast allen untersuchten Bedingungen detektierbar und heraufreguliert; inwiefern sich diese geringen Mengen an RNA auf Proteinebene widerspiegeln, bleibt zu untersuchen. Die Expression von *Sox9* wurde in allen Kulturbedingungen nach Aktivierung von Notch1 induziert.

#### 4.5 Etablierung eines Systems zur Untersuchung der biologischen Relevanz der Notch1-Zielgene während der mesodermalen Differenzierung

Im vorangegangenen Abschnitt der Arbeit wurde die differentielle Expression verschiedener Gene, die in *Microarrays* als potentielle Zielgene von Notch1 identifiziert worden waren, auf Ebene der Expression von mRNA vor und nach Aktivierung von Notch1 untersucht. Als ausschlaggebend für ihre Funktion als Zielgen von Notch1 ist allerdings nicht allein die differentielle Expression der einzelnen Gene in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien vor und nach Aktivierung von Notch1 anzusehen, sondern vor allem ihre biologische Relevanz während der Differenzierung. Um diese analysieren zu können, wurde begonnen, ein System zu etablieren, das die durch die Aktivierung von Notch1 induzierten Effekte auf einzelne Gene „abfangen“ und so deren durch Notch1 vermittelte Funktion in der mesodermalen Differenzierung deutlich machen würde.

In allen untersuchten Kulturbedingungen induzierte die Aktivierung von Notch1 die Expression verschiedener Gene. Um genauer untersuchen zu können, welches dieser Gene Einfluss auf die mesodermale Differenzierung nimmt, sollte die Induktion eines einzelnen Gens nach Aktivierung von Notch1 unterdrückt werden. Dadurch sollte Art und Zeitpunkt des potentiellen, durch Notch1 vermittelten Einflusses auf die mesodermale Differenzierung untersucht werden. Die Differenzierung als komplexes Netzwerk sollte dabei durch den Versuchsaufbau möglichst wenig beeinträchtigt werden. Mittels gleichzeitiger Aktivierung von Notch1 und Einsatz von siRNA würde sich idealerweise die Induktion eines bestimmten Gens durch Notch1 unterdrücken lassen. Dennoch würde ein physiologisches Expressionsniveau des Gens erhalten werden sowie andere durch Notch1 bedingte Effekte nicht unterdrückt werden. Die praktische Realisierung würde aus der Kombination verschiedener Versuche bestehen: zunächst sollten embryonale Stammzellen, die auf Gelatine in undifferenziertem Zustand gehalten worden waren, transient mit siRNA transfiziert werden. Sobald die Repression eingesetzt hätte, würden diese Zellen abgelöst, gewaschen und auf OP9-Stromazellen unter Bedingungen kokultiviert, die die mesodermale Differenzierung förderten. Durch die Zugabe von OHT von Beginn der Kokultur an könnte der Einfluss des Zielgens nach Aktivierung von Notch1 untersucht werden. In Abwesenheit von OHT könnte der Einfluss reduzierter Expression des Zielgens auf die mesodermale Differenzierung charakterisiert werden. Um einen derartigen

Versuchsaufbau zu realisieren, mussten im Vorfeld verschiedene Punkte abgeklärt werden: auf der einen Seite die Stärke, Dauer und Kinetik der durch die siRNA hervorgerufene Repression, auf der anderen Seite die Kombination der Transfektion von siRNA und der Kokultur der embryonalen Stammzellen auf OP9-Stromazellen einschließlich der Aktivierung von Notch1. Die erste Gruppe der zu untersuchenden Gene waren die basischen HLHs *Id1*, *Id2*, *Id3* und *Id4*.

Der erste Schritt zum Aufbau eines derartigen Versuchssystems war die Etablierung der spezifischen Repression von Genen mittels siRNA. Dies geschah durch Transfektion von EB5 Nert mit einer Mischung verschiedener spezifischer, gegen *GAPDH* gerichteter siRNAs. Durch die Mischung verschiedener siRNAs sollten unspezifische, sogenannte *off-target* Effekte minimiert werden. Undifferenzierte, auf Gelatine gehaltene adhärente EB5 Nert wurden mittels modifizierter Lipofektion mit 100 nM siRNA transfiziert; nach 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 48 h wurde jeweils RNA isoliert und die relative Expression von *GAPDH* in der *Real-Time RT-PCR* bestimmt.

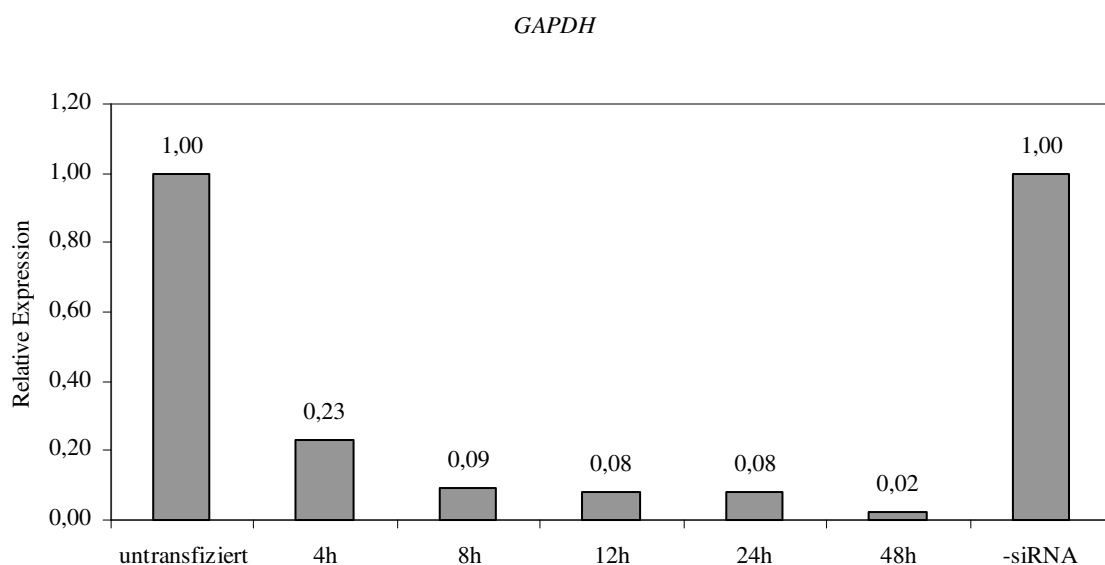


Abb. 4.27: Die Expression von *GAPDH* wird durch siRNA fast vollständig unterdrückt. EB5 Nert wurden mit 100 nM gegen *GAPDH* gerichtete siRNA transfiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde RNA isoliert. Nach reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde mittels *Real-Time RT-PCR* die relative Expression von *GAPDH* ermittelt. Die Probe „-siRNA“ wurde mit Transfektionsreagenz, nicht jedoch mit siRNA behandelt. Die Normalisierung der Werte erfolgte über alle gemessenen Gene. Die Daten stellen Einzelwerte dar.

Wie Abb. 4.27 zeigt, war die relative Expression von *GAPDH* bereits nach vier Stunden um 77% reduziert. Diese Repression verstärkte sich auf bis zu 98% nach 48 h. Die Zellen

waren dabei nach 30 h erneut ausgesät und expandiert worden, um eine zu große Dichte der Zellen zu verhindern. Eine „leere“ Transfektion der Zellen mit Puffer anstelle von siRNA in Transfektionsreagenz („-siRNA“) hatte keinen Einfluss auf die Expression von *GAPDH*. Um eine Auswirkung der spezifischen siRNA auf andere Gene einschränken zu können, wurde ebenfalls die Expression von *Id1*, *Id2*, *Id3*, *Id4* und der DNA-dirigierten RNA Polymerase II Polypeptid F (*Polr2f*) überprüft. Deren Expression wurde durch die gegen *GAPDH* gerichtete siRNA nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Die Konzentration der eingesetzten siRNA korreliert direkt mit der Stärke von *off-target* Effekten. Deshalb wurde im nächsten Schritt die Konzentrationsabhängigkeit der Repression ermittelt. Wie im vorangegangenen Versuch wurden EB5 Nert mit gegen *GAPDH* gerichteter siRNA in Konzentrationen zwischen 1 nM und 100 nM transfiziert und nach 24 h RNA isoliert. Es waren keine morphologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Proben zu erkennen. Die relative Expression von *GAPDH* lag zwischen 40 nM und 100 nM auf einem Niveau. Daher wurde für weitere Experimente die siRNA in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Die Expression der übrigen untersuchten Gene *Id1* bis *Id4* und *Polr2f* wurde durch die Repression von *GAPDH* mit Ausnahme von *Id3* bei 40 nM siRNA nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).

Um die Rolle der Ids bei den durch Notch1 vermittelten Differenzierungsvorgängen von embryonalen Stammzellen zu mesodermalen Vorläuferzellen charakterisieren zu können, war nicht die absolute Stärke der Repression von Bedeutung. Vielmehr sollte durch die zeitlich auf die Aktivierung von Notch1 abgestimmte Transfektion mit siRNA die durch Notch1 verursachte Induktion der Expression verhindert werden, so dass im Idealfall das Niveau der Expression unverändert bliebe. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Versuch die Kinetik der durch siRNA bedingten Repression in den ersten Stunden nach der Transfektion untersucht. EB5 Nert wurden dazu in einer Konzentration von 50 nM einerseits mit gegen *GAPDH* gerichteter siRNA, andererseits mit unspezifischer siRNA („Negativ siRNA“) transfiziert und es wurde stündlich bis 4 h nach der Transfektion RNA isoliert. Als Positivkontrolle diente ein nach 24 h genommener Wert. Wiederum waren keine morphologischen Unterschiede zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen zu erkennen. Wie aus Abbildung 4.28 ersichtlich wird, war eine deutliche Reduktion der Expression von *GAPDH* bereits nach 2 h deutlich, die von 61% bis auf 83% Repression nach 24 h anstieg. Die Transfektion der Zellen mit unspezifischer siRNA hatte dabei zwar besonders in den ersten Stunden Einfluss auf die Expression von *GAPDH*; die Repression betrug jedoch nie mehr als 50%. Nachdem die Zellen im endgültigen

Versuchsaufbau direkt nach Einsetzen der Wirkung der siRNA mit OP9-Stromazellen kokultiviert werden sollten, wurde als dafür geeigneter Zeitpunkt der Wert 3 h nach der Transfektion ausgewählt. Zu diesem Zeitpunkt konnten keine Auswirkungen der siRNA auf die Expression der *Ids* und von *Polr2f* festgestellt werden; lediglich nach zweistündiger Transfektion der Zellen mit unspezifischer siRNA wurde eine Induktion von *Id1* um den Faktor 2,1 gemessen (Daten nicht gezeigt).

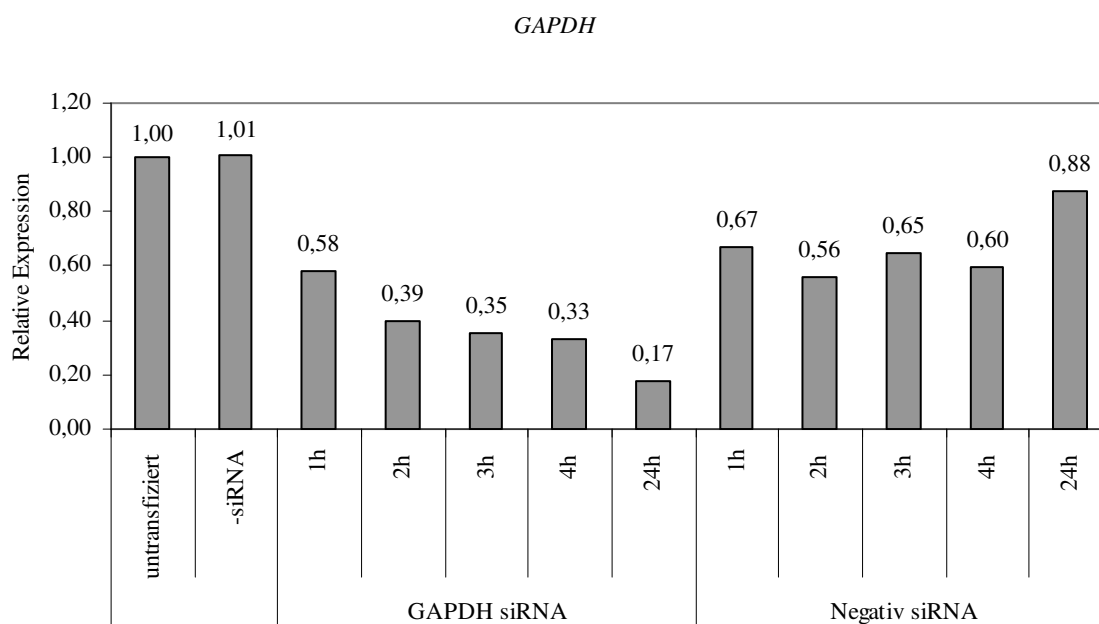


Abb. 4.28: Nach 2 h beträgt die Repression durch spezifische siRNA mehr als 40%. EB5 Nert wurden mit 50 nM gegen *GAPDH* gerichtete bzw. unspezifische siRNA transfiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde RNA isoliert. Nach reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde mittels *Real-Time RT-PCR* die relative Expression von *GAPDH* ermittelt. Die Probe „-siRNA“ wurde mit Transfektionsreagenz, nicht jedoch mit siRNA behandelt. Die Normalisierung der Werte erfolgte über alle gemessenen Gene. Die Daten stellen Einzelwerte dar.

Die Experimente zur Etablierung der Transfektion waren mit siRNA durchgeführt worden, die gegen *GAPDH* gerichtet war. Um den Beginn, die Stärke und den Einfluss der spezifisch gegen die verschiedenen *Ids* gerichteten siRNAs zu analysieren, wurden embryonale Stammzellen mit den verschiedenen spezifischen siRNAs transfiziert (s. Abb. 4.29). Dabei sollte in einem Ansatz gleichzeitig *Id1* und *Id3* herunterreguliert werden, da diese Gene in ihren Funktionen zum Teil redundant sind (Übersicht bei Benezra *et al.*, 2001).





Abb. 4.29: Spezifische Repression der verschiedenen *Ids* mittels siRNA. EB5 Nert wurden mit 50 nM gegen *GAPDH*, *Id1*, *Id2*, *Id3* oder *Id4* gerichtete bzw. unspezifische siRNA transfiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde RNA isoliert. Nach reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde mittels *Real-Time RT-PCR* die relative Expression von *GAPDH*, *Id1*, *Id2*, *Id3* und *Id4* ermittelt. Die Probe „-siRNA“ wurde mit Transfektionsreagenz, nicht jedoch mit siRNA behandelt. Die Normalisierung der Werte erfolgte über alle gemessenen Gene. Die Daten stellen Einzelwerte dar. Schwarz markiert sind Expressionen der Proben, die mit der jeweils spezifischen siRNA behandelt worden waren.

Die Gesamtkonzentration der siRNA bei allen Transfektionen betrug 50 nM. Nach 3 h und 24 h wurde jeweils die RNA der Zellen isoliert und mittels *Real-Time RT-PCR* die relative Expression der verschiedenen Gene bestimmt.

Wie Abbildung 4.29 zeigt, waren große Unterschiede in der Stärke der jeweiligen Repression sowohl nach 3 h als auch nach 24 h zu erkennen. Ihr Wert variierte nach 3 h zwischen 23% und 78%, nach 24 h zwischen 48% und 90%. Die stärkste spezifische Repression war dabei durch gegen *Id2* gerichtete siRNA zu beobachten, die schwächste, die nach 3 h weniger als 50% betrug, durch gegen *Id3* gerichtete siRNA. Auch bei der Repression von *Id1* konnte nach 3 h kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Die kombinierte Transfektion von gegen *Id1* und *Id3* gerichteter siRNA resultierte zwar zumindest nach 24 h in der Repression von *Id1*, nicht aber von *Id3*. Auch die Repression von *GAPDH* betrug nach 3 h lediglich 48% und nicht 65% wie im vorangegangenen Experiment. Die mit siRNA gegen *Id4* und gegen die Kombination von *Id1* und *Id3* transfizierten Zellen zeigten nach 24 h eine Induktion der Expression von *GAPDH*, welche stärker als zweifach war. Die geringste Beeinflussung der Expression der übrigen analysierten Gene in Kombination mit deutlicher spezifischer Repression durch die siRNA zeigten die Zellen, die mit *Id4* spezifischer siRNA transfiziert worden waren.

Die spezifische Repression der Genexpression durch siRNA in Kombination mit der Aktivierung von Notch1 stellt ein Versuchssystem mit vielen Parametern dar. Um gezielt einen Aspekt analysieren zu können, bedarf es der genauen Anpassung dieser Parameter an die Untersuchung jedes einzelnen Zielgens. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass verschiedene Aspekte wie z.B. die Dauer der Repression durch siRNA erst bestimmt werden müssen, um die biologische Relevanz der Zielgene von Notch1 im Hinblick auf die mesodermale Differenzierung analysieren zu können.

## 5. Diskussion

Notch spielt in vielen verschiedenen Differenzierungsprozessen in Abhängigkeit des jeweiligen Zellkontext eine wichtige Rolle und kann dabei sowohl aktivierend als auch inhibierend wirken (Übersichten bei Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Bray, 2006). Dieser Einfluss bezieht sich auf Differenzierung, Proliferation und Apoptose und reicht von der Embryonalentwicklung bis hin zu Vorgängen in adulten Zellen. In embryonalen Stammzellen bewirkt beispielsweise die Aktivierung von Notch1 die Repression der Bildung mesodermaler Vorläuferzellen (Schroeder *et al.*, 2006) und begünstigt die ektodermale Differenzierung (Lowell *et al.*, 2006). Zusammen mit cAMP und VEGF bewirkt Notch1 die Entwicklung arterieller Endothelzellen aus vaskulären Vorläuferzellen (Yurugi-Kobayashi *et al.*, 2006). In adulten Organismen beeinflusst Notch beispielsweise die Entwicklung von B- und T-Zellen sowie die Funktion peripherer T-Zellen (Radtke *et al.*, 2004).

Trotz des relativ einfachen Aufbaus der durch Notch vermittelten Signaltransduktion hat Notch höchst unterschiedliche Auswirkungen auf die Differenzierung verschiedener Zelltypen. Die Regulation und Modulation dieser Signalübermittlung erfolgt an verschiedenen Stellen: die Bindung zwischen Rezeptor und Ligand wird u. a. durch Glykosylierung von Notch mittels Glykosyltransferasen wie Lunatic Fringe, Radical Fringe oder Maniac Fringe moduliert (Übersicht bei Bray, 2006). Darüber hinaus erfolgt Regulation durch die Endozytose von Notch und seinen Liganden (Übersicht bei Le Borgne *et al.*, 2005). Nach Abspaltung der intrazellulären Domäne von Notch kann durch den Antagonisten Numb Notch degradiert und damit die Signalübermittlung inhibiert werden (McGill und McGlade, 2003). Diese Möglichkeiten der Regulation können jedoch nicht die Kontextabhängigkeit der durch Notch vermittelten Effekte hinreichend erklären.

Sehr begrenzt ist die Zahl der bislang bekannten Zielgene von Notch, die entweder für die weitere Modifizierung, Spezifizierung und Weiterleitung des Signals oder für die eigentlichen Effekte Verantwortung tragen. Zu diesen Genen zählen Mitglieder der *Hes*- und *Hey*-Familien (Übersicht bei Fischer und Gessler, 2007) sowie *Nrarp* (*Notch-related ankyrin-repeat protein*), *Deltex*, *Ptcra* und *Cdkn1a* (Übersicht bei Radtke *et al.*, 2004). Eine Möglichkeit, die Vielfalt und Kontextabhängigkeit der durch Notch vermittelten

Effekte zu erklären, ist, dass neben den bisher bekannten weitere unbekannte generelle und kontextabhängige Zielgene von Notch existieren.

Ein Einfluss von Notch1 auf initiale Zelllinienentscheidungen in murinen embryonalen Stammzellen sowie auf die mesodermale Differenzierung konnte, z. T. im Rahmen dieser Arbeit, bereits nachgewiesen werden (Schroeder *et al.*, 2006). Die Aktivierung von Notch1 in embryonalen Stammzellen reprimierte die Bildung Flk-1<sup>+</sup> mesodermaler Vorläuferzellen. Wurde Notch1 erst in den mesodermalen Vorläuferzellen aktiviert, bewirkte dies die reduzierte Generierung von Kardiomyozyten und von Endothelzellen, nicht aber von muralen Zellen. In hämatopoetischen Vorläuferzellen beeinträchtigte die Aktivierung von Notch1 die Selbsterneuerung der Zellen und blockierte nicht deren Differenzierung (Schroeder *et al.*, 2006). Die Identifizierung der für diese Auswirkungen verantwortlichen und spezifischen kontextabhängigen Zielgene von Notch1 in embryonalen Stammzellen und in mesodermalen Vorläuferzellen war ein Hauptziel dieser Arbeit. Um die Kontextabhängigkeit der einzelnen Zielgene zu bestätigen, wurde im nächsten Schritt die differentielle Expression verschiedener potentieller Zielgene vor und nach Aktivierung von Notch1 in verschiedenen Kulturbedingungen analysiert. Die Funktion und damit die biologische Relevanz der Zielgene im Kontext der durch Notch1 beeinflussten Differenzierung zu charakterisieren, wäre der nächste Schritt. Dadurch ließen sich die molekularen Mechanismen und Interaktionen, die hinter dem Notch1-Signalweg stehen und mit großer Wahrscheinlichkeit zur Vielfalt der von ihm beeinflussten Zelllinienentscheidungen beitragen, analysieren. Mit der Etablierung eines Systems hierzu wurde abschließend begonnen. Da die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse hauptsächlich auf Grundlagenexperimenten zur differentiellen und kontextabhängigen Expression der identifizierten Zielgene von Notch1 beruhen, soll neben der Erörterung technischer Ein- und Auswirkungen vor allem die Einbindung der gewonnenen Ergebnisse in bereits bekannte Zusammenhänge und daraus resultierend die Möglichkeit weiterführender Experimente aufgezeigt werden.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war, dass die Aktivierung von Notch1 in embryonalen Stammzellen, die unter Bedingungen gehalten wurden, welche die mesodermale Differenzierung förderten, in der Repression Flk-1<sup>+</sup> mesodermaler Vorläuferzellen resultierte. Dabei war weder von Bedeutung, ob diese Aktivierung zu Beginn oder während der Differenzierung für mindestens 24 h erfolgte, noch ob die Aktivierung temporär war. Eine vierstündige Aktivierung zu Beginn der Differenzierung reichte aus, die Bildung

Flk-1<sup>+</sup> Zellen zu unterdrücken. Betrachtet man dieses Ergebnis isoliert, dann stellt sich die Frage, welchen Einfluss Notch1 auf die Differenzierung nimmt: einerseits käme eine 1. entweder grundsätzliche oder 2. lediglich temporäre Inhibition der mesodermalen Differenzierung in Frage, andererseits 3. die Möglichkeit, dass Notch1 nur die Expression von Flk-1 hemmt und keinen Einfluss auf die mesodermale Differenzierung an sich nimmt.

Die Annahme, dass die Aktivierung von Notch1 lediglich die Expression des Moleküls Flk-1 inhibiert, wurde widerlegt. Zum einen wiesen die in Kokultur mit OP9-Stromazellen gehaltenen EB5 Nert morphologisch deutliche Unterschiede in An- bzw. Abwesenheit von OHT auf (s. Abb. 4.2). EB5 Nert zeigten darüber hinaus nach Aktivierung von Notch1 auf Kollagen IV unter Bedingungen, welche die mesodermale Differenzierung förderten, morphologische Merkmale radialer Gliazellen (unveröffentlichtes Ergebnis Prof. Dr. U. Just). Dies deutet auf eine Induktion der Differenzierung in Zellen des ektodermalen Keimblatts hin. Diese Beobachtung wurde durch andere Studien bekräftigt, welche die begünstigte Induktion der ektodermalen Differenzierung von Stammzellen durch Notch1 zeigen (Lowell *et al.*, 2006; Nemir *et al.*, 2006).

Bei einer temporären Inhibition der mesodermalen Differenzierung würde die Aktivierung von Notch1 die Kinetik der Bildung mesodermaler Vorläuferzellen verändern, aber nicht generell blockieren. Dieser Aspekt wurde bisher nicht untersucht. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass bei einer Inkubationsdauer von vier bis fünf Tagen eine vierstündige Aktivierung von Notch1 zu Beginn der Differenzierung oder die Aktivierung von Notch1 während der gesamten letzten 24 h der Inkubation ausreicht, um die Bildung mesodermaler Vorläuferzellen zu diesem Zeitpunkt zu unterdrücken. Eine längere Differenzierung der Zellen unter gleich bleibenden Bedingungen könnte klären, ob Flk-1<sup>+</sup> mesodermale Vorläuferzellen auch nach Aktivierung von Notch1, nur später, gebildet würden.

Läge eine generelle Blockierung der mesodermalen Differenzierung vor, sprechen Punkte für die Differenzierung der embryonalen Stammzellen in die ektodermale Reihe. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Morphologie der Zellen (EB5 Nert) in Anwesenheit von OHT nicht die typischen Merkmale undifferenzierter Zellen aufwies (Daten nicht gezeigt), sich aber dennoch von Zellen unterschied, die in Abwesenheit von OHT differenziert worden waren (s. Abb. 4.2). Dies spricht zunächst nur für eine Induktion der Differenzierung außerhalb des mesodermalen Keimblatts. Die bereits erläuterte Begünstigung der ektodermalen Differenzierung nach Aktivierung von Notch1 in embryonalen Stammzellen konnte unter Kulturbedingungen, welche die ektodermale

Differenzierung förderten, gezeigt werden (Lowell *et al.*, 2006; Nemir *et al.*, 2006). In Kombination mit der Beobachtung, dass die auf Kollagen IV gehaltenen EB5 Nert, in denen Notch1 aktiviert wurde und die unter Bedingungen gehalten wurden, welche die mesodermale Differenzierung förderten, morphologische Merkmale radialer Gliazellen aufwiesen (unveröffentlichtes Ergebnis Prof. Dr. U. Just), sprechen diese Ergebnisse für die Induktion der ektodermalen Differenzierung nach Aktivierung von Notch1 in embryonalen Stammzellen.

Bei der Untersuchung der Differenzierung embryonaler Stammzellen in Zellen eines bestimmten Keimblatts muss bedacht werden, dass die *in vitro* benötigten Kulturbedingungen die Differenzierung der Zellen bereits beeinflussen. Dabei begünstigt oder inhibiert jede Kulturbedingung die Differenzierung der *in vitro* gehaltenen Zellen. So inhibiert beispielsweise FCS die ektodermale Differenzierung. Dieser Effekt kann durch den Zusatz von Retinolsäure aufgehoben werden, was jedoch wiederum mesodermale Differenzierung unterdrücken würde (Bain *et al.*, 1996). Notch1 scheint diesen inhibierenden Effekt durch FCS nicht überwinden zu können (Lowell *et al.*, 2006). Für die mesodermale Differenzierung der Zellen ist, nach dem in dieser Arbeit verwendeten Protokoll, die Zugabe von FCS vonnöten. Die Vermutung, dass die Aktivierung von Notch1 die Differenzierung embryonaler Stammzellen in ektodermale Zellen induziert, kann deshalb nur durch die Kombination verschiedener Versuche unter Bedingungen, welche die Differenzierung in jeweils eines der drei Keimblätter begünstigen, bestätigt werden.

Auswirkungen auf die Differenzierung, die allein auf die Wirkung von Notch1 zurückzuführen sind, müssen *in vitro* in verschiedenen Kulturbedingungen charakterisiert werden. Zusätzlich zum verwendeten System der mesodermalen Differenzierung durch Kokultur mit OP9-Stromazellen sind deshalb Experimente unter Bedingungen, welche die ektodermale bzw. endodermale Differenzierung fördern, unentbehrlich. Auch Analysen der Wirkung von Notch1 auf die Bildung und Zusammensetzung von *Embryoid Bodies*, welche Zellen aller drei Keimblätter beinhalten, könnten weitere Hinweise zur Beantwortung der Frage geben, ob und welche Zelllinienentscheidung Notch1 in embryonalen Stammzellen begünstigt.

Die durchgeführten Differenzierungsexperimente zeigten, dass Notch1 Zelllinienentscheidungen in embryonalen Stammzellen (diese Arbeit) sowie in mesodermalen Vorläuferzellen (Schroeder *et al.*, 2006) beeinflusst. Erste Hinweise auf die

Beantwortung der Frage, wie Notch1 diese Zelllinienentscheidungen vermittelt, sollten *Microarray*-Versuche geben. Dies ist mit der bereits erläuterten Schwierigkeit verbunden, Einflüsse bestimmter Parameter auf primäre Zelllinienentscheidungen zwischen den drei Keimblättern von der Notch1-Aktivierung zu trennen.

Um den äußeren Einfluss durch Medienbedingungen von Notch1-bedingten Effekten separieren zu können, wurden *Microarray*-Experimente mit RNA aus Zellen, die in drei unterschiedlichen Kulturbedingungen gehalten worden waren, durchgeführt. In der anschließenden Expressionsanalyse verschiedener potentieller Zielgene in der *Real-Time RT-PCR* wurde der Bereich der untersuchten Kulturbedingungen auf undifferenzierte Zellen, in denen in Gegenwart von LIF Notch1 aktiviert worden war, erweitert. Dadurch sollte die Charakterisierung eines einzelnen Parameters, dem Einfluss von Notch1, innerhalb eines komplexen Geflechts voneinander abhängiger und einander bedingender Reaktionen ermöglicht werden.

Einen großen Teil der in der *Real-Time RT-PCR* näher untersuchten potentiellen Zielgene von Notch1 stellen Transkriptionsfaktoren dar, von denen einige der Gruppe der basischen HLHs angehören.

Eine Gruppe von Genen, die bereits bekannte Zielgene von Notch sind, sind Mitglieder der *Hes/Hey*-Familie. Sie gehören zu den basischen Helix-Loop-Helix-Proteinen (Übersicht bei Davis und Turner, 2001) und wirken hauptsächlich als Repressoren; darüber hinaus ist bereits eine Interaktion zwischen Notch und anderen Signaltransduktionswegen bekannt, die in einer Aktivierung der Genexpression verschiedener *Hes*- und *Hey*-Gene münden (Takizawa *et al.*, 2003). Nicht alle Gene dieser Familie werden dabei in ihrer Expression von Notch reguliert. Die Regulation durch Notch konnte zwar für alle *Hey*-Gene (*Hey1*, *Hey2* und *HeyL*), bei den *Hes*-Genen aber nur für *Hes1*, *Hes5* und *Hes7* gezeigt werden. Während die Expression von *Hes2*, *Hes3* und *Hes6* in Säugetieren durch Notch nicht beeinflusst wird, fehlen entsprechende Daten für *Hes4* bisher (Übersicht bei Fischer und Gessler, 2007). Ein Homolog des Gens *Hes4* ist in der Maus bislang nicht bekannt (Datenbanksuche NCBI). Sowohl in den *Microarrays* als auch in der Analyse der differentiellen Expression konnte durch Notch1 eine Aktivierung der Genexpression der bereits bekannten Zielgene *Hes1*, *Hes5*, *Hes7*, *Hey1*, *Hey2* und *HeyL* nachgewiesen werden. Dabei wurden diese Gene unterschiedlich, abhängig von den Kulturbedingungen, durch Notch1 induziert. *Hes1*, als Zielgen von Notch bekannt (Übersicht bei Fischer und Gessler, 2007), wurde in mesodermalen Vorläuferzellen nicht durch Notch1 reguliert.

*Hes7* fungierte unter Kulturbedingungen, die die mesodermale Differenzierung begünstigten, nicht als Zielgen von Notch1. Sowohl *Hes5* als auch *HeyL* wurden zwar in allen untersuchten Kulturbedingungen stärker als zweifach induziert; die relative Expression dieser Gene war allerdings in undifferenzierten Zellen äußerst gering, so dass bereits geringe Unterschiede in der Expression zwischen Zellen mit und ohne Aktivierung von Notch1 eine dem Betrag nach hohe Induktion verursachten.

Bei der Expression der *Hes*- und *Hey*-Gene vor allem während der Embryonalentwicklung sind zwei Aspekte hervorzuheben: das oszillierende Expressionsmuster und die Regulation der Genexpression durch negative Rückkopplung. Die Expression von *Hes7* oszilliert ausschließlich im Stadium des präsomitischen Mesoderm (PSM) (Übersicht bei Kageyama *et al.*, 2007). *Hes1* zeigt sowohl im PSM als auch in anderen Zellen, wie z. B. Neuroblasten, Myoblasten und Fibroblasten, oszillierende Genexpression (Hirata *et al.*, 2002; Übersicht bei Kageyama *et al.*, 2007). Die Regulation der Genexpression durch negative Rückkopplung beeinflusst die Expression von *Hes1*, *Hes7*, *Lfng* und *Notch* (Übersicht bei Bolos *et al.*, 2007). Die oszillierende Expression von *Hes1* wird bedingt durch diese negative Autoregulation, wobei jede Phase etwa zwei Stunden andauert (Übersicht bei Bolos *et al.*, 2007).

Eine Auswertung der vorhandenen Daten im Hinblick auf oszillierende Genexpression war mit dem vorliegenden Zellkulturmodell nicht möglich, da u. a. die Entwicklung der Zellen zum Zeitpunkt der Aktivierung von Notch1 nicht synchronisiert war. Die ausgebliebene Induktion von *Hes1* auf die Aktivierung von Notch1 in mesodermalen Vorläuferzellen kann deshalb nicht als Aspekt oszillierender Genexpression interpretiert werden. In einer Mischpopulation von Zellen, in denen *Hes1* oszillierend exprimiert würde, wäre die in einem Teil der Zellen erfolgende Induktion der Expression von *Hes1* nach Aktivierung von Notch1 zumindest in geringer Stärke messbar. Der direkte Vergleich der auf Kollagen IV differenzierten mesodermalen Vorläuferzellen mit Zellen des präsomitischen Mesoderm ist darüber hinaus nur auf Einzelzellebene möglich. Die oszillierende Expression von *Hes1* wurde bereits mit Hilfe von Luciferase, deren Expression unter der Kontrolle des Promotors von *Hes1* stand, sowohl in Zellen des PSM als auch in Fibroblasten auf Einzelzellebene untersucht (Masamizu *et al.*, 2006). Das in dieser Arbeit verwendete Zellkulturmodell ermöglicht sowohl die Differenzierung von Zellen des Seitenplattenmesoderm als auch des paraxialen Mesoderm, aus welchem sich die Somiten abteilen. Vorläuferzellen dieser beiden Populationen können *in vitro* bis zu einem gewissen Zeitpunkt ihren Phänotyp wechseln und dadurch zu Zellen der jeweils

anderen Population differenzieren (Sakurai *et al.*, 2006). Das in dieser Arbeit für die mesodermale Differenzierung verwendete FCS war dahingehend ausgewählt worden, eine größtmögliche Anreicherung von Zellen des Seitenplattenmesoderm zu ermöglichen.

Zusammenfassend sind die vorliegenden Daten der *Real-Time RT-PCR* dahingehend zu interpretieren, dass im vorliegenden Modell *Hes1* in mesodermalen Vorläuferzellen kein Zielgen von Notch1 darstellt. Eine *in vivo* und *in vitro* Untersuchung der Regulation von *Hes1* durch Notch1 in den verschiedenen Subtypen mesodermaler Vorläuferzellen, auch im Hinblick auf oszillierende Expression, würde das Bild der Auswirkungen von Notch1 auf das Expressionsmuster dieses Zielgens in verschiedenen Zelltypen verfeinern.

Für *Hes1* und *Hes7* ist die Regulation durch eine negative Rückkopplungsschleife bekannt, welche zusätzlich die Expression von *Lfng* und *Notch* beeinflusst (Übersicht bei Bolos *et al.*, 2007). Die beiden letztgenannten erschienen in den *Microarrays* (*Notch1*, s. Tabelle Appendix A) respektive in der *Real-Time RT-PCR* (*Lfng*, s. Abb. 4.12) in allen untersuchten Kulturbedingungen als positiv reguliert. Durch die zusätzliche Analyse der Genexpression in Gegenwart von Cycloheximid konnte die negative Rückkopplung von *Hes1* in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden: die relative Expression von *Hes1* stieg nach Blockade der Proteinbiosynthese in allen untersuchten Bedingungen an. Die Induktion der Expression von *Hes1* nach Aktivierung von Notch1 war in Gegenwart von Cycloheximid ebenfalls erhöht. Ein deutlicher Unterschied in der Stärke der relativen Expression von *Hes1* in An- bzw. Abwesenheit von OHT zeigte sich nach Zugabe von Cycloheximid auch in mesodermalen Vorläuferzellen. Es bedarf weiterer Experimente, ob diese Induktion nach Aktivierung von Notch1 in einem Zelltyp, in dem *Hes1* kein Zielgen von Notch1 darstellt, allein auf die inhibierte Autoregulation oder auf das Fehlen zusätzlicher Repressoren zurückzuführen ist.

Die relativen Expressionen von *Hes5*, *Hes7* und *Hey1* stiegen in Anwesenheit von Cycloheximid und Abwesenheit von OHT in mesodermalen Vorläuferzellen um das drei- bis fünffache an. Die zusätzliche Inkubation mit OHT dagegen bewirkte in allen untersuchten Bedingungen bei *Hes5* und *Hey1* eine Steigerung der Induktion um das zwei bis 3,7-fache. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei *Hes7* in „Mesoderm begünstigend“ und *HeyL* in „Mesoderm“. Ob diese Effekte ebenfalls auf Autoregulation oder auf der Wirkungsweise bisher unbekannter externer Repressoren beruhen, bedarf der weiteren Untersuchung.

Alle Gene der *Hes*- und *Hey*-Familien, die in der vorliegenden Arbeit durch Notch1 reguliert worden waren, waren bereits als Zielgene von Notch bekannt. Die Vielfältigkeit



der unterschiedlichen Aspekte, die durch Vermittlung dieser Gene beeinflusst werden, betrifft Vorgänge in Zellen aller drei Keimblätter. Bis auf die erläuterten Ausnahmen wurden die *Hes*- und *Hey*-Gene in der vorliegenden Arbeit in allen untersuchten Kulturbedingungen durch Notch1 reguliert. Die bisherigen Erkenntnisse über *Hes1* belegen u. a. Funktionen sowohl im Bereich der Entwicklung der Epidermis (Blanpain *et al.*, 2006) als auch in Melanoblasten und Melanocyten (Moriyama *et al.*, 2006) sowie in der Angiogenese (Takeshita *et al.*, 2007). *Hes5*<sup>-/-</sup> Mäuse weisen Defekte an Auge und Innenohr auf (Übersicht bei Fischer und Gessler, 2007); die Doppelmutante *Hes1*<sup>-/-</sup>*Hes5*<sup>-/-</sup> führt zur Beschleunigung neuronaler Differenzierung und der Depletion radialer Gliazellen (Hatakeyama *et al.*, 2004). *Hes7* spielt eine wichtige Rolle während der Somitogenese (Bessho *et al.*, 2001a; Bessho *et al.*, 2001b). In Zusammenspiel mit dem BMP-Signalweg hat *Hey1* Einfluss auf die Muskelentwicklung (Dahlqvist *et al.*, 2003); die Differenzierung des Herzgewebes wird entscheidend von *Hey2* beeinflusst (Fischer *et al.*, 2005; Gessler *et al.*, 2002). Die kombinierte Deletion von *Hey1* und *HeyL* *in vivo* führt in der Maus ebenfalls zu angeborenen Herzfehlern (Fischer *et al.*, 2007), wohingegen die kombinierte Deletion von *Hey1* und *Hey2* Defekte in der Angiogenese und der Differenzierung der Arterien verursacht (Übersicht bei Fischer und Gessler, 2007). Welche Auswirkungen die verstärkte Expression der *Hes*- und *Hey*-Gene hingegen auf die Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen *in vitro* hat, ist nicht bekannt. Zu untersuchen wäre, ob die durch Aktivierung von Notch1 verursachte Repression Flk-1<sup>+</sup> mesodermaler Vorläuferzellen durch ein oder mehrere Mitglieder der Gruppe der *Hes*- und *Hey*-Gene vermittelt wird. Sollte sich bei der genaueren Charakterisierung der Repression Flk-1<sup>+</sup> Zellen nach Aktivierung von Notch1 erweisen, dass diese Effekte reversibel sind, wäre darüber hinaus zu untersuchen, durch welche molekularen Mechanismen diese Reversibilität vermittelt würde. Weitere Experimente könnten die Frage untersuchen, welche Auswirkungen die durch Notch1 verursachte Induktion verschiedener *Hes*- und *Hey*-Gene auf die weitere Differenzierung mesodermaler Vorläuferzellen hätte. Zusätzlich wäre dabei von besonderer Bedeutung zu analysieren, durch welchen Mechanismus *Hes1* in diesem Zelltyp nicht als Zielgen von Notch1 fungiert. Die Untersuchung dieses Aspekts könnte weiteren Aufschluss über die Kontextabhängigkeit der durch Notch1 vermittelten Signale geben. Diese Experimente könnten im Hinblick auf sowohl bereits gewonnene Erkenntnisse über die Gene der *Hes*- und *Hey*-Familien als auch auf die Ergebnisse dieser Arbeit von besonderer Bedeutung sein, die molekularen Mechanismen der von Notch1 vermittelten Zelllinienentscheidungen zu analysieren.

Neben der unterschiedlichen Regulation der *Hes*- und *Hey*-Gene an sich stellt die Interaktion der *Hes*- und *Hey*-Gene mit anderen Transkriptionsfaktoren, u. a. ebenfalls aus der Gruppe der basischen HLHs, einen wichtigen Faktor dar. Die Bildung von Heterodimeren (Übersicht bei Massari und Murre, 2000) würde eine weitere Modulation der von Notch1 induzierten Effekte auf die Zellen ermöglichen. Durch die Identifizierung dieser Interaktionspartner könnte der molekulare Mechanismus der Signaltransduktion von Notch1 ausgehend weiter entschlüsselt werden. Eine Gruppe potentieller Interaktionspartner stellen die vier *Ids* dar, die alle in verschiedenen Kombinationen der vier untersuchten Kulturbedingungen nach Aktivierung von Notch1 positiv oder negativ reguliert wurden.

Die Gruppe der vier *Id*-Gene gehört wie die der *Hes* und *Heys* zu den basischen HLHs. Durch das Fehlen der DNA-Bindungsdomäne und der Bildung von Heterodimeren mit anderen Vertretern dieser Gruppe verhindern die *Id*-Proteine die primäre Wirkung ihrer Interaktionspartner und können so sowohl inhibitorischen als auch aktivierenden Einfluss auf Proliferation und Differenzierung von Zellen ausüben (Übersicht bei Yokota, 2001). Dieser Einfluss bezieht sich auf Zellen aller drei Keimblätter, wobei die vier Vertreter dieser Familie ein gewebsspezifisches Expressionsmuster besitzen und in ihrer Funktion teilweise redundant sind (Übersicht bei Benezra *et al.*, 2001). Die *Id*-Proteine binden dabei nicht nur Vertreter der bHLHs, sondern können auch mit anderen Transkriptionsfaktoren wie Pax5 interagieren (Roberts *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur kontextabhängigen Induktion der vier Gene durch Notch1 zeigen, dass in jeder Kulturbedingung eine bestimmte Kombination der verschiedenen *Ids* vorlag, deren Expression durch Notch1 induziert bzw. reprimiert wurde. Dabei wurde für die Auswertung ein Schwellenwert festgelegt, wonach die Expression eines Zielgens von Notch1 durch Zugabe von OHT mindestens zweifach positiv bzw. negativ reguliert werden musste. Dieser Wert stellt einen Erfahrungswert dar, der zur Auswertung der *Microarrays* genutzt wurde. Aufgrund der unterschiedlichen Stichprobenanzahl bei den vorliegenden *Real-Time RT-PCR*-Experimenten ist die Ermittlung der statistischen Signifikanz einer Induktion und deren Vergleich untereinander von eingeschränkter Aussagekraft. Aus diesem Grund wurde für die erste Auswertung der *Real-Time RT-PCR*-Experimente der bei den *Microarrays* genutzte Schwellenwert einer zweifachen Regulation als Anhaltspunkt beibehalten. Nichtsdestotrotz kann ein biologischer Effekt durch Notch1, der die Induktion eines Zielgens mit einem Betrag  $< 2$

zur Grundlage hat, nicht ausgeschlossen werden. Zur weiteren Untersuchung der biologischen Funktion potentieller Zielgene ist dies auf jeden Fall zu berücksichtigen.

Allein die Expression von *Id4* wurde ohne Ausnahme nach Aktivierung von Notch1 in An- und Abwesenheit von Cycloheximid stärker als zweifach heraufreguliert und *Id4* somit als Zielgen von Notch1 in allen untersuchten Bedingungen identifiziert. Im Gegensatz dazu nimmt *Id2* eine Sonderstellung ein und stellt das einzige Gen dieser Gruppe dar, das durch Notch1 in seiner Expression reprimiert wurde. Die Regulation verfehlte dabei knapp den angesetzten Schwellenwert der zweifachen Änderung. Die Repression eines Gens lässt auf eine Funktion als indirektes Zielgen schließen, da das Modell des kanonischen Notch-Signalwegs, welcher die Interaktion mit RBP-J $\kappa$  einschliesst, in der verstärkten Expression von Genen mündet. Die Varianz bei indirekten Effekten ist größer als bei direkten, was zu größeren Schwankungen bei den Beträgen der Repression führt. Der Schwellenwert der zweifachen Regulation wurde ebenfalls bei *Id1* in undifferenzierten und mesodermalen Vorläuferzellen in Gegenwart von Cycloheximid leicht unterschritten, was sich durch den Anstieg der relativen Expression nach Blockade der Proteinsynthese erklären lässt. Auch *Id1* konnte wie *Id4* als Zielgen von Notch1 in allen untersuchten Bedingungen identifiziert werden. *Id3* wurde nur in den Bedingungen „Mesoderm begünstigend“ und „Mesoderm“ durch Notch induziert. Ob die starke Repression dieser Induktion in Anwesenheit von Cycloheximid auf die Funktion als indirektes Zielgen schließen lässt oder sich wie im Fall von *Id1* durch Steigerung der relativen Expression erklären lässt, ist noch zu klären. Beispielsweise könnte untersucht werden, ob die Expression von *Id1* durch ein direktes Zielgen von Notch1 wie z. B. *Hes1* induziert wird. Auch die Untersuchung der regulatorischen Regionen von *Id1* auf das Vorhanden sein von RBP-J $\kappa$ -Bindestellen könnte diese Frage beantworten.

Ebenso wie die Vertreter der *Hes*- und *Hey*-Gene sind die *Id*-Gene an vielen verschiedenen Differenzierungsprozessen beteiligt. Durch das Fehlen einer DNA-Bindungsdomäne bewirkt die Bildung von Heterodimeren zwischen *Id*-Proteinen und anderen Vertretern der bHLHs die Inaktivierung der Letztgenannten (Übersicht bei Yokota, 2001). Die Untersuchung ihrer Funktion als Zielgen von Notch1 und damit ihre Interaktion mit Notch1 während der Modulation zellkontextabhängiger Signaltransduktion kann deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit als wichtig für die Analyse der molekularen Mechanismen der durch Notch1 vermittelten Zelllinienentscheidungen erachtet werden. Die durch die *Id*-Proteine vermittelten Effekte beziehen sich sowohl auf Vorgänge während der Embryonalentwicklung als auch in adulten Zellen in allen drei Keimblättern.

Während *Id1-Id3* eine Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus spielen (Zebedee und Hara, 2001), konnte für *Id2* speziell gezeigt werden, dass es mitverantwortlich für die Induktion axonalen Wachstums in ruhenden Neuronen ist (Lasorella *et al.*, 2006). Ebenfalls nehmen *Id1-Id3* durch Bindung an verschiedene gewebspezifische bHLHs wie *Hes1* in Neuroblastomzelllinien Einfluss auf neuronale Differenzierungen, wahrscheinlich durch Regulation der negativen Rückkopplung von *Hes1* (Jogi *et al.*, 2002). *Id4* reguliert die Differenzierung und Proliferation neuronaler Stammzellen und ist mitverantwortlich für die Größenentwicklung des Gehirns (Yun *et al.*, 2004). Darüber hinaus inhibiert *Id4* die Differenzierung von Oligodendrozyten und wirkt regulierend auf den Prozess der Myelinierung (Marin-Husstege *et al.*, 2006).

Der Einfluss der *Ids* erstreckt sich jedoch nicht nur auf Zellen ektodermalen Ursprungs, sondern ebenfalls auf die mesodermale Differenzierung. So ist *Id2* sowohl an der weiteren Differenzierung dendritischer Zellen (Hacker *et al.*, 2003) als auch an der Differenzierung von Langerhans Zellen aus hämatopoetischen Vorläufern (Heinz *et al.*, 2006) entscheidend beteiligt. Eine Rolle spielen die verschiedenen *Ids* auch bei zahlreichen Differenzierungsschritten während der Entwicklung von Lymphozyten (Übersicht bei Rivera und Murre, 2001) und während der Angiogenese (Übersicht bei Benezra *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte Deregulation der Expression der *Ids* in verschiedenen Tumoren festgestellt werden (Übersicht bei Lasorella *et al.*, 2001).

Um die biologische Relevanz der ermittelten differentiellen und zellkontextabhängigen Expression der verschiedenen Zielgene nach Aktivierung von Notch1 zu überprüfen, wurde damit begonnen, ein Versuchssystem zur Untersuchung der Bedeutung bestimmter Zielgene für Notch1-vermittelte Zelllinienentscheidungen während der mesodermalen Differenzierung zu etablieren. Durch die Kombination der Repression einzelner Zielgene von Notch1 mittels siRNA in embryonalen Stammzellen bzw. der mesodermalen Differenzierung dieser Zellen auf OP9-Stromazellen während gleichzeitiger Aktivierung von Notch1 sollte der Einfluss des jeweiligen Gens auf die durch Notch1 vermittelte Zelllinienentscheidung untersucht werden. Idealerweise würden sich die durch Notch1 induzierten Effekte und die Repression durch die siRNA aufheben und weiterhin ein physiologisches Expressionsniveau des jeweiligen Gens in den Zellen vorliegen. Zur Etablierung des Systems wurden embryonale Stammzellen mit gegen *GAPDH* gerichteter siRNA transfiziert. Diese Transfektion resultierte in der Repression von *GAPDH* von 48-65% nach 3 h bzw. 83-87% nach 24 h. Für die Repression der individuellen Zielgene wurde der Zeitpunkt von 3 h gewählt, um die Zellen während gleichzeitiger Aktivierung

von Notch1 auf den Stromazellen auszusäen, nachdem die Repression durch die siRNA eingesetzt hatte.

Der Beginn der Etablierung eines derartigen Versuchssystems, das zur Untersuchung der ausgewählten, durch Notch1 regulierten Zielgene dienen soll, erfolgte am Beispiel der vier *Id*-Gene. Erste Ergebnisse mit siRNA gegen verschiedene *Ids* zeigen, dass die Expression jedes untersuchten Gens erfolgreich reprimiert werden konnte. Bei Genen wie z. B. *Id3*, deren relative Expression deutlich über der der anderen Gene lag, könnten wahrscheinlich mit höheren Konzentrationen der siRNA auch stärkere Repressionen erzielt werden. Auch die kombinierte Repression von *Id1* und *Id3* ließe sich vermutlich mittels höherer Konzentrationen von siRNA oder auch längerer Inkubationszeiten realisieren, um unspezifische Effekte zu minimieren. Ein wesentlicher Schritt bei der Etablierung des Systems ist die Anpassung des Protokolls der transienten Transfektion an die jeweiligen siRNAs, um mit jeder siRNA vergleichbare spezifische Repressionen ohne Auswirkungen auf andere Gene zu erzielen. Des Weiteren ist eine Analyse des Verlaufs der Repression durch siRNA nötig, um zu entscheiden, ob die Induktion durch Notch1 inhibiert werden kann, ohne das Expressionsniveau zu stark zu senken. Dies beträfe nicht nur den Beginn des Verlaufs, sondern auch und vor allem die absolute Dauer der Repression. Nachdem in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass eine 24stündige Aktivierung von Notch1 ausreicht, um die Bildung mesodermaler Vorläuferzellen zu unterdrücken, ist dieser Punkt von besonderer Bedeutung für die Aussagekraft zukünftiger Versuche. Gleichmaßen ist es notwendig, den Verlauf der Induktion des jeweiligen Gens nach Aktivierung von Notch1 zu analysieren.

Bei der Etablierung eines derartigen Versuchssystems muss außerdem bedacht werden, dass beide angewandten Techniken, die Zugabe von OHT zum Medium und die Repression von Genen durch siRNA, unabhängig von der Aktivierung von Notch1, die Zellphysiologie verändern können. Gegebenenfalls könnte dies Auswirkungen auf die Differenzierung der Zellen haben. Durch geeignete Kontrollen muss daher versucht werden, diese unspezifischen Auswirkungen so gering wie möglich zu halten bzw. genau abgrenzen zu können. Eine mögliche geeignete Kontrolle wäre die parallele Differenzierung von EB5 Nert oder EB5 Kontrolle, die in An- bzw. Abwesenheit von OHT mit unspezifischer siRNA transfiziert wurden.

Darüber hinaus muss bedacht werden, dass eine Repression der *Id*-RNA, wie sie bereits in den ersten drei Stunden der Transfektion auftritt, bereits Auswirkungen auf Interaktionspartner wie andere bHLHs und damit möglicherweise auf die Differenzierung

haben könnte. Eine kontrollierende Analyse der Expressionsniveaus verschiedener anderer Gene wie z.B. *Hes1* könnte darüber Aufschluss geben. Besonders wichtig in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass mit Hilfe eines derartigen Versuchssystems die Auswirkungen eines einzelnen Parameters auf die mesodermale Differenzierung untersucht werden könnten, ohne die Expression anderer Zielgene von Notch1 zu beeinträchtigen.

Die Kontextabhängigkeit der durch Notch1 vermittelten Signale ist ein wichtiger Punkt bei der Analyse der molekularen Mechanismen, mittels derer die Differenzierung der Zellen gesteuert wird. Von entscheidender Bedeutung ist dabei auch die Verknüpfung des Notch-Signalweges mit anderen Signaltransduktionswegen. Bereits bekannte Interaktionen mit den wichtigen Signalwegen Hedgehog, Jak/STAT, RTK, TGF- $\beta$  und Wnt geben einen weiteren Hinweis auf die Fähigkeit, eine Vielzahl an Auswirkungen durch eine begrenzte Anzahl von Auslösern zu koordinieren und zu modulieren (Übersicht bei Hurlbut *et al.*, 2007). Zu den in den *Microarrays* identifizierten Zielgenen von Notch1 zählen sowohl Gene, die andere Signaltransduktionswege aktivieren als auch solche, die als Zielgen anderer Signaltransduktionswege bekannt sind.

In Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg wurde mittels *Real-Time RT-PCR* die in den *Microarrays* identifizierte differentielle Expression zweier Gene nach Aktivierung von Notch1 untersucht. *Wisp1*, das in mesodermalen Vorläuferzellen durch Notch1 reguliert wurde (s. Abb. 4.12), ist ein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs, welcher wie der Notch-Signalweg eine Rolle bei einer Vielzahl verschiedener Zelllinienentscheidungen spielt (Übersicht bei Katoh, 2007b). Die Deletion verschiedener Wnt-Proteine ist beispielsweise verantwortlich für Defekte in Kleinhirn und Nieren (Übersichten bei Logan und Nusse, 2004; Wodarz und Nusse, 1998). Die deregulierte Expression von *Wisp1* als Zielgen von Wnt1 spielt bei der Tumorgenese von Dickdarmkrebs eine Rolle (Pennica *et al.*, 1998). Ebenfalls in mesodermalen Vorläuferzellen erfolgte die Induktion von *Wnt4* nach Aktivierung von Notch1 (s. Abb. 4.12). Dieses Gen fungiert als Auslöser des Wnt-Signalwegs (Übersicht bei Katoh, 2007b). Die Abwesenheit von *Wnt4* hat Auswirkungen auf die Entwicklung von Niere (Park *et al.*, 2007) und Brustdrüse (Briskin *et al.*, 2000). Eine weitere Untersuchung der gegenseitigen Beeinflussung der Signalwege von Wnt und Notch1 wäre von besonderer Bedeutung zum besseren Verständnis der Zelllinienentscheidungen in mesodermalen Vorläuferzellen. Der Wnt-Signalweg, der eine von vier Hauptgruppen der parakrinen Signalübermittlung darstellt, ist in Interaktion mit dem Notch-Signalweg auch an der Selbsterneuerung hämatopoetischer Stammzellen

beteiligt (Duncan *et al.*, 2005; Übersicht bei Hurlbut *et al.*, 2007). Diese bekannte Interaktion in mesodermalen Zellen verdeutlicht die Wichtigkeit zukünftiger Arbeiten zur Untersuchung weiterer Interaktionen zwischen den beiden Signaltransduktionswegen. Erste Grundlagen für weitere Untersuchungen in dieser Richtung konnten in der vorliegenden Arbeit geschaffen werden.

Mitglieder der Gruppe der *Fibroblast Growth Factors* oder *Fgf* können die Signalkaskaden sowohl des RTK- als auch des JAK-STAT-Signalweges aktivieren. Die Signaltransduktion mittels des Rezeptors *Fgfr1* ist zusammen mit durch Wnt und Notch vermittelten Signalen an der Somitogenese in der Maus beteiligt (Wahl *et al.*, 2007). *Fgf2* spielt in Vorläuferzellen des Endhirns zusammen mit Notch1 eine wichtige Rolle und unterstützt die Bildung radialer Gliazellen (Yoon *et al.*, 2004). Über die Interaktion von Notch1 und *Fgf5*, das in der vorliegenden Arbeit nach Aktivierung von Notch1 in mesodermalen Vorläuferzellen reprimiert wurde (s. Abb. 4.12), ist bisher nichts bekannt. *Fgf5* induziert die Angiogenese im Herz (Übersicht bei Vatner, 2005) und stimuliert Myozyten im *hibernating myocardium*, wieder in den Zellzyklus einzutreten (Suzuki *et al.*, 2005). Die Ergebnisse der Expressionsexperimente dieser Arbeit zeigen eine Funktion von *Fgf5* als indirektem Zielgen von Notch1 in mesodermalen Vorläuferzellen. Inwieweit die Repression von *Fgf5* dabei als direkte Folge der Induktion eines der in dieser Arbeit identifizierten direkten Zielgene von Notch1 zu sehen ist und welche Auswirkungen diese wiederum kontextabhängige Interaktion auf Zelllinienentscheidungen hat, wäre von Interesse. Welche Rolle die Repression von *Fgf5* in Verbindung mit Notch1 auf die Differenzierung nimmt und ob eine der Interaktionen zwischen Notch1 und den genannten Signaltransduktionswegen durch diese Verknüpfung entsteht, wäre eine wichtige zu untersuchende Fragestellung.

Ein großer Teil der in den *Microarrays* identifizierten Zielgene gehört der Gruppe der basischen HLHs an. Die im Hinblick auf die differentielle Expression der dieser Gruppe angehörenden *Hes*- und *Hey*-Gene gewonnenen Ergebnisse wurden bereits erläutert; darüber hinaus wäre auch die Analyse einer durch diese Gene vermittelten Interaktion zwischen den Signaltransduktionswegen, z.B. über *Fgf5*, eine Möglichkeit, die molekularen Mechanismen der Zelllinienentscheidungen weiter zu untersuchen. Dabei spielt die potentielle Bildung von Heterodimeren verschiedener bHLHs eine besondere Rolle. Auch auf eine weitere Gruppe potentieller Interaktoren, der *Ids*, wurde bereits gesondert eingegangen. Eine Regulation der Auswirkungen anderer Zielgene ist bei ihnen

besonders wahrscheinlich, da ihre Wirkung durch das Fehlen der DNA-Bindungsdomäne ausschließlich auf der Bildung von Heterodimeren beruht.

Ebenfalls zur Gruppe der basischen HLHs gehört *Myf5*. Zusammen mit *MyoD*, *Myogenin* und *Myf6* spielt dieser Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle bei der Bildung von Skelettmuskeln (Übersicht bei Arnold und Braun, 1996). Die Expression von *Myf5* ist durch *in situ* Hybridisierung während der murinen Embryogenese erst an Tag 8 in den Somiten detektierbar (Ott *et al.*, 1991), durch *RT-PCR* auch im präsomitischen Mesoderm an Tag 8,5 (Kopan *et al.*, 1994). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von *Myf5* ohne Aktivierung von Notch1 nicht nachgewiesen werden. Nach Aktivierung von Notch1 war das Expressionsniveau von *Myf5* in undifferenzierten Zellen sehr gering und lag, falls detektierbar, nur geringfügig oberhalb der Nachweisgrenze. Bereits geringe Steigerungen der Expression bewirkten dadurch auch in undifferenzierten Zellen dem Betrag nach hohe Induktionen. Da *Myf5* in embryonalen Stammzellen funktionell jedoch keine Rolle spielt, bezieht sich sowohl die Diskussion der erzielten Ergebnisse als auch die Planung zukünftiger Experimente auf die Funktion von *Myf5* als Zielgen von Notch1 in mesodermalen Vorläuferzellen. Die relative Expression von *Myf5* war in diesen Zellen um den Faktor 2-3 höher, jedoch ebenfalls nur nach Aktivierung von Notch1 nachweisbar. Um Aussagen über die Funktion von *Myf5* als Zielgen von Notch1 in mesodermalen Vorläuferzellen zu treffen, wäre ein erster Schritt die Modulierung des Versuchsaufbaus, um die Varianzen derart geringer Expressionen zu minimieren. Dies wäre z. B. durch den Einsatz spezieller Protokolle zur reversen Transkription geringer RNA-Mengen oder durch die Verwendung höherer Konzentrationen cDNA in der *Real-Time RT-PCR* möglich. Auch die Untersuchung der genauen Zusammensetzung der als „mesodermale Vorläuferzellen“ bezeichneten Kulturen wäre von besonderem Interesse. Skelettmuskeln entstehen aus Zellen des paraxialen Mesoderm. Die verwendete Differenzierungsmethode ermöglicht das Wachstum von Zellen des paraxialen Mesoderm sowie des Seitenplattenmesoderm. Darüber hinaus können Zellen beider Populationen bis zu einem bestimmten Punkt die Präsentation des Oberflächenmarkers Flk-1 und damit die Zugehörigkeit zu einer der beiden Populationen wechseln (Sakurai *et al.*, 2006). Das verwendete FCS war nach dem Gesichtspunkt ausgewählt worden, die Anreicherung von Zellen des Seitenplattenmesoderm zu optimieren. Diese Population wurde auch innerhalb der Mischpopulation quantifiziert. Untersuchungen über die Zusammensetzung der übrigen Zellen könnten Aufschluss darüber geben, ob das geringe Niveau der Expression von *Myf5*



in mesodermalen Vorläuferzellen darauf zurückzuführen ist, dass lediglich in einem Teil der Zellen die Expression von *Myf5* nach Aktivierung von Notch1 induziert wird.

Das Zusammenwirken von *MyoD* und *Myf5* ist für die Bildung der Skelettmuskeln von besonderer Bedeutung. Mäuse, die homozygot negativ für beide Gene sind, bilden keinerlei Skelettmuskeln aus und sterben kurz nach der Geburt. Da die Deletion jeweils eines der Gene zu lebensfähigen Mäusen führt, die jedoch unterschiedliche Phänotypen zeigen, wurde auf eine gewisse Redundanz der beiden Proteine geschlossen (Übersicht bei Arnold und Braun, 1996). Daraus konnte ein Modell entwickelt werden, nachdem unterschiedliche Signale die Expression entweder von *Myf5* oder *MyoD* in Somiten induzieren. Die daraus entstehenden Zellen hemmen sich gegenseitig in ihrer weiteren Differenzierung, so dass die differenzierten Muskelzellen alle einer Ursprungspopulation entstammen (Braun und Arnold, 1996). Die Aktivierung des RBP-J $\kappa$ -abhängigen Notch-Signalwegs in Myoblasten führt zu einer Inhibition der Muskeldifferenzierung durch Blockierung von *MyoD*, wobei die Expression von *Myf5* nicht beeinflusst wurde (Vasyutina *et al.*, 2007). RBP-J $\kappa$  als Koaktivator des kanonischen Notch-Signalwegs ist im sich entwickelnden Muskel dafür verantwortlich, proliferierende Vorläuferzellen undifferenziert zu halten und Satellitenzellen zu bilden (Vasyutina *et al.*, 2007). Mäuse, die kein *Myf5* exprimieren, zeigen Verzögerungen bei der Regenerierung von Skelettmuskeln und verminderte Proliferation der Satellitenzellen (Ustanina *et al.*, 2007). Weiterhin zu untersuchen wäre, inwieweit die in dieser Arbeit gezeigte Funktion von *Myf5* als direktem Zielgen von Notch1 in mesodermalen Vorläuferzellen in die bereits bekannten Vorgänge der Myogenese einzubinden ist. Besonders die Untersuchung einer eventuellen Verknüpfung der letztgenannten Aspekte in Bezug auf Bildung von Satellitenzellen und Regeneration verletzter Muskelfasern durch diese Zellen erscheint als viel versprechender Ansatz, die Funktion von Notch1 in embryonalen und adulten Muskeln zu charakterisieren. Darüber hinaus besteht auch beim Teilaspekt der Differenzierung von Skelettmuskeln die Möglichkeit der Interaktion verschiedener Signaltransduktionswege, da beispielsweise die Induktion der Muskeldifferenzierung durch *Wnt1*, *Wnt3*, *Sonic Hedgehog* und *BMP4* erfolgt (Dietrich *et al.*, 1998; Munsterberg *et al.*, 1995; Stern *et al.*, 1995).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression des Transkriptionsfaktors *Runx1* in mesodermalen Vorläuferzellen nach Aktivierung von Notch1 direkt induziert wurde. *Runx1* wurde zwar auch in undifferenzierten Zellen exprimiert, fungierte dort aber nach den oben genannten Kriterien nicht als Zielgen von Notch1. Diese Ergebnisse

stimmen mit den bisher ermittelten Funktionen von *Runx1* und Notch1 während der mesodermalen Differenzierung überein. *Runx1*<sup>-/-</sup> Mäuse sterben ungefähr an Tag 12,5 der Embryonalentwicklung (Okuda *et al.*, 1996). *Runx1* reprimiert Flk-1 während der mesodermalen Differenzierung und nimmt dadurch Einfluss auf die weitere Differenzierung von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen (Hirai *et al.*, 2005). Erste Ergebnisse sprechen auch für einen Zusammenhang zwischen Notch und *Runx1*. Die Expression von *Runx1* wird in einer Fibroblastenzelllinie durch Notch nach 48h induziert und die Überexpression von *Runx1* in *Notch*<sup>-/-</sup>-Zellen ist dafür verantwortlich, deren Defekte bei der Differenzierung hämatopoetischer Zellen auszugleichen (Nakagawa *et al.*, 2006). Außerdem konnte physikalische Interaktion zwischen Hes1 und *Runx1* nachgewiesen werden (Nakagawa *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass *Runx1* ein direktes Zielgen von Notch1 ist. Inwieweit *Runx1* das direkte Bindeglied zwischen der Aktivierung von Notch1 und der Repression von Flk-1 im Zuge der mesodermalen Differenzierung darstellt, wäre ein geeigneter Ansatzpunkt zur weiteren Untersuchung der molekularen Mechanismen der durch Notch1 vermittelten Effekte während der mesodermalen Differenzierung. Um diesen Aspekt zu analysieren, könnten mehrere Versuchsansätze verfolgt werden. Zum einen wäre es denkbar, die Expression von *Runx1* mittels siRNA zu reprimieren, während Notch1 aktiviert wird. Bei gleichzeitiger mesodermaler Differenzierung der embryonalen Stammzellen auf OP9-Stromazellen könnte somit untersucht werden, ob *Runx1* allein oder zusätzlich zu anderen Faktoren für die Repression von Flk-1 verantwortlich ist. Zum anderen wurde bereits eine embryonale Stammzelllinie etabliert, die das Gen für den fluoreszierenden Farbstoff VENUS unter der Kontrolle eines Promoters von *Runx1* exprimiert (Hirai *et al.*, 2005). Durch stabile Transfektion dieser Zellen mit dem induzierbaren NERT-System könnte untersucht werden, ob nach Aktivierung von Notch1 während der mesodermalen Differenzierung jede *Runx1*<sup>+</sup> Zelle Flk-1<sup>-</sup> wird oder ob weitere Faktoren an der Repression von Flk-1 beteiligt sind.

Ein weiterer, in dieser Arbeit als zellkontextabhängiges direktes Zielgen von Notch1 identifizierter Transkriptionsfaktor ist *Pax6*. *Pax6* gehört zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die durch die Anwesenheit einer *paired domain* charakterisiert werden. *Pax6* spielt eine entscheidende Rolle sowohl bei der Entwicklung des Auges und des zentralen Nervensystems als auch während der Differenzierung von Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas (Übersicht bei Chi und Epstein, 2002). Während der Augenentwicklung von *Xenopus laevis* induziert die Aktivierung des Notch-Signalwegs

nach 12h die verstärkte Expression von *Pax6* (Onuma *et al.*, 2002). Auch in *D. melanogaster* reguliert Notch die Expression von *eyeless*, dem Ortholog von *Pax6* (Kurata *et al.*, 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen *Pax6* als Zielgen von Notch1 in embryonalen Stammzellen, die unter Bedingungen gehalten wurden, welche die ektodermale Differenzierung begünstigten. Ob dies auch unter Bedingungen, welche die endodermale Differenzierung begünstigen, eintreten würde, wäre von ebenso großem Interesse wie die biologische Funktion, die *Pax6* in Abhängigkeit von Notch1 während der ektodermalen Differenzierung erfüllt und ob diese Funktion in der Maus denen in *D. melanogaster* und *X. laevis* äquivalent ist.

Der Transkriptionsfaktor *Sox9*, der zur Gruppe von Transkriptionsfaktoren mit einer HMG-box (High mobility group) DNA-Bindungsdomäne zählt, wurde in dieser Arbeit als eines der wenigen Notch1-Zielgene identifiziert, das sowohl in undifferenzierten Zellen als auch in mesodermalen Vorläuferzellen nach Aktivierung von Notch1 induziert wird. Die bereits bekannten Funktionen von *Sox9* lassen sich in Effekte auf Mesoderm und Endoderm unterteilen. Im Mesoderm ist *Sox9* an der Aufrechterhaltung des Notochord verantwortlich (Barrionuevo *et al.*, 2006). Darüber hinaus ist *Sox9* einer von mehreren Transkriptionsfaktoren, welche an der Chondrogenese beteiligt sind und spielt während der ersten Schritte der Chondrogenese eine Rolle (Übersichten bei Goldring *et al.*, 2006; Hardingham *et al.*, 2006). Auch durch den Notch-Signalweg wird die Differenzierung von Chondrozyten beeinflusst (Übersichten bei Hardingham *et al.*, 2006; Nakanishi *et al.*, 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *Sox9* ein direktes Zielgen von Notch1 in mesodermalen Vorläuferzellen ist. Ein Ansatz wäre nun, zu analysieren, inwieweit ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Notch1 in mesodermalen Vorläuferzellen und der daraus resultierenden verstärkten Expression von *Sox9* sowie der Induktion der Chondrogenese besteht.

Während der endodermalen Entwicklung liegt eine bekannte Funktion von *Sox9* darin, pankreatische Vorläuferzellen undifferenziert zu halten (Seymour *et al.*, 2007). Die Aktivierung des RBP-J $\kappa$ -abhängigen Notch-Signalwegs verhindert ebenfalls die vorzeitige Differenzierung pankreatischer Vorläuferzellen (Fujikura *et al.*, 2006). Darüber hinaus und in Relation zu dem in dieser Arbeit gezeigten Ergebnis, dass *Sox9* ein direktes Zielgen von Notch1 ist, war *Sox9* in pankreatischen Vorläuferzellen für die Induktion des bekannten Notch-Zielgens *Hes1* verantwortlich (Seymour *et al.*, 2007). Ein erster Schritt wäre nun, die Auswirkungen der Aktivierung von Notch1 auf die Expression von *Sox9* unter Bedingungen, welche die endodermale Differenzierung begünstigten, zu untersuchen. Ein

direkter Zusammenhang erscheint durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, dass *Sox9* in allen untersuchten Bedingungen ein direktes Zielgen von Notch1 ist, wahrscheinlich. Welche biologische Funktion die in dieser Arbeit gezeigte Steigerung der Expression von *Sox9* nach Aktivierung von Notch1 in undifferenzierten embryonalen Stammzellen hat, bleibt ebenso noch zu klären wie die Frage, ob zwischen Notch1 und *Sox9* ein Mechanismus der gegenseitigen Regulation durch positive Rückkopplung besteht. Dies erscheint möglich, nachdem wie beschrieben kontextabhängig sowohl die Induktion von *Sox9* durch Notch (Ergebnisse dieser Arbeit) als auch umgekehrt (Seymour *et al.*, 2007) gezeigt werden konnte.

Die Vielfältigkeit und Vielzahl der bisher bekannten, durch die Aktivierung von Notch1 induzierten Effekte beruht auf der Modulation des Signalwegs an unterschiedlichen Stellen und deren Kontextabhängigkeit. Die Interaktion mit anderen Signaltransduktionswegen ist eine Möglichkeit, mittels Induktion verschiedener Zielgene von Notch1 Einfluss auf Differenzierung und Proliferation von Zellen in unterschiedlichsten Geweben und Differenzierungsstadien zu nehmen. Des Weiteren wird durch epigenetische Modifizierungen sowohl die Anzahl als auch das Muster der möglichen Zielgene in Abhängigkeit des Kontexts festgelegt, wodurch eine Einschränkung der Auswirkungen von Notch1 vorgenommen wird. Auch besteht die Möglichkeit, dass die biologische Funktion von Notch1 z. T. in der Veränderung des Chromatins besteht und so auf die Differenzierung der Zellen einwirkt. So konnte gezeigt werden, dass eine Verbindung zwischen dem Notch-Signalweg und epigenetischen Veränderungen während der Tumorbildung in *Drosophila* besteht: durch Überexpression des Liganden Delta erfolgte neben übermäßigem Größenwachstums der Augen die reduzierte Methylierung des Histons 3; die Kombination mit der deregulierten Expression zweier Polycomb-Gene führte zur Bildung methastasierender Tumore (Übersicht bei Dominguez, 2006). Aufgrund bereits bekannter Funktionen von Notch sowohl als Tumorsuppressor als auch als Onkogen in der Maus und beim Menschen (Übersicht bei Bolos *et al.*, 2007) ist anzunehmen, dass epigenetische Veränderungen auch bei Säugern in der Tumorbildung eine Rolle spielen können (Übersicht bei Dominguez, 2006).

Doch nicht nur bei der Entwicklung von Tumoren, sondern auch während früher Differenzierungsschritte und Zelllinienentscheidungen in embryonalen Stammzellen spielt die Modifizierung des Chromatins einschließlich der Methylierung der DNA im *Imprinting* eine entscheidende Rolle (Übersicht bei Surani *et al.*, 2007). Nachdem eine Verbindung

zwischen Notch, epigenetischen Veränderungen und Tumorbildung wahrscheinlich scheint, liegt es nahe, einen eventuellen derartigen Zusammenhang auch während der Differenzierung zu vermuten. Inwieweit Notch1 auf diese Mechanismen Einfluss nimmt, ist ein weiteres Teilgebiet, durch dessen Untersuchung eine Erklärung für die Vielfalt Notch1-bedingter Auswirkungen auf die Differenzierung gefunden werden könnte. In Kombination mit der Analyse der biologischen Funktionen, welche die in dieser Arbeit identifizierten kontextabhängigen Zielgene von Notch1 einnehmen, könnten die molekularen Mechanismen der Differenzierung weiter aufgedeckt werden. Dies wäre z. B. durch Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) und anschließende Analyse mittels *Microarray (ChIP-on-chip)* realisierbar.

In dieser Arbeit konnte eine Vielzahl verschiedener Notch1-Zielgene identifiziert werden, deren Expression kontextabhängig erfolgt. Diese Kontextabhängigkeit zeigt, dass die Expression der Zielgene von weiteren intrinsischen oder extrinsischen Faktoren reguliert wird. Auffällig an den *in vitro* erzielten Ergebnissen ist dabei die Vielfältigkeit und Vielzahl der in jeder einzelnen Kulturbedingung von Notch1 induzierten Gene, die *in vivo* an verschiedenen Vorgängen z. B. während der Chondrogenese, der Somitogenese oder der Bildung von Skelettmuskeln beteiligt sind. Das verwendete *in vitro*-System für undifferenzierte embryonale Stammzellen und mesodermale Vorläuferzellen birgt dabei sowohl Vorteile als auch Nachteile. Einerseits stellt die Untersuchung von Zelllinienentscheidungen *in vitro* die einzige Möglichkeit dar, Auswirkungen einzelner Parameter in embryonalen Stammzellen möglichst isoliert untersuchen zu können. Andererseits verwehrt diese Isolierung Rückschlüsse auf einen Phänotyp, der möglicherweise erst durch kontextabhängige Interaktionen, die *in vitro* nicht darstellbar sind, sichtbar wird. Die Untersuchung von Effekten asymmetrisch gerichteten Wachstums wie der axialen Ausrichtung des Embryos, in deren Verlauf *Nodal* eine wichtige Rolle spielt (Übersichten bei Shen, 2007; Shiratori und Hamada, 2006), kann ebenfalls nur *in vivo* durchgeführt werden. *Nodal* wurde in der vorliegenden Arbeit als Zielgen von Notch1 in mesodermalen Vorläuferzellen identifiziert (s. Abb. 4.12). Eine Interaktion zwischen dem Notch-Signalweg und dem parakrinen Faktor *Nodal* konnte bereits nachgewiesen werden (Krebs *et al.*, 2003; Raya *et al.*, 2003); nicht geklärt werden konnte bisher allerdings der Zusammenhang der kontextabhängigen Induktion von *Nodal*, welches in allen untersuchten Bedingungen exprimiert wurde, jedoch nur in mesodermalen Vorläuferzellen durch Notch induziert wurde.

In dieser Arbeit konnten verschiedene Zielgene von Notch1 in embryonalen Stammzellen identifiziert werden. Die funktionelle Charakterisierung der identifizierten Zielgene *in vitro* und *in vivo* ist unumgänglich, um die molekularen Mechanismen der durch Notch1 vermittelten Effekte in den verschiedenen Zelltypen zu untersuchen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden sämtlich mit der murinen embryonalen Stammzelllinie EB5 durchgeführt. Eine Überprüfung der in der embryonalen Stammzelllinie EB5 gewonnenen Ergebnisse besteht darin, die differentielle Expression der verschiedenen Zielgene nach Aktivierung von Notch1 in einer weiteren murinen embryonalen Stammzelllinie wie z. B. D3 zu analysieren. Eine Untersuchung mit *ex vivo* präparierten mesodermalen Vorläuferzellen zur Überprüfung der erzielten Ergebnisse ist aus verschiedenen Gründen technisch schwer zu realisieren. Zum einen könnte pro Tier nur eine äußerst geringe Anzahl der entsprechenden Zellen isoliert werden. Durch die notwendige Aufreinigung würde außerdem erheblicher Stress auf die Zellen ausgeübt werden, so dass bei einer Untersuchung des Transkriptoms diese Einflüsse die erzielten Ergebnisse verfälschen könnten. Das verwendete System der mesodermalen Differenzierung *in vitro* stellt also mit den genannten Einschränkungen ein sehr gut geeignetes System dar, in einem ersten Schritt die kontextabhängigen Auswirkungen des Notch1-Signalweges auf die mesodermale Differenzierung zu untersuchen.

Ein sehr wichtiger Punkt bei der Untersuchung der biologischen Relevanz der gewonnenen Ergebnisse über die differentielle Expression der Zielgene von Notch1 ist die Beantwortung der Frage, ob der durch Notch1 vermittelte Einfluss irreversibel ist und Zelllinienentscheidungen induziert, oder ob es sich um Einflüsse auf die Kinetik der Differenzierung handelt. Die Identifizierung der weiteren Faktoren, die die kontextabhängige Expression und Induktion der Zielgene beeinflussen, würde darüber hinaus Aufschluss über die molekularen Mechanismen der durch Notch1 verursachten Effekte geben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Zielgene von Notch1 in murinen embryonalen Stammzellen und in mesodermalen Vorläuferzellen identifiziert und in ihrer differentiellen und kontextabhängigen Expression untersucht. Es konnten mehrere direkte Zielgene von Notch1 identifiziert werden, deren Expression bisher nicht mit dem Notch1-Signaltransduktionsweg in Bezug gebracht worden war, wie z. B. *Myf5*. Darüber hinaus konnte bei einigen Genen, für die ein funktioneller Zusammenhang mit der Aktivierung von Notch bereits beschrieben worden war, gezeigt werden, dass es sich bei

ihnen ebenfalls um direkte Zielgene von Notch1 handelt. Ein Beispiel hierfür ist *Sox9*. Durch die Untersuchung der differentiellen Expression in embryonalen Stammzellen und in mesodermalen Vorläuferzellen konnte die Kontextabhängigkeit verschiedener im Vorfeld bekannter Zielgene von Notch1 dargestellt werden. In diesem Zusammenhang ist zu nennen, dass *Hes1* in mesodermalen Vorläuferzellen nicht als Zielgen von Notch1 fungiert. Darüber hinaus konnte mit dieser Arbeit die Grundlage für nachfolgende Experimente geschaffen werden, welche die biologischen Funktionen dieser Gene als Zielgen von Notch1 während der Differenzierung charakterisieren sollen. Diese nachfolgenden Untersuchungen werden wahrscheinlich dazu beitragen können, die molekularen Mechanismen der durch Notch1 vermittelten Zelllinienentscheidungen zu analysieren.

Zur Ausarbeitung der molekularen Mechanismen der durch Notch1 vermittelten Linienentscheidungen bedarf es weiterer Experimente. Nachdem damit begonnen wurde, ein System zur Untersuchung der biologischen Funktion der Zielgene während der frühen mesodermalen Differenzierung zu entwickeln, wäre es notwendig, dieses System nun weiter auszuarbeiten. Durch Verwendung anderer Differenzierungssysteme wie z. B. der Bildung von *Embryoid Bodies* oder der Kokultur der embryonalen Stammzellen auf Stromazelllinien wie z. B. PA6, eine die ektodermale Differenzierung unterstützende Zelllinie (Kawasaki *et al.*, 2000), und anderer Kulturbedingungen könnten die Auswirkungen der jeweiligen Zielgene auf die ektodermale Differenzierung untersucht werden. Durch diese kombinierte *in vitro*-Analyse der Effekte auf die drei verschiedenen Keimblätter würde eine Aussage über die Vermittlung der Zelllinienentscheidung und der kontextabhängigen Induktion der Zielgene ermöglicht werden.

Während der Embryonalentwicklung erschweren zwar die Vielfalt der verschiedenen Signaltransduktionswege und darüber hinaus deren Regulation, Modulation und Interaktion die isolierte Betrachtung eines Parameters und dessen Effekt auf das komplexe System, ermöglichen aber andererseits eine Vielzahl von Zelllinienentscheidungen und Differenzierungsvorgängen, die zur Entwicklung eines komplexen Organismus führen. Die Regulation dieses komplexen Systems erfolgt durch verschiedene generelle Mechanismen, wobei die Regulation jedes einzelnen Signaltransduktionsweges mit Art, Modifikation und Verfügbarkeit der Liganden beginnt. Daraus und durch andere kontextabhängige Signale ergibt sich eine zellspezifische Zusammenstellung verschiedener Zielgene. Bei diesen Signalen könnte es sich sowohl um epigenetische Merkmale handeln als auch um

Interaktion mit anderen Signaltransduktionswegen. Die Zielgene werden wiederum durch Interaktionen wie z. B. der Bildung von Heterodimeren aus bHLHs oder dem Einfluss anderer Signaltransduktionswege modifiziert und bewirken auf diese Weise die Expression weiterer Zielgene. In dieser Arbeit konnten Zielgene eines wichtigen Signaltransduktionsweges, Notch1, in murinen embryonalen Stammzellen und in mesodermalen Vorläuferzellen identifiziert und in ihrer differentiellen Expression analysiert werden. Damit wurde ein erster Schritt getan und die Grundlage für weitere Arbeiten geschaffen, um die Funktion von Notch1 im komplexen Netzwerk intrinsischer und extrinsischer Signale besser verstehen zu lernen. Die Untersuchung der Integration der verschiedenen Signale in den regulatorischen Regionen der identifizierten Zielgene könnte zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Determinierung und Differenzierung beitragen.



## 6. Zusammenfassung

Der Notch-Signaltransduktionsweg ist von essentieller Bedeutung für die Embryonalentwicklung vielzelliger Organismen. Er induziert und reguliert zahlreiche Zelllinienentscheidungen und ist für äußerst vielfältige kontextabhängige Effekte in den unterschiedlichsten Zell- und Gewebetypen verantwortlich. Diese Effekte betreffen sowohl Differenzierung als auch Proliferation und Apoptose. Die Regulation der Signaltransduktion durch Notch ist in ihren Grundzügen bekannt; die molekularen Mechanismen, die den Zelllinienentscheidungen zugrunde liegen, oft nicht. Eine Erklärung für die Vielfältigkeit der durch Notch vermittelten Effekte ist, dass bisher nicht alle generellen oder kontextabhängigen Zielgene von Notch identifiziert werden konnten.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Blockierung der mesodermalen Differenzierung durch Notch1, quantifiziert durch die Repression Flk-1<sup>+</sup> mesodermaler Vorläuferzellen nach Aktivierung von Notch1 *in vitro* in der murinen embryonalen Stammzelllinie EB5. Neben der genaueren Charakterisierung dieser Blockierung durch Notch1 stand die Identifizierung der Zielgene von Notch1, welche wahrscheinlich den Mechanismus dieser Zelllinienentscheidung vermitteln, im Vordergrund. Durch *Microarray*-Analysen in embryonalen Stammzellen sowie in daraus differenzierten mesodermalen Vorläuferzellen konnten 484 bekannte Gene identifiziert werden, deren Expression nach Aktivierung von Notch1 in zumindest einer der untersuchten Kulturbedingungen mindestens zweifach reguliert worden war. 32 dieser Gene, deren biologische Funktion zu der von Notch1 passend war, wurden zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Zu dieser Gruppe zählten bereits bekannte Zielgene von Notch1, aber auch Gene, deren Expression mit der Aktivierung von Notch1 bisher nicht im direkten Zusammenhang stand, z. B. *Myf5*, *Sox9* oder *Pax6*. Neben der Analyse der differentiellen kontextabhängigen Expression dieser Gene unter verschiedenen Kulturbedingungen und in verschiedenen Zelltypen wurde ebenfalls überprüft, ob die durch Notch1 vermittelte Regulation der Expression dieser Gene direkt war. Abschließend wurde begonnen, mittels RNA-Interferenz ein System zur Charakterisierung der biologischen Funktion der Zielgene während der Inhibition der mesodermalen Differenzierung durch Notch1 zu entwickeln.

Durch die Identifizierung der Zielgene von Notch1 in embryonalen Stammzellen und mesodermalen Vorläuferzellen wurde ein erster wichtiger Schritt getan, um die molekularen Mechanismen der kontextabhängigen Effekte von Notch1 während der frühen Embryonalentwicklung der Maus aufdecken zu können.

## 7. Summary

Notch signalling is essential for the embryonic development of multicellular organisms. Depending on the cellular context, Notch induces and regulates a variety of cell lineage decisions and affects differentiation, proliferation and apoptosis in different types of cells or tissues. Up to now basic aspects of the regulation of Notch signalling are known, however in most cases little is known about the molecular mechanisms which are the basis of the cell lineage decisions. One explanation for the diversity of Notch regulated effects is maybe the presence of still not identified general or context dependent target genes.

This study was based on the repression of mesodermal differentiation caused by Notch1. This effect was quantified by measuring the amount of Flk-1<sup>+</sup> mesodermal progenitor cells generated *in vitro* in the embryonic stem cell line EB5 after activation of Notch1. Beside further characterization of this result, the main goal of this study was to identify the target genes of Notch1 which probably cause this cell lineage decision. 484 known genes - whose expression was at least two fold regulated after activation of Notch1 in at least one of the analysed culture conditions - were identified by microarray analysis in embryonic stem cells as well as in mesodermal progenitor cells. 32 genes out of this group were chosen for ongoing analysis. The known functions of these genes were comparable to the known functions of Notch1 during embryonic development. Belonging to this group of genes were known target genes of Notch1 as well as genes with so far unknown direct relation between their expression and the activation of Notch1, for example *Myf5*, *Sox9* or *Pax6*. The differential context dependent expression of the identified Notch1 target genes was analysed in different culture conditions as well as in different cell types. In addition, it was investigated if regulation of gene expression after activation of Notch1 was induced directly or indirectly. Final part of this work was starting the development of an experimental system based on RNA interference to characterize the biological function of the identified target genes during inhibition of mesodermal differentiation caused by activation of Notch1.

A first important step was taken to uncover the molecular mechanisms which manage the context dependent effects of Notch1. The identification of Notch1 target genes in embryonic stem cells and mesodermal progenitor cells and the analysis of their differential expression laid the foundation for future investigations.

---

## 8. Literaturverzeichnis

- Arnold, H.H., und T. Braun. 1996. Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review. *Int J Dev Biol.* 40:345-53.
- Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, und R.J. Lake. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 284:770-6.
- Azuara, V., P. Perry, S. Sauer, M. Spivakov, H.F. Jorgensen, R.M. John, M. Gouti, M. Casanova, G. Warnes, M. Merckenschlager, und A.G. Fisher. 2006. Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol.* 8:532-8.
- Bain, G., W.J. Ray, M. Yao, und D.I. Gottlieb. 1996. Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 223:691-4.
- Barrionuevo, F., M.M. Taketo, G. Scherer, und A. Kispert. 2006. Sox9 is required for notochord maintenance in mice. *Dev Biol.* 295:128-40.
- Benezra, R., S. Rafii, und D. Lyden. 2001. The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene.* 20:8334-41.
- Bessho, Y., G. Miyoshi, R. Sakata, und R. Kageyama. 2001a. Hes7: a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. *Genes Cells.* 6:175-85.
- Bessho, Y., R. Sakata, S. Komatsu, K. Shiota, S. Yamada, und R. Kageyama. 2001b. Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes Dev.* 15:2642-7.
- Blanpain, C., W.E. Lowry, H.A. Pasolli, und E. Fuchs. 2006. Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev.* 20:3022-35.
- Blaumueller, C.M., H. Qi, P. Zagouras, und S. Artavanis-Tsakonas. 1997. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell.* 90:281-91.
- Boiani, M., und H.R. Scholer. 2005. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:872-84.
- Bolos, V., J. Grego-Bessa, und J.L. de la Pompa. 2007. Notch Signaling in Development and Cancer. *Endocr Rev.* 28:339-63.

- Braun, T., und H.H. Arnold. 1996. Myf-5 and myoD genes are activated in distinct mesenchymal stem cells and determine different skeletal muscle cell lineages. *Embo J.* 15:310-18.
- Bray, S.J. 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:678-89.
- Brisken, C., A. Heineman, T. Chavarria, B. Elenbaas, J. Tan, S.K. Dey, J.A. McMahon, A.P. McMahon, und R.A. Weinberg. 2000. Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev.* 14:650-4.
- Burns, C.E., D. Traver, E. Mayhall, J.L. Shepard, und L.I. Zon. 2005. Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. *Genes Dev.* 19:2331-42.
- Calvi, L.M., G.B. Adams, K.W. Weibrecht, J.M. Weber, D.P. Olson, M.C. Knight, R.P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F.R. Bringhurst, L.A. Milner, H.M. Kronenberg, und D.T. Scadden. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 425:841-6.
- Carmena, A., S. Speicher, und M. Baylies. 2006. The PDZ Protein Canoe/AF-6 Links Ras-MAPK, Notch and Wntless/Wnt Signaling Pathways by Directly Interacting with Ras, Notch and Dishevelled. *PLoS ONE.* 1:e66.
- Chang, J.T., V.R. Palanivel, I. Kinjyo, F. Schambach, A.M. Intlekofer, A. Banerjee, S.A. Longworth, K.E. Vinup, P. Mrass, J. Oliaro, N. Killeen, J.S. Orange, S.M. Russell, W. Weninger, und S.L. Reiner. 2007. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science.* 315:1687-91.
- Chapman, G., L. Liu, C. Sahlgren, C. Dahlqvist, und U. Lendahl. 2006. High levels of Notch signaling down-regulate Numb and Numbl like. *J Cell Biol.* 175:535-40.
- Cheng, H.T., M. Kim, M.T. Valerius, K. Surendran, K. Schuster-Gossler, A. Gossler, A.P. McMahon, und R. Kopan. 2007. Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development.* 134:801-11.
- Chi, N., und J.A. Epstein. 2002. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet.* 18:41-7.
- Christ, B., und C.P. Ordahl. 1995. Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl).* 191:381-96.
- Cinquin, O. 2007. Understanding the somitogenesis clock: What's missing? *Mech Dev.* 124:501-17.

- Cossu, G., R. Kelly, S. Tajbakhsh, S. Di Donna, E. Vivarelli, und M. Buckingham. 1996. Activation of different myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm. *Development*. 122:429-37.
- Dahlqvist, C., A. Blokzijl, G. Chapman, A. Falk, K. Dannaeus, C.F. Ibanez, und U. Lendahl. 2003. Functional Notch signaling is required for BMP4-induced inhibition of myogenic differentiation. *Development*. 130:6089-99.
- Davis, R.L., und D.L. Turner. 2001. Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene*. 20:8342-57.
- de Haan, G., E. Weersing, B. Dontje, R. van Os, L.V. Bystrykh, E. Vellenga, und G. Miller. 2003. *In vitro* generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1. *Dev Cell*. 4:241-51.
- Dho, S.E., M.B. French, S.A. Woods, und C.J. McGlade. 1999. Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem*. 274:33097-104.
- Dietrich, S., F.R. Schubert, C. Healy, P.T. Sharpe, und A. Lumsden. 1998. Specification of the hypaxial musculature. *Development*. 125:2235-49.
- Dominguez, M. 2006. Interplay between Notch signaling and epigenetic silencers in cancer. *Cancer Res*. 66:8931-4.
- Duncan, A.W., F.M. Rattis, L.N. DiMascio, K.L. Congdon, G. Pazianos, C. Zhao, K. Yoon, J.M. Cook, K. Willert, N. Gaiano, und T. Reya. 2005. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol*. 6:314-22.
- Ema, M., S. Takahashi, und J. Rossant. 2006. Deletion of the selection cassette, but not cis-acting elements, in targeted Flk1-lacZ allele reveals Flk1 expression in multipotent mesodermal progenitors. *Blood*. 107:1111-7.
- Feil, R., J. Wagner, D. Metzger, und P. Chambon. 1997. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*. 237:752-7.
- Fischer, A., und M. Gessler. 2007. Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res*. 35:4583-96.

- Fischer, A., J. Klattig, B. Kneitz, H. Diez, M. Maier, B. Holtmann, C. Englert, und M. Gessler. 2005. Hey basic helix-loop-helix transcription factors are repressors of GATA4 and GATA6 and restrict expression of the GATA target gene ANF in fetal hearts. *Mol Cell Biol.* 25:8960-70.
- Fischer, A., C. Steidl, T.U. Wagner, E. Lang, P.M. Jakob, P. Friedl, K.P. Knobloch, und M. Gessler. 2007. Combined loss of Hey1 and HeyL causes congenital heart defects because of impaired epithelial to mesenchymal transition. *Circ Res.* 100:856-63.
- Fujikura, J., K. Hosoda, H. Iwakura, T. Tomita, M. Noguchi, H. Masuzaki, K. Tanigaki, D. Yabe, T. Honjo, und K. Nakao. 2006. Notch/Rbp-j signaling prevents premature endocrine and ductal cell differentiation in the pancreas. *Cell Metab.* 3:59-65.
- Gallo, R., F. Zazzeroni, E. Alesse, C. Mincione, U. Borello, P. Buanne, R. D'Eugenio, A.R. Mackay, B. Argenti, R. Gradini, M.A. Russo, M. Maroder, G. Cossu, L. Frati, I. Screpanti, und A. Gulino. 2002. REN: a novel, developmentally regulated gene that promotes neural cell differentiation. *J Cell Biol.* 158:731-40.
- Gan, Q., T. Yoshida, O.G. McDonald, und G.K. Owens. 2007. Concise review: epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells. *Stem Cells.* 25:2-9.
- Gessler, M., K.P. Knobloch, A. Helisch, K. Amann, N. Schumacher, E. Rohde, A. Fischer, und C. Leimeister. 2002. Mouse gridlock: no aortic coarctation or deficiency, but fatal cardiac defects in *Hey2*<sup>-/-</sup> mice. *Curr Biol.* 12:1601-4.
- Goldring, M.B., K. Tsuchimochi, und K. Ijiri. 2006. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem.* 97:33-44.
- Gossen, M., und H. Bujard. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:5547-51.
- Gridley, T. 2007. Notch signaling in vascular development and physiology. *Development.* 134:2709-18.
- Gu, G., J. Dubauskaite, und D.A. Melton. 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development.* 129:2447-57.
- Hacker, C., R.D. Kirsch, X.S. Ju, T. Hieronymus, T.C. Gust, C. Kuhl, T. Jorgas, S.M. Kurz, S. Rose-John, Y. Yokota, und M. Zenke. 2003. Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat Immunol.* 4:380-6.

- Hardingham, T.E., R.A. Oldershaw, and S.R. Tew. 2006. Cartilage, SOX9 and Notch signals in chondrogenesis. *J Anat.* 209:469-80.
- Hatakeyama, J., Y. Bessho, K. Katoh, S. Ookawara, M. Fujioka, F. Guillemot, and R. Kageyama. 2004. Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development.* 131:5539-50.
- Hebert, J.M., M. Boyle, and G.R. Martin. 1991. mRNA localization studies suggest that murine FGF-5 plays a role in gastrulation. *Development.* 112:407-15.
- Heinz, L.X., B. Platzer, P.M. Reisner, A. Jorgl, S. Taschner, F. Gobel, and H. Strobl. 2006. Differential involvement of PU.1 and Id2 downstream of TGF-beta1 during Langerhans-cell commitment. *Blood.* 107:1445-53.
- Hicks, C., E. Ladi, C. Lindsell, J.J. Hsieh, S.D. Hayward, A. Collazo, and G. Weinmaster. 2002. A secreted Delta1-Fc fusion protein functions both as an activator and inhibitor of Notch1 signaling. *J Neurosci Res.* 68:655-67.
- Hirai, H., I.M. Samokhvalov, T. Fujimoto, S. Nishikawa, and J. Imanishi. 2005. Involvement of Runx1 in the down-regulation of fetal liver kinase-1 expression during transition of endothelial cells to hematopoietic cells. *Blood.* 106:1948-55.
- Hirata, H., S. Yoshiura, T. Ohtsuka, Y. Bessho, T. Harada, K. Yoshikawa, and R. Kageyama. 2002. Oscillatory expression of the bHLH factor Hes1 regulated by a negative feedback loop. *Science.* 298:840-3.
- Hochedlinger, K., and R. Jaenisch. 2006. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature.* 441:1061-7.
- Hofmann, J.J., and M.L. Iruela-Arispe. 2007. Notch signaling in blood vessels: who is talking to whom about what? *Circ Res.* 100:1556-68.
- Hogan, B.L. 1996. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10:1580-94.
- Hooper, M., K. Hardy, A. Handyside, S. Hunter, and M. Monk. 1987. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature.* 326:292-5.
- Hori, K., M. Fostier, M. Ito, T.J. Fuwa, M.J. Go, H. Okano, M. Baron, and K. Matsuno. 2004. Drosophila deltex mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development.* 131:5527-37.
- Hurlbut, G.D., M.W. Kankel, R.J. Lake, and S. Artavanis-Tsakonas. 2007. Crossing paths with Notch in the hyper-network. *Curr Opin Cell Biol.* 19:166-75.

- Ingram, W.J., K.I. McCue, T.H. Tran, A.R. Hallahan, und B.J. Wainwright. 2007. Sonic Hedgehog regulates Hes1 through a novel mechanism that is independent of canonical Notch pathway signalling. *Oncogene*. Vorabveröffentlichung. PubMed ID: 17873912.
- Itoh, F., S. Itoh, M.J. Goumans, G. Valdimarsdottir, T. Iso, G.P. Dotto, Y. Hamamori, L. Keddes, M. Kato, und P. ten Dijke Pt. 2004. Synergy and antagonism between Notch and BMP receptor signaling pathways in endothelial cells. *EMBO J*. 23:541-51.
- James, R.G., und T.M. Schultheiss. 2003. Patterning of the avian intermediate mesoderm by lateral plate and axial tissues. *Dev Biol*. 253:109-24.
- Jan, Y.N., und L.Y. Jan. 1998. Asymmetric cell division. *Nature*. 392:775-8.
- Jogi, A., P. Persson, A. Grynfeld, S. Pahlman, und H. Axelson. 2002. Modulation of basic helix-loop-helix transcription complex formation by Id proteins during neuronal differentiation. *J Biol Chem*. 277:9118-26.
- Kabrun, N., H.J. Buhring, K. Choi, A. Ullrich, W. Risau, und G. Keller. 1997. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development*. 124:2039-48.
- Kageyama, R., Y. Masamizu, und Y. Niwa. 2007. Oscillator mechanism of Notch pathway in the segmentation clock. *Dev Dyn*. 236:1403-9.
- Kataoka, H., N. Takakura, S. Nishikawa, K. Tsuchida, H. Kodama, T. Kunisada, W. Risau, T. Kita, und S.I. Nishikawa. 1997. Expressions of PDGF receptor alpha, c-Kit and Flk1 genes clustering in mouse chromosome 5 define distinct subsets of nascent mesodermal cells. *Dev Growth Differ*. 39:729-40.
- Katoh, M. 2007a. Notch signaling in gastrointestinal tract (review). *Int J Oncol*. 30:247-51.
- Katoh, M. 2007b. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res*. 13:4042-5.
- Kawasaki, H., K. Mizuseki, S. Nishikawa, S. Kaneko, Y. Kuwana, S. Nakanishi, S.I. Nishikawa, und Y. Sasai. 2000. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*. 28:31-40.
- Kodama, H., M. Nose, S. Niida, und S. Nishikawa. 1994. Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Exp Hematol*. 22:979-84.
- Koo, B.K., M.J. Yoon, K.J. Yoon, S.K. Im, Y.Y. Kim, C.H. Kim, P.G. Suh, Y.N. Jan, und Y.Y. Kong. 2007. An obligatory role of mind bomb-1 in notch signaling of Mammalian development. *PLoS ONE*. 2:e1221.



- Kopan, R., J.S. Nye, und H. Weintraub. 1994. The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development*. 120:2385-96.
- Krebs, L.T., N. Iwai, S. Nonaka, I.C. Welsh, Y. Lan, R. Jiang, Y. Saijoh, T.P. O'Brien, H. Hamada, und T. Gridley. 2003. Notch signaling regulates left-right asymmetry determination by inducing Nodal expression. *Genes Dev*. 17:1207-12.
- Kurata, S., M.J. Go, S. Artavanis-Tsakonas, und W.J. Gehring. 2000. Notch signaling and the determination of appendage identity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:2117-22.
- Kwan, K.M. 2002. Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis*. 32:49-62.
- Lacaud, G., L. Gore, M. Kennedy, V. Kouskoff, P. Kingsley, C. Hogan, L. Carlsson, N. Speck, J. Palis, und G. Keller. 2002. Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development *in vitro*. *Blood*. 100:458-66.
- Lasorella, A., J. Stegmuller, D. Guardavaccaro, G. Liu, M.S. Carro, G. Rothschild, L. de la Torre-Ubieta, M. Pagano, A. Bonni, und A. Iavarone. 2006. Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth. *Nature*. 442:471-4.
- Lasorella, A., T. Uo, und A. Iavarone. 2001. Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene*. 20:8326-33.
- Le Borgne, R., A. Bardin, und F. Schweisguth. 2005. The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development*. 132:1751-62.
- Lefevre, G., F.J. Ratty, und G.D. Hanks. 1953. Frequency of Notch Mutations Induced in Normal, Duplicated and Inverted X-Chromosomes of *Drosophila Melanogaster*. *Genetics*. 38:345-59.
- Lefort, K., und G.P. Dotto. 2004. Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression. *Semin Cancer Biol*. 14:374-86.
- Lewis, S.L., und P.P. Tam. 2006. Definitive endoderm of the mouse embryo: formation, cell fates, and morphogenetic function. *Dev Dyn*. 235:2315-29.
- Lindl, T. 2000. Zell- und Gewebekultur. *Spektrum-Verlag*. 4. Auflage: 64-66.
- Littlewood, T.D., D.C. Hancock, P.S. Danielian, M.G. Parker, und G.I. Evan. 1995. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res*. 23:1686-90.

- Logan, C.Y., und R. Nusse. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:781-810.
- Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N.G. Seidah, und A. Israel. 1998. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:8108-12.
- Lowell, S., A. Benchoua, B. Heavey, und A.G. Smith. 2006. Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biol.* 4:e121.
- Lubman, O.Y., S.V. Korolev, und R. Kopan. 2004. Anchoring notch genetics and biochemistry; structural analysis of the ankyrin domain sheds light on existing data. *Mol Cell.* 13:619-26.
- Maillard, I., T. Fang, und W.S. Pear. 2005. Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu Rev Immunol.* 23:945-74.
- Marin-Husstege, M., Y. He, J. Li, T. Kondo, F. Sablitzky, und P. Casaccia-Bonnel. 2006. Multiple roles of Id4 in developmental myelination: predicted outcomes and unexpected findings. *Glia.* 54:285-96.
- Masamizu, Y., T. Ohtsuka, Y. Takashima, H. Nagahara, Y. Takenaka, K. Yoshikawa, H. Okamura, und R. Kageyama. 2006. Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:1313-8.
- Massague, J. 1996. TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell.* 85:947-50.
- Massari, M.E., und C. Murre. 2000. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol.* 20:429-40.
- Mastick, G.S., N.M. Davis, G.L. Andrew, und S.S. Easter, Jr. 1997. Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain. *Development.* 124:1985-97.
- Mauch, T.J., G. Yang, M. Wright, D. Smith, und G.C. Schoenwolf. 2000. Signals from trunk paraxial mesoderm induce pronephros formation in chick intermediate mesoderm. *Dev Biol.* 220:62-75.
- McGill, M.A., und C.J. McGlade. 2003. Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem.* 278:23196-203.
- McMahon, A.P., P.W. Ingham, und C.J. Tabin. 2003. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol.* 53:1-114.

- Mishra, L., R. Derynck, and B. Mishra. 2005. Transforming growth factor-beta signaling in stem cells and cancer. *Science*. 310:68-71.
- Mohr, O.L. 1919. Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics*. 4:275-82.
- Morimoto, M., Y. Takahashi, M. Endo, and Y. Saga. 2005. The Mesp2 transcription factor establishes segmental borders by suppressing Notch activity. *Nature*. 435:354-9.
- Moriyama, M., M. Osawa, S.S. Mak, T. Ohtsuka, N. Yamamoto, H. Han, V. Delmas, R. Kageyama, F. Beermann, L. Larue, and S. Nishikawa. 2006. Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells. *J Cell Biol*. 173:333-9.
- Mumm, J.S., and R. Kopan. 2000. Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol*. 228:151-65.
- Munsterberg, A.E., J. Kitajewski, D.A. Bumcrot, A.P. McMahon, and A.B. Lassar. 1995. Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev*. 9:2911-22.
- Nakagawa, M., M. Ichikawa, K. Kumano, S. Goyama, M. Kawazu, T. Asai, S. Ogawa, M. Kurokawa, and S. Chiba. 2006. AML1/Runx1 rescues Notch1-null mutation-induced deficiency of para-aortic splanchnopleural hematopoiesis. *Blood*. 108:3329-34.
- Nakanishi, K., Y.S. Chan, and K. Ito. 2007. Notch signaling is required for the chondrogenic specification of mouse mesencephalic neural crest cells. *Mech Dev*. 124:190-203.
- Nemir, M., A. Croquelois, T. Pedrazzini, and F. Radtke. 2006. Induction of cardiogenesis in embryonic stem cells via downregulation of Notch1 signaling. *Circ Res*. 98:1471-8.
- Nichols, J.T., A. Miyamoto, S.L. Olsen, B. D'Souza, C. Yao, and G. Weinmaster. 2007. DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *J Cell Biol*. 176:445-58.
- Nicolas, M., A. Wolfer, K. Raj, J.A. Kummer, P. Mill, M. van Noort, C.C. Hui, H. Clevers, G.P. Dotto, and F. Radtke. 2003. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet*. 33:416-21.
- Niessen, K., and A. Karsan. 2007. Notch signaling in the developing cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 293:C1-11.

- Nishikawa, S., L.M. Jakt, und T. Era. 2007. Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:502-7.
- Nishikawa, S.I., S. Nishikawa, M. Hirashima, N. Matsuyoshi, und H. Kodama. 1998. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development.* 125:1747-57.
- Niwa, H., J. Miyazaki, und A.G. Smith. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 24:372-6.
- Okuda, T., J. van Deursen, S.W. Hiebert, G. Grosveld, und J.R. Downing. 1996. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell.* 84:321-30.
- Olivera-Martinez, I., J. Thelu, und D. Dhouailly. 2004. Molecular mechanisms controlling dorsal dermis generation from the somitic dermomyotome. *Int J Dev Biol.* 48:93-101.
- Onuma, Y., S. Takahashi, M. Asashima, S. Kurata, und W.J. Gehring. 2002. Conservation of Pax 6 function and upstream activation by Notch signaling in eye development of frogs and flies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:2020-5.
- Ott, M.O., E. Bober, G. Lyons, H. Arnold, und M. Buckingham. 1991. Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development.* 111:1097-107.
- Park, J.S., M.T. Valerius, und A.P. McMahon. 2007. Wnt/beta-catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. *Development.* 134:2533-9.
- Pedrazzini, T. 2007. Control of cardiogenesis by the notch pathway. *Trends Cardiovasc Med.* 17:83-90.
- Pennica, D., T.A. Swanson, J.W. Welsh, M.A. Roy, D.A. Lawrence, J. Lee, J. Brush, L.A. Taneyhill, B. Deuel, M. Lew, C. Watanabe, R.L. Cohen, M.F. Melhem, G.G. Finley, P. Quirke, A.D. Goddard, K.J. Hillan, A.L. Gurney, D. Botstein, und A.J. Levine. 1998. WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:14717-22.
- Pownall, M.E., M.K. Gustafsson, und C.P. Emerson, Jr. 2002. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18:747-83.
- Radtke, F., F. Schweisguth, und W. Pear. 2005. The Notch 'gospel'. *EMBO Rep.* 6:1120-5.

- Radtke, F., A. Wilson, S.J. Mancini, und H.R. MacDonald. 2004. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 5:247-53.
- Rahimi, R.A., und E.B. Leof. 2007. TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J Cell Biochem.* 102:593-608.
- Rand, M.D., L.M. Grimm, S. Artavanis-Tsakonas, V. Patriub, S.C. Blacklow, J. Sklar, und J.C. Aster. 2000. Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Mol Cell Biol.* 20:1825-35.
- Rathjen, J., J.A. Lake, M.D. Bettess, J.M. Washington, G. Chapman, und P.D. Rathjen. 1999. Formation of a primitive ectoderm like cell population, EPL cells, from ES cells in response to biologically derived factors. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 5):601-12.
- Raya, A., Y. Kawakami, C. Rodriguez-Esteban, D. Buscher, C.M. Koth, T. Itoh, M. Morita, R.M. Raya, I. Dubova, J.G. Bessa, J.L. de la Pompa, und J.C. Belmonte. 2003. Notch activity induces Nodal expression and mediates the establishment of left-right asymmetry in vertebrate embryos. *Genes Dev.* 17:1213-8.
- Rivera, R., und C. Murre. 2001. The regulation and function of the Id proteins in lymphocyte development. *Oncogene.* 20:8308-16.
- Roberts, E.C., R.W. Deed, T. Inoue, J.D. Norton, und A.D. Sharrocks. 2001. Id helix-loop-helix proteins antagonize pax transcription factor activity by inhibiting DNA binding. *Mol Cell Biol.* 21:524-33.
- Sakurai, H., T. Era, L.M. Jakt, M. Okada, S. Nakai, und S. Nishikawa. 2006. *In vitro* modeling of paraxial and lateral mesoderm differentiation reveals early reversibility. *Stem Cells.* 24:575-86.
- Sasai, Y., und E.M. De Robertis. 1997. Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Dev Biol.* 182:5-20.
- Schindler, C., und J.E. Darnell, Jr. 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem.* 64:621-51.
- Schroeder, T., und U. Just. 2000. Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. *EMBO J.* 19:2558-68.
- Schroeder, T., H. Kohlhof, N. Rieber, und U. Just. 2003. Notch signaling induces multilineage myeloid differentiation and up-regulates PU.1 expression. *J Immunol.* 170:5538-48.

- Schroeder, T., F. Meier-Stiegen, R. Schwanbeck, H. Eilken, S. Nishikawa, R. Hasler, S. Schreiber, G.W. Bornkamm, und U. Just. 2006. Activated Notch1 alters differentiation of embryonic stem cells into mesodermal cell lineages at multiple stages of development. *Mech Dev.* 123:570-9.
- Seymour, P.A., K.K. Freude, M.N. Tran, E.E. Mayes, J. Jensen, R. Kist, G. Scherer, und M. Sander. 2007. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:1865-70.
- Shalaby, F., J. Ho, W.L. Stanford, K.D. Fischer, A.C. Schuh, L. Schwartz, A. Bernstein, und J. Rossant. 1997. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell.* 89:981-90.
- Shalaby, F., J. Rossant, T.P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X.F. Wu, M.L. Breitman, und A.C. Schuh. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 376:62-6.
- Shen, M.M. 2007. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development.* 134:1023-34.
- Shi, Y., und J. Massague. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 113:685-700.
- Shiratori, H., und H. Hamada. 2006. The left-right axis in the mouse: from origin to morphology. *Development.* 133:2095-104.
- Spivakov, M., und A.G. Fisher. 2007. Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet.* 8:263-71.
- Spooncer, E., D. Boettiger, und T.M. Dexter. 1984. Continuous *in vitro* generation of multipotential stem cell clones from src-infected cultures. *Nature.* 310:228-30.
- Spooncer, E., C.M. Heyworth, A. Dunn, und T.M. Dexter. 1986. Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Differentiation.* 31:111-8.
- Stern, H.M., A.M. Brown, und S.D. Hauschka. 1995. Myogenesis in paraxial mesoderm: preferential induction by dorsal neural tube and by cells expressing Wnt-1. *Development.* 121:3675-86.
- Surani, M.A., K. Hayashi, und P. Hajkova. 2007. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell.* 128:747-62.

- Susini, L., B.J. Passer, N. Amzallag-Elbaz, T. Juven-Gershon, S. Prieur, N. Privat, M. Tuynder, M.C. Gendron, A. Israel, R. Amson, M. Oren, und A. Telerman. 2001. Siah-1 binds and regulates the function of Numb. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:15067-72.
- Suzuki, G., T.C. Lee, J.A. Fallavollita, und J.M. Canty, Jr. 2005. Adenoviral gene transfer of FGF-5 to hibernating myocardium improves function and stimulates myocytes to hypertrophy and reenter the cell cycle. *Circ Res*. 96:767-75.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, und S. Yamanaka. 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 131:861-72.
- Takahashi, K., und S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126:663-76.
- Takeshita, K., M. Satoh, M. Ii, M. Silver, F.P. Limbourg, Y. Mukai, Y. Rikitake, F. Radtke, T. Gridley, D.W. Losordo, und J.K. Liao. 2007. Critical role of endothelial Notch1 signaling in postnatal angiogenesis. *Circ Res*. 100:70-8.
- Takizawa, T., W. Ochiai, K. Nakashima, und T. Taga. 2003. Enhanced gene activation by Notch and BMP signaling cross-talk. *Nucleic Acids Res*. 31:5723-31.
- Tamura, K., Y. Taniguchi, S. Minoguchi, T. Sakai, T. Tun, T. Furukawa, und T. Honjo. 1995. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol*. 5:1416-23.
- Toriya, M., A. Tokunaga, K. Sawamoto, K. Nakao, und H. Okano. 2006. Distinct functions of human numb isoforms revealed by misexpression in the neural stem cell lineage in the Drosophila larval brain. *Dev Neurosci*. 28:142-55.
- Ustanina, S., J. Carvajal, P. Rigby, und T. Braun. 2007. The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification. *Stem Cells*. 25:2006-16.
- Varjosalo, M., und J. Taipale. 2007. Hedgehog signaling. *J Cell Sci*. 120:3-6.
- Vas, V., L. Szilagy, K. Paloczi, und F. Uher. 2004. Soluble Jagged-1 is able to inhibit the function of its multivalent form to induce hematopoietic stem cell self-renewal in a surrogate *in vitro* assay. *J Leukoc Biol*. 75:714-20.
- Vasyutina, E., D.C. Lenhard, H. Wende, B. Erdmann, J.A. Epstein, und C. Birchmeier. 2007. RBP-J (Rbpsi) is essential to maintain muscle progenitor cells and to generate satellite cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:4443-8.

- Vatner, S.F. 2005. FGF induces hypertrophy and angiogenesis in hibernating myocardium. *Circ Res.* 96:705-7.
- Verdi, J.M., A. Bashirullah, D.E. Goldhawk, C.J. Kubu, M. Jamali, S.O. Meakin, and H.D. Lipshitz. 1999. Distinct human NUMB isoforms regulate differentiation vs. proliferation in the neuronal lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:10472-6.
- Wahl, M.B., C. Deng, M. Lewandoski, and O. Pourquie. 2007. FGF signaling acts upstream of the NOTCH and WNT signaling pathways to control segmentation clock oscillations in mouse somitogenesis. *Development.* 134:4033-41.
- Weiss, F.U., H. Daub, and A. Ullrich. 1997. Novel mechanisms of RTK signal generation. *Curr Opin Genet Dev.* 7:80-6.
- Wernig, M., A. Meissner, R. Foreman, T. Brambrink, M. Ku, K. Hochedlinger, B.E. Bernstein, and R. Jaenisch. 2007. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature.* 448:318-24.
- Wilkin, M.B., A.M. Carbery, M. Fostier, H. Aslam, S.L. Mazaleyrat, J. Higgs, A. Myat, D.A. Evans, M. Cornell, and M. Baron. 2004. Regulation of notch endosomal sorting and signaling by Drosophila Nedd4 family proteins. *Curr Biol.* 14:2237-44.
- Willert, K., J.D. Brown, E. Danenberg, A.W. Duncan, I.L. Weissman, T. Reya, J.R. Yates, 3rd, and R. Nusse. 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature.* 423:448-52.
- Wodarz, A., and R. Nusse. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14:59-88.
- Yamashita, J., H. Itoh, M. Hirashima, M. Ogawa, S. Nishikawa, T. Yurugi, M. Naito, and K. Nakao. 2000. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature.* 408:92-6.
- Yeoh, J.S., R. van Os, E. Weersing, A. Ausema, B. Dontje, E. Vellenga, and G. de Haan. 2006. Fibroblast growth factor-1 and -2 preserve long-term repopulating ability of hematopoietic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells.* 24:1564-72.
- Yokota, Y. 2001. Id and development. *Oncogene.* 20:8290-8.
- Yoon, K., S. Nery, M.L. Rutlin, F. Radtke, G. Fishell, and N. Gaiano. 2004. Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors. *J Neurosci.* 24:9497-506.



- Yu, J., M.A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J.L. Frane, S. Tian, J. Nie, G.A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, II, und J.A. Thomson. 2007. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*. Vorabveröffentlichung. PubMed ID: 18029452.
- Yun, K., A. Mantani, S. Garel, J. Rubenstein, und M.A. Israel. 2004. Id4 regulates neural progenitor proliferation and differentiation *in vivo*. *Development*. 131:5441-8.
- Yurugi-Kobayashi, T., H. Itoh, T. Schroeder, A. Nakano, G. Narazaki, F. Kita, K. Yanagi, M. Hiraoka-Kanie, E. Inoue, T. Ara, T. Nagasawa, U. Just, K. Nakao, S. Nishikawa, und J.K. Yamashita. 2006. Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26:1977-84.
- Zaehres, H., und H.R. Scholer. 2007. Induction of pluripotency: from mouse to human. *Cell*. 131:834-5.
- Zebedee, Z., und E. Hara. 2001. Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene*. 20:8317-25.
- Zhou, Y., J.B. Atkins, S.B. Rompani, D.L. Bancescu, P.H. Petersen, H. Tang, K. Zou, S.B. Stewart, und W. Zhong. 2007. The mammalian Golgi regulates numb signaling in asymmetric cell division by releasing ACBD3 during mitosis. *Cell*. 129:163-78.
- Zuniga-Pflucker, J.C. 2004. T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol*. 4:67-72.

## Appendix A: Liste der in den *Microarrays* durch Notch1 regulierten Gene und ESTs

Gen	Affymetrix ID	Locus Link	Ektoderm	Mesoderm		
			begünstigend	begünstigend	Mesoderm	
<i>Abcb1b</i>	1418872_at	18669	1,1	-	-	-
<i>Abhd5</i>	1417566_at	67469	1	-	-	-
<i>Abl1</i>	1423999_at	11350	1,4	1,5	-	-
<i>Acss2</i>	1422478_a_at	60525	1,5	-	-	-
<i>Adamts1</i>	1450716_at	11504	1,8	1,9	1,5	1,7
<i>Adamts4</i>	1452595_at	240913	1,5	1,5	-	-
<i>Adarb1</i>	1421480_a_at	110532	-	-	1,5	1,8
<i>Adck4</i>	1448490_at	76889	-	-	1,6	1,2
<i>Adm</i>	1416077_at	11535	-	-	-1,2	-1,5
<i>Adm</i>	1447839_x_at	11535	-	-	-1,2	-1,1
<i>Ak3</i>	1423718_at	56248	1,2	-	-	-
<i>Akap2</i>	1449168_a_at	11641	1,1	-	-	-
<i>Alcam</i>	1426301_at	11658	-	-	1,2	1
<i>Alg9</i>	1418844_at	102580	1,2	-	-	-
<i>Ankrd1</i>	1420992_at	107765	-	-	1,6	1,3
<i>Ankrd50</i>	1435880_at		1	-	-	-
<i>Apobec2</i>	1417889_at	11811	-	1	-	-
<i>Arg2</i>	1418847_at	11847	-	-	2,9	1,5
<i>Arg2</i>	1438841_s_at	53612	-	-	1,9	1,1
<i>Arhgap23</i>	1419745_at	58996	1,1	-	-	-
<i>Armex2</i>	1415780_a_at	67416	1,3	1,2	-	-
<i>Armex2</i>	1456739_x_at	67416	1,1	1	-	-
<i>Arsa</i>	1460346_at	11883	1	-	-	-
<i>Atg4c</i>	1434014_at	242557	1,2	-	-	-
<i>Atp1a2</i>	1443823_s_at		-	-	1,3	1,1
<i>Atp1a2</i>	1452308_a_at	98660	-	-	1	1,2
<i>Atp7a</i>	1418774_a_at	11977	1,2	-	-	-
<i>Atp7a</i>	1436921_at	11977	1	-	-	-
<i>Bcar1</i>	1439388_s_at	12927	1	-	-	-
<i>Bcl7c</i>	1440906_at		-	-	1,3	1,2
<i>Bhlhb2</i>	1418025_at	20893	1,6	1,2	-	-
<i>Btg1</i>	1437455_a_at	12226	1,2	-	-	-
<i>Btg2</i>	1448272_at	12227	1	-	1	1,3
<i>Bzrp</i>	1438948_x_at	12257	1,1	-	-	-
<i>Cacna1h</i>	1422710_a_at	58226	-	-	2,2	2,3
<i>Capg</i>	1450355_a_at	12332	1,6	1,6	-	-
<i>Card10</i>	1449491_at	105844	1,1	1	-	-
<i>Cav1</i>	1449145_a_at	12389	1,4	1,3	1,1	1,4

Appendix A: Auflistung der in den Microarrays durch Notch1 regulierten Gene und ESTs

Gen	Affymetrix ID	Locus Link	Ektoderm	Mesoderm		
			begünstigend	begünstigend	Mesoderm	
<i>Cbln1</i>	1423286_at	12404	1,5	-	-	-
<i>Ccnd1</i>	1417419_at	12443	-	-	1,1	1,5
<i>Ccnd1</i>	1448698_at	12443	1,2	-	1,1	1,2
<i>Ccnd1</i>	1417420_at	12443	1,1	-	-	-
<i>Ccnd2</i>	1448229_s_at	12444	-	-	1,1	1
<i>Ccnd2</i>	1416123_at	12444	-	-	1	1
<i>Cd109</i>	1436346_at	235505	-	1	-	-
<i>Cd24a</i>	1437502_x_at	12484	1,3	-	-	-
<i>Cd24a</i>	1448182_a_at	12484	1,1	-	-	-
<i>Cd24a</i>	1416034_at	12484	1,2	1	-	-
<i>Cd276</i>	1417599_at	102657	1,9	1,6	-	-
<i>Cd97</i>	1418394_a_at	26364	1,3	1,3	1,2	1,1
<i>Cdc42ep4</i>	1416511_a_at	56699	1,1	1,1	-	-
<i>Cdc91l1</i>	1439350_s_at		1	-	-	-
<i>Cdh1</i>	1443509_at		-	-	1,2	1,4
<i>Cdh1</i>	1448261_at	12550	1,3	1,1	-	-
<i>Cdx1</i>	1449582_at	12590	-	-	1,5	1,3
<i>Cebpb</i>	1418901_at	12608	1,3	-	-	-
<i>Cldn4</i>	1418283_at	12740	1,1	-	-	-
<i>Cldnd1</i>	1431293_a_at	224250	1	-	-	-
<i>Clock</i>	1418659_at	12753	1,5	1,4	-	-
<i>Cntnap2</i>	1422798_at	66797	2,4	1,6	2,7	2,7
<i>Col6a1</i>	1448590_at	12833	-	-	1	1
<i>Cpox</i>	1422492_at	12892	1	-	-	-
<i>Creb3l1</i>	1419295_at	26427	-	-	1,6	1,7
<i>Creg1</i>	1415947_at	23850	1	-	-	-
<i>Creg1</i>	1415948_at	23850	1	-	-	-
<i>Cryab</i>	1416455_a_at	12955	1,1	-	-	-
<i>Cryab</i>	1434369_a_at	12955	1	-	-	-
<i>Ctdspl</i>	1422510_at	69274	-	-	1,3	1,3
<i>Cttmbp2</i>	1435435_at	195624	-	-	2,1	1,7
<i>Cx3cl1</i>	1415803_at	20312	-	1,7	1,7	2,1
<i>Cxadr</i>	1453282_at	13052	1,2	-	-	-
<i>Cxcl1</i>	1419209_at	14825	2,4	2,7	2,4	2,6
<i>Cxcl1</i>	1457644_s_at	14825	2,6	1,6	1,5	2,2
<i>Cxcl10</i>	1418930_at	15945	-	-	2,2	3
<i>Cyp26a1</i>	1419430_at	13082	-	-	-1,4	-1,5
<i>Cyp7b1</i>	1421074_at	13123	-	-	-1,2	-1,2
<i>Cyp7b1</i>	1421075_s_at	13123	-	-	-1,4	-1,3
<i>Cyr61</i>	1438133_a_at	16007	-	-	1,2	1,2
<i>Cysltr1</i>	1449282_at	58861	-	-	-1,3	-1,2
<i>Dand5</i>	1436476_at		-	-	4,4	3
<i>Dbn2</i>	1451431_a_at	52840	2,1	1,6	-	-
<i>Ddr1</i>	1435820_x_at	12305	1,1	1,1	-	-
<i>Ddr1</i>	1415797_at	12305	1	1,1	-	-

Appendix A: Auflistung der in den Microarrays durch Notch1 regulierten Gene und ESTs

Gen	Affymetrix ID	Locus Link	Ektoderm	Mesoderm		
			begünstigend	begünstigend	Mesoderm	
<i>Ddr1</i>	1456226_x_at	12305	1,2	1	-	-
<i>Ddx58</i>	1446457_at	230073	-	-	2	1,3
<i>Decr1</i>	1419367_at	67460	1	-	-	-
<i>Dixdc1</i>	1435207_at	330938	-	1,7	-	-
<i>Dkk1</i>	1420360_at	13380	-	-	-1,7	-1,4
<i>Dlat</i>	1452005_at	235339	1	-	-	-
<i>Dnmt3a</i>	1423063_at	13435	1,3	-	-	-
<i>Dsc2</i>	1426911_at	13506	2	1,7	-	-
<i>Dscr1</i>	1416601_a_at	54720	-	1,1	-	-
<i>Dscr1</i>	1416600_a_at	54720	1,1	1,1	-	-
<i>Dsp</i>	1435494_s_at	105072	2	1,7	-	-
<i>Dsp</i>	1435493_at	105072	2,1	1,6	-	-
<i>Dtx1</i>	1425822_a_at	14357	1,3	1,2	1,6	1,6
<i>Dusp1</i>	1448830_at	19252	1,5	1,5	-	-
<i>Dusp2</i>	1450698_at	13537	-	-	3,3	2,9
<i>Dusp4</i>	1428834_at	70236	-	-	-2	-1,5
<i>Dusp5</i>	1437199_at		-	-	1	1,1
<i>E2f7</i>	1437187_at	52679	1	-	-	-
<i>Edg2</i>	1448606_at	14745	1,3	1	-	-
<i>Edg3</i>	1438658_a_at	13610	3	3,2	-	-
<i>Efhd2</i>	1431339_a_at	27984	-	1	1,3	1,1
<i>Efhd2</i>	1437478_s_at	27984	1,4	1	-	-
<i>Efna1</i>	1416895_at	13636	-	2,9	1,1	1,3
<i>Efna3</i>	1431170_at	13638	1,7	1,2	-	-
<i>Efnb1</i>	1451591_a_at	13641	1,9	-	1,1	1,1
<i>Efnb1</i>	1418285_at	13641	2,3	1,8	-	-
<i>Efnb1</i>	1418286_a_at	13641	1,3	1	-	-
<i>Efnb2</i>	1419639_at	13642	1,1	-	-	-
<i>Efnb2</i>	1419638_at	13642	1,2	1	-	-
<i>Egr1</i>	1417065_at	13653	1,1	-	2,7	2,8
<i>Egr3</i>	1436329_at	13655	-	-	1,8	3,1
<i>Eif2ak2</i>	1440866_at		-	-	1	1,2
<i>Ela1</i>	1423693_at	109901	1,5	1,1	-	-
<i>Elmod2</i>	1433730_at	244548	1,1	-	-	-
<i>Eml1</i>	1428321_at	68519	-	-	1,3	1,2
<i>Endod1</i>	1426541_a_at	71946	1,1	-	-	-
<i>Epas1</i>	1435436_at		-	-	1,6	1,5
<i>Epha4</i>	1421929_at	13838	-	-	1,3	1,8
<i>Epha7</i>	1451991_at	13841	-	-	-1,5	-1,7
<i>Eras</i>	1456511_x_at	353283	-	-	-1	-1,1
<i>ErbB3</i>	1434606_at	13867	1,2	-	-	-
<i>Ercc6l</i>	1444024_at	236930	-	1	-	-
<i>Ets1</i>	1426725_s_at	23871	1,3	-	-	-
<i>Eva1</i>	1416236_a_at	14012	1	-	-	-
<i>Fabp7</i>	1450779_at	12140	2,8	2,1	1,4	1,5

Appendix A: Auflistung der in den Microarrays durch Notch1 regulierten Gene und ESTs

Gen	Affymetrix ID	Locus Link	Ektoderm	Mesoderm	
			begünstigend	begünstigend	Mesoderm
<i>Faim</i>	1418029_at	23873	1	-	-
<i>Fbn1</i>	1460208_at	14118	1,1	-	1,2 1,1
<i>Fgd4</i>	1455337_at	320417	-	-	-1 -1
<i>Fgf5</i>	1438883_at	14176	-	-	-1,6 -2
<i>Fgfr1</i>	1424050_s_at	14182	1,3	-	- -
<i>Fgfr1</i>	1425911_a_at	14182	1,1	-	- -
<i>Fhl2</i>	1419184_a_at	14200	-	-	1,3 1,2
<i>Fjx1</i>	1422733_at	14221	2,2	1,9	2,4 1,7
<i>Fjx1</i>	1450728_at	14221	2,4	1,4	2 1,9
<i>Flcn</i>	1438167_x_at	216805	1	-	- -
<i>Flt1</i>	1440926_at		-	-	1,3 1,2
<i>Flt1</i>	1451756_at	14254	1,1	1,2	1,2 1,4
<i>Foxf1a</i>	1434939_at	15227	-	-	1,4 2,1
<i>Frk</i>	1426570_a_at	14302	-	-	1,1 1
<i>Frmd4b</i>	1438169_a_at	232288	2	1,6	- -
<i>Frmd4b</i>	1452123_s_at	232288	2,1	1,5	- -
<i>Fry</i>	1456480_at	320365	1,7	1,8	- -
<i>Frzb</i>	1416658_at	20378	-	-	1,7 1
<i>Fst</i>	1434458_at		-	-	-1,3 -1,5
<i>Fst</i>	1421365_at	14313	-	-	-1,5 -1
<i>Gad1</i>	1416561_at	14415	-	-	-1,4 -1,3
<i>Gadd45b</i>	1449773_s_at	17873	2,6	2,3	1,9 1,6
<i>Gadd45b</i>	1450971_at	17873	2	2	2,1 1,6
<i>Gas6</i>	1417399_at	14456	-	1,4	1 1,1
<i>Gbx2</i>	1420337_at	14472	-	-1	- -
<i>Gcnt2</i>	1451733_at	14538	-	-	1,7 1,1
<i>Gcnt2</i>	1425503_at	14538	-	-	1,3 1,3
<i>Gcnt2</i>	1421415_s_at	14538	-	-	1,1 1,5
<i>Gcnt2</i>	1430826_s_at	14538	1,1	-	2,2 1,4
<i>Glis3</i>	1443253_at		-	-	2,7 1,2
<i>Glis3</i>	1430353_at	71622	-	-	1 1
<i>Glis3</i>	1443157_at		-	-	1 1,9
<i>Gm22</i>	1459622_at	195209	-	1,5	- -
<i>Gm440</i>	1434456_at		-	-	-1 -1
<i>Gnai1</i>	1434440_at	14677	-	-	-1,3 -1
<i>Gnai1</i>	1454959_s_at	14677	-	-	-1,4 -1,3
<i>Gpkow</i>	1434344_at	209416	1	-	- -
<i>Gpr19</i>	1421756_a_at	14760	1,1	-	- -
<i>Gpsm2</i>	1424895_at	76123	1,7	1,7	- -
<i>Gramd1a</i>	1416708_a_at	52857	1,2	1,2	- -
<i>Grhl3</i>	1436932_at		1,1	-	- -
<i>Gss</i>	1448273_at	14854	1	-	- -
<i>Gsta3</i>	1423436_at	14585	1,3	-	- -
<i>Gt(ROSA)26Sor</i>	1452239_at	14910	1	-	- -
<i>Gtl2</i>	1436713_s_at	17263	1	-	- -

Appendix A: Auflistung der in den Microarrays durch Notch1 regulierten Gene und ESTs

Gen	Affymetrix ID	Locus Link	Ektoderm	Mesoderm		
			begünstigend	begünstigend	Mesoderm	
<i>Gucy1a3</i>	1420534_at	60596	-	-	4,5	2,7
<i>Gucy1a3</i>	1434141_at	60596	-	-	3,7	4,1
<i>Gucy1b3</i>	1420872_at	54195	-	-	2,2	2,7
<i>Gucy1b3</i>	1420871_at	54195	-	-	1,7	1,5
<i>H19</i>	1448194_a_at	14955	1,3	1,2	-	-
<i>H47</i>	1435735_x_at	109815	1	-	-	-
<i>Hbegf</i>	1418349_at	15200	1,7	1,3	1,7	1,9
<i>Hbegf</i>	1418350_at	15200	1,5	1,2	2,1	2,1
<i>Heatr1</i>	1452419_at	217993	-	1,3	-	-
<i>Hes1</i>	1418102_at	15205	1,7	1,2	-	-
<i>Hes5</i>	1456010_x_at	15208	5,3	5,7	7	6
<i>Hes5</i>	1423146_at	15208	4,6	2	2,5	4,3
<i>Hes7</i>	1422950_at	84653	-	-	2,7	2,9
<i>Hey1</i>	1415999_at	15213	1,9	2,3	1,9	2,3
<i>Hey2</i>	1418106_at	15214	-	-	1,5	2
<i>Heyl</i>	1419302_at	56198	-	-	2,4	1,9
<i>Hmgn3</i>	1434875_a_at	94353	1,1	-	-	-
<i>Hspb2</i>	1429888_a_at	69253	1,3	1,2	-	-
<i>Hspb8</i>	1417014_at	80888	1,3	-	1,8	1,8
<i>Hspb8</i>	1417013_at	80888	1,8	2,2	2,1	2
<i>Id1</i>	1425895_a_at	15901	2,1	2,1	1,4	1,3
<i>Id2</i>	1435176_a_at	15902	-	-	-1,8	-1,6
<i>Id3</i>	1416630_at	15903	1,6	1,5	-	-
<i>Id4</i>	1423259_at	15904	2,9	3,3	1,3	1,2
<i>Id4</i>	1450928_at	15904	3	3	-	-
<i>Id4</i>	1423260_at	15904	2	1,4	-	-
<i>Ier5</i>	1417612_at	15939	1,5	1,4	-	-
<i>Ifi35</i>	1459151_x_at	70110	-	-	1,2	1,4
<i>Ifi35</i>	1424617_at	70110	-	-	1	1,1
<i>Ifi35</i>	1445897_s_at	70110	1,4	1	-	-
<i>Ifih1</i>	1426276_at	71586	-	-	1	1,2
<i>Ifit1</i>	1450783_at	15957	-	-	2,4	2,6
<i>Ifit2</i>	1418293_at	15958	-	-	1,5	2,2
<i>Ifit3</i>	1449025_at	15959	-	-	1,7	1,9
<i>Igfbp3</i>	1423062_at	16009	-	-	-1,5	-1,3
<i>Igfbp3</i>	1458268_s_at	16009	-	-	-1,5	-1,3
<i>Igfbp4</i>	1437405_a_at	16010	1	-	-	-
<i>ligp1</i>	1419043_a_at	60440	-	-	-1,5	-1
<i>lldr1</i>	1423276_at	106347	1,3	-	-	-
<i>Inhbb</i>	1426858_at	16324	2,1	1,8	2,9	2,3
<i>Ints8</i>	1431096_at	72656	-	1	-	-
<i>Irx3</i>	1418517_at	16373	1,7	-	-	-
<i>Itpkb</i>	1435272_at	68660	-	-	1,2	1,3
<i>Itpkc</i>	1454755_at	233011	1	-	1	1
<i>Jag1</i>	1421106_at	16449	1,6	2,1	2,4	1,7

Appendix A: Auflistung der in den Microarrays durch Notch1 regulierten Gene und ESTs

Gen	Affymetrix ID	Locus Link	Ektoderm	Mesoderm		
			begünstigend	begünstigend	Mesoderm	
<i>Jag1</i>	1434070_at	16449	2,1	1,8	2,2	2
<i>Jun</i>	1417409_at	16476	-	-	1,1	1,1
<i>Jun</i>	1448694_at	16476	-	-	1	1,2
<i>Kalrn</i>	1457899_at		-	-	2,1	2
<i>Kalrn</i>	1442554_s_at		1,4	-	1,8	1,5
<i>Kalrn</i>	1429796_at	72378	2,8	2,4	1,8	1,8
<i>Kif21a</i>	1455029_at	16564	-	-	-1	-1,4
<i>Kitl</i>	1415854_at	17311	-	-	5	1,7
<i>Kitl</i>	1448117_at	17311	-	-	1,7	1,3
<i>Kitl</i>	1415855_at	17311	1,4	1,4	1,4	1,4
<i>Klf10</i>	1416029_at	21847	-	-	-1	-1
<i>Klf12</i>	1455521_at	72598	1,2	-	-	-
<i>Krt1-19</i>	1417156_at	16669	1	-	-	-
<i>Krtdap</i>	1434227_at		-	-	3,1	3,1
<i>Lama1</i>	1418153_at	16772	1,4	1	-	-
<i>Lfng</i>	1420643_at	16848	-	-	2,3	1,6
<i>Loxl1</i>	1451978_at	16949	-	1	-	-
<i>Lpin2</i>	1452836_at	64898	1	-	-	-
<i>Lrig1</i>	1449893_a_at	16206	1,9	2,3	1,2	1,1
<i>Lrig1</i>	1434210_s_at	67582	2,4	1,8	1,4	1,1
<i>Mark1</i>	1425511_at	226778	-	-	1,6	1,4
<i>Mark1</i>	1425510_at	98697	-	-	1,4	1,2
<i>Mark1</i>	1449630_s_at	98697	-	-	1,3	1,5
<i>Mbtps2</i>	1437495_at	270669	1,1	-	-	-
<i>Mbtps2</i>	1436883_at	270669	1	-	-	-
<i>Mcam</i>	1416357_a_at	84004	1,2	1	-	-
<i>Mcpt-ps1</i>	1427755_at	17223	-	-	2,8	3,4
<i>Mef2d</i>	1437300_at	17261	1,6	-	-	-
<i>Mef2d</i>	1434487_at	17261	1,6	1,4	-	-
<i>Mest</i>	1423294_at	17294	-	-	1,1	1
<i>Mfap3l</i>	1428804_at	71306	-	-	-1,2	-1
<i>Mgst1</i>	1415897_a_at	56615	-	-	1,8	1,9
<i>Mical1</i>	1456439_x_at	171580	1	1,1	-	-
<i>Mirg</i>	1440097_at	373070	1,2	-	-	-
<i>Mizf</i>	1440255_at	102423	1,1	-	-	-
<i>Mnt</i>	1418192_at	17428	-	-	-1	-1
<i>Mpz1l</i>	1428167_a_at	68481	1,2	-	-	-
<i>Mrg1</i>	1417129_a_at	17536	1,3	-	-	-
<i>Msn</i>	1450379_at	17698	-	1	-	-
<i>Mtmr4</i>	1459874_s_at		1	-	-	-
<i>Mtss1</i>	1424826_s_at	211401	-	-	-1,1	-1,1
<i>Mtss1</i>	1434036_at	211401	-	-	-1,2	-1,1
<i>Mum1l1</i>	1455238_at	245631	1,4	-	-	-
<i>Myf5</i>	1420757_at	17877	-	-	2,6	1,8
<i>Myo1b</i>	1448989_a_at	17912	-	-	1	1,1

Appendix A: Auflistung der in den Microarrays durch Notch1 regulierten Gene und ESTs

Gen	Affymetrix ID	Locus Link	Ektoderm	Mesoderm	
			begünstigend	begünstigend	Mesoderm
<i>Myo1b</i>	1448990_a_at	17912	1,1	-	-
<i>Myo1b</i>	1459679_s_at	17912	1,2	1,1	-
<i>Myo1b</i>	1427450_x_at	17912	1,1	1	-
<i>Nanog</i>	1429388_at	71950	1,1	-	-
<i>Ndrgr1</i>	1423413_at	17988	-	-	-1 -1,1
<i>Ndrgr1</i>	1450976_at	17988	-	-	-1,1 -1,2
<i>Ndrgr1</i>	1456174_x_at	17988	-	-	-1,5 -1,6
<i>Ndr1</i>	1420760_s_at	17990	-	-	-1 -1,1
<i>Nes</i>	1449022_at	18008	-	-	1,6 1,7
<i>Nfxl1</i>	1417145_at	100978	1,1	-	-
<i>Ngfr</i>	1454903_at	18053	1,1	-	-
<i>Nhsl1</i>	1426934_at	215819	1,3	1,2	1,4 1,5
<i>Nkx1-2</i>	1422050_at	20231	-	-	-1,2 -1
<i>Nodal</i>	1422057_at	18119	-	-	1 1,3
<i>Nope</i>	1416473_a_at	56741	-	-	-1,1 -1,1
<i>Notch1</i>	1418634_at	18128	1,6	1,5	2 2,1
<i>Notch1</i>	1418633_at	18128	1,6	1,1	1,9 2,1
<i>Nrarp</i>	1417985_at	67122	4,1	4,3	3,6 2,9
<i>Nrarp</i>	1417986_at	67122	3,9	4,3	3,7 3,4
<i>Nrip1</i>	1434384_at	108849	1,1	-	-
<i>Nrip1</i>	1449089_at	268903	1	-	-
<i>Nt5e</i>	1428547_at	23959	1	-	-
<i>Ntn1</i>	1454974_at	268425	1,4	1,2	-
<i>Nuak1</i>	1438684_at		1	-	-
<i>Nuak2</i>	1429049_at	74137	1,3	1,2	1,8 1,4
<i>Nupr1</i>	1419665_a_at	56312	1,1	-	-
<i>Nxn</i>	1422465_a_at	18230	1,1	-	-
<i>Oaz2</i>	1426764_at	18247	1,5	1,3	-
<i>Oaz2</i>	1426763_at	18247	1,4	1,3	-
<i>Ogt</i>	1425517_s_at	108155	-	1	-
<i>Osmr</i>	1418674_at	18414	-	-	2,1 1,5
<i>Pacsin1</i>	1449381_a_at	23969	1,9	-	-
<i>Pax6</i>	1419271_at	18508	1,7	1,4	-
<i>Pcdh18</i>	1422889_at	73173	-	-	-1 -1
<i>Pcdh7</i>	1437442_at	54216	-	-	-1,1 -1,1
<i>Pcdh8</i>	1417051_at	18530	2,1	1,8	-
<i>Pcdh8</i>	1447825_x_at	18530	2,4	1,7	-
<i>Pcdhal-12/Pcdhac1+2</i>	1420798_s_at	116731	-	-	1,7 2,8
<i>Pdgfb</i>	1450414_at	18591	-	-	2,4 2,9
<i>Pdgfb</i>	1450413_at	18591	-	-	1,7 1,9
<i>Pdgfrb</i>	1436970_a_at	18596	1,6	1,6	-
<i>Pea15</i>	1416406_at	18611	-	1	-
<i>Pel1</i>	1431061_s_at	67245	-	1	-
<i>Phc2</i>	1416048_at	54383	1	-	-
<i>Phc2</i>	1437239_x_at	54383	1,1	1	-



Appendix A: Auflistung der in den Microarrays durch Notch1 regulierten Gene und ESTs

Gen	Affymetrix ID	Locus Link	Ektoderm	Mesoderm		
			begünstigend	begünstigend	Mesoderm	
<i>Phlda2</i>	1417837_at	22113	1,3	1,3	1,2	1,1
<i>Pik3cd</i>	1422992_s_at	18707	2,1	1,9	1,8	1,3
<i>Pik3cd</i>	1453281_at	18707	2,3	1,7	1,6	1,5
<i>Pja1</i>	1452083_a_at	18744	1,3	-	-	-
<i>Pja1</i>	1426448_at	18744	-	1,1	-	-
<i>Plat</i>	1415806_at	18791	1	1	-	-
<i>Plekhg1</i>	1435363_at	213783	1,4	-	-	-
<i>Plekhg2</i>	1418201_at	101497	1,8	1,6	-	-
<i>Plekhg6</i>	1425073_at		-	-	1	1,4
<i>Plscr1</i>	1453181_x_at	22038	1	-	-	-
<i>Plscr1</i>	1429527_a_at	22038	1,1	-	-	-
<i>Pmaip1</i>	1418203_at	58801	1,1	-	-	-
<i>Pnrc2</i>	1416186_at	52830	1,3	-	-	-
<i>Pnrc2</i>	1416187_s_at	52830	1	-	-	-
<i>Pou3f1</i>	1460038_at		-	-1,1	-	-
<i>Ppard</i>	1439797_at	19015	-	-	1	1
<i>Ppargc1b</i>	1449945_at	170826	1,1	-	1,6	2,1
<i>Ppfibp2</i>	1417801_a_at	19024	1,2	1	-	-
<i>Prdm1</i>	1420425_at	12142	-	-	-1,1	-1,3
<i>Prickle1</i>	1452249_at	106042	2,6	2,6	-	-
<i>Prkch</i>	1434248_at	18755	-	-	2,2	1,9
<i>Prkch</i>	1422079_at	18755	-	-	2	2
<i>Prom1</i>	1419700_a_at	19126	1	-	-	-
<i>Prpf38b</i>	1452869_at	66921	1	-	-	-
<i>Ptges</i>	1449449_at	64292	1,3	-	2,8	1,9
<i>Ptges</i>	1449450_at	64292	2	1,9	2,8	2,2
<i>Ptges</i>	1439747_at	64292	1,9	1,9	2,6	1,5
<i>Ptgs1</i>	1436448_a_at	19224	-	-	-1,4	-1,3
<i>Ptgs2</i>	1417262_at	19225	-	-	1,6	1,7
<i>Ptgs2</i>	1417263_at	19225	-	-	1,1	1,5
<i>Pus7l</i>	1428800_a_at	78895	1,1	-	-	-
<i>Pvrl3</i>	1423331_a_at	58998	1	-	-	-
<i>Pvrl3</i>	1448673_at	58998	1	-	-	-
<i>Ralb</i>	1435517_x_at	64143	1,4	-	-	-
<i>Raph1</i>	1434302_at	77300	-	-	-1,4	-1,5
<i>Rasa3</i>	1415850_at	19414	1,2	-	1,6	1,4
<i>Rbm16</i>	1455310_at		1,1	-	-	-
<i>Rcsd1</i>	1424194_at	226594	1,1	-	2,3	2,7
<i>Rerg</i>	1451236_at	232441	-	-	1,3	1,7
<i>Rgs3</i>	1425701_a_at	50780	1,2	-	1,1	1,4
<i>Rgs3</i>	1425296_a_at	50780	1,6	1,4	1	1
<i>Rgs5</i>	1420941_at	19737	-	-	1,7	1,5
<i>Rhou</i>	1449028_at	69581	1,3	1,2	-	-
<i>Rhou</i>	1449027_at	69581	1,4	1,1	-	-
<i>Rhov</i>	1424976_at	228543	-	-	4,4	4,3

Appendix A: Auflistung der in den Microarrays durch Notch1 regulierten Gene und ESTs

Gen	Affymetrix ID	Locus Link	Ektoderm	Mesoderm	
			begünstigend	begünstigend	Mesoderm
<i>Ric8b</i>	1435096_at	237422	1,1	-	-
<i>Rims2</i>	1422809_at	116838	1,1	-	-
<i>Ripk4</i>	1418487_at	72388	1,3	1,3	-
<i>Ripk4</i>	1418488_s_at	72388	1,5	1,1	-
<i>Rnd1</i>	1455197_at	223881	-	-	2,2 2,4
<i>Rnd3</i>	1416700_at	74194	1,5	1,2	-
<i>Rnd3</i>	1416701_at	74194	1,3	1	-
<i>Rnf12</i>	1439403_x_at	30929	1,3	-	-
<i>Rnf12</i>	1443167_at		1,2	-	-
<i>Rnf12</i>	1417250_at	30929	1,3	1	-
<i>Rnf122</i>	1454857_at	68867	-	-	1,4 1,6
<i>Runx1</i>	1422864_at	12394	-	-	1,5 1
<i>S100a13</i>	1418704_at	20196	1,4	-	1,3 1,5
<i>Sbk1</i>	1451190_a_at	104175	-	-	-1,7 -1,3
<i>Scel</i>	1422837_at	64929	3,1	2,5	1,6 1,7
<i>Scml2</i>	1456984_at	107815	-	-	-1,1 -1
<i>Scotin</i>	1423986_a_at	66940	1,1	-	-
<i>Scotin</i>	1437503_a_at	66940	1,1	-	-
<i>Sdc1</i>	1437279_x_at	20969	1	-	-
<i>Sdc4</i>	1448793_a_at	20971	1	-	1 1,1
<i>Sema3c</i>	1429348_at	20348	-	-	-1,2 -1,7
<i>Sept11</i>	1429233_at	52398	1	-	-
<i>Sept8</i>	1426801_at	20362	1,4	1,2	-
<i>Serpine1</i>	1419149_at	18787	-	-	1,3 2
<i>Sgpl1</i>	1415892_at	20397	1,1	-	-
<i>Sgpl1</i>	1415893_at	20397	-	1,4	-
<i>Sh3gl2</i>	1418792_at	20404	-	-	1,8 1,5
<i>Sh3gl2</i>	1418791_at	20404	-	-	1,5 1,2
<i>Sh3gl2</i>	1449228_at	20404	-	-	1,5 1
<i>Sh3px3</i>	1434361_at	235406	-	-	1 1,1
<i>Shc4</i>	1457118_at		-	-	1,2 1,2
<i>Shrm</i>	1422629_s_at	27428	1	-	-
<i>Sipa1l2</i>	1434261_at	244668	1,2	-	-
<i>Slc12a7</i>	1449011_at	20499	1,6		1,2 1
<i>Slc12a7</i>	1418257_at	20499	1,2		1,3 1
<i>Slc19a2</i>	1426117_a_at	116914	-	1	-
<i>Slc23a2</i>	1417329_at	54338	1,1	1,1	-
<i>Slc26a2</i>	1443882_at		1,2	-	-
<i>Slc2a3</i>	1427770_a_at	20527	-	1	-
<i>Slc33a1</i>	1423621_a_at	11416	1	-	-
<i>Slc35b4</i>	1416550_at	58246	-	1,2	-
<i>Slc35b4</i>	1416548_at	58246	1,3	1,2	-
<i>Slc35b4</i>	1416549_at	58246	1	1,1	-
<i>Slc40a1</i>	1417061_at	53945	-	-	-1,2 -1,4
<i>Slc9a1</i>	1417397_at	20544	1	-	-

Appendix A: Auflistung der in den Microarrays durch Notch1 regulierten Gene und ESTs

Gen	Affymetrix ID	Locus Link	Ektoderm	Mesoderm		
			begünstigend	begünstigend	Mesoderm	
<i>Slco4a1</i>	1438160_x_at	108115	1,5	1	1,3	1,1
<i>Slfn9</i>	1436472_at		1,6	-	-	-
<i>Smarca1</i>	1460292_a_at	93761	1	-	-	-
<i>Snai1</i>	1448742_at	20613	-	-	1,2	1,2
<i>Socs7</i>	1434834_at	69676	1	-	-	-
<i>Sox4</i>	1449370_at	20677	-	-	1	1,1
<i>Sox9</i>	1451538_at	20682	-	-	2,7	3,2
<i>Spib</i>	1460407_at	272382	-	-	2,7	2,4
<i>Spl3</i>	1423658_at	74585	1,1	1	-	-
<i>Spsb1</i>	1449752_at	74646	-	-	1	1
<i>Spsb1</i>	1420150_at	74646	1,8	1,8	1,8	2
<i>Spsb1</i>	1428472_at	74646	-	1,1	1,2	1,5
<i>Spsb4</i>	1451418_a_at	211949	1,8	1,7	-	-
<i>Spsb4</i>	1451419_at	211949	1,8	1,3	1,5	1,5
<i>Srd5a1</i>	1454649_at	78925	1,6	1	-	-
<i>St8sia4</i>	1419186_a_at	20452	-	-	-1,4	-1,3
<i>St8sia6</i>	1456440_s_at	241230	-	-	2,3	1,5
<i>St8sia6</i>	1456147_at	241230	-	-	1,8	1,3
<i>Stat1</i>	1440481_at	20846	-	-	2,7	1,4
<i>Stat1</i>	1420915_at	20846	-	-	1,5	1,7
<i>Stat1</i>	1450034_at	20846	-	-	1,5	1,8
<i>Stat1</i>	1450033_a_at	20846	-	-	1,3	1,8
<i>Stat2</i>	1450403_at	20847	-	-	1	1,1
<i>Stc2</i>	1449484_at	20856	-	-	-1	-1,2
<i>Stx6</i>	1460004_x_at	58244	1	-	-	-
<i>Suhw3</i>	1427983_at	208968	1	-	-	-
<i>Syde2</i>	1437424_at	214804	-	-	-1,1	-1,1
<i>Tacc2</i>	1425745_a_at	57752	1	-	-	-
<i>Tbl1x</i>	1434644_at	21372	-	1,1	-	-
<i>Tead2</i>	1448519_at	21677	1	-	-	-
<i>Tec</i>	1460204_at	21682	2,4	2,5	1,7	1,6
<i>Tenc1</i>	1452264_at	209039	2,7	3,3	2,9	2,8
<i>Tgm2</i>	1417500_a_at	21817	-	-	2,8	2,8
<i>Tgm2</i>	1437277_x_at	21817	-	-	2,8	2,6
<i>Tgm2</i>	1455900_x_at	21817	-	-	2,7	2,6
<i>Tgm2</i>	1433428_x_at	21817	1	-	2,6	2,7
<i>Tgtp</i>	1449009_at	21822	-	-	2,1	1,8
<i>Tle3</i>	1449554_at	21887	-	-	1	1
<i>Tle3</i>	1419654_at	21887	1	-	-	-
<i>Tle3</i>	1419655_at	21887	1,4	1	-	-
<i>Tmbim1</i>	1417162_at	69660	1,1	-	-	-
<i>Tmem24</i>	1428095_a_at	71764	1,6	1,3	-	-
<i>Tmem51</i>	1424383_at	214359	1,7	1,6	-	-
<i>Tmem90a</i>	1438355_at		-	-	2,8	2,1
<i>Tmem90a</i>	1458342_at		-	-	2,2	1,5

Appendix A: Auflistung der in den Microarrays durch Notch1 regulierten Gene und ESTs

Gen	Affymetrix ID	Locus Link	Ektoderm	Mesoderm		
			begünstigend	begünstigend	Mesoderm	
<i>Tmod3</i>	1438556_a_at	50875	1	-	-	-
<i>Tnfaip2</i>	1416273_at	21928	-	-	1,9	2
<i>Tnfaip2</i>	1438855_x_at	21928	2	1,8	2,2	2,1
<i>Tnfaip8</i>	1416950_at	106869	1,1	1,2	-	-
<i>Tob2</i>	1448667_x_at	57259	1	-	-	-
<i>Trim30</i>	1417961_a_at	20128	-	-	1,4	1,6
<i>Trim30</i>	1451860_a_at	20128	-	-	1,1	1,7
<i>Trim30 /// AI451617</i>	1456494_a_at	20128	-	-	1	1,2
<i>Trim59 /// LOC630539</i>	1431430_s_at	72558	-	1	-	-
<i>Trim63</i>	1438704_at		1,1	-	-	-
<i>Trim8</i>	1418577_at	93679	1,2	-	-	-
<i>Trpc1</i>	1421096_at	22063	-	-	1	1
<i>Tsc22d1</i>	1454758_a_at	21807	1	-	-	-
<i>Tspan17</i>	1455642_a_at	74257	1,2	-	-	-
<i>Tuft1</i>	1416689_at	22156	-	-	1,5	1,1
<i>Txndc13</i>	1453120_at	52837	1	-	-	-
<i>Ube2a</i>	1417609_at	22209	1,2	-	-	-
<i>Unc119</i>	1418123_at	22248	1	-	-	-
<i>Unc5b</i>	1453269_at	107449	1,2	-	-	-
<i>Unc5b</i>	1435110_at	107449	1	-	-	-
<i>Ung2</i>	1455114_at	218630	-	-	-1	-1,3
<i>Usp18</i>	1418191_at	24110	-	-	2	2,1
<i>Vasn</i>	1455812_x_at	246154	1,4	1,2	-	-
<i>Vav3</i>	1417122_at	57257	-	-	1,6	1
<i>Vcam1</i>	1448162_at	22329	-	-	2,9	4,2
<i>Vcam1</i>	1415989_at	22329	-	-	1,5	1
<i>Wdr40b</i>	1454869_at	245404	1,1	-	-	-
<i>Wdr40b</i>	1434170_at	245404	1	-	-	-
<i>Wfdc2</i>	1424351_at	67701	1,3	1,1	1,6	1,5
<i>Wisp1</i>	1448593_at	22402	1,5	1,6	1,7	1,5
<i>Wisp1</i>	1448594_at	22402	1,4	1,2	1,6	1,8
<i>Wnt4</i>	1450782_at	22417	1,3	-	1,4	1,2
<i>X99384</i>	1448134_at	27355	1,2	1	1,2	1,5
<i>Zbtb33</i>	1434022_at	56805	1	-	-	-
<i>Zbtb34</i>	1436085_at		1,1	-	-	-
<i>Zfp148</i>	1418381_at	22661	1,2	-	-	-
<i>Zfp180</i>	1428170_at	210135	1,3	-	-	-
<i>Zfp238</i>	1417010_at	30928	1,1	-	-	-
<i>Zfp36</i>	1452519_a_at	22695	1,1	-	1,2	1
<i>Zfp383</i>	1453212_at	73729	1,3	1	-	-
<i>Zfp426</i>	1451997_at	235028	-	1	-	-
	1417466_at	19737	-	-	1,2	1,3
---	1434156_at	268451	-	-	1	1,1
---	1441687_at		2,1	-	1,4	1,5
---	1450024_at	24069	1,2	-	-	-

Appendix A: Auflistung der in den Microarrays durch Notch1 regulierten Gene und ESTs

Gen	Affymetrix ID	Locus Link	Ektoderm	Mesoderm	
			begünstigend	begünstigend	Mesoderm
---	1424915_s_at	217732	1	-	-
---	1437321_at		-	1,1	-
---	1450113_at	56217	-	1	-
---	1456700_x_at	17118	1	-	-
---	1436287_at		1,4	1,2	1,3
---	1456752_at		1,1	-	-
---	1436359_at		-	-	1,3
---	1456552_at		-	-	1,9
---	1444524_at		-	-	1,2
---	1456861_at		-	-	1,2
---	1442917_at		1	-	-
---	1452287_at		1,6	1,1	-
---	1439794_at		-	1,3	-
1110014F24Rik	1428781_at	73712	1,8	-	1,9
1110067D22Rik	1451313_a_at	216551	1,2	-	-
1200007D18Rik	1437908_a_at	67458	1	-	-
1600029D21Rik	1423933_a_at	76509	1,3	-	-
1700020C11Rik	1424223_at	67900	1	-	-
2310007O11Rik	1436446_at	74177	1	-	-
2310010G23Rik	1429895_at	69591	1,1	1,3	-
2310030G06Rik	1449357_at	66952	2,2	1,8	-
2310044G17Rik	1424913_at	217732	-	1,2	-
2310066E14Rik	1424239_at	75687	1,1	-	-
2610204M08Rik	1436216_s_at	70435	1	-	-
2610528J11Rik	1450947_at	66451	1,1	-	-
2900052N01Rik	1436231_at	73040	-	-	4,8
2900093B09Rik	1419118_at	58188	-	-	1,5
4631426J05Rik	1452092_at	77590	-	-	-1,4
4632404H22Rik	1452682_at	78755	1,2	-	-
4732473B16Rik	1433877_at	100342	-	-	1,3
4921524J17Rik	1454136_a_at	66714	1,3	1,2	-
4930422I07Rik	1458491_at		-	1,3	-
4930538D17Rik	1438561_x_at		1,2	-	-
4933427D14Rik	1433998_at	74477	1,2	1	-
4933433K01Rik	1438493_at	194908	-	1	-
5133401H06Rik	1428663_at	71305	2,8	3,3	1,6
5430432M24Rik	1453768_a_at	73847	-	1,3	-
5730410I19Rik	1433479_at	66622	-	1,2	-
5730438N18Rik	1424211_at	70556	1,2	1,1	-
6330530A05Rik	1434094_at	230678	1,7	1,1	-
6330534C20Rik	1437936_at		1,5	1,5	-
6430514L14Rik	1425213_at	76886	1	-	-
6530403A03Rik	1423633_at	67797	1	-	-
6720401G13Rik	1435744_at	103012	1,2	-	-
6720401G13Rik	1438916_x_at	319617	1,5	1,1	-

*Appendix A: Auflistung der in den Microarrays durch Notch1 regulierten Gene und ESTs*

Gen	Affymetrix ID	Locus Link	Ektoderm	Mesoderm	
			begünstigend	begünstigend	Mesoderm
9030409G11Rik	1431711_a_at	71529	1,3	-	-
9030409G11Rik	1434169_at	71529	1,3	-	-
9230117N10Rik	1416200_at	77125	2,4	1,7	1,4 1,8
9530066K23Rik	1441909_s_at		-	-	1,9 1,2
9630058J23Rik	1436795_at	226744	1,1	-	-
9830147J24Rik	1425156_at	229900	-	-	1 1,1
A830058L05Rik	1457566_at	210503	-	-	-1,5 -1,5
A930024E05Rik	1440206_at	109202	-	-	-1 -1,2
AA536743	1452359_at	100532	1,2	-	1,2 1
AA536743	1427243_at	100532	1	1	1,1 1
AI427122	1460406_at	102502	1,5	1,1	- -
AI427138	1455604_at	14367	1	-	- -
AI429294	1458407_s_at	224829	-	-	-1,6 -1,3
AI467606	1433465_a_at	101602	1	-	- -
AI467606	1433466_at	101602	1	-	- -
AI848100	1460573_at	226551	1,1	-	- -
AI848100	1455133_s_at	226551	1	-	- -
AI848100	1427430_at	226551	-	1,1	- -
AI987944	1455914_at	233168	-	1,1	- -
AV025504	1433898_at	67554	1	-	- -
AW011738	1456164_at	100382	-	-	2,5 2,5
AW548124	1454838_s_at	106522	-	-	-1,7 -1,1
B230333C21Rik	1457265_at	245380	1,3	1	- -
B430119L13Rik	1435648_at	320974	1,9	1,7	- -
BB114106	1439527_at		-	-	-1 -1
BC050188	1438872_at	244448	1	-	- -
BC055107	1434202_a_at	268709	-	-	-1,5 -1,3
BE136769	1418734_at	15006	-	-	-1 -1,1
C230093N12Rik	1426894_s_at	98952	1,4	1,2	- -
C330012H03Rik	1439764_s_at	319765	1	-	- -
C79267	1435455_at		1,2	-	- -
C920006C10Rik	1416131_s_at	76740	1	-	- -
D030029J20Rik	1437885_at	99324	1,1	-	- -
D12Ertd553e	1454806_at	76820	1,6	-	- -
D130058I21Rik	1455794_at	276829	1,1	1	- -
D330050I23Rik	1434301_at	320469	2,4	-	- -
D4Ertd429e	1438010_at	230917	1	-	- -
E130309D02Rik	1456585_x_at	231868	1	-	- -
E430014L09Rik	1435981_at		1,3	-	1,3 1,6
LOC677168	1431591_s_at	53606	-	-	1,6 1,5

## Appendix B: Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
<i>Adm</i>	Adrenomedullin
bHLH	basisches Helix-Loop-Helix-Protein
βME	β-Mercaptoethanol
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovines Serumalbumin
CADASIL	Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarction and leukoencephalopathy
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
CD	Cluster of Differentiation
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
CHX	Cycloheximid
CSL	CBF1 – Supressor of Hairless - LAG
d	Tag
Da	Dalton
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSL	Delta, Serrate und LAG-2
<i>Efna</i>	Ephrin A
<i>Efnb</i>	Ephrin B
EGF	Epidermal Growth Factor
<i>Epha</i>	Ephrin Rezeptor A
ERT2	Hormonbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors α (OHT-sensitive Mutante)
ESC	embryonic stem cell (Embryonale Stammzelle)
EST	Expressed Sequence Tag
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
<i>Fgf</i>	Fibroblast growth factor
Flk-1	Fetal liver kinase 1
<i>Hes</i>	Hairy and Enhancer of Split
<i>Hey</i>	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif
HMG	High mobility group
<i>Hmgn</i>	High mobility group nucleosomal binding domain
<i>Hsp</i>	Heat shock protein
ICM	Inner cell mass
<i>Id</i>	Inhibitor of DNA-binding/differentiation
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
JAK-STAT	Janus Kinase – Signal transducers and activators of transcription
<i>KitL</i>	Kit Ligand
LIF	Leukemia inhibitory factor
<i>Lfng</i>	Lunatic fringe
LNR	LIN12/Notch-repeats
<i>Mnt</i>	Max binding protein
<i>Myf</i>	Myogenic factor
n. e.	nicht bzw. nicht nachweisbar exprimiert
<i>Nes</i>	Nestin
NERT	Fusionsprotein des intrazellulären Teils von murinem Notch1 und der Hormonbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors
NLS	Kernlokalisationssequenz
n. u.	nicht untersucht
<i>Oct</i>	Octamer factor
OHT	4-Hydroxy-Tamoxifen
OPA	Glutamin-reich
<i>Pax</i>	paired box gene
PBS	Phosphate buffered saline



PEST	Prolin-Glutamin-Serin-Threonin-reich
<i>Polr2f</i>	DNA-dirigierte RNA Polymerase II, Polypeptid F
<i>Prom</i>	Prominin
PRR	Prolin-reiche Region
PSM	präsomitisches Mesoderm
RBP-J $\kappa$	Recombination recognition sequence binding protein at the J $\kappa$ site
RTK	Rezeptor Thyrosin Kinase
<i>Runx</i>	Runt related transcription factor
SLR	Signal Log Ratio
SOP	Sensory Organ Precursor
<i>Sox</i>	SRY-box containing gene
TACE	Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
Upm	Umdrehungen pro Minute
<i>Vcam</i>	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
<i>Wisp</i>	WNT1 inducible signaling pathway protein
<i>Wnt</i>	wingless-related MMTV integration site

## Appendix C: Publikation

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Schroeder, T., F. Meier-Stiegen, R. Schwanbeck, H. Eilken, S. Nishikawa, R. Hasler, S. Schreiber, G.W. Bornkamm, und U. Just. 2006. Activated Notch1 alters differentiation of embryonic stem cells into mesodermal cell lineages at multiple stages of development. *Mech Dev.* 123:570-9.

## Lebenslauf

Name	Franziska Meier-Stiegen
Geburtsdatum und -ort	13. Juli 1980, Rosenheim
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

## Schulbildung

1986-1989	Grundschule Wasserburg am Inn
1989-1990	Grundschule Handorf
1990-1991	Orientierungsstufe Bardowick
1991-1999	Luitpold-Gymnasium Wasserburg am Inn
25. Juni 1999	Erhalt der allgemeinen Hochschulreife

## Universitäre Ausbildung

WS 1999/2000 – SS 2001	Studium der Biologie/Diplom an der Philipps-Universität Marburg
WS 2000/2001 – SS 2001	Studium der Humanbiologie/Diplom an der Philipps-Universität Marburg
28. September 2001	Erhalt des Vordiploms der Philipps-Universität Marburg in Biologie
WS 2001/2002 – SS 2004	Studium der Biologie/Diplom an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
3. November 2003 – 30. Juli 2004	Diplomarbeit am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg, Abteilung für Immunologie bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Fleischer
26. August 2004	Erhalt des Grades „Diplom-Biologin univ.“ der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
WS 2004/2005 – SS 2006	Studium der Biologie/Promotion an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
seit 15. Oktober 2004	Durchführung des praktischen Teils der Promotionsarbeit am Institut für Biochemie in der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Verantwortlicher Betreuer ist Prof. Dr. S. Rose-John

## Danksagung

Prof. Dr. Stefan Rose-John möchte ich ganz besonders sowohl für die Übernahme des Referats als auch für die freundliche Aufnahme im Biochemischen Institut danken.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Ursula Just für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Für Diskussionen rund um die Stammzellen im Allgemeinen und Notch im Besonderen möchte ich mich ebenso bedanken wie für die Einführung in den praktischen Umgang mit diesen Zellen sowie wertvolle fachliche Ratschläge.

Vielen Dank an Prof. Dr. Matthias Leippe für die Übernahme des Korreferats.

Ein ganz besonderer Dank geht an Prof. Dr. Martin Zenke, Dr. Thomas Hieronymus und David Ruau von der RWTH Aachen für die Betreuung der *Microarray*-Versuche, die Tipps zu deren Auswertung und das für Nachfragen stets offene Ohr. Ebenso möchte ich mich bei Beate Kratz von der Chip-Facility für das Hybridisieren und Färben der *Microarrays* bedanken.

Dr. Timm Schroeder und Hanna Eilken von der GSF Neuherberg möchte ich für die freundliche Kooperation und Zusammenarbeit danken.

Vielen Dank an Dr. Robert Häsler und Dorina Oelsner vom Institut für Klinische Molekularbiologie für die Hilfe bei der Nutzung der *Real-Time PCR*.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an alle Mitglieder der „Stammzell- und Hefegruppe“ für das angenehme Arbeitsklima während der letzten drei Jahre. Besonders danken möchte ich Dr. Ralf Schwanbeck für die Tipps zum Umgang mit Excel und *Real-Time PCR* sowie Silke Horn für Unterstützung in der Zellkultur.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Franziska Meier-Stiegen, an Eides statt, die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer, selbstständig und nur mit den hier angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Die vorliegende Abhandlung wurde bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt. Teilergebnisse der Arbeit wurden bereits veröffentlicht (siehe Appendix C).

Darüber hinaus erkläre ich, kein weiteres Promotionsvorhaben ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Kiel, den 13.12.2007

Franziska Meier-Stiegen