

Molekulare Mechanismen der Aktivierung von Zielgenen
durch Notch1

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

vorgelegt von

Kristina Bernoth

Kiel, 2012

Erste/r Gutachter/in: Prof. Dr. U. Just

Zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. T. Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2012

Zum Druck genehmigt: Kiel, 19.12.2012

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung der Arbeit.....	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Summary.....	2
2. Einleitung	3
2.1 Frühe Embryogenese der Maus	3
2.2 Murine embryonale Stammzellen.....	6
2.3 Chromatin und epigenetische Regulation.....	7
2.3.1 Chromatin-Struktur	7
2.3.2 Histon-Modifikationen.....	8
2.3.3 DNA-Methylierung.....	11
2.3.4 Chromatin-Remodellierung	11
2.4 Notch	12
2.4.1 Notch-Rezeptoren	12
2.4.2 Liganden von Notch.....	13
2.4.3 Der klassische Notch Signalweg.....	14
2.4.4 Der RBP-J-Repressor-Komplex.....	15
2.4.5 Der RBP-J-Aktivator-Komplex	16
2.4.6 Regulation des Notch Signalweges.....	17
2.4.7 Funktionen von Notch1.....	18
2.5 Konditionelle Aktivierung von Notch1 mithilfe des NERT-Konstruktes	19
2.6 Die Rolle von Histon-Modifikationen an regulatorischen Regionen von Notch-Zielgenen	20
2.7 Fragestellung der Arbeit	22
3. Material und Methoden	24
3.1 Material.....	24
3.1.1 Zelllinien	24

3.1.2 Reagenzien	25
3.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	27
3.1.3.1 Geräte	27
3.1.3.2 Verbrauchsmaterialien.....	28
3.1.4 Kits	28
3.1.5 Assays für die <i>Real-Time-PCR</i>	29
3.1.6 Primer für die ChIP-Analyse	29
3.1.7 Primer zur Einführung von Mutationen	30
3.1.8 Hydrolyse-Sonden.....	31
3.1.9 Plasmide	31
3.1.10 Puffer, Lösungen und Zellkultur-Medien	33
3.1.11 Antikörper	34
3.1.12 Software	35
3.2 Methoden	35
3.2.1 Zellkulturmethoden.....	35
3.2.1.1 Kultur undifferenzierter embryonaler Stammzellen	35
3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von embryonalen Stammzellen	36
3.2.1.3 Neurale Differenzierung von embryonalen Stammzellen	36
3.2.1.4 Mesodermale Differenzierung von embryonalen Stammzellen.....	36
3.2.1.5 Kultur hämatopoetischer Stammzellen	37
3.2.1.6 Mykoplasmen- <i>PCR</i>	37
3.2.1.7 Transfektion	38
3.2.1.8 Luziferase-Reporter- <i>Assay</i>	38
3.2.1.9 Chromatin-Immunopräzipitation.....	39
3.2.1.10 <i>Real-time PCR</i> mit ChIP-Proben.....	39
3.2.2 RNA-Methoden.....	41
3.2.2.1 RNA-Isolierung.....	41

3.2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung	41
3.2.2.3 Kontrolle auf Degradierung	41
3.2.2.4 RNA-Fällung	41
3.2.2.5 cDNA-Synthese	42
3.2.2.6 <i>Real-Time PCR</i>	42
3.2.3 Bakterienkultur	43
3.2.3.1 Bakterienkultivierung	43
3.2.3.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	43
3.2.3.3 Transformation	43
3.2.4 DNA-Techniken	43
3.2.4.1 Extraktion von Plasmiden	43
3.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA	44
3.2.4.3 Restriktionverdau von DNA	44
3.2.4.4 Ligation	44
3.2.4.5 Gelextraktion	44
3.2.4.6 Gezielte Mutagenese	45
3.2.5 Statistische Methoden	45
4. Ergebnisse	46
4.1 Einfluss von Notch1 auf ausgewählte Zielgene in ES-Zellen und während ihrer <i>in vitro</i> Differenzierung	46
4.1.1 Der Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von Transkriptionsfaktoren in ES-Zellen und während der mesodermalen Differenzierung	46
4.1.2 Keine Wirkung von OHT auf die mRNA-Expression von Notch1-Zielgenen in undifferenzierten und mesodermal differenzierten Kontroll-Zellen	55
4.2 RBP-J steuert die Expression von neuen Notch1-Zielgenen	58
4.3 Charakterisierung von RBP-J Bindungsstellen im regulatorischen Bereich von Notch1-Zielgenen	60

4.4 Regulation der Expression von <i>Sox9</i> und <i>Pax6</i> durch Notch1 in ES-Zellen über direkte Bindung an RBP-J Bindungsstellen	66
4.4.1 Verringerung der Notch1 induzierten Expression von <i>Sox9</i> und <i>Pax6</i> nach Mutation der RBP-J Bindungsstellen	67
4.4.2 Regulation der Expression von <i>Sox9</i> durch RBP-J Bindungsstellen 1 und 2 in neural differenzierten Zellen.....	71
4.5 Notch1 beeinflusst den Chromatinstatus des Promotors von Notch1-Zielgenen in embryonalen Stammzellen	73
4.6 Notch1 verändert verschiedene Histon-Modifikationen im Promotor von Notch1-Zielgenen in mesodermalen Vorläuferzellen.....	78
4.7 Kinetik ausgewählter Histon-Modifikationen im Promotor von Notch1-Zielgenen während der Notch1-Aktivierung in embryonalen Stammzellen.....	83
4.7.1 Effekt von Notch1 auf Histon-Modifikationen des <i>Sox9</i> -Promotors in hämatopoetischen Stammzellen.....	88
4.8 Analyse ausgewählter Histon-Modifikationen im Promotor von Notch1-Zielgenen in Abwesenheit von RBP-J.....	90
5. Diskussion	92
6. Literaturverzeichnis.....	110
7. Publikationen.....	120
8. Abkürzungsverzeichnis	121
9. Lebenslauf	123
10. Danksagung.....	124
11. Eidesstattliche Erklärung.....	125

1. Zusammenfassung der Arbeit

1.1 Zusammenfassung

Der Notch-Signalweg ist ein hoch konservierter Zell-Zell-Kommunikationsweg, der von essentieller Bedeutung für die Entwicklung vielzelliger Organismen ist. Er reguliert grundlegende Vorgänge wie Zelllinienentscheidungen, Zelldifferenzierung und Apoptose. Die Signaltransduktion verläuft nach einem vergleichsweise einfachen Schema und kommt ohne sekundäre Botenstoffe aus. Nach Bindung des Liganden wird der Notch-Rezeptor proteolytisch gespalten. Daraufhin transloziert die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors in den Zellkern, wo sie über den Transkriptionsfaktor RBP-J die Transkription von Zielgenen aktiviert. Auf diese Weise wird die Expression einer Vielzahl an Genen in einer sehr zellkontextabhängigen Art und Weise reguliert. Bislang ist immer noch wenig über die molekularen Mechanismen und die Regulation der zellkontextabhängigen Effekte von Notch bekannt. Erste Daten zeigen, dass epigenetische Vorgänge wie die Modifikation der Histone eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription von Notch-Zielgenen spielen. In den Promotorregionen der von uns identifizierten Notch1-Zielgene sind sowohl die aktivierende H3-Trimethylierung von Lysin 4 (H3K4me3) als auch sogenannte bivalente Domänen, also das gleichzeitige Auftreten von aktivierenden (H3K4me3) und reprimierenden (H3K27me3) Modifikationen, vermehrt angereichert. Darüber hinaus konnten wir mehrere potenzielle RBP-J Bindungsstellen in den regulatorischen Bereichen der neu identifizierten Zielgene finden. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels ChIP Analyse gezeigt, dass die Aktivierung von Notch1 in ES-Zellen zu einem Anstieg der H3K4me3 Modifikation und zu einem Rückgang der H3K27me3 Modifikation im Bereich der potenziellen RBP-J Bindungsstellen der direkten Notch1-Zielgene *Hes5*, *Sox9* und *Pax6* kommt. Die Aktivierung des Notch1-Signalweges in ES-Zellen hat somit einen Einfluss auf die bivalenten Domänen im Promotor seiner Zielgene. In mesodermalen Vorläuferzellen konnte weiterhin beobachtet werden, dass die Anwesenheit von H3K4me3 eine essentielle Voraussetzung für die Aktivierbarkeit der Notch1 induzierten Gene zu sein scheint. Außerdem wurde anhand von Luziferase-Reporter-Assays gezeigt, dass die RBP-J Bindungsstellen nahe des Transkriptionsstartpunktes von *Sox9* und *Pax6* in ES-Zellen sowie in neuroektodermalen Vorläuferzellen eine essentielle Rolle während der Induktion durch Notch1 spielen. Dabei kommt es zur Kooperation mehrerer Bindungsstellen abhängig vom Zellkontext.

Die hier präsentierten Ergebnisse geben einen Einblick in die molekularen Mechanismen der Aktivierung von Notch1-Zielgenen in ES-Zellen und den zellkontextabhängigen Einfluss von Histon-Modifikationen auf die Wirkungsweise von Notch1.

1.2 Summary

The Notch signaling pathway is a highly conserved signaling mechanism that plays a pivotal role throughout development of multicellular organisms. Notch signaling influences a wide variety of fundamental processes such as cell fate decisions, differentiation, proliferation and apoptosis. The Notch pathway is remarkably simple without second messengers involved. Upon ligand binding, the Notch intracellular domain (NICD) is cleaved from the cytoplasmic membrane and translocates into the nucleus. Here, it binds to DNA via the adapter protein RBP-J and converts it from a transcriptional repressor into an activator. Notch signaling regulates the expression of genes in a highly cell-context dependent manner. However, little is known about the molecular mechanisms and regulation of the cell-context dependent Notch1 effects. Initial evidence suggests that epigenetic events like histone modification are tightly involved in the control of Notch target gene expression. Recently we have shown that the promoter regions of newly identified Notch1 target genes are marked by an enrichment of H3 trimethylation of Lysine 4 (H3K4me3), an activating modification, and bivalent domains, containing an activating (H3K4me3) and repressing (H3K27me3) modification. Furthermore, several potential RBP-J binding sites were found in the regulatory regions of newly identified Notch target genes. Upon activation of Notch1 signaling in embryonic stem cells (ESC) an increase in H3K4me3 and a decrease in H3K27me3 at the potential RBP-J binding sites in the promoter of direct Notch targets *Hes5*, *Sox9* and *Pax6* was observed. Thus, Notch1 signaling alters epigenetic marks, in particular the bivalent domains at the regulatory regions of its target genes which may promote gene expression. Furthermore, in mesodermal progenitor cells the presence of H3K4me3 seems to be an essential prerequisite for activation of Notch1 target genes. Moreover, an important role for the RBP-J binding sites proximal to the transcriptional start site of *Sox9* and *Pax6* could be revealed for Notch1 mediated upregulation in ESC and neuroectodermal progenitors. It was shown that, depending on the cellular context, the RBP-J binding sites act in a cooperative manner to activate gene expression.

In conclusion, this study reveals important aspects of the molecular mechanisms during Notch1 target gene activation in ESC and of the chromatin control mechanisms, which set the stage for cell-context dependent expression of Notch1 target genes.

2. Einleitung

2.1 Frühe Embryogenese der Maus

Nach der Befruchtung durchläuft die Zygote eine Reihe von Zellteilungen. Bis zum 8-Zellstadium sind alle Zellen noch totipotent, d.h. sie sind in der Lage zu allen Zellen des Organismus einschließlich der Zellen des Trophoblasten zu differenzieren. Zwischen dem 8- und 16-Zellstadium, dem sog. Morula-Stadium entstehen erstmals zwei unterschiedliche Zellpopulationen: die Zellen der Inneren Zellmasse, aus denen sich der spätere Embryo entwickelt und die Zellen des Trophektoderms, der den embryonalen Teil der Plazenta bildet (s. Abb. 1.1). Diese beiden Regionen lassen sich durch die Expression zweier Transkriptionsfaktoren unterscheiden. In den Zellen der Inneren Zellmasse wird *Oct4* exprimiert, während sich die Expression von *Cdx2* auf die Zellen des Trophektoderms beschränkt. Die Morula entwickelt sich weiter zur Blastozyste, in der die Zellen der Inneren Zellmasse zwei unterschiedliche Zelllinien bilden. Zum einen das primitive Entoderm mit Expression von *Gata6*, welches später alle extraembryonalen Gewebe bildet. Zum anderen den Epiblast mit Expression von *Nanog*, aus dem das primitive Ektoderm hervorgeht, welches anschließend den Embryo bildet (Niwa, 2007; Surani *et al.*, 2007). Aus dem Epiblasten entwickeln sich im Zuge der Gastrulation die drei Keimblätter des Entoderm, Mesoderm und Ektoderm. Welche Gewebetypen sich während der Embryonalentwicklung aus den drei Keimblättern entwickeln, soll im Folgenden kurz dargestellt werden.

Aus dem Ektoderm, dem äußersten Keimblatt, entstehen die Epidermis, das Neuralrohr und die Neuralleiste. Zu den epidermalen Zelltypen gehören die Zellen der Haut, Haare, Nägel und die der Linse. Das Neuralrohr entwickelt sich im Verlauf der Neurulation aus dem dorsalen Teil des Ektoderms. Es bildet dann das zentrale Nervensystem mit Gehirn, Retina, Motoneuronen und Rückenmark. An der ektodermalen Spezifizierung sind unter anderem der Notch-, der Wnt-, der FGF (*Fibroblast Growth Factor*)- und TGF (*Transforming Growth Factor*)- β -Signalweg beteiligt (Suter und Krause, 2008). Die Aktivierung des Notch-Signalweges in embryonalen Stammzellen führt zu einer neuralen Determinierung der Zellen, während das Ausschalten des Signalweges die Bildung von neuralen Zelltypen inhibiert (Lowell *et al.*, 2006). Bei der Differenzierung neuraler Zellen fördert Notch die Erhaltung des Stammzell- oder Vorläufercharakters von neuralen Stammzellen oder Vorläuferzellen (Bolos *et al.*, 2007). Damit wird die weitere Entwicklung dieser Zellen in Neuronen oder Gliazellen inhibiert. Außerdem ist bekannt, dass Notch eine Rolle bei der Zelllinienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen spielt, wobei es die Differenzierung zu Gliazellen begünstigt (Bolos

et al., 2007; Cau und Blader, 2009). Die Neuralleiste entwickelt sich an der Grenze zwischen der Neuralplatte und der Epidermis. Nach dem Zusammenschluss des Neuralrohrs lösen sich die Neuralleistenzellen vom dorsalen Neuralrohr ab und beginnen zu migrieren, um zu einer Vielzahl an unterschiedlichen Zelltypen zu differenzieren. Dazu gehören die Neuronen und Gliazellen des sensorischen, sympathischen und parasymphatischen Nervensystems, Melanozyten, die Adrenalin-produzierenden Zellen des Nebennierenmarks sowie mesenchymale Zelltypen wie Knorpel und Knochen des Kopfes (Steventon *et al.*, 2005). Bei der Induktion der Neuralleistenzellen spielen eine Reihe von Signalwegen eine wichtige Rolle, darunter der FGF- und der Wnt-Signalweg sowie Retinolsäure und BMPs (*Bone Morphogenetic Proteine*). Auch der Notch-Signalweg ist an der Differenzierung der Neuralleistenzellen maßgeblich beteiligt, so inhibiert Notch zum Beispiel die Entwicklung von Neuronen (Steventon *et al.*, 2005).

Das Mesoderm lässt sich während der frühen Embryonalentwicklung in drei Gruppen unterteilen: das paraxiale Mesoderm, das Seitenplattenmesoderm und das intermediäre Mesoderm. Aus diesen drei Gruppen erfolgt die weitere Differenzierung in die verschiedenen mesodermalen Gewebetypen (Christ und Ordahl, 1995). Das paraxiale Mesoderm wird im Verlauf der Somitogenese segmentiert. Aus den Somiten entwickeln sich Knorpelzellen, Skelettmuskeln und die Dermis des Rückens (Christ und Ordahl, 1995; Kato und Aoyama, 1998; Olivera-Martinez *et al.*, 2004). Während der Somitogenese übernimmt unter anderem der Notch-Signalweg eine besondere Rolle. So ist Notch beispielsweise an der Regulation der oszillierenden Expression verschiedener Gene beteiligt, was zur Abschnürung der Somiten vom paraxialen Mesoderm führt (Cinquin, 2007). Aus dem Seitenplattenmesoderm entstehen Herzmuskelzellen, murale Zellen, Blutzellen und Endothelzellen während sich aus dem intermediären Mesoderm das Urogenitalsystem entwickelt (Stalsberg und DeHaan, 1969; Shalaby *et al.*, 1997). Vorläuferzellen des Seitenplattenmesoderm sind durch die Expression der fötalen Leberkinase Flk-1 gekennzeichnet, welche bei der Differenzierung von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen eine Rolle spielt (Shalaby *et al.*, 1995; Nishikawa *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang inhibiert der Notch-Signalweg die Bildung von Flk-1-positiven Zellen (Schroeder *et al.*, 2006). Notch spielt aber auch bei der Differenzierung von Herzzellen, muralen Zellen und Skelettmuskelzellen eine Rolle (Schroeder *et al.*, 2006; Bolos *et al.*, 2007).

Das Entoderm bildet das innerste Keimblatt des Embryos, wobei zwei Gruppen unterschieden werden können: das viszerale Entoderm und das definitive Entoderm (Lewis und Tam, 2006). Das viszerale Entoderm ist an der Bildung extraembryonaler Strukturen beteiligt wie zum

Beispiel dem Dottersack. Das definitive Entoderm bildet eine Vielzahl von Epithelzelltypen, welche die Atem- und Verdauungssysteme auskleiden. Darüber hinaus bildet es auch alle Anhangsorgane wie die Schilddrüse, Thymus, Lunge, Leber, Magen, Darm, Gallenblase und Pankreas (Zorn und Wells, 2009). An der Regulation der Differenzierung in die verschiedenen Zellpopulationen sind eine Reihe von Signalwegen beteiligt, darunter der Notch-, Wnt-, und der Nodal-Signalweg. Der Notch-Signalweg spielt unter anderem eine Rolle bei der Entwicklung des Pankreas. So wird die vorzeitige Differenzierung pankreatischer Vorläuferzellen in endokrine Zellen durch Notch verhindert (Fujikura *et al.*, 2006). Weiterhin reguliert Notch die Differenzierung von endo- bzw. exokrinen Zellen aus gemeinsamen Vorläuferzellen und übernimmt damit eine entscheidende Rolle bei der frühen Pankreasentwicklung (Bolos *et al.*, 2007). Auch an der frühen Entwicklung des Darmtraktes ist Notch beteiligt, zum Beispiel bei der Differenzierung von Vorläuferzellen in Enterozyten oder endokrine Zellen. Die Mutation des Notch-Zielgens *Hes1* führt zur verstärkten Differenzierung in endokrine Zellen und einer verminderten Differenzierung in Enterozyten (Bolos *et al.*, 2007). Eine weitere entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Entoderms spielt der Nodal-Signalweg (TGF- β Familie). Während der Gastrulation sorgt Nodal für die Initiation der Entwicklung von Entoderm und Mesoderm, wobei dieser Effekt dosisabhängig zu sein scheint. Hohe Konzentrationen des Nodal-Liganden begünstigen die Differenzierung in Entoderm, während geringere Konzentrationen zur Bildung von Mesoderm führen (Shen, 2007).

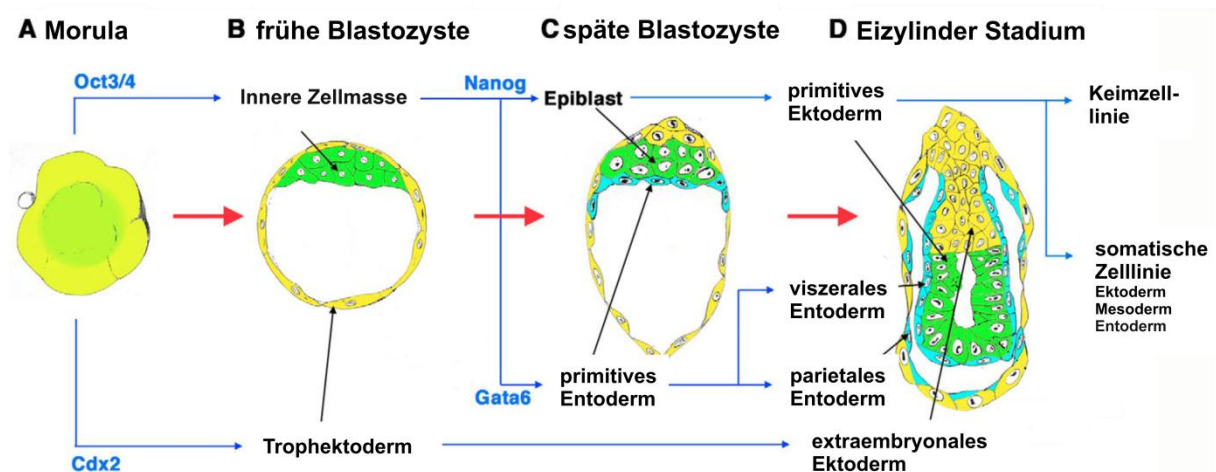


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der frühen Embryonalentwicklung der Maus

Die pluripotenten Stammzellen (grün) sind in dem Morula-Stadium als innere Zellen dargestellt. Diese bilden die innere Zellmasse der frühen Blastozyste. Aus den Zellen der inneren Zellmasse entstehen zum einen das primitive Entoderm und der Epiblast. Die Zellen des primitiven Entoderms bilden einige extraembryonale Gewebe. Die Zellen des Epiblasten bilden das primitive Ektoderm, aus dem die Keimbahnzellen sowie die drei Keimblätter des Entoderms, Mesoderms und Ektoderms entstehen. Die Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Cdx2, Nanog und Gata6 übernehmen die Schlüsselrolle bei der Differenzierung der embryonalen Zelllinien (verändert nach Niwa, 2007).

2.2 Murine embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus werden aus der Inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen. Ihre Isolierung gelang erstmals Anfang der 80er Jahre (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Während der Embryogenese entstehen aus der Inneren Zellmasse zwei unterschiedliche Zellreihen: das primitive Entoderm, welches einige extraembryonale Gewebe bilden wird und der Epiblast, aus welchem sich der Embryo entwickelt. Unter definierten Bedingungen können die Zellen der Inneren Zellmasse in die Zellkultur überführt werden und wachsen zu embryonalen Stammzellen aus, welche in einem undifferenzierten Zustand gehalten werden können (Nishikawa *et al.*, 2007). Hierfür erfolgt die Kultivierung von ES-Zellen entweder auf einem sog. *Feederlayer* aus mitotisch inaktivierten embryonalen Mausfibroblasten oder in Anwesenheit von Differenzierungshemmfaktoren wie dem *Leukemia-Inhibitory-Factor* (LIF). ES-Zellen zeichnen sich durch Pluripotenz und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung aus, d.h. ES-Zellen besitzen die Fähigkeit sich in der Zellkultur unbegrenzt zu vermehren und sich in alle Zellen des Organismus zu entwickeln. Die Pluripotenz von ES-Zelllinien zeigt sich nach Injektion in Blastozysten, wo sich die ES-Zellen (zusammen mit den Zellen der Ursprungsblastozyste) an der Entwicklung des Embryos beteiligen und Zellen aller drei Keimblätter und Keimzellen bilden. Eine weitere Methode die Pluripotenz zu demonstrieren ist die Injektion der ES-Zellen in immunsupprimierte Mäuse, in denen sie Teratome bilden, d.h. Tumore, die die unterschiedlichsten Zelltypen enthalten.

Die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von ES-Zellen erfolgt durch die Unterdrückung der Differenzierung und die Förderung der Proliferation und wird hauptsächlich von den Transkriptionsfaktoren Oct3/4 (Pou5f1), Nanog und Sox2 kontrolliert (Nishikawa *et al.*, 2007; Niwa, 2007). Diese Faktoren wirken Molekülen entgegen, die die Differenzierung fördern. Und zwar bilden Oct3/4 und Sox2 einen Komplex, welcher die Expression von *Cdx2* unterdrückt, das an der Differenzierung in primitives Entoderm beteiligt ist (Niwa *et al.*, 2005; Nishikawa *et al.*, 2007). Nanog beeinflusst die Expression von *Gata6* und *brachyury* und inhibiert so die Differenzierung in primitives Entoderm beziehungsweise Mesoderm (Nishikawa *et al.*, 2007). Bei der Kultivierung von murinen ES-Zellen spielt die Zugabe von LIF eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung der Pluripotenz. LIF gehört zu der Familie der Interleukin-6-Zytokine und bindet an einen heterodimeren Rezeptor aus den Untereinheiten LIF-Rezeptor- β und gp130. Diese Bindung führt zur Aktivierung des kanonischen JAK/STAT Signalwegs. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von STAT3 (*Signal Transducer*

and Activator of Transcription) ausreicht, um die Pluripotenz von murinen ES-Zellen zu erhalten (Niwa *et al.*, 1998).

Im Jahr 2006 ist es Yamanaka *et al.* gelungen, differenzierte Zellen (murine embryonale und adulte Fibroblasten) in einen ES-Zell-ähnlichen pluripotenten Zustand zu reprogrammieren (Takahashi und Yamanaka, 2006). Hierzu wurden lediglich die vier Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc retroviral in die differenzierten Zellen eingebracht. Diese induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) ähnelten ES-Zellen in ihrer Morphologie, Proliferation, der Expression einiger Stammzellmarker und durch die Fähigkeit nach Injektion in die Maus Teratome zu bilden (Takahashi und Yamanaka, 2006). Auch das globale Genexpressionsmuster der iPS Zellen zeigt hohe Übereinstimmungen mit dem von ES-Zellen, genauso wie die Verteilung von Histon-Modifikationen (Maherali *et al.*, 2007; Okita *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2008). Seitdem wurden iPS-Zellen aus verschiedenen somatischen Zellen gewonnen einschließlich B-Lymphozyten, Pankreaszellen, neuralen Zellen sowie aus humanen Fibroblasten und Keratinozyten (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Aasen *et al.*, 2008; Eminli *et al.*, 2008; Hanna *et al.*, 2008; Stadtfeld *et al.*, 2008).

2.3 Chromatin und epigenetische Regulation

Epigenetische Mechanismen wie die Modifikation der Kernhistone, DNA-Methylierung und Chromatin-Remodellierung übernehmen eine entscheidende Rolle bei der Regulation und Kontrolle der Genexpression während der Entwicklung und Differenzierung. Insbesondere hängt die Regulation der Pluripotenz und der Differenzierung von embryonalen Stammzellen mit den Veränderungen dieser Mechanismen zusammen.

2.3.1 Chromatin-Struktur

Im Zellkern aller eukaryotischer Zellen ist die genomische DNA mithilfe von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen dicht verpackt und bildet so ein stark kondensiertes, dynamisches Polymer, genannt Chromatin. Die fundamentale Einheit des Chromatins bildet das Nukleosom. Jedes Nukleosom besteht aus einem Oktamer aus den vier Kern-Histonen (H3, H4, H2A, H2B) um die jeweils 147 bp der DNA gewickelt sind. Hierbei formen jeweils zwei H3/H4 Dimere ein zentrales Histon-Tetramer, welches auf jeder Seite von einem H2A/H2B Dimer flankiert wird. Die Histone sind basische Proteine mit einer globulären Domäne und einem flexiblen NH₂-Terminus (Histon-„Schwanz“), welcher aus dem Nukleosom herausragt

(Jenuwein und Allis, 2001). Ein besonderes Merkmal dieser NH₂-terminalen Domänen der Histone ist, dass sie Ziel einer großen Vielfalt von Modifikationen sind, wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und weiteren posttranslationalen kovalenten Modifikationen. Darüber hinaus sollen sie an der Bildung höher geordneter Chromatin-Strukturen beteiligt sein (Suganuma und Workman, 2011). Ein weiteres Histonprotein, das Linker-Histon H1, welches sich strukturell von den anderen Histonen unterscheidet, interagiert mit der DNA zwischen den Nukleosomen und scheint so an der Verdichtung des Chromatins beteiligt zu sein. In einer sich nicht teilenden Zelle kann das Chromatin in zwei funktionelle Stadien eingeteilt werden: Euchromatin oder Heterochromatin. Das Euchromatin ist kennzeichnend für transkriptionell aktive Bereiche der Chromosomen, in denen die DNA zugänglich für Transkriptionsfaktoren und Chromatin-assoziierte Proteine ist, während die DNA im Heterochromatin stark komprimiert vorliegt (Jenuwein und Allis, 2001; Kouzarides, 2007).

2.3.2 Histon-Modifikationen

Die NH₂-terminalen Domänen der Kernhistone unterliegen einer Vielzahl an posttranslationalen Modifikationen. Hierzu gehören die Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung, ADP-Ribosylierung und Sumolierung von Lysinresten, die Methylierung von Arginin und die Phosphorylierung von Serin und Threonin (Kouzarides, 2007). Die Histon-Modifikationen haben erheblichen Einfluss auf die Struktur und Funktion des Chromatins und übernehmen eine wichtige regulatorische Funktion in einer Vielzahl an biologischen Prozessen. So können verschiedene Modifikationen einerseits die Rekrutierung von Enzym-Komplexen zur DNA steuern und direkten Einfluss auf Vorgänge wie Transkription, Replikation oder DNA-Reparatur nehmen. Darüber hinaus sind verschiedene Modifikationen in denselben oder unterschiedlichen Domänen voneinander abhängig und können eine Vielzahl an unterschiedlichen Kombinationen erschaffen. Wegen dieser kombinatorischen Vielfalt spricht man auch vom „Histon-Code“ (Strahl und Allis, 2000; Jenuwein und Allis, 2001).

Die bisher am besten charakterisierten Modifikationen sind die Acetylierung und die Methylierung von Lysinen der NH₂-terminalen Domänen von den Histonen H3 und H4 und sollen hier in Zusammenhang mit der Transkription kurz näher betrachtet werden. Die Acetylierung von Lysinresten ist fast ausschließlich mit der Aktivierung der Transkription verbunden und wird durch zwei gegensätzlich wirkende Enzymfamilien reguliert, Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC) (Allis *et al.*, 2007; Bannister und Kouzarides, 2011). Die Acetyltransferasen sorgen für die Anheftung von

Acetylgruppen an die spezifischen Lysinreste und werden in drei Gruppen eingeteilt: GNAT, MYST und CBP/p300, wobei jedes dieser Enzyme mehrere Lysine innerhalb der N-terminalen Domäne modifizieren kann (Sterner und Berger, 2000). Durch die Anlagerung einer Acetylgruppe kann die positive Ladung des Lysins neutralisiert werden, wodurch die Affinität zwischen den Histonen und der negativ geladenen DNA verringert wird und so zu einem leichter zugänglicheren Chromatin-Zustand beigetragen wird. Aufgrund dieser Fähigkeit sind Histonacetyltransferasen oft ein Teil von transkriptionellen Ko-Aktivator-Komplexen. Unter anderem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass durch Nukleosomen, die einheitlich an Lysin 16 des Histons H4 (H4K16) acetyliert waren, die Kondensierung des Chromatins in 30 nm Fasern verhindert wurde (Shogren-Knaak *et al.*, 2006). Die Acetylierung von H3K27 ist kennzeichnend für aktive *Enhancer*, welche die Transkription fördern und kann zur Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven *Enhancer* herangezogen werden (Creyghton *et al.*, 2010). Die Histondeacetylasen entfernen die Acetylgruppe vom Lysin und sind als Komponenten in Repressor-Komplexen zu finden. HDACs werden in drei Gruppen eingeteilt, die Klasse I und Klasse II HDACs und die NAD⁺-abhängige Klasse III oder Sirtuin-Familie (Yang und Seto, 2007). Im Allgemeinen haben die HDACs eine eher geringe Substratspezifität und kommen in mehreren unterschiedlichen Komplexen vor, oft mit unterschiedlichen HDAC-Mitgliedern. So sind zum Beispiel HDAC1 und HDAC2 zusammen innerhalb der Multiprotein-Komplexe NuRD, Sin3a sowie des CoREST Komplexes zu finden (Yang und Seto, 2008).

Die Methylierung der Histone kann im Gegensatz zur Acetylierung sowohl mit transkriptioneller Aktivierung als auch Inaktivierung im Zusammenhang stehen (Jenuwein und Allis, 2001). Methylierung von Histonen kann an Lysin- und Argininresten erfolgen, wobei Lysine jeweils mono-, di- oder trimethyliert werden können, während Arginine mono- und symmetrisch oder asymmetrisch dimethyliert werden können (Bedford und Clarke, 2009; Lan und Shi, 2009; Ng *et al.*, 2009). Lysin-Methyltransferasen weisen im Gegensatz zu den Acetyltransferasen eine sehr hohe Substratspezifität auf und ihre Aktivität kann sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Transkription wirken (Bannister und Kouzarides, 2005). Im Allgemeinen lässt sich beobachten, dass die Methylierung von H3K4, H3K36 oder H3K79 mit transkriptioneller Aktivierung zusammenhängt und die Methylierung von H3K9, H3K20 oder H3K27 mit der Reprimierung der Transkription (Kouzarides, 2007).

Die aktivierende Trimethylierung von H3 an Lysin 4 (H3K4me3) ist meist im Bereich des Transkriptionsstarts und am 5'Ende von aktiven Genen zu finden und ist charakteristisch für die Initiation der Transkription (Bernstein und Schreiber, 2002). Die Trimethylierung von

H3K36 ist an der Elongation der Transkription beteiligt. Diese Markierung ist innerhalb der transkribierten Regionen aktiver Gene direkt hinter den H3K4me3 Markierungen im Promoter angereichert. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass das Level der H3K36me3 Markierung dem Level der Genexpression entspricht (Mikkelsen *et al.*, 2007). Monovalente Promotoren mit der H3K4me3 Modifikation sind oft für die Regulation von *Housekeeping*-Genen zuständig, welche beispielsweise bei der Replikation oder im Metabolismus eine Rolle spielen (Mikkelsen *et al.*, 2007). Die Methylierung von H3K9, H3K20 und H3K27 im Promotorbereich von Genen spielt eine Rolle bei deren Repression. Auch an der Bildung von Heterochromatin sind diese Modifikationen beteiligt. Die Markierungen H3K9me3 und H4K20me3 sind an der Inaktivierung von Zentromeren, Transposons und *Tandem repeats* beteiligt. Diese beiden Markierungen zeigen, bezogen auf die Anreicherung in ES-Zellen, ein nahezu identisches Muster. Sie kommen besonders stark an Telomeren, Satellit-DNA und *long terminal repeats* vor (Mikkelsen *et al.*, 2007). Die H3K9 Methylierung kommt nicht nur im Heterochromatin vor, sondern scheint auch in transkribierten Regionen aktiver Gene eine Rolle zu spielen (Vakoc *et al.*, 2005). Auch die H3K27 Methylierung ist bei der Repression von Genen, der Etablierung von Heterochromatin und bei der Stilllegung des inaktiven X-Chromosoms beteiligt. Beispielsweise bindet das Protein *Polycomb* spezifisch an die H3K27me3 Markierung, was zur Rekrutierung eines aktiven *Polycomb*-Repressor-Komplexes führt (Cao *et al.*, 2002).

Bivalente Domänen

In ES Zellen konnte ein spezifisches Modifikationsmuster charakterisiert werden. Hierbei kommen aktivierende H3K4me3 und reprimierende H3K27me3 Modifikationen, die sich normalerweise gegenseitig ausschließen, zusammen in regulatorischen Regionen innerhalb desselben Nukleosoms vor (Azucara *et al.*, 2006; Bernstein *et al.*, 2006; Mikkelsen *et al.*, 2007). Bei der Untersuchung von hochkonservierten nicht-kodierenden Elementen (HCNE) konnte gezeigt werden, dass H3K27me3 in größeren Bereichen und H3K4me3 in kleineren Bereichen um den Transkriptionsstart angesiedelt sind (Bernstein *et al.*, 2006). Diese Regionen werden als bivalente Domänen bezeichnet und kommen an den Promotoren entwicklungspezifischer Gene, insbesondere bei Transkriptionsfaktoren vor. Aufgrund des dominanten Effekts von H3K27me3 über H3K4me3 wird die Expression dieser Gene reprimiert, gleichzeitig aber werden sie für die Transkription bereit gehalten, um so eine rasche Aktivierung während der Differenzierung gewährleisten zu können. Sobald die Differenzierung der ES Zellen in einen bestimmten Zelltyp festgelegt wurde, werden die

reprimierenden Markierungen (H3K27me3) von den Promotoren zelllinienspezifischer Gene entfernt, während die aktivierenden Markierungen (H3K4me3) an Genen entfernt werden, die stabil reprimiert bleiben sollen (Bernstein *et al.*, 2006).

2.3.3 DNA-Methylierung

Die Methylierung der DNA ist meist mit der dauerhaften Inaktivierung verknüpft und spielt eine Rolle bei einer Vielzahl an biologischen Prozessen, wie der X-Chromosom-Inaktivierung, der Kontrolle der Genexpression und der Differenzierung und bei der Regulation der Chromatin-Struktur (Jones und Takai, 2001). Die Methylierung der DNA erfolgt an der 5' Position des Cytosins innerhalb eines CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin) Dinukleotids und wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert. DNMT1 erkennt hemimethylierte DNA nach der Replikation und kopiert die vorhandenen Methylierungsmuster auf den neuen DNA-Tochterstrang (Jaenisch und Bird, 2003). DNMT3a und DNMT3b spielen bei der *de novo* DNA-Methylierung während der Embryonalentwicklung und Differenzierung eine Rolle (Okano *et al.*, 1999). Die Methylgruppen im Promotorbereich werden von Methyl-CpG-bindenden Proteinen (MBP) erkannt, welche dann ihrerseits Histondeacetylasen und Histonmethyltransferasen, die Teil von Ko-Repressor-Komplexen sind, rekrutieren und so für die transkriptionelle Repression sorgen. Darüber hinaus kann die DNA-Methylierung im transkribierten Bereich von Genen die Elongation der Transkription verhindern (Klose und Bird, 2006).

2.3.4 Chromatin-Remodellierung

Eine weitere Möglichkeit der epigenetischen Regulation der Genexpression besteht in der Veränderung der Chromatinstruktur durch ATP-abhängige Chromatin-Remodellierungs-Komplexe. Bisher gibt es vier verschiedene Familien dieser Chromatin-Remodellierungs-Komplexe, welche die Nukleosomenstruktur auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen. Dennoch weisen die einzelnen Mitglieder grundlegende Gemeinsamkeiten auf. Sie besitzen eine ATPase Domäne, DNA- und Nukleosom-Bindungsdomänen und Domänen, die Histon-Modifikationen erkennen und binden. Sie sind in der Lage die Nukleosomen auf der DNA zu verschieben oder den Austausch bzw. die Entfernung von Histonen herbeizuführen (Clapier und Cairns, 2009). Auf diese Weise wird die Zugänglichkeit der DNA, etwa für Transkriptionsfaktoren, verändert. Chromatin-Remodellierungs-Komplexe spielen daher eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Genexpression. So erkennen und binden Mitglieder der

SWI/SNF Familie mittels einer Bromodomäne acetylierte Histone und entfernen diese unter Verbrauch von ATP von der DNA, wodurch nukleosomenfreie Regionen geschaffen werden, was zur Aktivierung von Genen beiträgt (Suganuma und Workman, 2011).

2.4 Notch

Der Notch-Signalweg ist evolutionär hoch konserviert und spielt eine stark zellkontextabhängige Rolle bei einer Vielzahl an Entwicklungsprozessen von *Drosophila melanogaster* bis zum Menschen (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Er beeinflusst unter anderem Zelllinienentscheidungen, Proliferation und Apoptose. Entdeckt wurde Notch im Jahre 1919 von Otto L. Mohr (Mohr, 1919). In *D. melanogaster* führte die Haploinsuffizienz des Notch-Gens zu Einkerbungen (*notches*) an den Flügelrändern, wodurch Notch seinen Namen erhielt.

2.4.1 Notch-Rezeptoren

In Säugern sind vier Notch-Rezeptoren (Notch1-4) bekannt, die sich in ihrem Aufbau nur geringfügig unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von murinem Notch1 untersucht. Notch1 ist ein heterodimeres Transmembranproteine mit einer Größe von ca. 300 kDa (s. Abb. 1.2). Die Notch-Proteine werden nach ihrer Synthese im Golgi-Apparat durch eine Furin-ähnliche Protease in eine intra- und eine extrazelluläre Domäne gespalten. Die beiden Domänen lagern sich an der Zellmembran zu einem nicht kovalent gebundenen Heterodimer zusammen. Dabei ist die extrazelluläre Domäne an der Ligandenbindung beteiligt und die zytoplasmatische Domäne ist für die Signaltransduktion zuständig (Bolos *et al.*, 2007). Die extrazelluläre Domäne beinhaltet 36 *Epidermal-Growth-Factor* (EGF)-ähnliche Wiederholungen, die eine essentielle Rolle bei der Ligandenbindung spielen und drei cysteinreiche LNR (LIN-12/Notch) Wiederholungen, welche die ligandenunabhängige Aktivierung verhindern. Die intrazelluläre Domäne enthält eine RAM23-Domäne (R), die an der Bindung an RBP-J (*Recombination signal sequence-Binding Protein Jk*) beteiligt ist sowie sechs Ankyrin Wiederholungen (ANK), die in die Protein-Protein Interaktion involviert sind und von zwei Kernlokalisationssignalen (NLS) umgeben sind (N1 und N2) (Blank *et al.*, 1992; Tamura *et al.*, 1995). Desweiteren ist beim Notch1-Rezeptor eine Transaktivierungsdomäne (TAD) zu finden (Kurooka *et al.*, 1998). Anschließend folgen eine glutaminreiche Domäne (OPA) und eine PEST-Sequenz (Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T)) (Rechsteiner, 1988). Darüber hinaus sind drei

weitere funktionelle Regionen der intrazellulären Domäne bekannt. PPD (*potential phosphorylated domain*) befindet sich zwischen den Ankyrin-Wiederholungen und der PEST-Sequenz und ist verantwortlich für die Verstärkung der Bindung von Notch an RBP-J (Le Gall und Giniger, 2004). DTS (*downregulation targeting sequence*) spielt eine Rolle bei Endozytose-Prozessen von Notch und bei der Interaktion mit dem Ras-Signalweg (Shaye und Greenwald, 2005). S4 ist eine C-terminale Phosphorylierungsstelle, die für den Abbau von Notch verantwortlich ist.

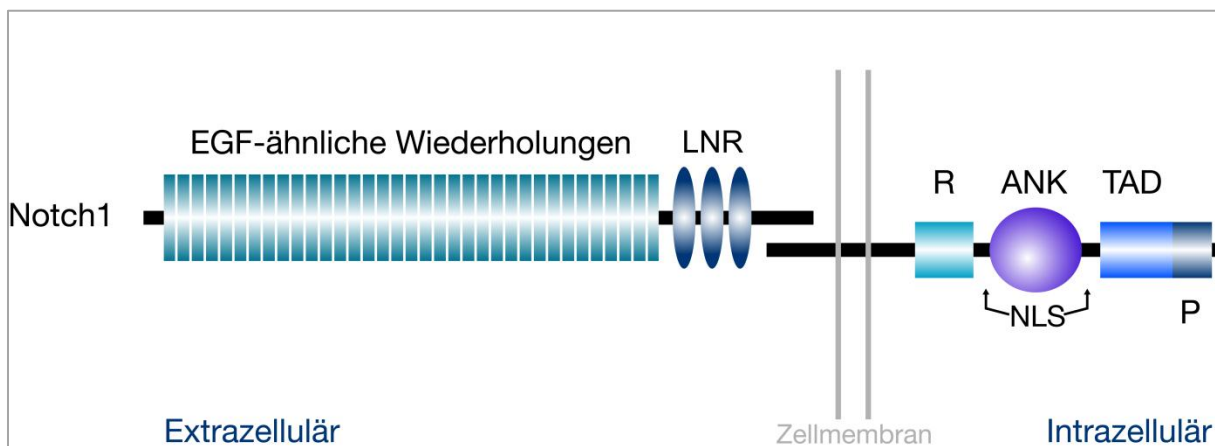


Abb. 1.2: Aufbau des Notch1-Rezeptors

Schematische Darstellung des Notch1-Rezeptors. Die extrazelluläre Domäne enthält 36 EGF-ähnlichen Wiederholungen und die 3 LNR-Wiederholungen. Die intrazelluläre Domäne besteht aus der RAM-Domäne (R), den Ankyrin-Wiederholungen (ANK) der Transaktivierungsdomäne (TAD) und der PEST-Sequenz (P). Außerdem befinden sich zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS) im intrazellulären Teil (verändert nach Radtke *et al.*, 2005).

2.4.2 Liganden von Notch

In Säugetieren sind fünf Liganden von Notch bekannt: Delta-like1, 3 und 4 und Jagged1 und 2. Sie wurden nach ihren Homologen Delta und Serrate in *D. melanogaster* benannt, wobei Jagged homolog zu Serrate ist und Delta-like zu Delta. Es handelt sich ebenfalls um membrangebundene Proteine. Sie besitzen in der extrazellulären Domäne mehrere EGF-ähnliche Wiederholungen und eine DSL-Domäne (Delta, Serrate, LAG-2). Jagged1 und 2 weisen zusätzlich eine Cystein-reiche Domäne auf (Bolos *et al.*, 2007).

2.4.3 Der klassische Notch Signalweg

Da es sich sowohl beim Notch-Rezeptor als auch bei seinen Liganden um Transmembranproteine handelt, erfolgt die Initiation der Signalgebung zwischen benachbarten Zellen (s. Abb. 1.3). Nach der Bindung der extrazellulären Domäne von Notch an den Liganden kommt es zur Trans-Endozytose in die Liganden-exprimierende Zelle. Es wird vermutet, dass es hierbei zu einer Konformationsänderung von Notch kommt, wobei die Heterodimerisierungsdomäne freigelegt wird. Hierdurch wird eine Schnittstelle (S2) nahe der Transmembrandomäne zugänglich und von der ADAM-Protease (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) TACE (*Tumor necrosis factor A Converting Enzyme*) erkannt und geschnitten. Der so freigesetzte extrazelluläre Teil des Rezeptors wird mit in die Liganden-exprimierende Zelle internalisiert (Bolos *et al.*, 2007). Es entsteht ein instabiles Protein, das von einem γ -Sekretase Komplex erkannt und an den Schnittstellen S3 und S4 innerhalb der Transmembrandomäne geschnitten wird. Der γ -Sekretase Komplex setzt sich aus den Proteasen Presenilin, Nicastrin, PEN2 (*Presenilin Enhancer 2*) und APH1 (*Anterior Pharynx defective 1*) zusammen und führt zur Freisetzung der intrazellulären Domäne von Notch (NICD) in das Zytoplasma. Nach der Translokation von NICD in den Zellkern, erfolgt *via* der RAM23-Domäne die Bindung an sein Effektormolekül, das DNA-gebundene Protein RBP-J und die Aktivierung von Notch-Zielgenen (Zanotti und Canalis, 2010). In der Abwesenheit von NICD ist RBP-J auf der DNA mit Ko-Repressor-Proteinen assoziiert, die Histon-Deacetylase-Komplexe rekrutieren und somit die Transkription der Zielgene unterdrücken. Durch die Bindung von NICD an RBP-J werden diese Ko-Repressoren verdrängt und stattdessen Ko-Aktivatoren wie MAML (*Mastermind-like*) gebunden. Auf diese Weise wird RBP-J von einem Repressor der Transkription zu einem Aktivator umgewandelt und die Expression von Notch-Zielgenen induziert (Zanotti und Canalis, 2010). Zu den bekannten Notch-Zielgenen gehören die bHLH (*basische Helix-Loop-Helix*) Transkriptionsfaktoren Hes (*hairy/enhancer of split*) und Hey (*hairy/enhancer of split-related*).

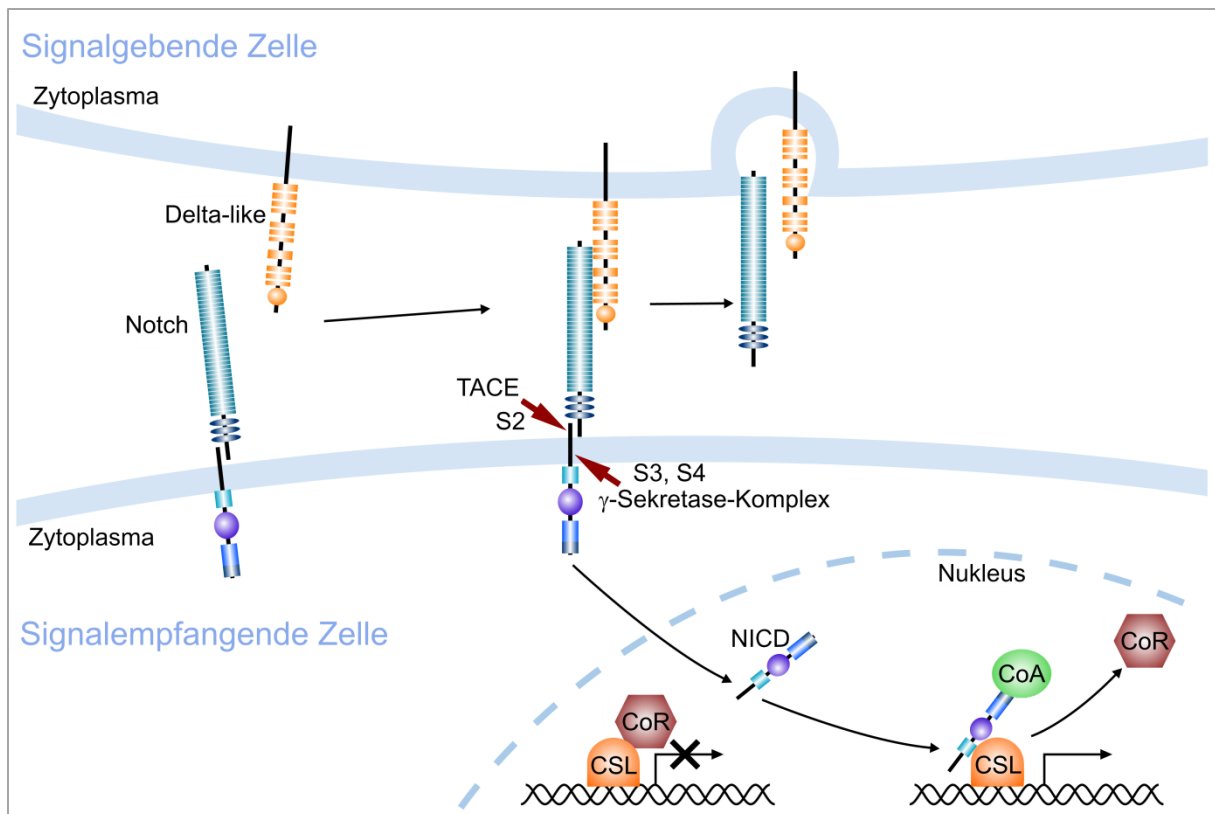


Abb. 1.3: Der klassische Notch-Signalweg

Schematische Darstellung des klassischen Notch-Signalweges. Die Bindung des Liganden (*Delta-like*) bewirkt die proteolytische Spaltung des Notch-Rezeptors durch die Protease TACE an der Schnittstelle S2 und durch den γ -Sekretase-Komplex an den Schnittstellen S3 und S4. Die auf diese Weise freigesetzte intrazelluläre Domäne von Notch (NICD) transloziert in den Zellkern. Über die Interaktion von NICD mit einem Protein der CSL-Familie (auch RBP-J genannt) wird die Transkription der Zielgene aktiviert. CoR: Co-Repressoren; CoA: Co-Aktivatoren; TACE: *Tumor necrosis factor- α -Converting-Enzyme* (verändert nach Radtke *et al.*, 2005).

2.4.4 Der RBP-J-Repressor-Komplex

RBP-J ist der einzige Transkriptionsfaktor des kanonischen Notch-Signalweges und übernimmt daher eine zentrale Rolle bei der Signalübertragung. In Abwesenheit von Notch bindet RBP-J an die regulatorischen Elemente von Notch-Zielgenen und übernimmt die Funktion der transkriptionellen Repression (Borggreffe und Oswald, 2009). RBP-J bildet dafür einen Komplex mit verschiedenen Komponenten an unterschiedlichen Notch-Zielgenen. Das am besten charakterisierte Element ist SHARP/MINT (*SMRT and HDAC Associated Repressor Proteine*), welches direkt mit RBP-J assoziiert und dessen entgegengesetzte Rolle zu Notch während der B- und T-Zellentwicklung *in vivo* gezeigt werden konnte (Oswald *et al.*, 2002; Kuroda *et al.*, 2003; Tsuji *et al.*, 2007; VanderWielen *et al.*, 2011). SHARP besitzt am C-Terminus eine SPOC-Domäne (*Spen Paralog and Ortholog C-terminal-domain*), welche für die Bindung weiterer Ko-Repressoren wie CtIP/CtBP, ETO und SMRT verantwortlich ist (Ariyoshi und Schwabe, 2003; Oswald *et al.*, 2005; Salat *et al.*, 2008). Ein weiterer Ko-Repressor-Komplex wird durch KyoT2 etabliert, welches ebenfalls direkt mit

RBP-J interagiert und daraufhin *Polycomb group* Proteine wie HPC2 (*Human Polycomb Protein 2*) oder Ring1 rekrutiert (Borggreffe und Oswald, 2009). Auch CIR (*CBF-1 Interacting Corepressor*) bindet direkt an RBP-J und bildet einen Komplex mit HDACs und SAP30 (*Sin3 Associated Polypeptid 30*) oder NKAP (*NF-Kappa-B-Activating Protein*) (Hsieh *et al.*, 1999).

2.4.5 Der RBP-J-Aktivator-Komplex

Die durch die proteolytischen Spaltungen freigesetzte intrazelluläre Domäne von Notch wandert in den Zellkern und bindet dort an RBP-J, wodurch die Ko-Repressoren verdrängt und Ko-Aktivatoren rekrutiert werden (Borggreffe und Oswald, 2009). Hierzu wird zunächst ein Komplex bestehend aus NICD, RBP-J und MAML gebildet, der an die regulatorischen Bereiche der Zielgene bindet (Borggreffe und Oswald, 2009; Kovall und Blacklow, 2010). In Säugetieren konnte gezeigt werden, dass MAML den RBP-J/NICD Komplex während der Aktivierung von Zielgenen stabilisiert (Wu *et al.*, 2000). *In vivo* konnte die zentrale Rolle von MAML innerhalb des Aktivator-Komplexes mithilfe einer dominant-negativen Form demonstriert werden, wodurch die gesamte Notch-vermittelte Aktivierung blockiert war (Maillard *et al.*, 2004). Die Aktivierung des Notch-Signalweges wird durch den Abbau von NICD terminiert. Hierzu rekrutiert MAML die Kinasen CyclinC/Cdk8, welche zunächst die PEST-Domäne von Notch phosphorylieren, anschließend erfolgt die Ubiquitinierung durch die E3 Ubiquitin Ligase Fbw7/Sel10 (Gupta-Rossi *et al.*, 2001; Oberg *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001; Fryer *et al.*, 2004).

Bisher wurde vermutet, dass RBP-J permanent an der DNA gebunden ist und sich die Aktivator und Repressor-Komplexe am Promotor zusammenfügen. Neuere Studien lassen jedoch vermuten, dass sich die RBP-J Komplexe teilweise auch im Zytoplasma oder Nukleoplasma zusammensetzen können, da die Bindung von RBP-J an Promotoren von Notch-Zielgenen in der Anwesenheit von NICD erhöht war (Krejci und Bray, 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die RBP-J-Mengen im Zellkern von bereits im Zytoplasma gebildeten Aktivator- oder Repressor-Komplexen abhängig sind (Zhou und Hayward, 2001).

Die Komponenten der RBP-J Aktivator- und Repressor-Komplexe sind zum Teil Histon-modifizierende Enzyme, welche in der Lage sind, die Chromatin-Umgebung an Notch-Zielgenen aktiv zu beeinflussen, um so die Transkription von Zielgenen entweder zu inhibieren oder reprimierte Gene in einen aktivierbaren Zustand zu versetzen.

2.4.6 Regulation des Notch Signalweges

Die Notch-Signalgebung erfolgt in der Regel zwischen benachbarten Zellen und benötigt keine sekundären Botenstoffe. Trotzdem sind die Auswirkungen von Notch äußerst vielfältig und der Signalweg reguliert diverse Entwicklungsprozesse. Dies wird sowohl durch die zeitliche und räumliche Regulation der Expression der Notch-Rezeptoren und ihrer Liganden während der Entwicklung gewährleistet als auch durch post-translationale Modifikationen des Rezeptors und seiner Liganden (Zanotti und Canalis, 2010). Weiterhin sind Chromatin-Modifikationen an den Notch-Zielgenen bei der Regulation der zellkontextabhängigen Expression beteiligt (Schwanbeck *et al.*, 2011; Borggreffe und Liefke, 2012).

Die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors bietet mit den EGF-ähnlichen Wiederholungen die Möglichkeit der Glykosylierung, wodurch sowohl die Rezeptor-Liganden-Interaktion reguliert wird, als auch der Transport von Notch zur Membran. Für die Glykosylierung von Notch ist die O-Fucosyltransferase Pofut1 verantwortlich (Rampal *et al.*, 2005). Darüber hinaus spielt Pofut1 als Chaperon eine wichtige Rolle bei der richtigen Faltung des Notch-Proteins (Stahl *et al.*, 2008). Die Glykosylierungen werden von Mitgliedern der *Fringe* Familie (*Lunatic fringe*, *Maniac fringe*, *Radical fringe*) erkannt und können von diesen erweitert werden, wodurch die Interaktion von Notch zu Delta-like1 begünstigt und die zu Jagged1 inhibiert wird (Stanley, 2007). Eine weitere Möglichkeit der Regulation ist die Ubiquitinierung von Notch durch E3 Ubiquitin-Ligasen, die Notch für die Endozytose markieren und so das Vorkommen von Notch an der Zelloberfläche regulieren. *Cbl*, eine RING (*Really Interesting New Gene*) finger E3 Ubiquitin-Ligase, markiert Notch für die Degradation bei Abwesenheit von Ligandenbindung (Jehn *et al.*, 2002). Eine weitere E3 Ubiquitin-Ligase ist *Itch*, welche die Degradation von Notch im Lysosom fördert (Chastagner *et al.*, 2008). Das ubiquitinierte Notch-Protein kann entweder zur Degradation ins Lysosom transportiert werden oder zum Recycling ins Endosom. Letzteres wird durch die E3 Ubiquitin-Ligase Deltex reguliert (Mukherjee *et al.*, 2005). Auch die Liganden von Notch werden durch Ubiquitinierung der intrazellulären Domäne und anschließender Endozytose reguliert. Zwei dieser Liganden-spezifischen Ubiquitin-Ligasen sind bisher bekannt: *Neuralized1* und *MindBomb1* (Zanotti und Canalis, 2010).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation des Notch-Signalweges besteht in der Anwesenheit von Numb. Numb ist ein membranassoziierter Inhibitor von Notch, welcher die Ubiquitinierung des membrangebundenen intrazellulären Teils von Notch vermittelt und auf diese Weise die Signaltransduktion stoppt (McGill und McGlade, 2003). Dabei interagiert Numb mit der E3 Ubiquitin-Ligase *Itch* (McGill und McGlade, 2003). Numb wird bei der

Zellteilung asymmetrisch auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt und beeinflusst so die Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen (McGill und McGlade, 2003).

2.4.7 Funktionen von Notch1

Trotz des einfachen Verlaufs der Signaltransduktion innerhalb der Zelle ist Notch für eine Vielzahl verschiedener Effekte, sowohl während der Embryogenese als auch im adulten Organismus verantwortlich. Die Auswirkungen von Notch sind äußerst vielfältig und reichen von der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes von Zellen und Selbsterneuerung über Zelllinienentscheidungen, Differenzierung und Proliferation bis hin zur Apoptose (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999).

Eine wichtige Rolle während der Entwicklung übernimmt Notch in Bezug auf Zelllinienentscheidungen (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Funktionsweise von Notch während der frühen Neurogenese in *D. melanogaster*, indem durch laterale Inhibition zwischen der Differenzierung in neurale oder epidermale Vorläuferzellen entschieden wird (Bolos *et al.*, 2007). Hierbei exprimieren die Zellen des proneuralen *Clusters*, welche die Fähigkeit besitzen sowohl in neuronale als auch in epidermale Vorläuferzellen zu differenzieren, zunächst Notch und auch seinen Liganden in etwa gleicher Menge. Geringe Unterschiede zwischen den Konzentrationen von Notch und Ligand verstärken sich allmählich, so dass einige Zellen hauptsächlich Notch, andere Ligand exprimieren. Auf diese Weise wird in den Zellen, die den Notch-Rezeptor tragen, der Notch-Signalweg aktiviert, was zur Inhibition der neuronalen Differenzierung in diesen Zellen führt. Sie entwickeln sich stattdessen in epidermale Vorläuferzellen, während die Zellen, die den Liganden tragen in die neurale Linie differenzieren (Parks *et al.*, 1997; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Bray, 2006). Außer an Zelllinienentscheidungen ist Notch auch an der Erhaltung des undifferenzierten Zustandes beteiligt. Während der Entwicklung des Nervensystems exprimieren die sich entwickelnden Neuronen den Liganden Delta und aktivieren somit Notch in ihren benachbarten Zellen, wodurch in diesen die neuronale Differenzierung inhibiert wird und die Zellen neurale Vorläuferzellen bleiben (Kageyama *et al.*, 2009). Diese Inhibition der Expression proneuraler Gene durch Notch erfolgt über die *bHLH* Repressorproteine *Hairy/Enhancer of split* (Lai, 2002; Iso *et al.*, 2003; Kageyama *et al.*, 2009). Auch die verwandte *Herp/Hey* Familie spielt eine Rolle bei der Notch vermittelten Inhibition der Differenzierung während der Entwicklung verschiedener Zellpopulationen einschließlich der Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur und des Verdauungstraktes (Lai, 2004). Demnach ist die Aktivierung der *bHLH* Repressorproteine durch Notch eine generelle Strategie um in einer

Population äquipotenter Zellen zu verhindern, dass alle das gleiche Zellschicksal einnehmen oder vorzeitig differenzieren.

Notch reprimiert nicht nur bestimmte Zellentscheidungen, sondern kann als weitere wichtige Aufgabe auch die Entwicklung in einen bestimmten Zelltyp fördern. So ist Notch an einer Vielzahl von Vorgängen auf eine induktive Art und Weise beteiligt z.B. bei der Hämatopoese, der Vaskulogenese, während der Leberentwicklung oder bei der Bildung der Haarzellen des Innenohres (Schroeder *et al.*, 2003b; Brooker *et al.*, 2006; Henning *et al.*, 2007; Roca und Adams, 2007; Zong *et al.*, 2009). In diesem Fall wird nicht die Expression von Repressoren induziert, sondern die Expression von positiv wirkenden Regulatoren. So ist Notch aufgrund von Zell-Zell-Interaktionen an den Grenzen zwischen unterschiedlichen Zellpopulationen an der Entstehung neuer Zelltypen beteiligt. Bei diesen induktiven Notch-regulierten Entwicklungsprozessen erfolgt eine direkte Aktivierung von Zielgenen, welche die Differenzierung fördern bzw. spezifisch für die terminale Differenzierung von Zellen sind (Schwanbeck *et al.*, 2011). In unserer Arbeitsgruppe konnte mithilfe von genomweiten Genexpressionsanalysen gezeigt werden, dass die Aktivierung von Notch direkten Einfluss auf die Expression von Genen hat, die für regulatorische Transkriptionsfaktoren kodieren, welche spezifisch für die Bildung bestimmter Zelllinien sind. Wir konnten beobachten, dass Notch abhängig vom Zellkontext zelllinienspezifische Transkriptionsfaktoren aktiviert, darunter Pax6, Sox9 und Runx1 sowie Mitglieder der Id-Familie (Meier-Stiegen *et al.*, 2010).

2.5 Konditionelle Aktivierung von Notch1 mithilfe des NERT-Konstruktes

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein induzierbares System verwendet, welches die konditionelle Aktivierung von Notch1 ermöglicht (Schroeder und Just, 2000). Grundlage hierfür stellt ein Fusionsprotein dar, welches aus dem intrazellulären Teil des murinen Notch1-Rezeptors ohne die OPA- und PEST-Sequenzen und der Hormonbindungsdomäne der Tamoxifen-sensitiven Mutante des humanen Östrogenrezeptors (ERT2) besteht (s. Abb. 1.4). Dieses Fusionsprotein (NERT) wird konstitutiv exprimiert und bindet im Zytoplasma an das Hitzeschockprotein 90 (HSP90). Durch die Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (OHT), welches an die Hormonbindungsdomäne bindet, wird das NERT-Protein freigesetzt und transloziert in den Nukleus, wo es an RBP-J bindet und seine Zielgene aktiviert. Dieses Versuchssystem wird nicht auf Ebene der Transkription reguliert und ermöglicht daher eine sehr schnelle Aktivierbarkeit des intrazellulären Notch1-Rezeptors. Die in dieser Arbeit verwendete murine

embryonale Stammzelllinie EB5 exprimiert stabil das NERT-Protein oder den leeren Kontrollvektor pCAG-IP (Schroeder *et al.*, 2006).

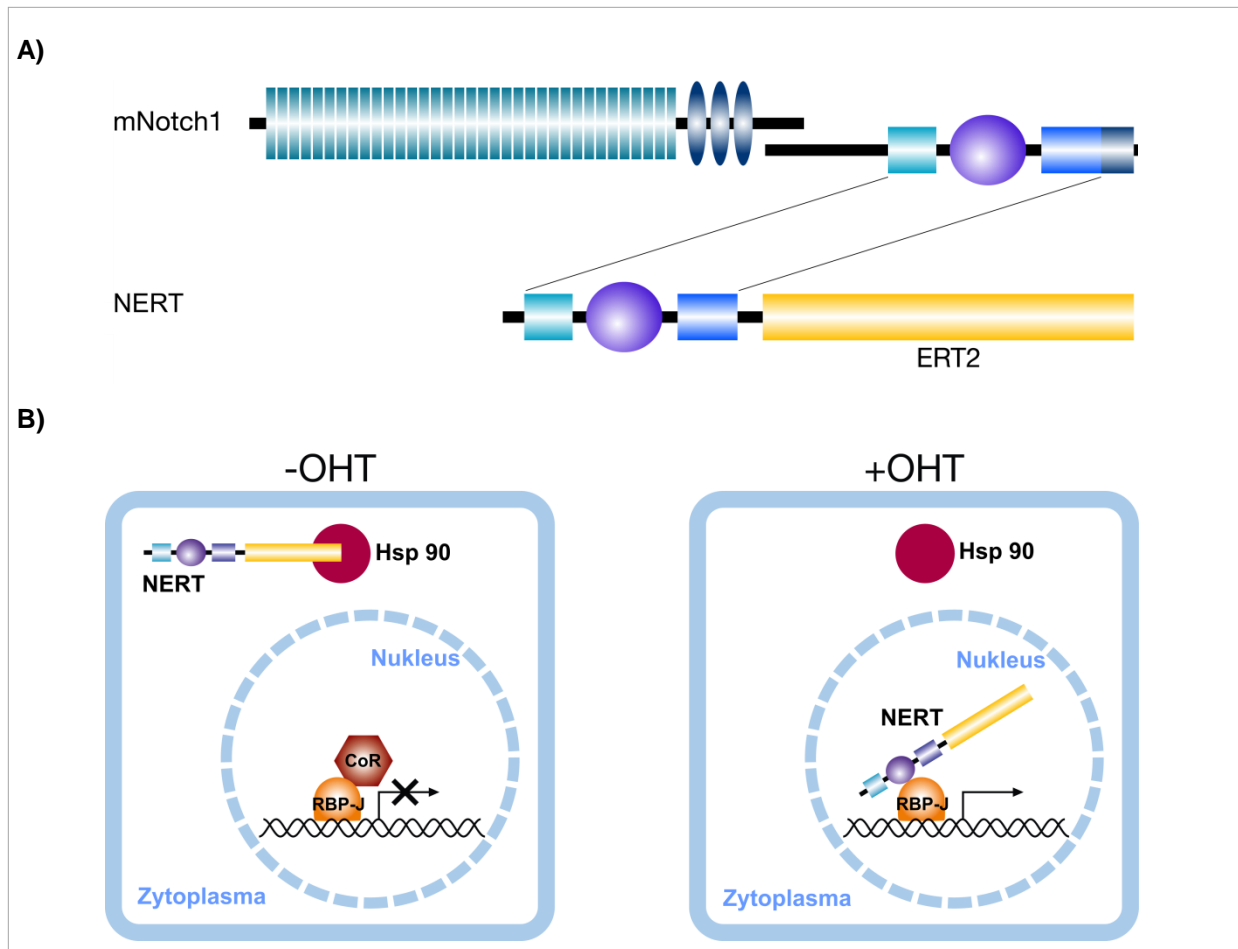


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des NERT-Konstruktes und seiner Funktionsweise.

A) Das NERT-Konstrukt besteht aus dem intrazellulären Teil des murinen Notch1-Rezeptors ohne die OPA-PEST-Sequenz und der Hormonbindungsdomäne der OHT-sensitiven Mutante des humanen Östrogenrezeptors α (ERT2) (verändert nach Schroeder und Just, 2000).

B) Durch Zugabe von OHT wird das Fusionsprotein vom HSP90 freigesetzt und transloziert in den Zellkern, wo es seine Zielgene aktivieren kann (verändert nach Haller *et al.*, 2012).

HSP: Hitzeschockprotein; OHT: 4-Hydroxytamoxifen; Co-R: Co-Repressor

2.6 Die Rolle von Histon-Modifikationen an regulatorischen Regionen von Notch-Zielgenen

Epigenetische Vorgänge wie Histon-Modifikationen, DNA Methylierung und Chromatin-Remodellierung sind an der Expression von Genen in hohem Maße beteiligt. Auch bei der Regulation von Notch-Zielgenen spielen Histon-Modifikationen eine wichtige Rolle. Spezifische post-translationale Histon-Modifikationen legen transkriptionell aktive oder inaktive Chromatindomänen fest. Somit tragen sie neben RBP-J-assoziierten Faktoren zum Ausgang einer Notch-vermittelten Signalübertragung in einer spezifischen Zelle bei

(Borggreffe und Oswald, 2009). Die hierbei häufigsten und bestcharakterisierten Modifikationen sind die Acetylierung und die Methylierung. In diesem Zusammenhang wurden einige Histon-modifizierende Enzyme mit der Regulation von Notch-Zielgenen in Verbindung gebracht. Über die genauen Mechanismen ist bislang wenig bekannt.

Die Komponenten der RBP-J Aktivator- und Repressor-Komplexe sind in die Regulation von Histon-Modifikationen involviert (Borggreffe und Liefke, 2012). So konnte gezeigt werden, dass die Histonacetyltransferasen GCN5/PCAF und p300 Teil des Aktivator-Komplexes sind (Kurooka und Honjo, 2000; Oswald *et al.*, 2001; Wallberg *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu sind im RBP-J Repressor-Komplex Histondeacetylasen (HDACs) zu finden (Kao *et al.*, 1998). Die Histondeacetylase SIRT1 bildet in Abwesenheit von aktiviertem Notch einen Korepressor-Komplex mit CtBP (*C-Terminal Binding Protein*) und LSD1 (*Lysine Specific Demethylase 1*), wodurch mehrere repressive Histon-Modifikationen an Notch-Zielgenen geschaffen werden, um auf diese Weise deren Expression zu reprimieren. SIRT1 ist hierbei für die Deacetylierung der H4K16 Modifikation zuständig und für die Rekrutierung von Histon H1 (Mulligan *et al.*, 2011). H4K16 Acetylierung spielt als eine aktivierende Modifikation eine entscheidende Rolle bei der Transkription, wobei bisher unbekannt ist, welche Histonacetyltransferase diese Modifikation bei der Aktivierung von Notch-Zielgenen etabliert. Bei LSD1 handelt es sich um eine Histondemethylase, welche mono- und dimethylierte Formen von H3K4 demethyliert, aber nicht die trimethylierte Form (Shi *et al.*, 2004). Für die H3K4 Trimethylierung konnte eine entscheidende Rolle während der Notch Signalgebung in *D. melanogaster* nachgewiesen werden, wobei die Demethylase Lid (*little imaginal disc*) als Komponente des ASF1/NAP1 Chaperon-Komplexes zu Notch Zielgenen rekrutiert wird (Moshkin *et al.*, 2009). In murinen Modellsystemen wurde eine dynamische Regulation der H3K4 Trimethylierung an Notch-Zielgenen gezeigt und in diesem Zusammenhang konnte auch eine direkte Interaktion zwischen RBP-J und der Demethylase KDM5A gezeigt werden (Liefke *et al.*, 2010). KDM5A entfernt Tri- und Dimethylierungen von H3K4 und trägt somit zusammen mit LSD1 zur Repression von Notch-Zielgenen bei. Nicht nur aktivierende Markierungen wie H3K4me3 spielen eine Rolle bei der Regulation des Notch-Signalweges, sondern auch reprimierende Markierungen wie H3K27me3. In *D. melanogaster* verstärken die *Polycomb*-Komplex-Komponenten *lola* und *pipsqueak* die Notch-abhängige Tumorigenese mithilfe der H3K27 Methyltransferase *Enhancer of zeste* (Ferre-Marco *et al.*, 2006).

Dass sowohl H3K4me3 als auch H3K27me3 Modifikationen bei der Regulation von Notch-Zielgenen beteiligt sind, zeigen auch Analysen der Chromatin-Modifikationen innerhalb der

regulatorischen Regionen von Notch-Zielgenen (Schwanbeck *et al.*, 2011). Mithilfe von öffentlichen Datenbanken (Mikkelsen *et al.*, 2007; Creighton *et al.*, 2008; Ku *et al.*, 2008) konnte die H3K4 Trimethylierung mit einer Reihe von Genen in Zusammenhang gebracht werden, die in ES-Zellen direkt durch Notch reguliert werden. Außerdem weisen viele Notch1-Zielgene in ES-Zellen bivalente Domänen im Promoter auf. Darüber hinaus kommen Komponenten des *Polycomb*-Repressor-Komplex 2 (PRC2) wie die H3K27 Methyltransferase *Ezh2* (*Enhancer of zeste homolog 2*) und *Suz12* (*Suppressor of zeste 12*) gehäuft an Notch-Zielgenen vor (Schwanbeck *et al.*, 2011).

2.7 Fragestellung der Arbeit

Der kanonische Notch1-Signalweg übt zentrale Funktionen sowohl während der embryonalen Entwicklung als auch im adulten Organismus aus. Er steuert eine Vielzahl an grundlegenden Prozessen wie Zelllinienentscheidungen, Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose. Obwohl es sich bei dem Notch1-Signalweg um einen vergleichsweise einfachen Signaltransduktionsweg handelt, der vollkommen ohne sekundäre Botenstoffe auskommt, reguliert er die Expression zahlreicher Zielgene in einer stark kontextabhängigen Art und Weise. Welche molekularen Mechanismen diesen kontextabhängigen Effekten zugrunde liegen, ist noch weitestgehend unbekannt. Die vorliegende Dissertation widmet sich der Frage, durch welche zellintrinsic Mechanismen die Weichen für diese hochspezifische Expression von Notch1-Zielgenen gestellt werden.

Einen wichtigen Ansatzpunkt hierbei bildet die Chromatinstruktur, insbesondere die Modifikationen von Histonen, die einen erheblichen Einfluss auf die Transkription haben. Wir konnten durch die Analyse der in den Datenbanken beschriebenen Histon-Modifikationen in ES-Zellen das Vorkommen von sog. bivalenten Domänen in den regulatorischen Regionen von Notch1-Zielgenen beobachten (Schwanbeck *et al.*, 2011). Um zu prüfen, welche Rolle diese Histon-Modifikationen bei der zellkontextabhängigen Aktivierung von Notch1-Zielgenen spielen, sollte ihre Anreicherung während der Aktivierung des Notch1-Signalwegs in ES-Zellen sowie in mesodermal differenzierten Zellen untersucht werden. Der Notch1-Signalweg konnte in den verwendeten Zelllinien mithilfe des Tamoxifen-induzierbaren Systems aktiviert werden und die Anreicherung der jeweiligen Modifikationen sollte dann mittels Chromatin-Immunopräzipitation und anschließender *Real-Time-PCR* analysiert werden. Die Analyse der Modifikationen konzentrierte sich auf die Promotorbereiche der Transkriptionsfaktoren Sox9 und Pax6, die abhängig vom zellulären Kontext direkt durch

Notch1 induziert werden (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Dabei sollten insbesondere die Bereiche, die potenzielle RBP-J Bindungsstellen aufweisen, betrachtet werden. Um der Frage nachzugehen, welche Rolle die einzelnen RBP-J Bindungsstellen bei der kontextabhängigen Aktivierung durch Notch1 spielen, sollten diese Bereiche mittels Chromatin-Immunopräzipitation zunächst auf die tatsächliche Bindung von RBP-J überprüft werden. Im Anschluss sollte dann ihre Funktionalität bei der Notch1 vermittelten Signalgebung analysiert werden. Hierzu sollten die Bindungsstellen in den Promotoren von *Sox9* und *Pax6* mutiert werden, um nach Einbringung in einen Luziferase-Vektor ihren Einfluss bei der Transaktivierung untersuchen zu können. Die hier genannten Experimente sollen einen Beitrag dazu leisten, den komplexen intrinsischen zellulären Kontext und die molekularen Mechanismen, die der Aktivierung von Notch1-Zielgenen zugrunde liegen, zu verstehen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Murine embryonale Stammzelllinien

- EB5: embryonale Stammzelllinie (Subtyp der murinen embryonalen Stammzelllinie E14tg2a), die das Gen für Blasticidinresistenz unter der Kontrolle des Oct4-Promotors exprimieren (Hooper *et al.*, 1987; Niwa *et al.*, 2000).
- EB5-Nert Zellen (EB5-122-1#7): EB5, die stabil mit pCAG-NERT^{ΔOP}-IP, einem Expressionsvektor für das Tamoxifen-induzierbare Notch1-konstrukt (Nert), transfiziert wurden, Subklon EB5-122-1#7 (Schroeder *et al.*, 2006).
- EB5 Kontrolle (EB5-121-II-1#6): EB5, die stabil mit pCAG-IP, dem leeren Expressionsvektor, transfiziert wurden, Subklon EB5-121-II-1#6 (Schroeder *et al.*, 2006).
- D3: embryonale Stammzelllinie (Oka *et al.*, 1995).
- RBP-J^{+/-} #3B4: embryonale Stammzelllinie D3, in der ein Allel des RBP-Jκ-Gens deletiert wurde, Subklon RBP-J^{+/-} #3B4 (Oka *et al.*, 1995).
- RBP-J^{-/-}: embryonale Stammzelllinie D3, in der beide Allele des RBP-Jκ-Gens deletiert wurden, Subklone RBP-J^{-/-} #24x121#1, RBP-J^{-/-} #49x121#4, RBP-J^{-/-} #68x121#6 (Oka *et al.*, 1995).
- RBP-J^{-/-} RBP-J-rescue: embryonale Stammzelllinie, Subklon von RBP-J^{-/-}, die RBP-Jκ transgen exprimieren, Subklone RBP-J^{-/-} #24x123#1, RBP-J^{-/-} #49x123#5, RBP-J^{-/-} #68x123#10 (Schroeder *et al.*, 2003a).

RBP-J^{-/-} VP16-RBP-J-rescue: embryonale Stammzelllinie, Subklon von RBP-J^{-/-}, die VP16-RBP-J_K, ein transkriptionell aktives Derivat von RBP-J_K, transgen exprimieren, Subklone RBP-J^{-/-} #24x125#1, RBP-J^{-/-} #49x125#3, RBP-J^{-/-} #68x125#5 (Schroeder *et al.*, 2003a).

Murine adulte Stammzelllinien

FDCP-Mix: Durch retrovirale Insertionsmutagenese generierte, multipotente, faktorabhängige, myeloische Stammzelllinie aus Knochenmarkslangzeitkulturen (Sponcer *et al.*, 1986; Just *et al.*, 2000).

rNERTneo24 FDCP-mix-Zellen, murine myeloische Stammzelllinie transfiziert mit induzierbarem Notch1 Subklon #24 (Schroeder *et al.*, 2003b).

3.1.2 Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30%	
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol (β-ME)	SIGMA-Aldrich, München
B27-Supplement	LifeTechnologies/Invitrogen, Darmstadt
Complete, EDTA-frei (Protease Inhibitor)	Roche, Mannheim
Diethyldicarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO), zellkulturgetestet	SIGMA-Aldrich, München
DMEM/F12 1:1	LifeTechnologies/Invitrogen, Darmstadt
DNA-ladder Fermentas GeneRuler 1 kb	Thermo Scientific/Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-ladder Fermentas GeneRuler 100 bp	Thermo Scientific/Fermentas, St. Leon-Rot
Ethanol (HPLC gradient grade)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS), zellkulturgetestet	Lonza, Köln
Gelatine, Type A, zellkulturgetestet	SIGMA-Aldrich, München
Humanes Insulin (4 mg/ml)	LifeTechnologies/Invitrogen, Darmstadt

Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Knockout-DMEM	LifeTechnologies/Invitrogen, Darmstadt
Knockout Serum Replacement (KSR)	LifeTechnologies/Invitrogen, Darmstadt
Leukemia inhibitory factor (LIF)	Dr. Ralf Schwanbeck
L-Glutamin	LifeTechnologies/Invitrogen, Darmstadt
LightCycler 480 Probes Master	Roche Applied Science, Mannheim
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Fluka, Seelze
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Neurobasal Medium	LifeTechnologies/Invitrogen, Darmstadt
Non Essential Amino Acids 100 x	LifeTechnologies/Invitrogen, Darmstadt
N2-Supplement	LifeTechnologies/Invitrogen, Darmstadt
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific/Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific/Fermentas, St. Leon-Rot
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Active Motif, La Hulpe, Belgien
Reactive Brown 10	SIGMA-Aldrich, München
Rinderserumalbumin (BSA) (98%)	SIGMA-Aldrich, München
TaqMan Universal PCR Master Mix	LifeTechnologies/AppliedBiosystems, Darmstadt
TEMED (N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Tergitol (Type NP-40)	SIGMA-Aldrich, München
Trichloressigsäure (TCA)	Riedel-de Haën, Seelze
Trypanblaulösung 0,4%	SIGMA-Aldrich, München
Trypsin-EDTA 0,5% (10x) zellkulturgetestet	LifeTechnologies/Invitrogen, Darmstadt
Tween20	Roth, Karlsruhe
4-Hydroxytamoxifen (OHT)	SIGMA-Aldrich, München
6x DNA/RNA Ladepuffer	Thermo Scientific/Fermentas, St. Leon-Roth
10x PBS	LifeTechnologies/Invitrogen, Darmstadt

3.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.1.3.1 Geräte

Elektronische Einkanalpipette, 120 µl	Biohit, Rosbach v. d. Höhe
Neubauer-Zählkammer	OptikLabor, Friedrichsdorf
Geldokumentation LAS 3000	Fujifilm, Düsseldorf
Elektrophorese-Gelkammer für Agarosegele	PeqLab, Erlangen
Elektrophorese-Gelkammer für SDS-Gelelektrophorese (Mini-Protean 3)	Biorad, München
GloMax®-96 Microplate Luminometer	Promega, Madison, USA
Inkubator Hera Cell 150	ThermoScientific, Langenselbold
Kryoboxen	Nalgene, Rochester, USA
LightCycler480	Roche Applied Science, Mannheim
Mechanische Einkanalpipetten	Gilson, Offheim
Nanodrop (Spectrophotometer ND1000)	PeqLab, Erlangen
Orbitalmixer, beheizbar Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss, Jena
Phasenkontrastmikroskop CKX41	Olympus, Hamburg
Pipettierhelfer: accu-jet	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseraufbereitung: MilliQ Plus	Millipore, Schwalbach
Sterilbank HeraSafe	Thermo Scientific, Langenselbold
Stuart Rollmixer	Bibby Scientific, Staffordshire
Stuart Rotator SB3	Bibby Scientific, Staffordshire
Waage BL1500S	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific, Langenselbold
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
7900HT Fast Real-Time PCR System	Life Technologies/Applied Biosystems, Darmstadt

3.1.3.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen 13mm	Sarstedt, Nümbrecht
Einfrierröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflaschen T12,5	BD Biosciences, Heidelberg
Gewebekulturflaschen T25, T75, T175 roter Deckel	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulosemembran 0,45 µm	Whatman, Dassel
Objektträger 76x26 mm	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Petrischalen ohne Nocken (92 x16 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen nunclon (145 cm ²)	Nunc, Thermo Scientific, Langenselbold
Pipettenspitzen: mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht
QiaShredder-Säulen	Qiagen, Hilden
Reagenz- und Zentrifugenröhre (15ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
24 <i>well</i> -Zellkulturplatte	TPP, Trasadingen, Schweiz
384 <i>well</i> Real-Time-PCR-Platten	Thermo Scientific, Langenselbold
6 <i>well</i> - Zellkulturplatte	Corning, Wiesbaden
6 <i>well</i> - Zellkulturplatte	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.4 Kits

ChIP-IT Express	Active Motif, La Hulpe, Belgien
Dual-Luziferase Reporter Assay System	Promega, Madison, USA
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare, München
NucleoBond PC500EF	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
Nucleo Spin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
RNeasy Mini Plus	Qiagen, Hilden

3.1.5 Assays für die *Real-Time-PCR*

TaqMan Gene Expression Assay-on-Demand Life Technologies/Applied Biosystems,
Darmstadt

Name	Nummer	Amplikon-Größe (bp)
GAPDH	Mm99999915_g1	107
Hes1	Mm00468601_m1	102
Hes5	Mm00439311_g1	91
Hey1	Mm00468865_m1	80
Hey2	Mm00469280_m1	85
HeyL	Mm00516555_m1	83
Oct4	Mm00658129_gH	148
Pax6	Mm00443072_m1	56
Polr2a	Mm00839502_m1	70
Sox9	Mm00448840_m1	101
Myf5	Mm00435125_m1	71

3.1.6 Primer für die ChIP-Analyse

Gen	Primer Paar	Sequenz (5'-3')	Amplikon-Größe (bp)
Sox9_A	Sox9_A for	TCCTCTCGTTCTCCAGGTTGTTTG	189
	Sox9_A rev	TGCTTGCGGTCAGTTCTGTTTC	
Sox9_B	Sox9_B for	TGCCTTTGTGCCAGAATACGTG	258
	Sox9_B rev	ACTACCCTGTAGCCTGTTTACGAG	
Sox9_C	Sox9_C for	TGCAGGTCTAAGAGGACGCAAC	255
	Sox9_C rev	ACTGAGTCACAAACACCGTCAG	
Sox9_D	Sox9_D for	ATTGCTGTAAACGCCAGCGAAG	240
	Sox9_D rev	ACGTCCGAGTGTGTAAGTTTGC	
Sox9_E	Sox9_E for	AATCAGCGACTTGCCAACACTG	162
	Sox9_E rev	AAAGTTGTCGCTCCCACAGAAG	
Pax6_A	Pax6_A for	ACAACGACACACGTTGACACAC	214
	Pax6_A rev	AAGAGTCCTCACCAAACACTCTCC	
Pax6_B	Pax6_B for	TAGGCATAGTTGTGCCACCATCG	212
	Pax6_B rev	ACGAGGTCCTTTCTTGTACAGTGG	
Pax6_C	Pax6_C for	ACAAACCGACCAATTGCACCAG	183
	Pax6_C rev	TGAACCAGAGCGGGAAATGAGG	
Pax6_D	Pax6_D for	ACTTGAGCCATCACCAATCAGC	219
	Pax6_D rev	CCACAACGGTTTGAAATGACGG	
Pax6_E	Pax6_E for	TCAGCGCAAAGGGACGTAGAG	211
	Pax6_E rev	ATGACCCTTTGGTGCTCGAGTG	
Id4_A	Id4_A for	TCAAGCATGTCTAAAGGTGGGAGG	107
Id4_B	Id4_A rev	ACAACCAAGCTCTTCAGATGGC	231
	Id4_B for	TCTTAAGCCCACTTCTGCATCTGG	
Id4_C	Id4_B rev	TCTTTGCACAATTGCCGAAGCCC	198
	Id4_C for	ACAAACAAGGCTCAGAGTCCCTC	
	Id4_C rev	AAGGGCACTCCATTCCGTCAAC	

Id4_D	Id4_D for	TTAGTCGAAGCTCAGAAGGGAACG	293
	Id4_D rev	GACCGCGACAAGCGGTAGAG	
Gapdh_A	Gapdh_A for	T TACTCGGGAAGCAGCATTCAG	257
	Gapdh_A rev	TAGCTGGGCCTCTCTCATTTCC	
Gapdh_B	Gapdh_B for	CTGTACGGGTCTAGGGATGCTG	160
	Gapdh_B rev	ATGAGATTAGCGTGGCCCGAAG	
Hes5_A	Hes5_A for	ATATCCAGGTACAGTCTTGGGTCC	284
	Hes5_A rev	AGCCAACAAGAAGTTCACACCAC	
Hes5_B	Hes5_B for	AGCAGAAGCCCAGACATACAGC	194
	Hes5_B rev	TTACCATGGATGGAAGCATCTGGG	
Hes5_C	Hes5_C for	GTTCTTACAAAGAGGCCCATCCAC	188
	Hes5_C rev	AAACCATGGCTGCCCTTAACTC	
Hes5_D	Hes5_D for	TCTCATTTCTCTGCGCCTGTGG	217
	Hes5_D rev	AATGTCCGGGCTGTGGGAAC	
Hes5_E	Hes5_E for	GGGAAAAGGCAGCATATTGAG	366
	Hes5_E rev	GGAGCTCTGGAGGCGATTAG	

3.1.7 Primer zur Einführung von Mutationen

Die Sequenzen der RBP-J Bindungsstellen sind in der Wildtyp-Sequenz im Kasten dargestellt und die mutierten Basen der jeweiligen Primer sind unterstrichen:

Primer	Sequenz (5'-3')
Sox9 BS1 Wildtyp	GAAACTTC <u>TGTGGGAG</u> CGACAAC TTTACCAGTTT
Sox9 BS1mut for	GAAACTTCTGACATCGCGACAAC TTTACCAGTTT
Sox9 BS1mut rev	AGTTGTCGCGATGTCAGAAAGTTTCCAGGCAGTTC
Sox9 BS2 Wildtyp	CACATCGG <u>TTCACACG</u> GAGACCGTTCCAAAAC T G
Sox9 BS2mut for	CACATCGGTG <u>TGTCAG</u> GAGACCGTTCCAAAAC T G
Sox9 BS2mut rev	ACGGTCTCCTGACACACCGATGTGTGTGTGTGTG
Sox9 BS5 Wildtyp	ACAAGCAC <u>TTCCAGG</u> TCCCCCCTAACACAGTGG
Sox9 BS5mut for	ACAAGCACTGAGTCGGTCCCCCCTAACACAGTGG
Sox9 BS5mut rev	AGGGGGGACCGACTCAGTGCTTGTCTACAGGGAA
Sox9 BS6 Wildtyp	CAGTGCTT <u>TTCCCACC</u> CCAATTCCCTGTAGACAA
Sox9 BS6mut for	CAGTGCTTT <u>CAGTC</u> CCCCAATTCCCTGTAGACAA
Sox9 BS6mut rev	GGAATTGGGGGACTGAAAGCACTGTAGATGCTCA
Pax6 BS1 Wildtyp	AAATGGCA <u>CGTGGGAG</u> AAGTTGGAGAGTGT T TGG
Pax6 BS1mut for	AAATGGCACGAAGTCGAAGTTGGAGAGTGT T TGG
Pax6 BS1mut rev	TCCAAC T TCGACTTCGTGCCATTTGTTGACTAAG
Pax6 BS2 Wildtyp	GGACAAGG <u>GGTGGGAA</u> GTTAGGGTGAAATGGGGC
Pax6 BS2mut for	GGACAAGGGGACGTCAGTTAGGGTGAAATGGGGC
Pax6 BS2mut rev	ACCCTAACTGACG T TCCCCTTGTCCACCTCGGCCT

Pax6 BS3 Wildtyp ATATTTTGTGTGGGAGCGAGCGGTGCATTTGCAT
Pax6 BS3mut for ATATTTTGTGAAGTCGCGAGCGGTGCATTTGCAT
Pax6 BS3mut rev ACCGCTCGCGACTTCACAAAATATTGCTTTATGC
Pax6 BS4 Wildtyp CTGTCTTCCTCCAGGATCTGAGAATTGCTCTC
Pax6 BS4mut for CTGTCTTCTCACATGGGATCTGAGAATTGCTCTC
Pax6 BS4mut rev CTCAGATCCCATGTGAGAAGACAGAGATTGACAA
Pax6 BS5 Wildtyp TCTCCCGGCTTCCCACA AACTCTATCTTGCGAAAG
Pax6 BS5mut for TCTCCCGGCTGTCTGCAACTCTATCTTGCGAAAG
Pax6 BS5mut rev ATAGAGTTGCAGACAGCCGGGAGAGCTAGGGCGT

3.1.8 Hydrolyse-Sonden

Universal ProbeLibrary Set, Mouse

Roche Applied Science, Mannheim

Nummer	Primer-Assay
66	Hes5_A
110	Hes5_D
58	Sox9_B
109	Sox9_C
94	Sox9_D
11	Sox9_E
81	Hes1
52	Gapdh_A

3.1.9 Plasmide

Plasmid	Beschreibung
RBP-J-luc	<i>Firefly</i> -Luziferase Leserahmen unter Kontrolle des minimalen β -Globin-Promotors und 12 RBP-J Bindungsstellen (Strobl <i>et al.</i> , 1997)
0-luc	Kontrollvektor zu RBP-J-luc (Strobl <i>et al.</i> , 1997)
Sox9-luc	<i>Firefly</i> -Luziferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3) enthält den <i>Sox9</i> Promotor (-4 kb bis +315 b) (Kanai und Koopman, 1999)
SoxBS1mut-luc	<i>Firefly</i> -Luziferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3) enthält den <i>Sox9</i> -Promotor mit mutierter RBP-J-Bindungsstelle 1 (Haller <i>et al.</i> , 2012)
SoxBS2mut-luc	<i>Firefly</i> -Luziferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3) enthält den <i>Sox9</i> -Promotor mit mutierter RBP-J-Bindungsstelle 2 (Haller <i>et al.</i> , 2012)

SoxBS1/2mut-luc	<i>Firefly</i> -Luziferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3) enthält den <i>Sox9</i> -Promotor mit mutierten RBP-J Bindungsstellen 1 und 2 (Haller <i>et al.</i> , 2012)
Sox9BS5mut-luc	<i>Firefly</i> -Luziferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3) enthält den <i>Sox9</i> -Promotor mit mutierter RBP-J-Bindungsstelle 5
Sox9BS6mut-luc	<i>Firefly</i> -Luziferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3) enthält den <i>Sox9</i> -Promotor mit mutierter RBP-J-Bindungsstelle 6
Pax6-luc	<i>Firefly</i> -Luziferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3) enthält den <i>Pax6</i> -Promotor (-3607bp - +437bp)
Pax6BS1mut-luc	<i>Firefly</i> -Luziferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3) enthält den <i>Pax6</i> -Promotor mit mutierter RBP-J-Bindungsstelle 1
Pax6BS3mut-luc	<i>Firefly</i> -Luziferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3) enthält den <i>Pax6</i> -Promotor mit mutierter RBP-J-Bindungsstelle 3
Pax6BS4mut-luc	<i>Firefly</i> -Luziferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3) enthält den <i>Pax6</i> -Promotor mit mutierter RBP-J-Bindungsstelle 4
Pax6BS5mut-luc	<i>Firefly</i> -Luziferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL3) enthält den <i>Pax6</i> -Promotor mit mutierter RBP-J-Bindungsstelle 5
Hes5-luc	<i>Firefly</i> -Luziferaseplasmid (Ausgangsvektor pGL2) enthält den <i>Hes5</i> -Promotor (-800bp bis +72bp) (Ong <i>et al.</i> , 2006)
Hes1-luc	<i>Firefly</i> -Luziferaseplasmid (Ausgangsvektor) enthält den <i>Hes1</i> -Promotor (-150bp bis +218bp) (Jarriault <i>et al.</i> , 1995)
pRL-TK	<i>Renilla</i> -Luziferaseplasmid enthält <i>Renilla</i> -Luziferase unter der Kontrolle des <i>Thymidinkinase (TK)</i> -Promotors (Promega, Cat.# E2241)

3.1.10 Puffer, Lösungen und Zellkultur-Medien

Erhaltungsmedium für EB5-Zellen	ad 100	KO-DMEM
	10%	KSR
	1%	FCS
	2 mM	L-Glutamin
	1%	Non Essential Amino Acids
	10 ng/ml	LIF
	0,1 mM	β -Mercaptoethanol
Erhaltungsmedium für FDCP-Mix-Zellen	ad 100	IMDM
	20%	Pferdeserum
	10%	IL-3 konditioniertes Medium
Einfriermedium für EB5-Zellen	50%	FCS
	40%	Erhaltungsmedium EB5
	10%	DMSO
Einfriermedium für FDCP-mix-Zellen	90%	Pferdeserum
	10%	DMSO
Mesodermales Differenzierungsmedium	ad 100	alpha-MEM
	15%	FCS für mesod. Diff.
	2 mM	L-Glutamin
	0,1 mM	β -Mercaptoethanol
Neurales Differenzierungsmedium N2B27	50%	Neurobasal
	50%	DMEM/F12 + Glutamax
	1%	B27 Supplement
	0,5%	N2-Supplement
	0,5%	L-Glutamin
	37,5 μ g/ml	BSA
	12,5 μ l/ml	Insulin
0,1 mM	β -Mercaptoethanol	

Proteinlysispuffer	1%	SDS
	10	mM EDTA
	50	mM Tris/HCl pH 7,5
Proteinladepuffer (4x)	4%	SDS
	16%	Glycerin
	25 mM	Tris/HCl, pH 6.8
	0.01%	Bromphenolblau
TAE-Puffer (50x)	2 M	Tris/HCl
	1 M	Natriumacetat
	62,5 mM	EDTA
	pH 8,5	

3.1.11 Antikörper

Anti-Histone H3, pan, clone A3S (Cat.# 05-928)	Millipore, Schwalbach
Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys27) (Cat.# 07-449)	Millipore, Schwalbach
Histone H2A.Z Rabbit, polyclonal (Cat.# 39113)	Active Motif, La Hulpe, Belgien
Histone H3 acetyl Lys27 Rabbit, polyclonal (Cat.# 39135)	Active Motif, La Hulpe, Belgien
Histone H3 acetyl Lys9 Rabbit, polyclonal (Cat.# 39137)	Active Motif, La Hulpe, Belgien
Histone H3 dimethyl Lys4 Rabbit, polyclonal (Cat.# 39141)	Active Motif, La Hulpe, Belgien
Histone H3 monomethyl Lys9 Rabbit, polyclonal (Cat.# 39249)	Active Motif, La Hulpe, Belgien
Histone H3 trimethyl Lys4 Rabbit, polyclonal (Cat.# 39159)	Active Motif, La Hulpe, Belgien
Histone H3 trimethyl Lys9 Rabbit, polyclonal (Cat.# 39161)	Active Motif, La Hulpe, Belgien
Histone H4 acetyl Lys16 Rabbit, polyclonal (Cat.# 39167)	Active Motif, La Hulpe, Belgien

Histone H4 monomethyl Lys20, polyclonal
(Cat.# 39176)

Active Motif, La Hulpe, Belgien

Normal rabbit IgG
(Cat.# 12-370)

Millipore, Schwalbach

3.1.12 Software

Adobe Photoshop Version 6.0

Adobe Systems, München

Microsoft Excel

Microsoft, Unterschleißheim

SDS 2.2.2 (7900HT, Version 2.2.2)

Applied Biosystems, Foster

ND1000 3.5.2

PeqLab, Erlangen

CorelDraw 11

Corel, Ottawa, Kanada

LightCycler 480 Software 1.5

Roche, Mannheim

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturmethoden

3.2.1.1 Kultur undifferenzierter embryonaler Stammzellen

Alle Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Undifferenzierte embryonale Stammzellen wurden in Erhaltungsmedium in Gewebekulturflaschen gehalten, die mit 0,1% Gelatinelösung beschichtet waren. Die Beschichtung erfolgte mindestens 30 min vor dem Aussäen der Zellen und überschüssige Gelatine wurde kurz vorher entfernt. Alle zwei Tage wurden die Zellen mit 0,5% Trypsin/EDTA abgelöst und auf neue mit 0,1% Gelatine beschichtete Zellkulturflaschen je nach Dichte in einem Verhältnis bis 1:4 neu ausgesät. Die Zellzahl wurde mithilfe von Neubauer-Zählkammern ermittelt. Zum Ausschluss toter Zellen erfolgte eine Verdünnung der Zellen von 1:2 mit 0,4% Trypanblau. Zum Entfernen des Trypsins wurden die Zellen einmal gewaschen (1000 rpm, 5 min., 20°C). 10 ng/ml LIF und 0,1 mM β-ME wurden jeweils frisch zum Erhaltungsmedium zugegeben.

3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von embryonalen Stammzellen

Zum Einfrieren wurden die ES-Zellen mit Trypsin abgelöst, abzentrifugiert und in Einfriermedium aufgenommen. Diese Suspension wurde auf Einfrierröhrchen verteilt, die anschließend in eine Kryobox, welche mit Isopropanol gefüllt war, gestellt wurden. Die Kryobox wurde umgehend in einer -80°C -Truhe gelagert. Dadurch wurden die Zellen von Raumtemperatur beginnend um ca. 1°C pro Minute abgekühlt. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Üblicherweise wurden ca. 1×10^6 Zellen in ein Einfrierröhrchen gegeben.

Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen zunächst im Wasserbad bei 37°C durch Schwenken angetaut und anschließend in ein 50 ml-Röhrchen überführt um dann tropfenweise 5 ml Erhaltungsmedium über einen Zeitraum von 10 min zuzugeben. Die Zellen wurden einmal gewaschen (1000 rpm, 5 min, 20°C) und entsprechend ihrer Dichte in Erhaltungsmedium ausgesät.

3.2.1.3 Neurale Differenzierung von embryonalen Stammzellen

Die neurale Differenzierung erfolgte als *Monolayer*-Differenzierung in N2B27-Medium nach Ying *et al.* 2003. Hierzu wurden die EB5-Nert Zellen einen Tag nach dem Umsetzen mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und in N2B27-Medium aufgenommen. Sie wurden in einer Zellzahl zwischen 0,125 und 1×10^5 Zellen pro *well* in 6*well*-Platten von Corning ausgesät. Dabei wurde jedes *well* mit 2 ml Medium befüllt. Während der Differenzierung wurde alle ein bis zwei Tage das Medium gewechselt. Der Differenzierungszeitraum lag zwischen einem und fünf Tagen. Zur Notch1-Aktivierung wurden 50 nM OHT zusammen mit dem Medium und bei jedem Mediumwechsel neu zugegeben.

3.2.1.4 Mesodermale Differenzierung von embryonalen Stammzellen

Die mesodermale Differenzierung embryonaler Stammzellen erfolgte mit Hilfe von *Embryoid Bodies* in sogenannten „Hängenden Tropfen“ (Wobus *et al.*, 1991). Von den undifferenziert gehaltenen EB5-Nert Zellen wurde zunächst das Erhaltungsmedium abgenommen und die Zellen wurden mit 0,5% Trypsin/EDTA abgelöst, zentrifugiert und in mesodermalem Differenzierungsmedium aufgenommen. Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und auf eine Zellzahl von $4 \times 10^4/\text{ml}$ eingestellt. Mit einer Mehrkanalpipette wurden nun Tropfen á 20 μl (entspricht einer Zellzahl von 800 Zellen/Tropfen) auf die Innenseite der Deckel von Petrischalen getropft, so dass sich ca. 50 Tropfen auf einem Deckel befanden. Die Tropfen sollten möglichst nicht miteinander

verlaufen. Nun wurde der Deckel vorsichtig umgedreht und auf die mit 5 ml reinst H₂O befüllte Petrischale gelegt. Die Zellen wurden für 2 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ gehalten. Die Zellen lagerten sich während dieser Zeit der Schwerkraft folgend am untersten Punkt der hängenden Tropfen zu Zellaggregaten zusammen, den sogenannten *Embryoid Bodies*. Nach zwei Tagen wurden die *Embryoid Bodies* in Suspension gebracht. Für die Suspensionskultur wurden zunächst 4 ml frisches Differenzierungsmedium in einer Bakterienchale vorgelegt und anschließend die Tropfen von insgesamt drei Deckeln mit jeweils 1 ml Differenzierungsmedium abgespült. Die *Embryoid Bodies* wurden so für weitere 8 Tage differenziert. Während dieser Zeit wurden die Zellen adhärent. Das Medium wurde an Tag fünf und an Tag sieben der Differenzierung erneuert. Zur Notch1-Aktivierung wurden 500 nM OHT zusammen mit dem Medium und bei jedem Mediumwechsel neu zugegeben.

3.2.1.5 Kultur hämatopoetischer Stammzellen

Die FDCP-mix-Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen gehalten (Sponcer *et al.*, 1986). Das Medium bestand aus 20% Pferdeserum, 10% IL-3 konditioniertem Medium und IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium). Alle drei bis vier Tage wurde die Zellzahl neu eingestellt und frisches IMDM-Medium zu den Zellen gegeben. Das Medium hatte eine Osmolarität von 310 - 320 mosm/kg. Die Aktivierung von Notch1 erfolgte durch Zugabe von 500 nM OHT. Betrug die Anzahl der toten FDCP-mix-Zellen nach dem Auftauen mehr als 50%, wurde ein Ficoll-Gradient für myeloische Zellen (Dichte: 1,077) durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in 1 ml IMDM-Medium aufgenommen und vorsichtig auf 2 ml Ficoll geschichtet. Die Abtrennung der toten Zellen erfolgte über einen Zentrifugationsschritt (15 min, 4°C, 800 g, keine Bremse), wobei sich die toten Zellen auf dem Boden des Zentrifugationsröhrchens und die lebenden Zellen sich in der Phase zwischen dem Ficoll und dem Medium befanden. Diese wurden mit Hilfe einer Spritze abgenommen und anschließend mit 10 ml IMDM-Medium gewaschen.

3.2.1.6 Mykoplasmen-PCR

Um Mykoplasmen-Kontaminationen auszuschließen, wurden die Zellen regelmäßig durch eine PCR auf das Vorhandensein von Mykoplasmen-DNA getestet. Diese PCR war eine sogenannte „nested PCR“ in der zwei PCRs hintereinander mit verschiedenen Primern durchgeführt wurden (Lindl, 2002). Alle eingesetzten Zellen waren mykoplasmenfrei. Folgende Primer wurden eingesetzt:

Sequenzen der äußeren Primer (5'- u. 3'-Gemisch)

5'-Primer-Mix: CGCCTGAGTAGTACGTTTCGC
 CGCCTGAGTAGTACGTACGC
 TGCCTGAGTAGTACATTCGC
 CGCCTGGGTAGTACATTCGC
 CGCCTGAGTAGTATGCTCGC
 TGCCTGGGTAGTACATTCGC

3'-Primer-Mix: GCGGTGTGTACAAGACCCGA
 GCGGTGTGTACAAAACCCGA
 GCGGTGTGTACAAAACCCGA

Sequenzen der inneren Primer (5'- u. 3'-Gemisch)

5'-Primer-Mix: TGGTGCATGGTTGTCGTCAG
 TGGTGCACGGTTGTCGTCAG

3'-Primer-Mix: GAACGTATTCACCGCAGCATA
 GAACGTATTCACCGCGACATA
 GAACGTATTCACCGTAGCGTA
 GAACGTATTCACCGCAGCGTA
 GAACGTATTCACCGCAGTATA
 GAACGTATTCACCGCAACATG
 GAACGTATTCACCGCGACATG

Produktlänge der ersten *PCR*: 520bp

Produktlänge der zweiten *PCR*: 300bp

3.2.1.7 Transfektion

Für die Transfektion von undifferenzierten EB5-Nert Zellen wurden 4×10^4 Zellen in 500 μ l Erhaltungsmedium pro *well* einer 24*well*-Zellkulturplatte 24 h vor der Transfektion ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit Fugene HD nach Angaben des Herstellers mit einer Fugene zu DNA Ratio von 1,5:1 und einer DNA-Menge von 0,5 μ g pro *well*.

3.2.1.8 Luziferase-Reporter-Assay

Für den Luziferase-Assay wurden undifferenzierte EB5-Nert Zellen in ein *well* einer 24 *well* Platte mit 0,45 μ g *Firefly*-Luziferaseplasmid und 0,05 μ g *Renilla*-Luziferaseplasmid transfiziert und mit 500 nM OHT induziert. Neural differenzierte EB5-Nert Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen in 2 ml pro *well* einer 6*well* Platte in An- oder Abwesenheit von 50 nM OHT ausgesät und nach 5 Tagen mit 0,45 μ g *Firefly*-Luziferaseplasmid und 0,05 μ g *Renilla*-Luziferaseplasmid transfiziert. Nach 16 h wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden sie einmal mit PBS gewaschen, der Überstand wurde vollständig abgesaugt und 100 μ l Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Nach 15minütiger Inkubation wurde das Zelllysate

bei 13000 rpm 5 min bei 4°C zentrifugiert und 20 µl von dem Überstand für den Luziferase-Assay eingesetzt. Die Luziferase-Aktivität wurde mit dem Dual Luziferase Reporter Assay System von Promega nach Angaben des Herstellers bestimmt.

3.2.1.9 Chromatin-Immunopräzipitation

Für die Chromatin-Immunopräzipitation wurden 3×10^6 EB5-Nert Zellen und $6,5 \times 10^7$ FDCP-Mix Zellen geerntet. Dazu wurden die Zellen im Falle der adhärennten EB5-Nert Zellen zunächst trypsiniert, in 10 ml Erhaltungsmedium aufgenommen und mit 1% Formaldehyd fixiert. Die in Suspension gehaltenen FDCP-Mix Zellen wurden direkt in der Zellkulturflasche durch Zugabe von 1% Formaldehyd fixiert. Die Fixierung wurde nach 5 min durch Zugabe von 0,125 mM Glycin gestoppt. Nun wurden auch die FDCP-Mix Zellen mittels eines Zellschabers abgelöst. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und das Pellet wurde nach Zugabe von *Protease-Inhibitor-Cocktail* (PIC) und PMSF bei -80°C eingefroren. Für die weitere Aufbereitung wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Das Pellet wurde aufgetaut und in 1 ml Lysispuffer, versetzt mit 1 µl PIC, 1 µl PMSF, 0,5% NP40 und 0,1% TritonX100, aufgenommen und 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellkernisolierung mit Hilfe eines *Dounce* Homogenisierers. Nach einem Zentrifugationsschritt (5000 rpm, 10 min, 4°C) wurde das Kernpellet entweder zur Vorbereitung des enzymatischen Scherens in 350 µl *Digestion*-Puffer, versetzt mit 1 µl PIC und 1 µl PMSF, aufgenommen und für 15 s bei 50% Power sonifiziert. Daraufhin erfolgte das enzymatische Scheren bei 37°C für 6 min (EB5) oder 10 min (FDCP-Mix). Sollte das Chromatin mechanisch geschert werden, wurde das Kernpellet in 350 µl *Shearing*-Puffer, versetzt mit 1 µl PIC und 1 µl PMSF, aufgenommen und 4-mal für 10 s bei 50% Power sonifiziert. Um die Konzentration des Chromatins und die Effizienz des Scherens zu überprüfen, wurde ein Aliquot des gescherten Chromatins für die DNA-Aufbereitung abgenommen und der Rest bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Chromatin-Immunopräzipitation erfolgte nach Angaben des ChIP-IT-Kits. Es wurden pro Ansatz 2,5 – 6 µg Chromatin eingesetzt.

3.2.1.10 *Real-time PCR* mit ChIP-Proben

Die in der Chromatin-Immunopräzipitation mittels spezifischer Antikörper angereicherte DNA wurde anschließend mithilfe der quantitativen *Real-Time PCR* quantifiziert. Hierfür wurden Primer verwendet, welche potenzielle RBP-J Bindungsstellen in den Promotoren von ausgewählten Notch-Zielgenen flankieren.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,5 µl DNA

0,5 µl Primer-Mix (6µM)

4,5 µl Power SYBR-Green PCR Master-Mix

4,5 µl H₂O

Die *PCR* wurde in einer 384 *well* Platte im LightCycler480 durchgeführt. Die Proben wurden als Duplikate gemessen. Folgendes Programm wurde verwandt:

Schritt 1 95°C 10 min

Schritt 2 95°C 15 s

Schritt 3 59°C 15 s

Schritt 4 72°C 30 s

Schritt 5 75°C 30 s

Schritt 2 bis Schritt 5 wurden 38-mal wiederholt.

Wurden Hydrolyse-Sonden verwendet, setzte sich der Reaktionsansatz wie folgt zusammen:

0,5 µl DNA

0,5 µl Primer-Mix (6µM)

4,3 µl LightCycler 480 Probes Master

0,2 µl Hydrolyse-Sonde

4,5 µl H₂O

Unter Verwendung der Hydrolyse-Sonden wurde folgendes Programm verwendet.

Schritt 1 95°C 10 min

Schritt 2 95°C 15 s

Schritt 4 60°C 30 s

Schritt 5 75°C 30 s

Schritt 2 bis Schritt 5 wurden 38-mal wiederholt.

3.2.2 RNA-Methoden

3.2.2.1 RNA-Isolierung

Die gesamte RNA der Zellen wurde mit dem „*RNeasy Mini Plus Kit*“ von Qiagen 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 Puffer RLT nach Entfernen des Mediums, anschließend wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die weitere Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Eluiert wurde mit 30-50 μl RNase-freiem Wasser.

3.2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 280 nm mit Hilfe des NanoDrop ND-1000. Eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entsprach einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger RNA. Die Reinheit wird durch das Verhältnis der Extinktionen von 260 nm zu 280 nm angegeben, wobei ein Wert zwischen 1,8 und 2,1 einer reinen, also proteinfreien, Probe entspricht.

3.2.2.3 Kontrolle auf Degradierung

Um eine mögliche Degradierung der RNA auszuschließen, wurden die Proben in einem 1% TAE-Agarosegel überprüft. Es wurde 1 μg RNA mit Ladepuffer vermischt aufgetragen und 30-45 Minuten bei 100 V aufgetrennt. Die Anfärbung der Nukleinsäuren erfolgte dabei durch das im Gel enthaltene Ethidiumbromid. Bei intakter RNA wurden zwei Banden, die die 28s und 18s rRNA darstellen im Verhältnis 2:1 sichtbar.

3.2.2.4 RNA-Fällung

Für die Langzeitlagerung von RNA wurden die Proben gefällt, um ihre Haltbarkeit zu verlängern. Dazu wurden die RNA-Proben im Verhältnis 1: 2,5 mit 100% Ethanol und im Verhältnis 1:0,1 mit 3 M Natriumacetat versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

3.2.2.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des „*First Strand cDNA Synthesis Kit*“ von Fermentas nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Üblicherweise wurden 1 µg RNA eingesetzt. Es wurden stets Oligo(dT)18-Primer verwandt und die Reaktion bei 37°C für 60 Minuten durchgeführt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.2.6 Real-Time PCR

Die Quantifizierung der mRNA erfolgte mittels *Real-Time PCR*. Die cDNA wurde dabei durch Bindung von *TaqMan* Sonden markiert. Für die Vorbereitung der Proben wurde der *TaqMan 2x Universal PCR MasterMix NoAmpEraseUNG* verwendet. Dabei wurden 0,5 µl der cDNA-Probe mit 4,5 µl des *PCR MasterMix* gemischt und in eine 384 well *PCR*-Platte pipettiert. Für die Bestimmung der Expression eines bestimmten Gens wurde ein Ansatz, bestehend aus 0,5 µl des entsprechenden Gen-Assays (*TaqMan Gene Expression Assay-on-Demand*) und 4,5 µl dest. H₂O, zu den Proben gegeben. Die Messung erfolgte mit dem *7900HT Fast Real-Time-PCR System* (Applied Biosystems) nach folgendem Protokoll:

Schritt 1: 95 °C 10 min

Schritt 2: 95 °C 15 s

Schritt 3: 60 °C 1 min

Schritt 2 und 3 wurden 40-mal wiederholt

Die relative Konzentration der Transkripte wurde mit Hilfe einer Standardkurve bestimmt. Die Expression der zu untersuchenden Gene wurde auf eine interne Kontrolle (*Gapdh*) normalisiert. 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 $\Delta\Delta C_t$ -Methode unter Berücksichtigung der tatsächlichen Effizienz der Assays berechnet. Die Effizienz jedes Assays wurde zuvor in einem Pilotexperiment mittels einer Standardkurve überprüft.

3.2.3 Bakterienkultur

3.2.3.1 Bakterienkultivierung

Die Bakterien (DH5 α) wurden nach der Transformation auf LB-Agarplatten, die Ampicillin (100 $\mu\text{g/L}$ Endkonzentration) enthielten selektioniert und bei 4°C gelagert. Davon konnte eine Flüssigkultur angesetzt werden. Zur dauerhaften Lagerung der Bakterien wurde ein Glycerolstock (ein Gemisch aus 0,5 ml 50%-igem Glycerol und 1 ml einer Bakterienkultur) angelegt, der bei -80°C eingefroren wurde.

3.2.3.2 Herstellung kompetenter *E. coli*

Zur Herstellung kompetenter Bakterien (DH5 α) wurde eine Übernachtskultur in 10 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Damit wurden 100 ml LB-Medium mit einer OD von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD von 0,4 bis 0,6 wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml Puffer RF1 aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für 5 min. Das Pellet wurde in 4 ml Puffer RF2 gelöst, wieder 15 min auf Eis inkubiert und anschließend in 100 μl Aliquots zuerst auf Trockeneis und anschließend bei -80°C eingefroren.

3.2.3.3 Transformation

Für die Transformation von Bakterien wurden 100 ng DNA zu 100 μl kompetenten Bakterien gegeben und 30 – 45 min auf Eis inkubiert. Es folgte für 90 s ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Bakterien wurden bei 37°C für 1 h geschüttelt. Davon wurden 100 μl auf einer LB-Agarplatte, die zur Selektion Ampicillin (100 $\mu\text{g/L}$) enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.4 DNA-Techniken

3.2.4.1 Extraktion von Plasmiden

Zur Vorbereitung einer Plasmidextraktion musste eine Flüssigkultur der entsprechenden Bakterien angelegt werden. Dazu wurde LB-Medium mit einem Antibiotikum (Ampicillin 100 $\mu\text{g/L}$ oder Kanamycin 30 $\mu\text{g/L}$ Endkonzentration) zur Selektion versetzt. Für eine Plasmid-Mini-Präparation wurden 3 ml Medium verwendet, für eine Plasmid-Maxi-Präparation 200 ml. Von einer LB-Agarplatte (s. 3.2.1.1) wurde eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und damit das Medium angeimpft. Die Kultur wurde über

Nacht bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Die Plasmid-Mini-Präparation erfolgte mit dem Kit „*NucleoSpin Plasmid*“ von Macherey-Nagel und die Plasmid-Maxi-Präparation mit dem Kit „*NucleoBond PC500EF*“ (Endotoxin-frei) von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers.

3.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 280 nm mit Hilfe des NanoDrop ND-1000. Eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entsprach einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

3.2.4.3 Restriktionverdau von DNA

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

3.2.4.4 Ligation

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

3.2.4.5 Gelextraktion

Sollten bestimmte DNA-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert werden, wurde die DNA unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm mithilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem „*NucleoSpin Extract II Kit*“ von Macherey-Nagel nach Anleitung des Herstellers.

3.2.4.6 Gezielte Mutagenese

Zum Mutieren ausgewählter Promotorsequenzen wurde die Methode nach *Quikchange Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene) angewandt. Für die gezielte Mutagenese einzelner RBP-J Bindungsstellen wurden Primer gewählt, die an die RBP-J-Bindungsstelle und jeweils 9 bp stromaufwärts und 18 bp stromabwärts davon banden, aber an vier bis fünf Positionen so verändert wurden, dass die RBP-J-Bindungsstelle nicht mehr funktionell war (siehe 3.1.7). Als Template diente doppelsträngige Plasmid-DNA. Die Primer banden an den komplementären Strängen des Plasmids. Die nach der *PCR* erhaltenen DNA-Fragmente bildeten ein mutiertes Plasmid. Anschließend wurde der *PCR*-Ansatz mit DpnI verdaut. Die DpnI Endonuklease schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA und verdaut so nur das Plasmid-Template. Die auf diese Weise selektierte, mutierte DNA wurde mittels des „*Nucleo Spin Extract II Kits*“ gereinigt und konnte sofort für die Transformation von *E.coli* verwendet werden. Die Einführung der Mutation wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

Folgender Ansatz wurde pipettiert:		Folgendes <i>PCR</i> -Programm wurde verwendet:	
Phusion Polymerase	0,5 µl	Schritt1	98°C 5min
5 x HF buffer	10 µl	Schritt2	98°C 20 s
2 mM dNTPs	5 µl	Schritt3	56°C 20 s
200 ng template	0,5 µl	Schritt4	72°C 4 min 30 s
Primer for (50 µM)	0,5 µl	Die Schritte 2 - 4 wurden 29-mal wiederholt	
Primer rev (50 µM)	0,5 µl	Schritt5	72°C 10 min
H ₂ O	33 µl	Schritt6	4°C

3.2.5 Statistische Methoden

Um die statistische Signifikanz der erhaltenen Werte zu ermitteln, wurde der Student's t-Tests für gepaarte Daten angewandt. Für die Analyse von *Real-Time PCR*-Daten wurden die Delta-Ct-Werte als Grundlage der Berechnung verwandt, für ChIP-Daten wurde die statistische Relevanz aus den % Input-Werten berechnet. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von Notch1 auf ausgewählte Zielgene in ES-Zellen und während ihrer *in vitro* Differenzierung

Eine der Hauptaufgaben des Notch1-Signalweges besteht unter anderem in der Regulation von Differenzierungsprozessen während der Embryogenese und im adulten Organismus. Der Notch1-Signalweg ist dafür bekannt, dass er die Differenzierung vor allem durch reprimierende Prozesse beeinflusst. Er kann jedoch die Differenzierung auch induzieren. Vor kurzem konnten wir zeigen, dass Notch1 an der Induktion von einigen Transkriptionsfaktoren beteiligt ist, die eine essentielle Rolle während der Differenzierung von Zelltypen verschiedener Keimblätter spielen (Meier-Stiegen *et al.*, 2010; Bernoth, 2008, Diplomarbeit). Hierzu gehören die Transkriptionsfaktoren Sox9, Pax6, Myf5 und Runx1, die abhängig vom Zellkontext direkt durch Notch1 reguliert werden. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde zunächst der Effekt von aktiviertem Notch1 auf die Expression dieser Gene während der Differenzierung in *Embryoid Bodies* untersucht. Bei der Differenzierung der embryonalen Stammzellen in *Embryoid Bodies* entstehen dreidimensionale Aggregate, die viele Aspekte der Differenzierung während der frühen Embryogenese rekapitulieren. Dabei entwickeln sich Zellen aller drei Keimblätter. Für die Untersuchung der Zielgene Sox9, Pax6, Myf5 und Runx1 wurden für die Differenzierung Kulturbedingungen gewählt, welche die mesodermale Differenzierung fördern.

4.1.1 Der Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von Transkriptionsfaktoren in ES-Zellen und während der mesodermalen Differenzierung

Für die genauere Charakterisierung der Notch1-Zielgene Sox9, Pax6, Myf5 und Runx1 wurde zunächst der Einfluss von aktiviertem Notch1 auf die mRNA-Expression dieser Gene in ES-Zellen und im Verlauf der mesodermalen Differenzierung analysiert. Hierzu wurde die Differenzierung der embryonalen Stammzellen in *Embryoid Bodies*, in sogenannten „Hängenden Tropfen“, durchgeführt. In allen Experimenten wurde die murine embryonale Stammzelllinie EB5 verwendet, die stabil mit dem konditionell aktivierbaren Notch1-Fusionsprotein NERT transfiziert worden ist (Schroeder *et al.*, 2006). Dieses Fusionsprotein setzt sich aus dem intrazellulären Teil des Notch1-Rezeptors und der

Hormonbindungsdomäne der Tamoxifen-sensitiven Mutante des humanen Östrogenrezeptors zusammen. Durch die Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (OHT) zum Medium der EB5-Nert Zellen kann Notch1 zu beliebigen Zeitpunkten während der Differenzierung aktiviert werden. Die EB5-Nert Zellen wurden für eine Dauer von 10 Tagen mesodermal differenziert. Hierbei stellte Tag 0 die undifferenzierten EB5-Nert Zellen dar. Notch1 wurde an den jeweiligen Tagen durch die Zugabe von OHT für vier Stunden aktiviert. Anschließend wurde die RNA präpariert. Die differentielle Expression der Notch1-Zielgene während der Differenzierung wurde mittels *Real-Time PCR* analysiert. Dabei wurde sowohl die relative Expressionsstärke bezogen auf *Gapdh* als auch die Induktion der Expression durch die Zugabe von OHT im Vergleich zu uninduzierten Zellen untersucht.

Die Aktivierung von Notch1 induziert die mRNA-Expression von Sox9 in ES-Zellen und in mesodermalen Vorläuferzellen

Sox9 ist ein Transkriptionsfaktor der „*sex determining region (SRY)-related HMG-box (SOX)*“-Familie und übernimmt Funktionen in allen drei Keimblättern. Im Mesoderm spielt *Sox9* bei der frühen Chondrogenese eine Rolle.

Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, wurde die *Sox9*-Expression sowohl in undifferenzierten ES-Zellen als auch während der Differenzierung in mesodermale Vorläuferzellen durch die vierstündige Zugabe von OHT an den untersuchten Tagen induziert. Aus Abbildung 4.1 A wird ersichtlich, dass das Expressionsniveau von *Sox9* in uninduzierten EB5-Nert Zellen zu Beginn der Differenzierung niedrig war und ab Tag 3 kontinuierlich anstieg. Im Vergleich dazu war die Expression in OHT-induzierten Zellen stark erhöht. Hier stieg die Expression ab Tag 2 nochmals an und ging ab Tag 5 in eine Sättigung über. Aus Abbildung 4.1 B wird deutlich, dass die Zugabe von OHT in undifferenzierten Zellen zu einer achtfachen Induktion der *Sox9*-Expression gegenüber der Expression in nicht induzierten Zellen führte. Zu Beginn der Differenzierung, an Tag 1, stieg die Expression durch die Zugabe von OHT um das Vierfache an. Die Stärke der Induktion stieg an Tag 2 und Tag 3 weiter an. Ab Tag 4 kam es zu einem Rückgang auf eine dreifache Induktion durch OHT, bis sie an Tag 10 verschwunden war.

Die Aktivierung von Notch1 induziert die mRNA-Expression von Pax6 in ES-Zellen aber nicht in mesodermalen Vorläuferzellen

Pax6 gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine *paired domain* aufweisen, und spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems und den pankreatischen Inselzellen (Chi und Epstein, 2002).

Wie aus Abbildung 4.2 A hervorgeht, wurde die *Pax6*-Expression in undifferenzierten EB5-Nert Zellen durch die Zugabe von OHT induziert. In uninduzierten Zellen sank das Expressionsniveau von *Pax6* während der mesodermalen Differenzierung kontinuierlich ab. Im Vergleich dazu kam es nach der OHT-induzierten Aktivierung von Notch1 zu einer erhöhten Expression in undifferenzierten Zellen (Tag 0) und an Tag 1 der Differenzierung. Auch in den induzierten Zellen sank das Expressionsniveau von *Pax6* während der Differenzierung stetig. Aus Abbildung 4.2 B wird deutlich, dass die *Pax6* Expression in undifferenzierten Zellen durch die Zugabe von OHT um das 1,7 fache gegenüber der Expression ohne die Zugabe von OHT anstieg. Im weiteren Verlauf der mesodermalen Differenzierung war ebenfalls eine Induktion der *Pax6* Expression zu beobachten. Jedoch müssen die ermittelten Induktionswerte mit Vorsicht betrachtet werden, da sich die Expression an den späteren Tagen auf einem sehr niedrigen Niveau befand. Des Weiteren entstehen während der mesodermalen Differenzierung in *Embryoid Bodies* zu geringen Anteilen auch Zellen anderer Keimblätter. Die Induktion von *Pax6* kann durch das Vorkommen ektodermaler Zellen hervorgerufen worden sein.

Die Aktivierung von Notch1 induziert die mRNA-Expression von Myf5 in mesodermalen Vorläuferzellen

Der Transkriptionsfaktor *Myf5* gehört zur Familie der myogenen Regulationsfaktoren und ist essentiell an der Entwicklung der Skelettmuskulatur beteiligt. Darüber hinaus unterstützt *Myf5* die Regeneration von Skelettmuskel, indem er die Proliferation von Satellitenzellen fördert (Ustanina *et al.*, 2007).

Wie Abbildung 4.3 A zeigt, war die relative Expression von *Myf5* in EB5-Nert Zellen durch die Zugabe von OHT deutlich erhöht. Die Induktion von *Myf5* nach Aktivierung von Notch1 war zu Beginn der Differenzierung in ES-Zellen (Tag 0) und an späteren Tagen (Tag 7) am stärksten (s. Abb. 4.3 B). Wobei hier anzumerken ist, dass sich das Expressionsniveau von *Myf5* in ES-Zellen ohne die Aktivierung von Notch1 nur geringfügig oberhalb der Nachweisgrenze befand, wodurch sich auch durch geringe Steigerungen der Expression durch Notch1-Aktivierung solch hohe Induktionen ermitteln ließen. Die geringen Expressionswerte

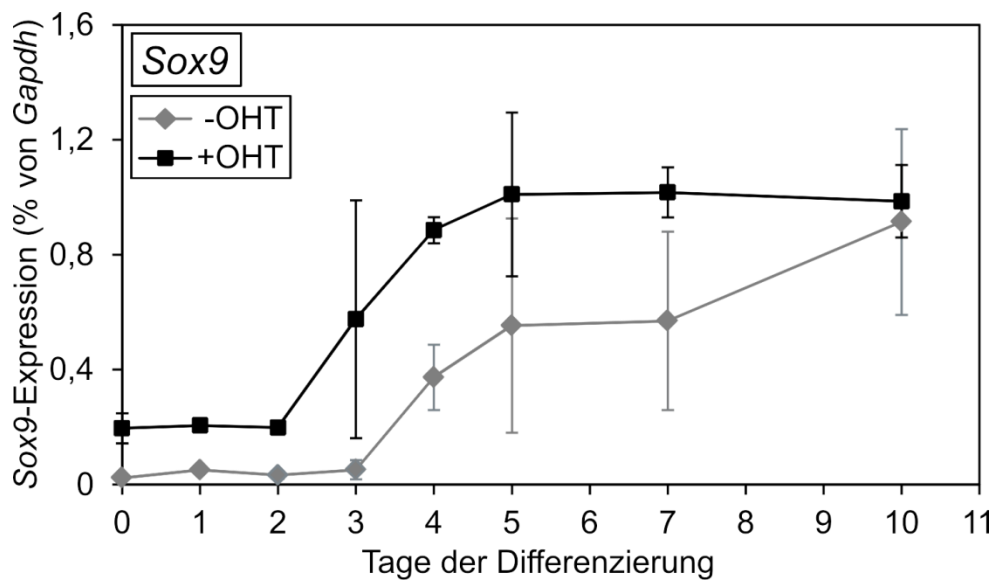
wie auch die Induktion von *Myf5* in ES-Zellen kann durch die Spontandifferenzierung der ES-Zellkultur bewirkt worden sein.

Die Aktivierung von Notch1 induziert die mRNA-Expression von *Runx1* in mesodermalen Vorläuferzellen, aber nicht in ES-Zellen

Runx1 ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Familie der *core binding factors (CBFs)* gehört. Er spielt eine essentielle Rolle bei der Regulation der Hämatopoese. Hierbei reguliert *Runx1* die Differenzierung mesodermaler Vorläuferzellen in hämatopoetische Zelllinien (Kurokawa, 2006).

Wie aus Abbildung 4.4 A hervorgeht, befand sich die mRNA-Expression von *Runx1* in den ersten Tagen der Differenzierung mit und ohne Notch1 Aktivierung auf einem niedrigen Niveau. Während der mesodermalen Differenzierung stieg die Expression ab Tag 2 - 3 an. Zu diesem Zeitpunkt war auch die Induktion durch aktives Notch1 am höchsten (s. Abb. 4.4 B). Die Expression und die Induktion von *Runx1* in ES-Zellen können durch die Spontandifferenzierung der ES-Zellen hervorgerufen worden sein.

A)



B)

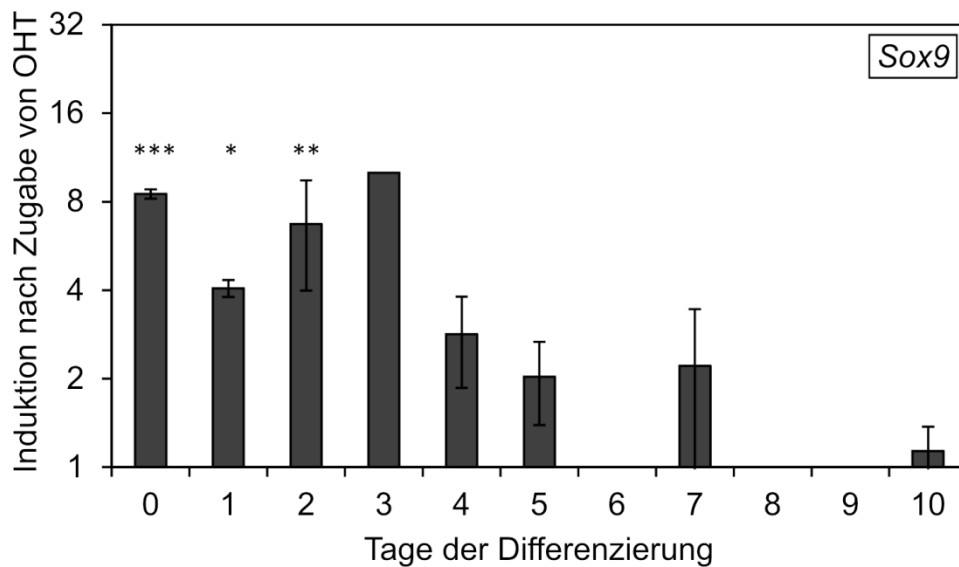


Abb. 4.1: Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von Sox9 während der *in vitro* Differenzierung von EB5-Nert Zellen.

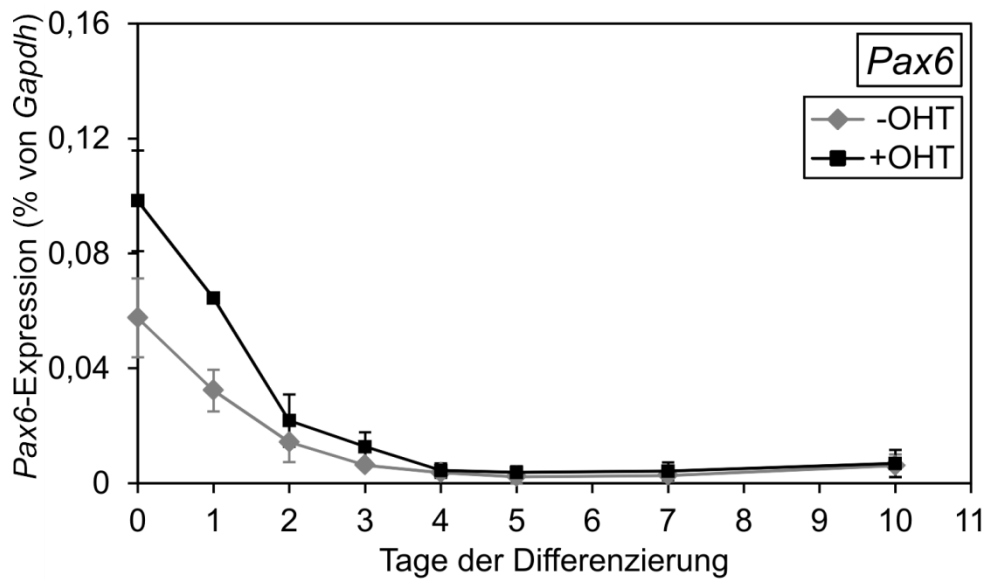
EB5-Nert Zellen wurden für 10 Tage unter mesodermalen Differenzierungsbedingungen in *Embryoid Bodies* differenziert. Tag 0 stellt die undifferenzierten ES-Zellen dar. An den angegebenen Tagen wurde Notch1 durch Zugabe von 500 nM OHT für 4 h aktiviert. Die Sox9-Expression wurde mittels *Real-Time PCR* analysiert.

A) Relative Expression bezogen auf *Gapdh* (*Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase*). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei bis drei unabhängigen Experimenten +/- OHT.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei bis drei unabhängigen Experimenten auf einer Log2-Skala.

*:p<0,05, **:p<0,01, ***p<0,005.

A)



B)

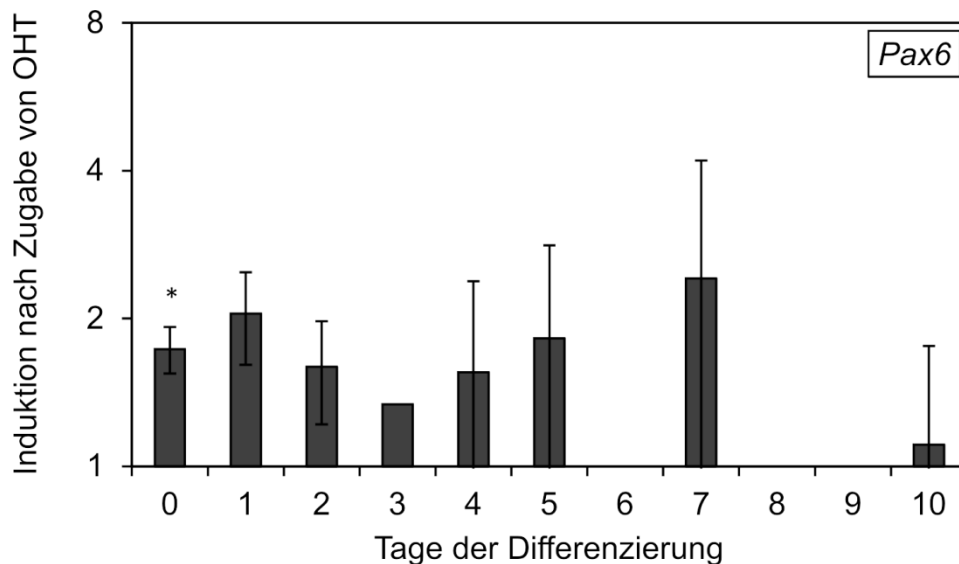


Abb. 4.2: Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von Pax6 während der *in vitro* Differenzierung von EB5-Nert Zellen.

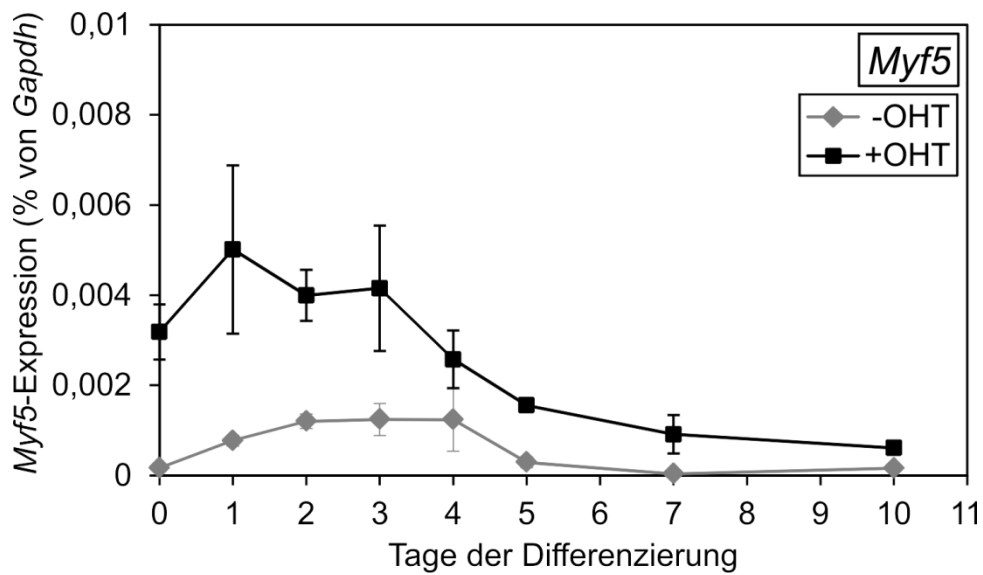
EB5-Nert Zellen wurden für 10 Tage unter mesodermalen Differenzierungsbedingungen in *Embryoid Bodies* differenziert. Tag 0 stellt die undifferenzierten ES-Zellen dar. An den angegebenen Tagen wurde Notch1 durch Zugabe von 500 nM OHT für 4 h aktiviert. Die Pax6-Expression wurde mittels *Real-Time PCR* analysiert.

A) Relative Expression bezogen auf Gapdh. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei bis drei unabhängigen Experimenten +/- OHT.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei bis drei unabhängigen Experimenten auf einer Log2-Skala.

*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,005$.

A)



B)

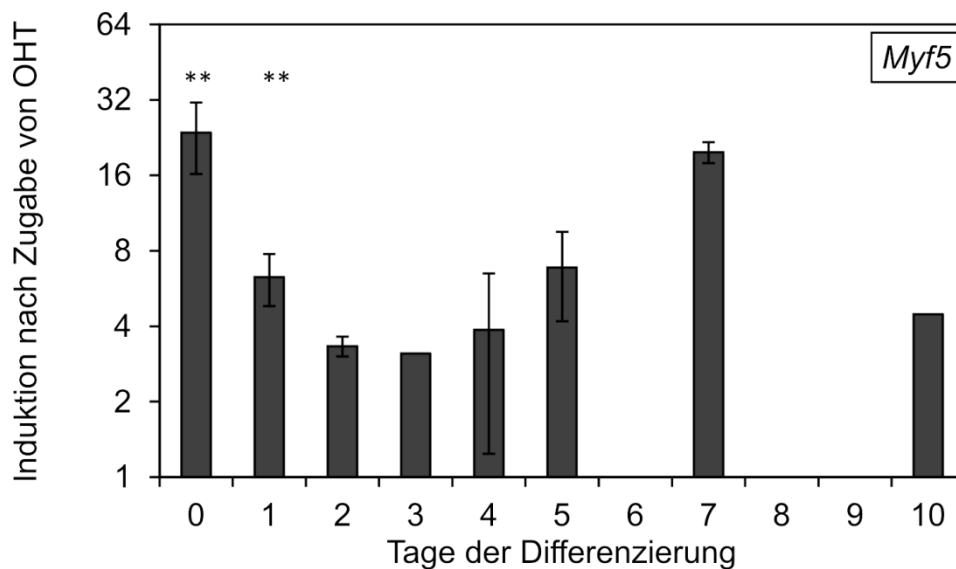


Abb. 4.3: Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von *Myf5* während der *in vitro* Differenzierung von EB5-Nert Zellen.

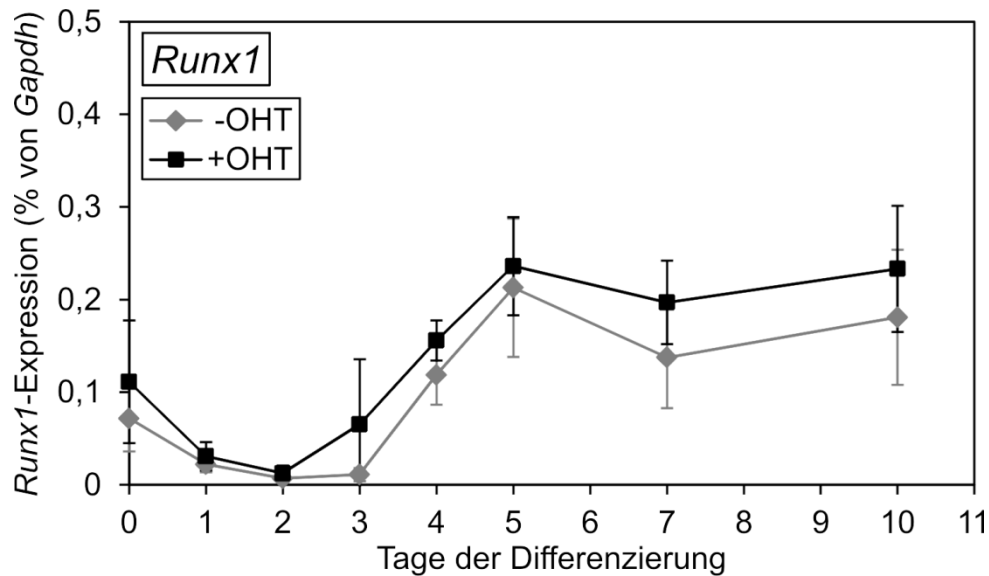
EB5-Nert Zellen wurden für 10 Tage unter mesodermalen Differenzierungsbedingungen in *Embryoid Bodies* differenziert. Tag 0 stellt die undifferenzierten ES-Zellen dar. An den angegebenen Tagen wurde Notch1 durch Zugabe von 500 nM OHT für 4 h aktiviert. Die *Myf5*-Expression wurde mittels *Real-Time PCR* analysiert.

A) Relative Expression bezogen auf *Gapdh*. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von ein bis drei unabhängigen Experimenten +/- OHT.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von ein bis drei unabhängigen Experimenten auf einer Log₂-Skala.

*:p<0,05, **:p<0,01, ***p<0,005.

A)



B)

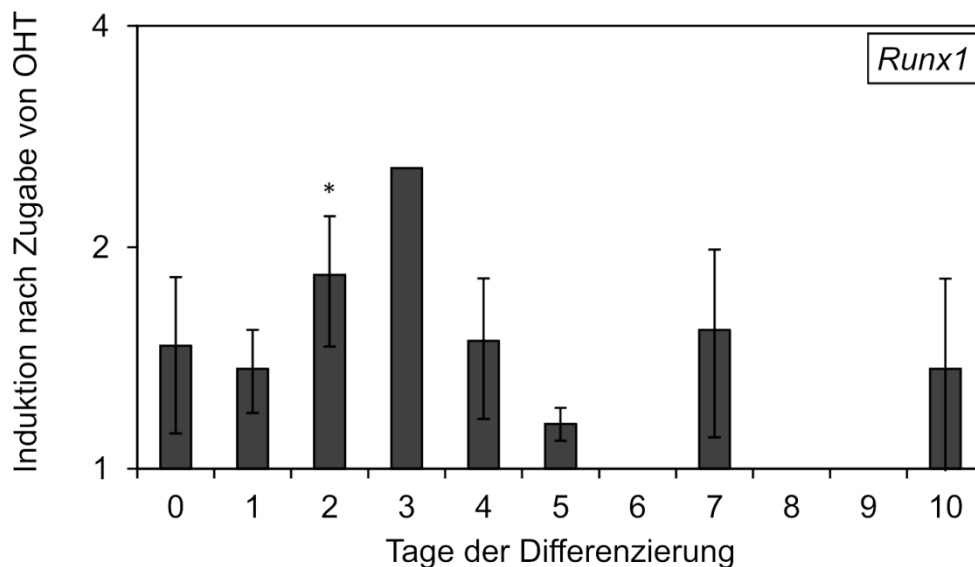


Abb. 4.4: Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von *Runx1* während der *in vitro* Differenzierung von EB5-Nert Zellen.

EB5-Nert Zellen wurden für 10 Tage unter mesodermalen Differenzierungsbedingungen in *Embryoid Bodies* differenziert. Tag 0 stellt die undifferenzierten ES-Zellen dar. An den angegebenen Tagen wurde Notch1 durch Zugabe von 500 nM OHT für 4 h aktiviert. Die *Runx1*-Expression wurde mittels *Real-Time PCR* analysiert.

A) Relative Expression bezogen auf *Gapdh*. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von ein bis drei unabhängigen Experimenten +/- OHT.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von ein bis drei unabhängigen Experimenten auf einer Log₂-Skala.

*:p<0,05, **:p<0,01, ***p<0,005.

Kein Einfluss von Notch1 auf die Expression des Stammzellmarkers *Oct4*

Während der mesodermalen Differenzierung in *Embryoid Bodies* wurde zusätzlich die Expression des Transkriptionsfaktors *Oct4* gemessen. *Oct4* wird während der frühen Embryonalentwicklung in der Inneren Zellmasse und *in vitro* in embryonalen Stammzellen exprimiert und kann daher als Marker für undifferenzierte, pluripotente embryonale Stammzellen genutzt werden. Wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist, nahm die Expression von *Oct4* sowohl mit als auch ohne Notch1-Aktivierung im Verlauf der Differenzierung kontinuierlich ab. Demnach erfolgte eine erfolgreiche Differenzierung der ES-Zellen unabhängig von der Notch1-Aktivierung und *Oct4* ist kein direktes Zielgen von Notch1.

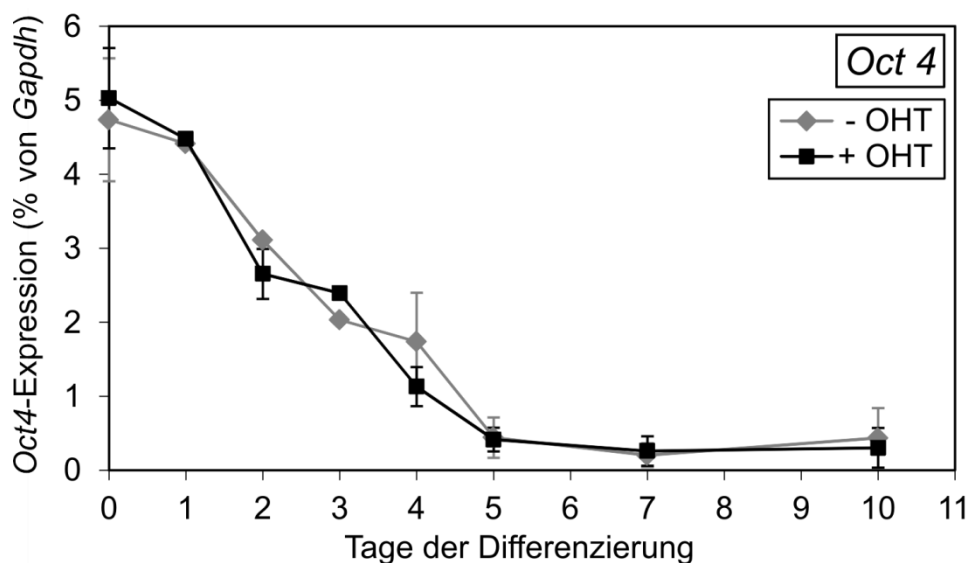


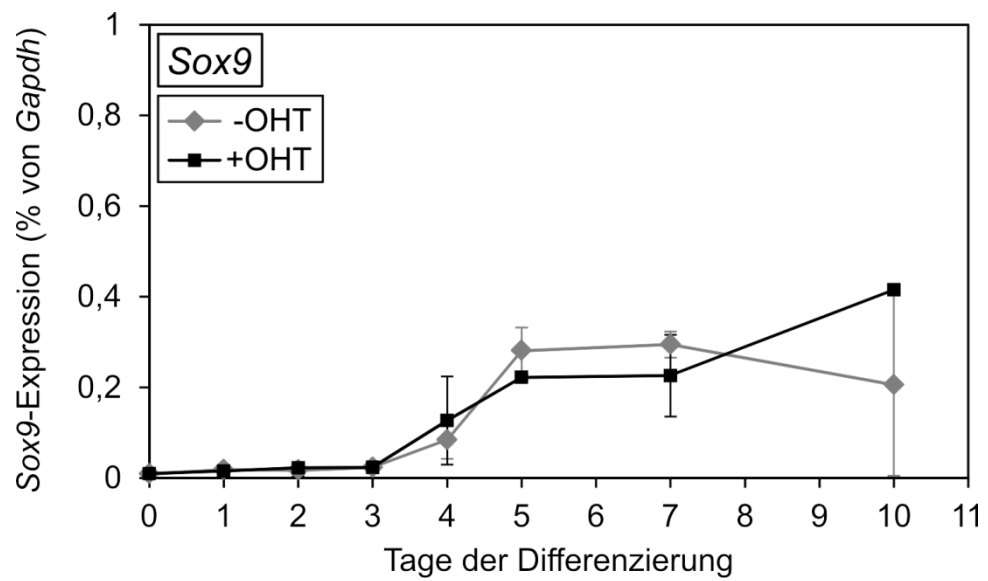
Abb. 4.5: Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von *Oct4* während der *in vitro* Differenzierung von EB5-Nert Zellen.

EB5-Nert Zellen wurden für 10 Tage unter mesodermalen Differenzierungsbedingungen in *Embryoid Bodies* differenziert. Tag 0 stellt die undifferenzierten ES-Zellen dar. An den angegebenen Tagen wurde Notch1 durch Zugabe von 500 nM OHT für 4 Stunden aktiviert. Die *Oct4*-Expression wurde mittels *Real-Time PCR* analysiert. Dargestellt ist die relative Expression bezogen auf *Gapdh* von zwei unabhängigen Experimenten.

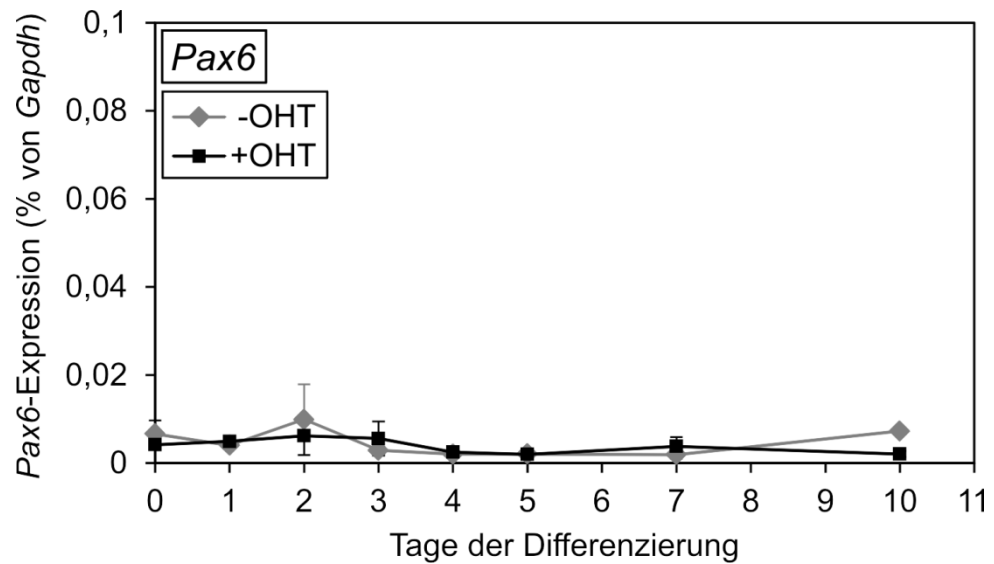
4.1.2 Keine Wirkung von OHT auf die mRNA-Expression von Notch1-Zielgenen in undifferenzierten und mesodermal differenzierten Kontroll-Zellen

In den Experimenten erfolgte die Aktivierung von Notch1 durch die Zugabe von OHT. Dadurch kommt es in den EB5-Nert Zellen zur Freisetzung des NERT-Konstrukts, welches in den Zellkern wandert und dort die Expression von Zielgenen induziert. Um einen Effekt von OHT allein auf die Zellen und ihre Differenzierung auszuschließen, wurden EB5-Kontroll Zellen eingesetzt, die anstelle des NERT-Konstrukts mit einem leeren Vektorkonstrukt stabil transfiziert wurden. In diesen Zellen konnte Notch1 durch OHT also nicht aktiviert werden. Die EB5-Kontroll Zellen wurden in *Embryoid Bodies* unter Kulturbedingungen, welche die mesodermale Differenzierung förderten, für zehn Tage differenziert. An den angegebenen Tagen wurde für vier Stunden 500 nM OHT zu den Zellen gegeben. Die Analyse der mRNA-Expression von *Sox9*, *Pax6*, *Myf5* und *Runx1* erfolgte mittels *Real-Time PCR*. Wie in Abbildung 4.6 zu sehen ist, hatte die Zugabe von OHT keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene. Somit konnte eine direkte Beeinflussung von OHT auf die Expression der untersuchten Zielgene in ES-Zellen und während der Differenzierung ausgeschlossen werden.

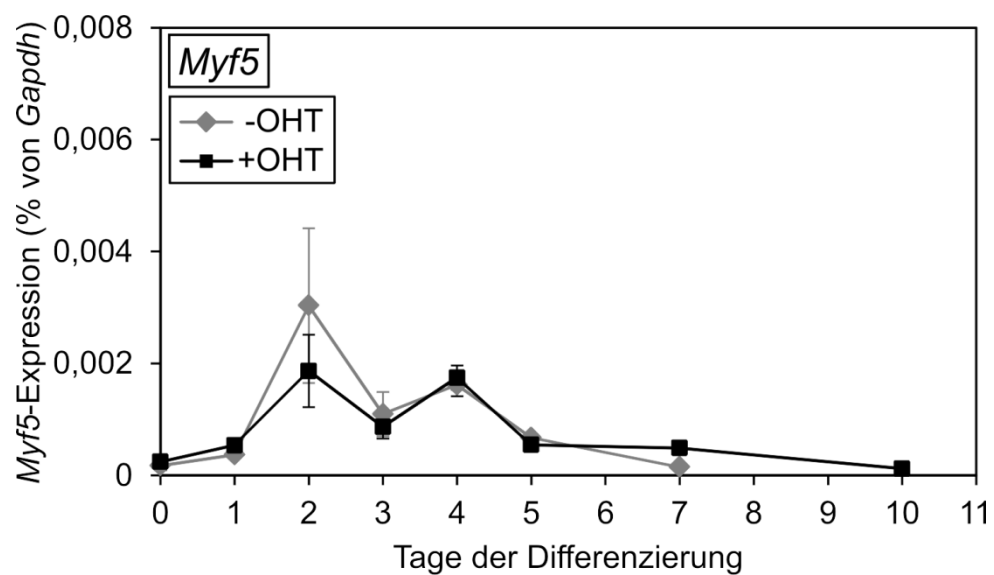
A)



B)



C)



D)

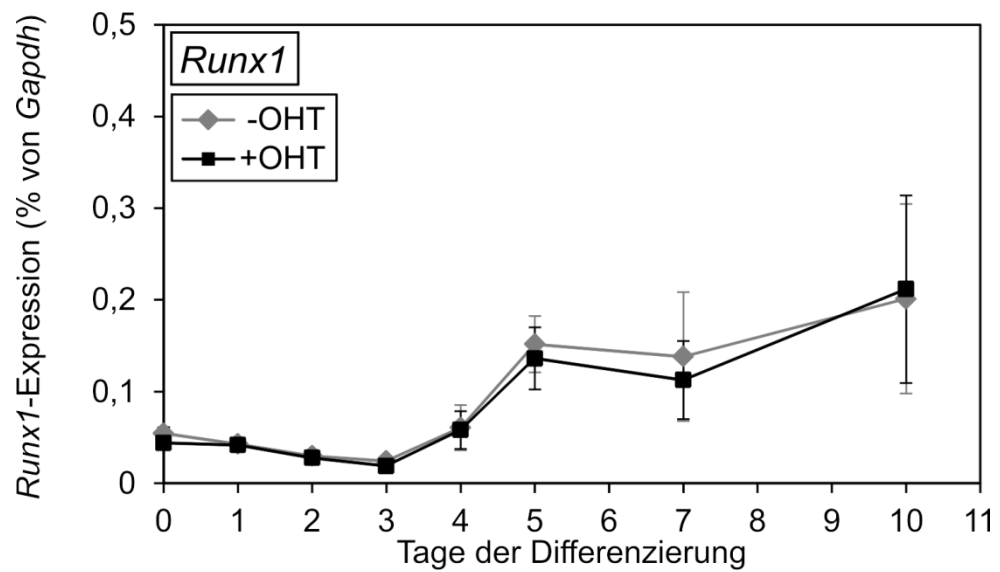


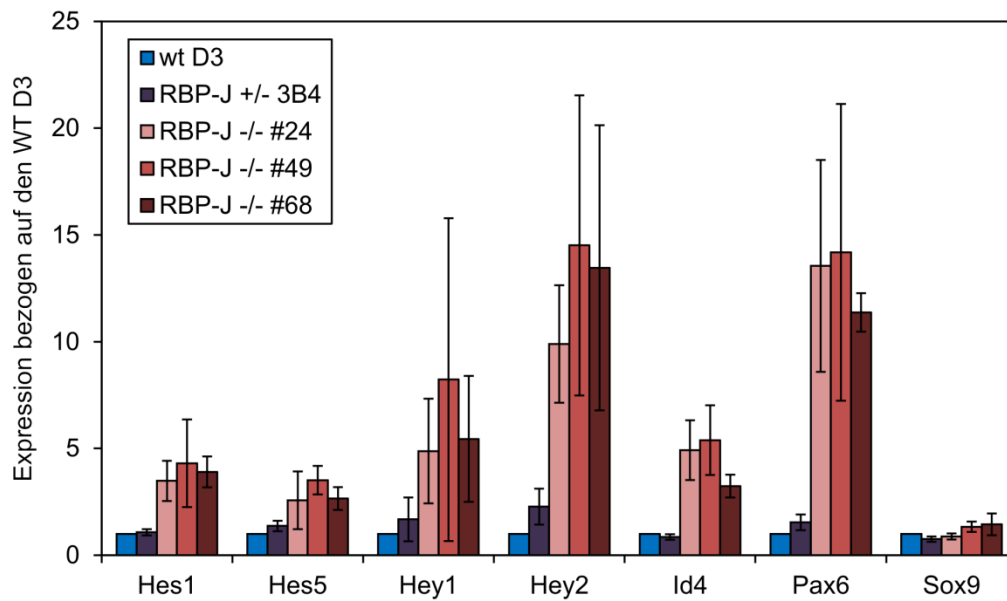
Abb. 4.6: Keine Wirkung von OHT auf die mRNA-Expression von Sox9, Pax6, Myf5 und Runx1 während der *in vitro* Differenzierung von EB5-Kontroll Zellen.

EB5-Kontroll Zellen wurden für 10 Tage unter mesodermalen Differenzierungsbedingungen in *Embryoid Bodies* differenziert. Tag 0 stellt die undifferenzierten ES-Zellen dar. An den angegebenen Tagen wurde 500 nM OHT für 4 h zugegeben. Die Expression von Sox9, Pax6, Myf5 und Runx1 wurde mittels *Real-Time PCR* analysiert. Dargestellt ist die relative Expression bezogen auf *Gapdh* von zwei unabhängigen Experimenten.

4.2 RBP-J steuert die Expression von neuen Notch1-Zielgenen

Um die Notch1-abhängige Regulation der ausgewählten Zielgene zu bestätigen, wurde die Expression dieser Gene in ES-Zellen analysiert, welche defizient für RBP-J waren (Oka *et al.*, 1995). RBP-J ist ein Transkriptionsfaktor, der die Rolle des zentralen Effektormoleküls während der kanonischen Notch1-Signaltransduktion übernimmt. In Abwesenheit der intrazellulären Domäne von Notch1 (NICD) fungiert RBP-J als Repressor der Transkription. Durch die Bindung von NICD an RBP-J wird dieser in einen Aktivator umgewandelt und die Expression von Zielgenen induziert. Um zu überprüfen, ob die Zielgene auch unter physiologischen Bedingungen durch Notch1 reguliert werden, wurde die Expression der Notch1-Zielgene *Hes1*, *Hes5*, *Hey1*, *Hey2*, *Id4*, *Pax6* und *Sox9* in ES-Zellen analysiert, die defizient für RBP-J sind (RBP-J^{-/-}) oder in denen RBP-J heterozygot deletiert wurde (RBP-J^{+/-}) und mit der Expression in Wildtyp ES-Zellen verglichen. Des Weiteren wurde die Expression der Zielgene in RBP-J^{-/-} ES-Zellen, in die RBP-J exogen wieder eingebracht worden war (RBP-J) analysiert sowie in RBP-J^{-/-} ES-Zellen, welche das Transgen VP16-RBP-J exprimierten (VP16-RBP-J) (Schroeder *et al.*, 2003a). Bei VP16-RBP-J handelt es sich um eine konstitutiv transkriptionell aktive Form von RBP-J (Kuroda *et al.*, 1999). Es wurden jeweils drei verschiedene RBP-J^{-/-} ES-Zellklone (RBP-J^{-/-} #24, #48, #68) analysiert. Aus Abbildung 4.7 A geht hervor, dass es bei der heterozygoten Deletion von RBP-J zu keinem signifikanten Unterschied in der Expression der Zielgene verglichen mit den Wildtyp ES-Zellen kam. In allen drei RBP-J^{-/-} Klonen war eine erhöhte Expression von *Hes1*, *Hes5*, *Hey1*, *Hey2*, *Id4* und *Pax6* relativ zu Wildtyp ES-Zellen (D3) zu beobachten. Dies stimmt mit der Rolle von RBP-J als transkriptionellem Repressor in Abwesenheit von aktiviertem Notch1 überein. Die relative Expression von *Sox9* war dagegen in RBP-J^{-/-} Zellen nicht verändert. Wurde in den RBP-J^{-/-} Zellen RBP-J von einem Transgen exprimiert, wurde die Repression der Zielgene wieder hergestellt (s. Abb. 4.7 B). Wurde dagegen die transkriptionell konstitutiv aktive Form VP16-RBP-J exprimiert, stieg das Expressionslevel aller untersuchten Gene an. Dies entspricht dem Effekt von aktiviertem Notch1. Bei *Sox9* fiel dieser Anstieg jedoch nicht so eindeutig aus wie bei der Induktion durch das NERT-System.

A)



B)

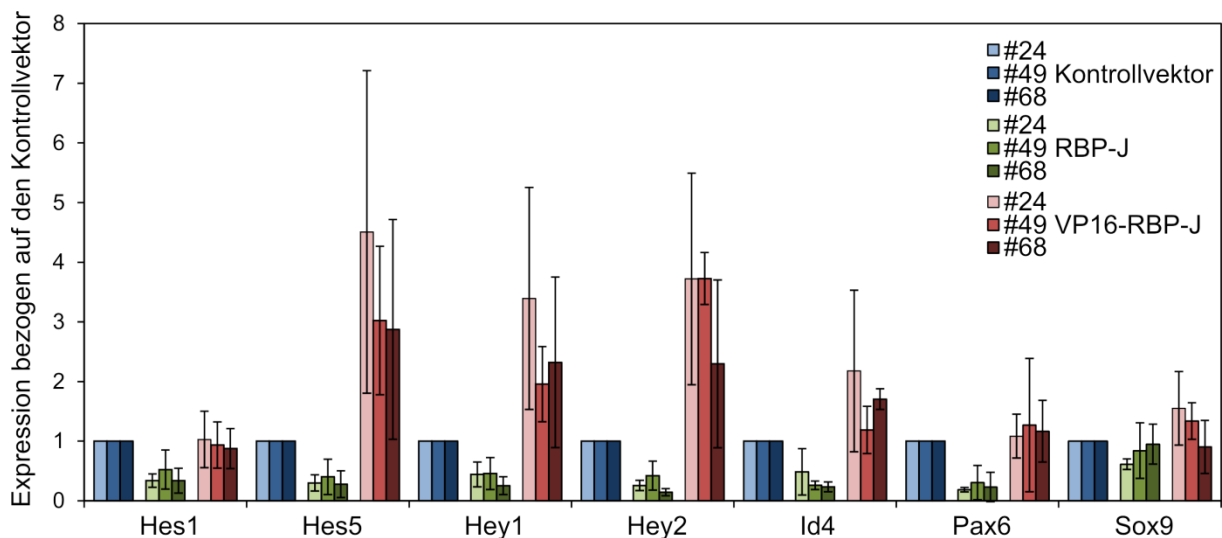


Abb. 4.7: Die mRNA-Expression von Notch1-Zielgenen in RBP-J^{-/-} ES-Zellen

RBP-J^{-/-} ES-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen gehalten. Die mRNA-Expression wurde mittels *Real-Time PCR* analysiert. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

A) Dargestellt ist die mRNA-Expression von Notch1-Zielgenen in RBP-J^{-/-} ES-Zellen (RBP-J^{-/-} #24, #49, #68) relativ zur Expression in RBP-J^{+/+} Wildtyp ES-Zellen D3 (wt D3).

B) Dargestellt ist die mRNA-Expression von Notch1-Zielgenen in RBP-J^{-/-} ES-Zellen (RBP-J^{-/-} #24, #49, #68) mit transgener RBP-J Expression (RBP-J) und mit Expression von einer aktiven Form von RBP-J (VP16-RBP-J) relativ zur Expression von Zellen, welche den Kontrollvektor enthielten.

4.3 Charakterisierung von RBP-J Bindungsstellen im regulatorischen Bereich von Notch1-Zielgenen

Der kanonische Notch1-Signalweg mündet in der Bindung des intrazellulären Teils von Notch1 an RBP-J, was anschließend zur Aktivierung von Zielgenen führt. Wir haben gezeigt, dass die Promotorregionen von Notch1-Zielgenen potenzielle RBP-J Bindungsstellen aufweisen (Meier-Stiegen *et al.*, 2010; Schwanbeck *et al.*, 2011). Im Folgenden sollten die potenziellen RBP-J Bindungsstellen in den Promotoren von Notch1-Zielgenen auf die tatsächliche Bindung von RBP-J kontrolliert werden. Hierzu wurde mit undifferenzierten RBP-J-defizienten ES-Zellen (RBP-J^{-/-}) bzw. ES-Zellen, die RBP-J transgen exprimierten (RBP-J-*rescue*) (Schroeder *et al.*, 2003a), eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit einem für RBP-J spezifischen Antikörper durchgeführt. Anschließend wurden mittels *Real-Time PCR* die Regionen in den Promotoren von *Hes5*, *Hes1*, *Sox9* und *Pax6* analysiert, welche eine oder mehrere potenzielle RBP-J Bindungsstellen aufwiesen. Die entsprechenden Primerpaare wurden so gewählt, dass die *Loci* mit den einzelnen Bindungsstellen möglichst getrennt voneinander untersucht werden konnten.

Der *Hes5* Promotor weist in dem Bereich zwischen -2500 bp bis +500 bp bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt drei bekannte RBP-J Bindungsstellen auf (BS1, 2 und 3) (Ong *et al.*, 2006). Darüber hinaus haben wir zwei weitere potenzielle RBP-J Bindungsstellen weiter stromaufwärts identifiziert (BS4 und 5). Für den *Hes5* Promotor wurden die *Loci* *Hes5_A*, *Hes5_B*, *Hes5_C*, *Hes5_D* und *Hes5_E* gewählt, wobei der Bereich von *Hes5_B* keine RBP-J Bindungsstelle aufwies und so einer Negativkontrolle entsprach (s. Abb. 4.8 A). Im Bereich von *Hes5_D* fanden sich zwei nahe beieinander liegende invertierte Bindungsstellen. Zwischen ihnen befanden sich lediglich 74 bp, weswegen sie unter diesem methodischen Versuchsaufbau nicht separat voneinander analysiert werden konnten. In den Bereichen *Hes5_C*, *Hes5_D* und *Hes5_E* konnte eine eindeutige Anreicherung von RBP-J beobachtet werden (s. Abb. 4.8 B). Dies entspricht den ersten drei RBP-J Bindungsstellen ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt. Bei *Hes5_A* ließ sich auch eine Anreicherung von RBP-J erkennen, jedoch war sie hier nicht signifikant. Für *Hes5_B* konnte weder in RBP-J^{-/-} ES-Zellen noch in den RBP-J exprimierenden ES-Zellen ein Signal nachgewiesen werden, was der Erwartung für die Negativkontrolle entsprach.

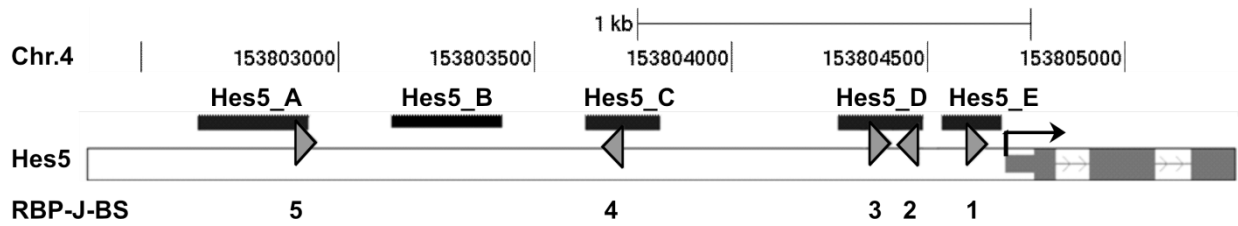
Der *Hes1* Promotor weist zwei gut untersuchte RBP-J Bindungsstellen auf (s. Abb. 4.9 A). Es handelt sich um zwei gepaarte, invertierte Bindungsstellen, die essentiell für eine Notch1-abhängige Aktivierung sind (Ong *et al.*, 2006). Wie in Abbildung 4.9 B zu sehen ist, kam es

in RBP-J exprimierenden ES-Zellen im *Locus* von *Hes1* zu einer deutlichen Anreicherung von RBP-J gegenüber den RBP-J^{-/-} ES-Zellen.

Für *Sox9* wurden im Promotorbereich zwischen -2500 bp bis +500 bp bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt sechs potenzielle RBP-J Bindungsstellen gefunden (s. Abb. 4.10 A). Entsprechend hierzu wurden Primerpaare für die *Loci* *Sox9_A*, *Sox9_B*, *Sox9_C*, *Sox9_D* und *Sox9_E* gewählt. *Sox9_A* umfasste die zwei am weitesten vom Transkriptionsstartpunkt entfernten Bindungsstellen 5 und 6. Bei den beiden von *Sox9_B* erfassten Bindungsstellen 3 und 4 handelte es sich um schwache Bindungsstellen. Der Bereich von *Sox9_C* enthielt keine potenzielle RBP-J Bindungsstelle und sollte als Negativkontrolle dienen. *Sox9_D* und *Sox9_E* umfassten jeweils die potenziellen Bindungsstellen 2 und 1, wobei sich die erste Bindungsstelle in der untranslatierten Region befand und *Sox9_E* den Bereich des Transkriptionsstartpunktes umfasste. In Abbildung 4.10 B ist zu sehen, dass es in RBP-J exprimierenden ES-Zellen an der Bindungsstelle 2 bei *Sox9_D* zu einer signifikanten Anreicherung von RBP-J im Vergleich zu RBP-J^{-/-} ES-Zellen kam. Auch an den *Loci* *Sox9_A* und *Sox9_E* war eine Anreicherung zu beobachten, jedoch konnte hier keine Signifikanz nachgewiesen werden. Für *Sox9_B* konnte kein Signal detektiert werden. Es wäre also möglich, dass sich in diesem Bereich keine RBP-J Bindungsstellen befanden. *Sox9_C* zeigte entsprechend seiner Funktion als Negativkontrolle keine bedeutende Anreicherung von RBP-J in RBP-J exprimierenden ES-Zellen gegenüber den RBP-J^{-/-} ES-Zellen. Zusammenfassend ließ sich im Bereich von *Sox9_D* an Bindungsstelle 2 eine signifikante Anreicherung von RBP-J beobachten.

In der regulatorischen Region von *Pax6* wurden vier potenzielle RBP-J Bindungsstellen gefunden. Eine weitere potenzielle Bindungsstelle konnte in der untranslatierten Region lokalisiert werden (s. Abb. 4.11 A). Die *Loci* *Pax6_A*, *Pax6_B*, *Pax6_C* und *Pax6_D* umfassten jeweils eine Bindungsstelle. *Pax6_E* lag im Bereich des Transkriptionsstartpunktes von *Pax6*, konnte jedoch in diesem Versuchsaufbau für die Detektion der Bindungsstelle 1 herangezogen werden. Aus Abbildung 4.11 B geht hervor, dass es an den *Loci* von *Pax6_D* und *Pax6_E*, welche den RBP-J Bindungsstellen 2 und 1 entsprachen, zu einer signifikanten Anreicherung von RBP-J in RBP-J exprimierenden ES-Zellen gegenüber den RBP-J^{-/-} ES-Zellen kam. In den Bereichen von *Pax6_A*, *Pax6_B* und *Pax6_C* war die Anreicherung von RBP-J nicht signifikant, aber möglicherweise kam es hier auch zu einer Bindung von RBP-J.

A)



B)

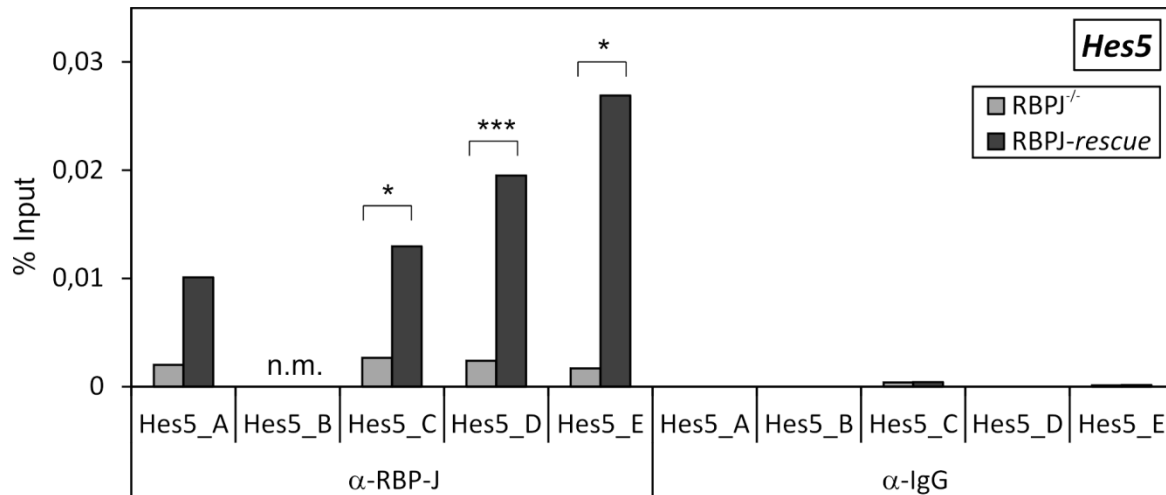
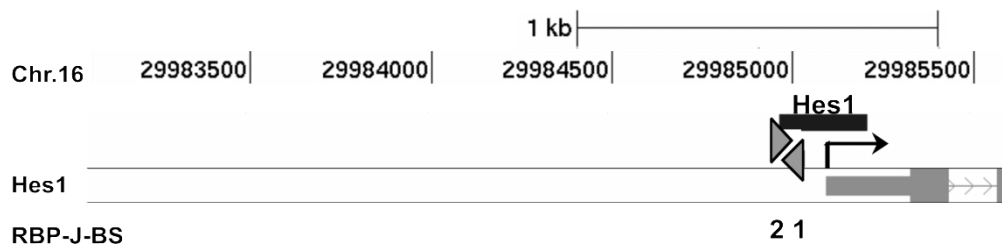


Abb. 4.8: RBP-J bindet in ES-Zellen im regulatorischen Bereich von *Hes5*

A) Schematische Darstellung des regulatorischen Bereichs von *Hes5* (-2500 bp bis +500 bp relativ zum TSS (Transkriptionsstartpunkt, schwarzer Pfeil) mit den beschriebenen RBP-J Bindungsstellen 1, 2 und 3 (Ong *et al.*, 2006) und den potenziellen RBP-J Bindungsstellen 4 und 5 (RBP-J-BS, graue Pfeilköpfe). Die *Loci* Hes5_A, Hes5_B, Hes5_C, Hes5_D und Hes5_E wurden in der *Real-Time PCR* analysiert.

B) Undifferenzierte RBP-J^{-/-} und RBP-J-rescue ES-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen gehalten und anschließend für den ChIP-Assay verwendet. Für den ChIP-Assay wurden anti-RBP-J und anti-IgG Antikörper eingesetzt. Die Analyse erfolgte mittels *Real-Time PCR* für folgende *Loci*: Hes5_A, Hes5_B, Hes5_C, Hes5_D und Hes5_E. Dargestellt sind die Ergebnisse eines Experiments relativ zum gesamten Input. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Dabei wurden inhaltlich vergleichbare Ergebnisse erhalten. n.m.: nicht messbar. *:p<0,05, **:p<0,01, ***:p<0,005

A)



B)

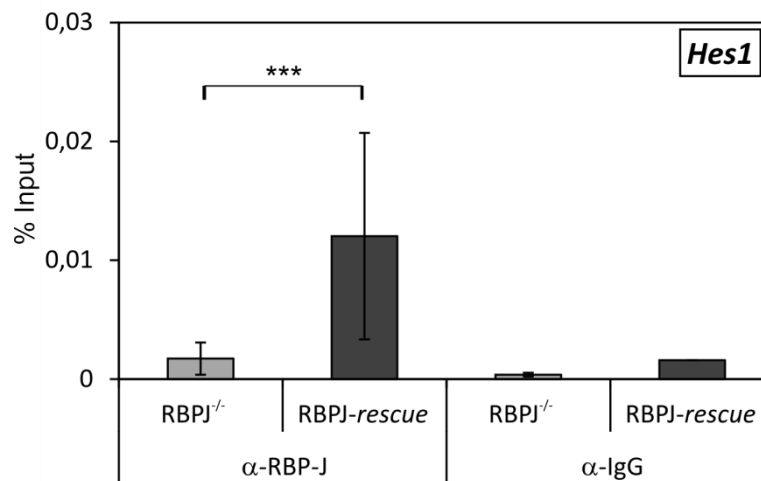
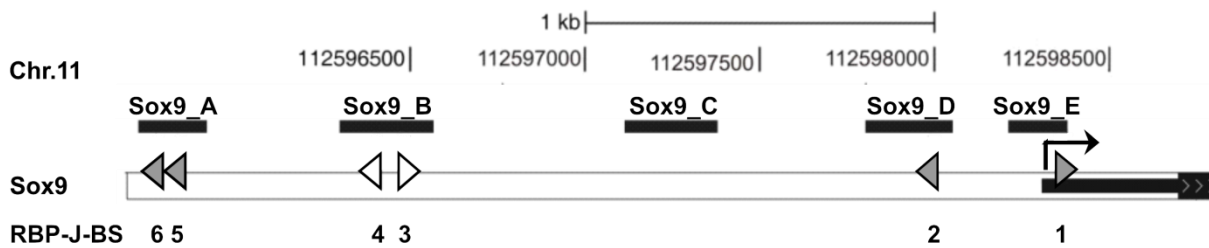


Abb. 4.9: RBP-J bindet in ES-Zellen im regulatorischen Bereich von Hes1

A) Schematische Darstellung des regulatorischen Bereichs von *Hes1* (-2000 bp bis +500 bp relativ zum TSS, schwarzer Pfeil) mit den beschriebenen RBP-J Bindungsstellen (Ong *et al.*, 2006) (RBP-J-BS, graue Pfeilköpfe) und den in der *Real-Time PCR* analysierten *Locus Hes1*.

B) Undifferenzierte RBP-J^{-/-} und RBP-J-rescue ES-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen gehalten und anschließend für den ChIP-Assay verwendet. Für den ChIP-Assay wurden anti-RBP-J und anti-IgG Antikörper eingesetzt. Die Analyse erfolgte mittels *Real-Time PCR* für *Locus Hes1*. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten relativ zum gesamten Input. ***:p<0,005

A)



B)

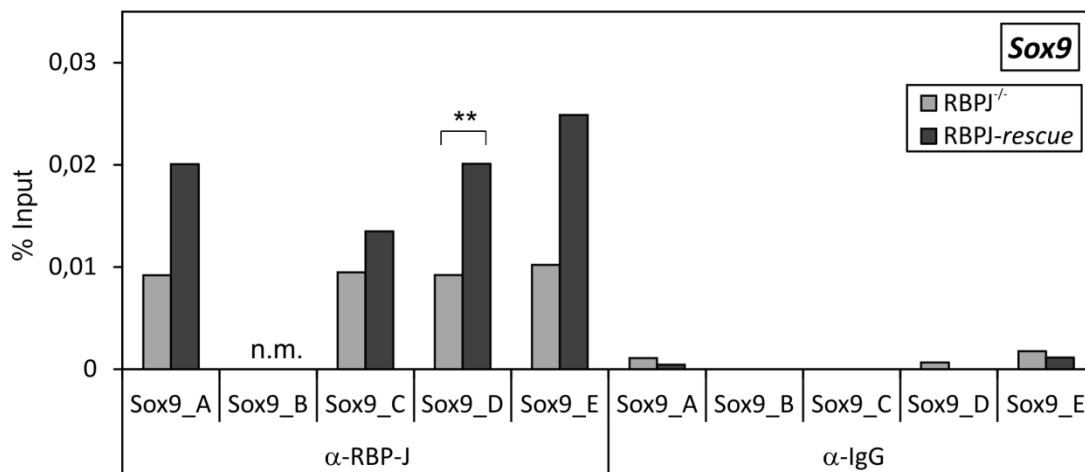
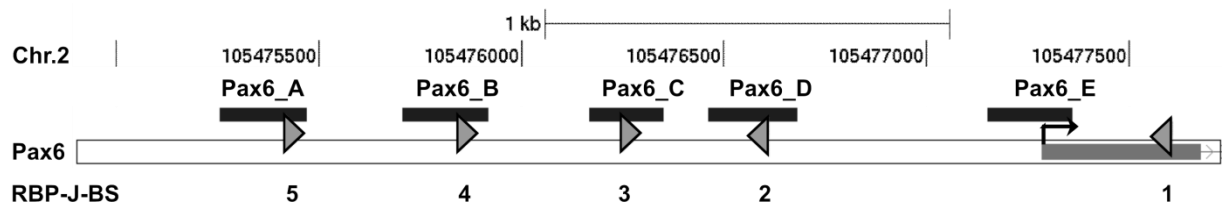


Abb. 4.10: RBP-J bindet in ES-Zellen im regulatorischen Bereich von Sox9

A) Schematische Darstellung des regulatorischen Bereichs von *Sox9* (-2500 bp bis +500 bp relativ zum TSS, schwarzer Pfeil) mit den potenziellen RBP-J Bindungsstellen (RBP-J-BS, graue Pfeilköpfe). Zwei schwache Bindungsstellen sind als weiße Pfeilköpfe dargestellt. In der *Real-Time PCR* wurden die *Loci* Sox9_A, Sox9_B, Sox9_C, Sox9_D und Sox9_E analysiert.

B) Undifferenzierte RBP-J^{-/-} und RBP-J-*rescue* ES-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen gehalten und anschließend für den ChIP-Assay verwendet. Für den ChIP-Assay wurden anti-RBP-J und anti-IgG Antikörper eingesetzt. Die Analyse erfolgte mittels *Real-Time PCR* für folgende *Loci*: Sox9_A, Sox9_B, Sox9_C, Sox9_D und Sox9_E. Dargestellt sind die Ergebnisse eines Experiments relativ zum gesamten Input. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Dabei wurden inhaltlich vergleichbare Ergebnisse erhalten. n.m.: nicht messbar. **:p<0,01

A)



B)

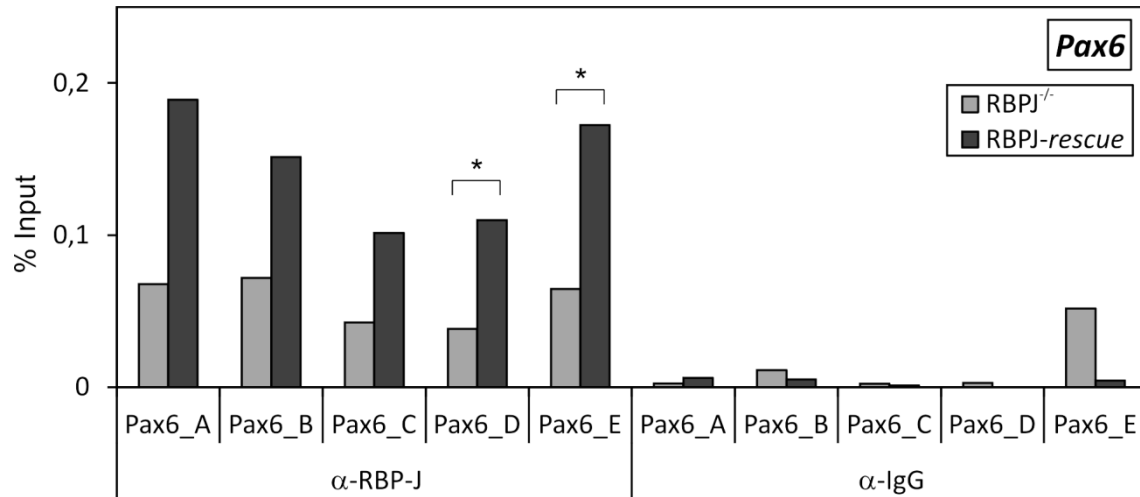


Abb. 4.11: RBP-J bindet in ES-Zellen im regulatorischen Bereich von Pax6

A) Schematische Darstellung des regulatorischen Bereichs von *Pax6* (-2500 bp bis +500 bp relativ zum TSS, schwarzer Pfeil) mit den potenziellen RBP-J Bindungsstellen (RBP-J-BS, graue Pfeilköpfe) und den in der *Real-Time PCR* analysierten *Loci* Pax6_A, Pax6_B, Pax6_C, Pax6_D und Pax6_E.

B) Undifferenzierte RBP-J^{-/-} und RBP-J-rescue ES-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen gehalten und anschließend für den ChIP-Assay verwendet. Für den ChIP-Assay wurden anti-RBP-J und anti-IgG Antikörper eingesetzt. Die Analyse erfolgte mittels *Real-Time PCR* für folgende *Loci*: Pax6_A, Pax6_B, Pax6_C, Pax6_D und Pax6_E. Dargestellt sind die Ergebnisse eines Experiments relativ zum gesamten Input. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Dabei wurden inhaltlich vergleichbare Ergebnisse erhalten. *:p<0,05

4.4 Regulation der Expression von *Sox9* und *Pax6* durch Notch1 in ES-Zellen über direkte Bindung an RBP-J Bindungsstellen

Um zu untersuchen, welche der RBP-J Bindungsstellen für die durch Notch1 induzierte Regulation der Zielgene *Sox9* und *Pax6* verwendet werden, wurden Luziferase-Assays durchgeführt. Dafür wurden Luziferase-Konstrukte verwendet, welche den Promotorbereich von *Sox9* (-4 kb bis +325 bp) und *Pax6* (-3,6 kb bis +437 bp) mit den potenziellen RBP-J Bindungsstellen enthielten. Um die Luziferase-Aktivität zu messen, wurden undifferenzierte EB5-Nert Zellen in An- bzw. Abwesenheit von 500 nM OHT gehalten und transient mit dem *Sox9* bzw. *Pax6* Reporter-Konstrukten und einem *Renilla*-Luziferase Konstrukt kotransfiziert. Das *Renilla*-Luziferase-Konstrukt diente als interne Kontrolle der Transfektionseffizienz. Die gemessene Lumineszenz des jeweiligen Reporter-Konstrukts wurde auf die gemessene Lumineszenz des *Renilla*-Luziferase-Konstrukts normalisiert. Als Kontrollvektor diente ein Luziferase-Konstrukt, das nur einen basalen Promotor enthielt (0-luc).

Wie aus Abbildung 4.12 hervorgeht, kam es zu einem deutlichen Anstieg der Luziferase-Aktivität von Sox9-luc sowie von Pax6-luc in undifferenzierten EB5-Nert Zellen durch Zugabe von OHT. Die Luziferase-Aktivität des Kontrollvektors 0-luc wurde durch die Zugabe von OHT nicht verändert. Dies bedeutet, dass die Promotoren von *Sox9* wie auch von *Pax6* durch die OHT-vermittelte Aktivierung von Notch1 reguliert werden.

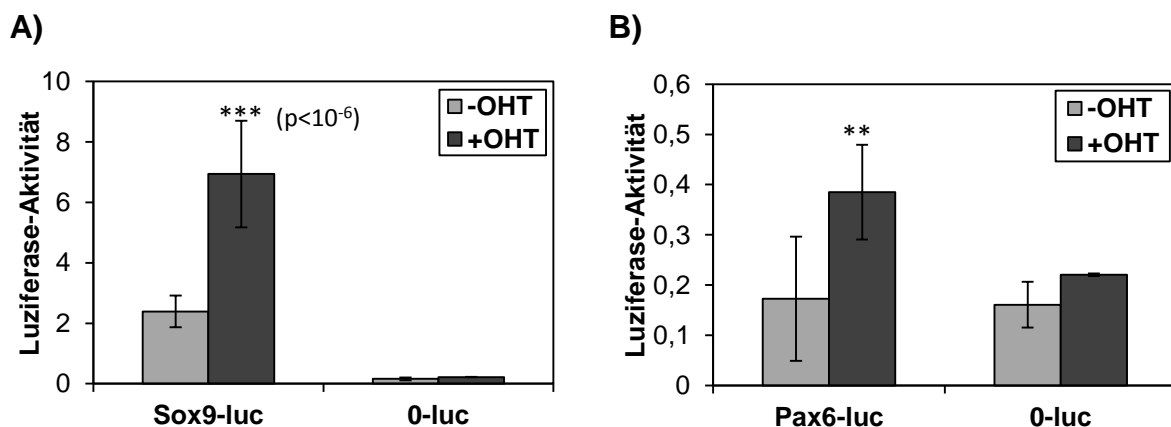


Abb. 4.12: Notch1 reguliert die Expression von *Sox9* und *Pax6* in ES-Zellen

EB5-Nert Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 500 nM OHT gehalten. Die Zellen wurden transient mit dem Plasmid Sox9-luc bzw. Pax6-luc und dem Kontrollplasmid 0-luc transfiziert und nach 18 h lysiert. Die Luziferase-Aktivität wurde bestimmt und auf die Aktivität der *Renilla*-Luziferase normalisiert. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 12 Experimenten für Sox9-luc, 5 Experimenten für Pax6-luc und 3 für 0-luc. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

4.4.1 Verringerung der Notch1 induzierten Expression von Sox9 und Pax6 nach Mutation der RBP-J Bindungsstellen

Um zu analysieren, ob die Transaktivierung der Plasmide Sox9-luc und Pax6-luc durch Notch1 über die in den Promotoren gefundenen RBP-J Bindungsstellen verläuft, wurden im nächsten Schritt diese Bindungsstellen so mutiert, dass sie von RBP-J nicht mehr erkannt werden können. Dazu wurden mit Hilfe der gezielten Mutagenese die einzelnen RBP-J Bindungsstellen 1, 2, 5 und 6 im Sox9-Promotor an fünf entscheidenden Basenpaaren verändert, so dass eine Bindung an diese Erkennungssequenz ausgeschlossen werden kann (s. Abb. 4.13 A). Die potenziellen Bindungsstellen 3 und 4 werden als schwache Bindungsstellen angesehen und wurden hier nicht charakterisiert. Anschließend wurde nach demselben Verfahren eine Doppelmutation von Bindungsstelle 1 und 2 eingeführt. Die neuen Konstrukte erhielten die Namen Sox9BS1mut-luc, Sox9BS2mut-luc, Sox9BS5mut-luc, Sox9BS6mut-luc und Sox9BS1/2mut-luc und wurden vergleichend mit dem Ausgangskonstrukt Sox9-luc in EB5-Nert Zellen transfiziert und deren Lumineszenz im Luziferase-Assay getestet. Entsprechend wurden auch im Promotorbereich von Pax6 die Bindungsstellen 1, 3, 4 und 5 an vier Positionen mutiert. Die Bindungsstelle 2 im Pax6 Promotor konnte nicht mutiert werden. Die entstandenen Konstrukte wurden Pax6BS1mut-luc, Pax6BS3mut-luc, Pax6BS4mut-luc und Pax6BS5mut-luc genannt und ebenfalls vergleichend mit dem Wildtypkonstrukt Pax6-luc getestet (s. Abb. 4.13 B). Um zu untersuchen, ob Notch1 die Aktivierung seiner Zielgene in Abhängigkeit vom Zellkontext über verschiedene RBP-J Bindungsstellen reguliert, wurden die veränderten Luziferase-Reporter-Konstrukte sowohl in ES-Zellen als auch in neuronalen Vorläuferzellen getestet.

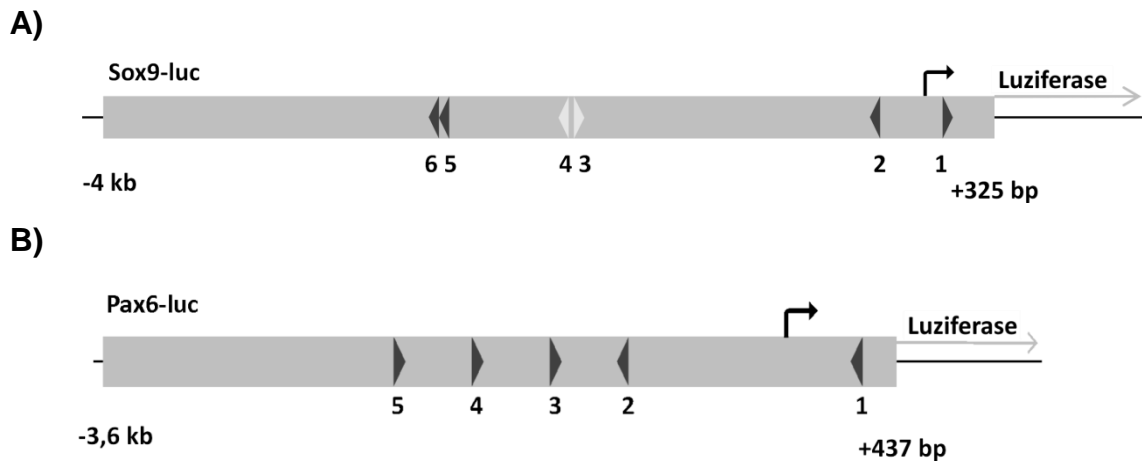


Abb. 4.13: Schematische Übersicht der Luziferase-Reporter-Konstrukte Sox9-luc und Pax6-luc

A) Schematische Darstellung des Sox9-luc Konstruktes, welches das Gen der *Firefly*-Luziferase unter Kontrolle des Sox9 Promotors (-4 kb bis +325 bp) trägt. Der Pfeil markiert den Transkriptionsstartpunkt (+1). Die Nummerierung markiert die potenziellen RBP-J Bindungsstellen und die Pfeilköpfe die Richtung der Bindung. Die Bindungsstellen 3 und 4 werden als schwache Bindungsstellen angesehen

B) Schematische Darstellung des Pax6-luc Konstruktes, welches das Gen der *Firefly*-Luziferase unter Kontrolle des Pax6 Promotors (-3,6 kb bis +437 bp) trägt. Der Pfeil markiert den Transkriptionsstartpunkt (+1). Die Nummerierung markiert die potenziellen RBP-J Bindungsstellen und die Pfeilköpfe die Richtung der Bindung.

Undifferenzierte EB5-Nert Zellen wurden in An- bzw. Abwesenheit von OHT gehalten und mit den Luziferase-Reporter-Konstrukten Sox9-luc, Sox9BS1mut, Sox9BS2mut, Sox9BS1/2mut, Sox9BS5mut und Sox9BS6mut transfiziert. Ihre Aktivität wurde im Luziferase-Assay gemessen. In Abbildung 4.14 A ist die gemessene Luziferase-Aktivität der Reporter-Konstrukte dargestellt. Es war zu beobachten, dass die Luziferase-Aktivität der mutierten Luziferase-Reporter-Konstrukte Sox9BS1mut, Sox9BS2mut und Sox9BS5mut verglichen mit dem Wildtyp-Plasmid Sox9-luc auch ohne die Zugabe von OHT erhöht war. Dies könnte auf die fehlende Repression von RBP-J zurückzuführen sein, das an diesen Stellen nicht mehr gebunden war. Nach Zugabe von OHT war die Luziferase-Aktivität zwar erhöht, wenn die RBP-J Bindungsstellen 1, 1/2 und 5 mutiert waren, jedoch war die Aktivierung verglichen mit dem Wildtyp Sox9-luc geringer. Durch die Mutation von Bindungsstelle 2 war nach der Zugabe von OHT keine signifikante Erhöhung der Luziferase-Aktivität, verglichen mit -OHT, zu messen. Die Mutation von Bindungsstelle 6 hatte keinen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung durch Notch1.

Abbildung 4.14 B zeigt die Induktion der Luziferase-Aktivität durch die Zugabe von OHT. In den Zellen, die mit den Konstrukten Sox9BS1mut, Sox9BS2mut, Sox9BS1/2mut und Sox9BS5mut transfiziert wurden, war die Induktion durch die Zugabe von OHT deutlich verringert, verglichen mit der Induktion des Wildtyps Sox9-luc. Durch die Mutation von Bindungsstelle 6 waren keine Veränderungen zu beobachten. Hiermit wurde gezeigt, dass es

durch die Aktivierung von Notch1 zu einer stark verminderten Induktion des *Sox9*-Promotors kam, wenn die Bindungsstellen 1, 2 oder 5 sowie beide Bindungsstellen 1 und 2 im *Sox9* Promotor mutiert waren. Ein mögliches Zusammenwirken der beiden Bindungsstellen 1 und 2 bei der Notch1 vermittelten Aktivierung konnte nicht nachgewiesen werden. Die Doppelmutation von Bindungsstelle 1 und 2 hatte in undifferenzierten EB5-Nert Zellen den gleichen Effekt auf die Aktivierung des *Sox9*-Promotors durch Notch1, wie die mutierte Bindungsstelle 2 allein.

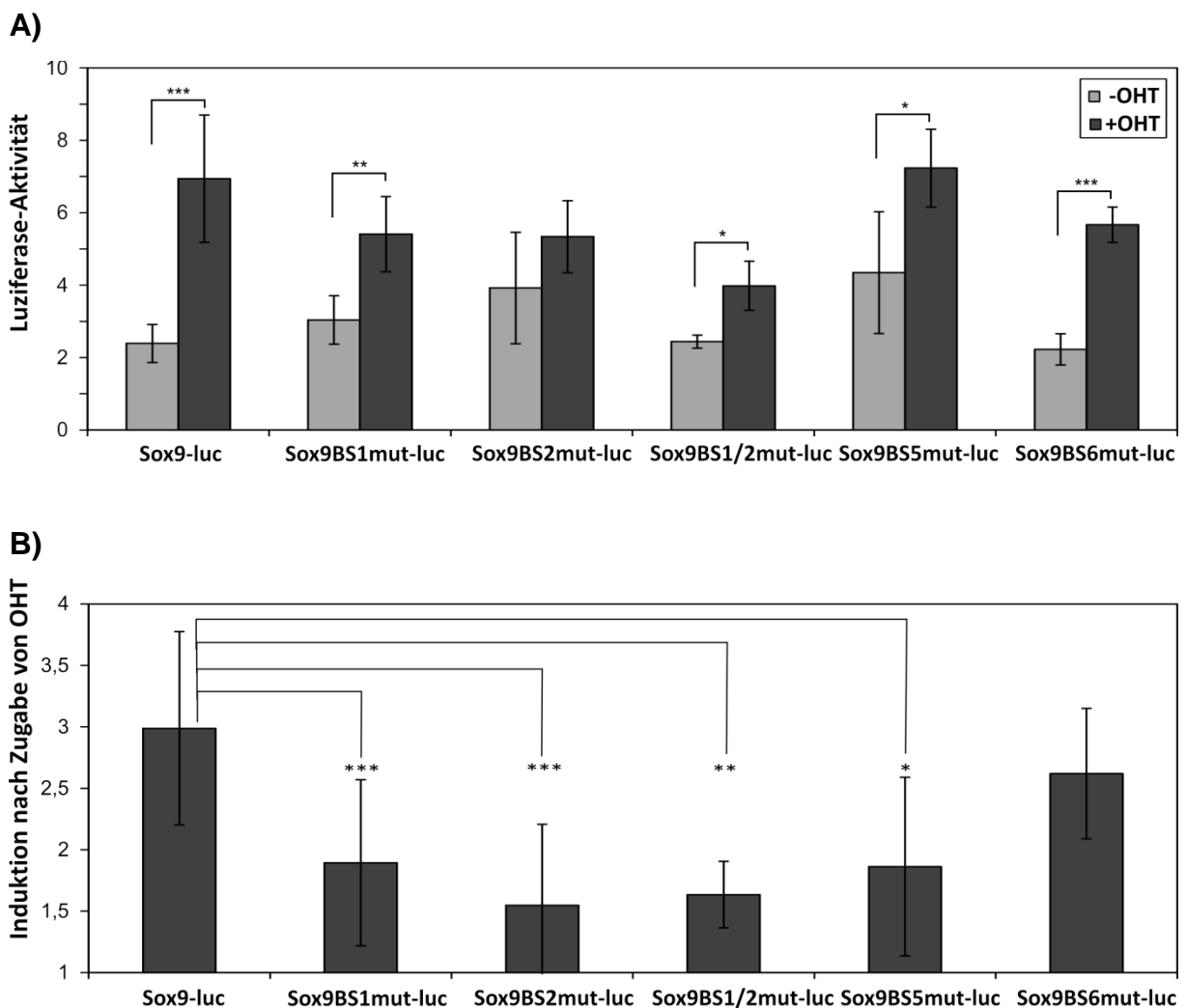


Abb. 4.14: Die Notch1-induzierte Expression von Sox9 ist verringert, wenn RBP-J Bindungsstellen mutiert sind

EB5-Nert Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 500 nM OHT gehalten. Die Zellen wurden transient mit den Plasmiden Sox9-luc, Sox9BS1mut-luc, Sox9BS2mut-luc, Sox9BS1/2mut-luc, Sox9BS5mut-luc und Sox9BS6mut-luc transfiziert und nach 18 h lysiert. Die Luziferase-Aktivität wurde bestimmt und auf die Aktivität der *Renilla*-Luziferase normalisiert.

A) Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der Luziferase-Aktivität von Sox9-luc: n=12, BS1mut-luc, BS2mut-luc: n=7, BS5mut-luc, BS6mut-luc: n=4 Experimenten. *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,005

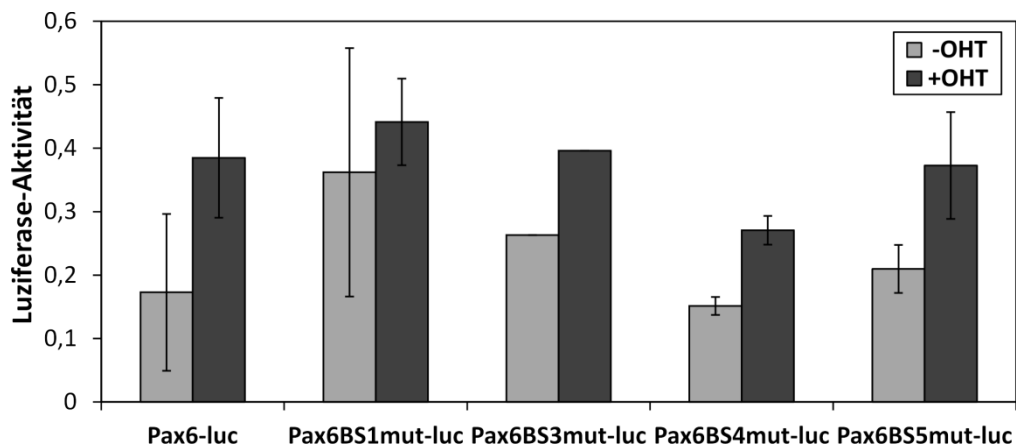
B) Dargestellt ist die Induktion der Luziferase-Aktivität nach Zugabe von OHT bezogen auf –OHT von Sox9-luc: n=12, BS1mut-luc, BS2mut-luc: n=7, BS5mut-luc, BS6mut-luc: n=4 Experimenten. *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,005

In einem nächsten Experiment wurden die undifferenzierten EB5-Nert Zellen in An- bzw. Abwesenheit von OHT gehalten und mit den Luziferase-Reporter-Konstrukten Pax6-luc, Pax6BS1mut, Pax6BS3mut, Pax6BS4mut, Pax6BS5mut transfiziert und deren Aktivität im Luziferase-Assay bestimmt.

Wie Abbildung 4.15 A zeigt, war die Luziferase-Aktivität im Fall von Pax6BS1mut-luc und Pax6BS3mut-luc verglichen mit dem Wildtyp Pax6-luc ohne die Zugabe von OHT erhöht. Dies könnte durch den fehlenden repressiven Effekt von RBP-J bedingt worden sein. Die Luziferase-Aktivität nach der Zugabe von OHT war verringert, wenn die Bindungsstellen 1, 3 oder 4 im *Pax6*-Promotor mutiert waren, verglichen mit dem Wildtyp Pax6-luc. Die Mutation von Bindungsstelle 5 hatte keinen Einfluss auf die OHT vermittelte Aktivierung.

Bei Betrachtung der Induktion durch Zugabe von OHT kam es beim Fehlen der funktionellen Bindungsstelle 1 zu einer erheblichen Verringerung der Induktion (s. Abb. 4.15 B). Auch die Mutation der Bindungsstellen 3, 4 oder 5, führten zu einer deutlichen Reduzierung der Induktion durch OHT. Das heißt, dass die Notch1 induzierte Induktion von Pax6 reduziert war, wenn die Bindungsstellen 1, 3, 4 oder 5 mutiert waren.

A)



B)

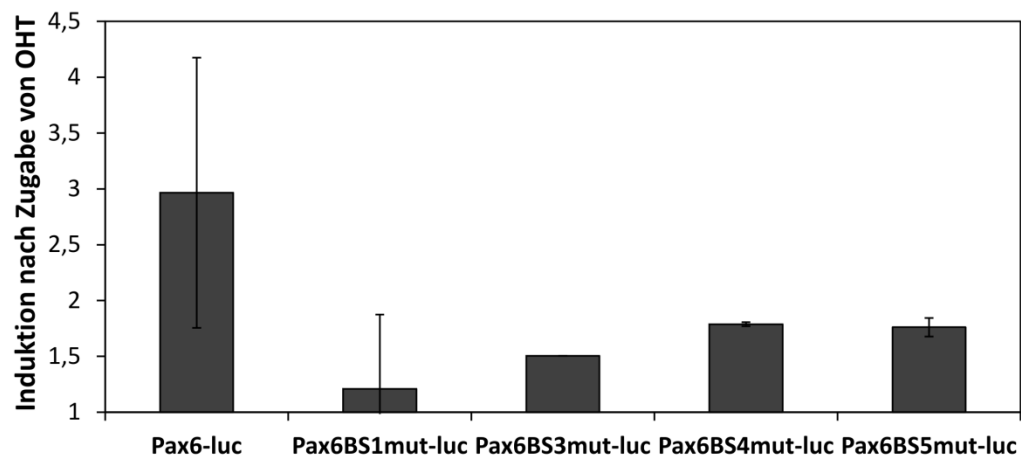


Abb. 4.15: Die Notch1-induzierte Expression von *Pax6* ist verringert, wenn die RBP-J Bindungsstellen mutiert sind

EB5-Nert Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 500 nM OHT gehalten. Die Zellen wurden transient mit den Plasmiden Pax6-luc, Pax6BS1mut, Pax6BS3mut, Pax6BS4mut, Pax6BS5mut transfiziert und nach 18 h lysiert. Die Luziferase-Aktivität wurde bestimmt und auf die Aktivität der *Renilla*-Luziferase normalisiert.

A) Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der Luziferase-Aktivität von Pax6-luc: n=5, BS1mut-luc, BS4mut-luc, BS5mut-luc: n=2, BS3mut-luc: n=1 Experimenten.

B) Dargestellt ist die Induktion der Luziferase-Aktivität nach Zugabe von OHT bezogen auf -OHT von Pax6-luc: n=5, BS1mut-luc, BS4mut-luc, BS5mut-luc: n=2, BS3mut-luc: n=1 Experimenten.

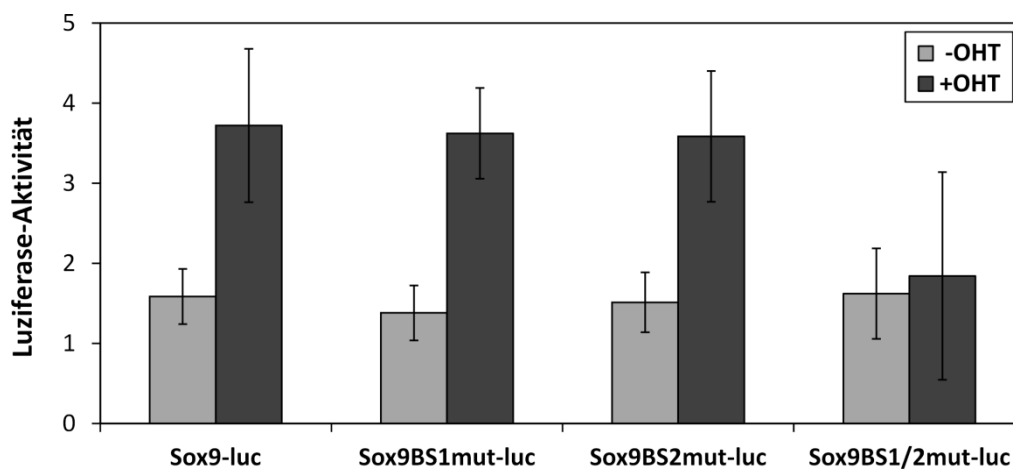
4.4.2 Regulation der Expression von *Sox9* durch RBP-J Bindungsstellen 1 und 2 in neural differenzierten Zellen

In den vorigen Experimenten wurde gezeigt, dass die RBP-J Bindungsstellen 1, 2 und 5 in undifferenzierten ES-Zellen essentiell für die Notch1 induzierte *Sox9*-Expression sind. Nun sollte überprüft werden, ob Notch1 die Expression von *Sox9* auch in neuroektodermal differenzierten Zellen über die gleichen RBP-J Bindungsstellen reguliert. Hierfür wurden EB5-Nert Zellen in An- bzw. Abwesenheit von 50 nM OHT für fünf Tage unter

neuroektodermalen Differenzierungsbedingungen gehalten und transient mit den Konstrukten Sox9-luc, Sox9BS1mut-luc, Sox9BS2mut-luc oder Sox9BS1/2mut-luc transfiziert.

Wenn die Bindungsstellen 1 und 2 mutiert waren, kam es in neural differenzierten Zellen zu keiner Veränderung in der Luziferase-Aktivität nach Notch1 Aktivierung verglichen mit dem Wildtyp Sox9-luc (s. Abb. 4.16). Waren beide Bindungsstellen mutiert, war keine Induktion der Expression durch Notch1 mehr erkennbar. In neuroektodermal differenzierten Zellen übernehmen also beide RBP-J Bindungsstellen eine entscheidende Rolle bei der Notch1 vermittelten *Sox9* Induktion.

A)



B)

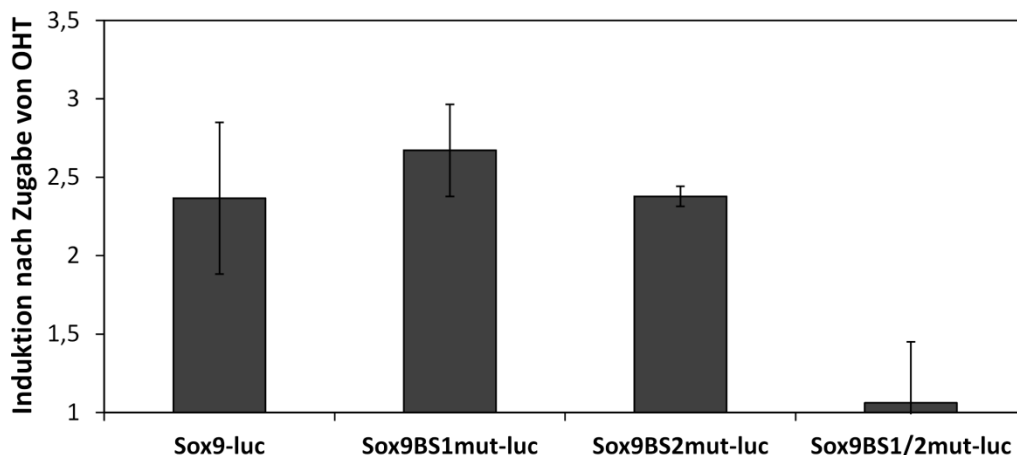


Abb. 4.16: Notch1 reguliert die Expression von Sox9 in neuralen Vorläuferzellen über die RBP-J Bindungsstellen 1 und 2

EB5-Nert Zellen wurden unter neuroektodermalen Differenzierungsbedingungen in An- oder Abwesenheit von 50 nM OHT gehalten. Die Zellen wurden an Tag 4 transient mit den Plasmiden Sox9-luc, Sox9BS1mut-luc, Sox9BS2mut-luc, Sox9BS1/2mut-luc transfiziert und nach 18 h lysiert. Die Luziferase Aktivität wurde bestimmt und auf die Aktivität der *Renilla*-Luziferase normalisiert.

A) Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der Luziferase-Aktivität von drei unabhängigen Experimenten.

B) Dargestellt ist die Induktion der Luziferase-Aktivität nach Zugabe von OHT bezogen auf -OHT von drei unabhängigen Experimenten.

4.5 Notch1 beeinflusst den Chromatinstatus des Promotors von Notch1-Zielgenen in embryonalen Stammzellen

Die RBP-J-abhängige, Notch1-induzierte Aktivierung von Notch1-Zielgenen erfolgt in einer zellkontextabhängigen Art und Weise. Neben dem Zusammenspiel von unterschiedlichen transkriptionellen Aktivatoren und Repressoren ist die Chromatin-Struktur erheblich an der Entscheidung über die Aktivierung bzw. Reprimierung der Transkription beteiligt. Die Untersuchung der regulatorischen Regionen von Genen, die in ES-Zellen von Notch1 reguliert werden, ergab eine Anreicherung der H3-Trimethylierung an Lysin 4 (H3K4me3) in diesen Regionen (Schwanbeck *et al.*, 2011). Ebenso wurde das Vorkommen von bivalenten Domänen beobachtet. Hierbei handelt es sich um ein spezifisches Modifikationsmuster, bei dem aktivierende H3K4me3 und reprimierende H3K27me3 Modifikationen gemeinsam innerhalb desselben Nukleosoms vorkommen. In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob diese Chromatin-Modifikationen an der zellkontextabhängigen Aktivierung von Notch1-Zielgenen beteiligt sind. Hierfür wurden die Histon-Modifikationen H3K4me3, H3K4me2 und H3K27me3 in undifferenzierten EB5-Nert Zellen vor und nach einer vierstündigen Aktivierung von Notch1 durch Zugabe von OHT bestimmt. Die H3K4me3 und H3K4me2 Modifikationen haben einen aktivierenden Einfluss auf die Transkription von Genen. H3K27me3 ist eine die Transkription reprimierende Modifikation. Es wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen die jeweiligen Modifikationen durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels *Real-Time PCR* an den *Loci* mit potenziellen RBP-J Bindungsstellen im regulatorischen Bereich der Notch1-Zielgene *Hes5*, *Sox9* und *Pax6*.

Für das prototypische Notch1-Zielgen *Hes5* erfolgte die Analyse an den *Loci* *Hes5_A*, *Hes5_C*, *Hes5_D* und *Hes5_E*, wobei *Hes5_D* und *Hes5_E* im Bereich der starken RBP-J Bindungsstellen lagen (s. Abb. 4.17 A). Wie in Abbildung 4.17 B zu sehen ist, war die H3K4me3 Modifikation ohne die Zugabe von OHT besonders in Richtung des Transkriptionsstarts von *Hes5* vermehrt angereichert. Nach der OHT-induzierten Aktivierung von Notch1 war ein Rückgang der H3K4me3 Modifikation im Bereich der starken RBP-J Bindungsstellen bei *Hes5_D* und *Hes5_E* zu sehen. Hingegen wies diese Modifikation bei *Hes5_A* und *Hes5_C* keine deutlichen Veränderungen auf. Die H3K4me2 Modifikation war ohne die Zugabe von OHT in Richtung des Transkriptionsstarts angereichert. Die Zugabe von OHT hatte an den *Loci* *Hes5_D* und *Hes5_E* keinen Einfluss auf die H3K4me2 Modifikation. In den Bereichen von *Hes5_A* und *Hes5_C* kam es nach Zugabe von OHT zu einem Anstieg

dieser Modifikation um das Doppelte. Die H3K27me3 Modifikation kam ohne die Zugabe von OHT in einem einheitlichen Niveau innerhalb des *Hes5* Promotors vor. In den Transkriptionsstart nahen Bereichen *Hes5_D* und *Hes5_E* ergaben sich keine Veränderungen der H3K27me3 Anreicherung nach der OHT-induzierten Notch1-Aktivierung. An den *Loci* *Hes5_A* und *Hes5_C* stieg das Niveau der H3K27me3 Modifikation nach OHT Zugabe an.

Für *Sox9* wurden die *Loci* *Sox9_A*, *Sox9_C*, *Sox9_D* und *Sox9_E* untersucht. *Sox9_A* lag innerhalb des *Sox9*-Promotors im Bereich zweier RBP-J Bindungsstellen. *Sox9_C* befand sich in einer Region ohne potenzielle RBP-J Bindungsstelle und diente als Kontrolle. *Sox9_D* lag im Bereich der signifikanten RBP-J Bindungsstelle 2 und *Sox9_E* umfasste den Bereich des Transkriptionsstartpunktes von *Sox9*, in dem eine potenzielle RBP-J Bindungsstelle vorkommt (s. Abb. 4.18 A). Aus Abbildung 4.18 B geht hervor, dass die aktivierende H3K4me3 Modifikation ohne die Aktivierung von Notch1 an den *Loci* nahe des Transkriptionsstarts von *Sox9* (*Sox9_D* und *Sox9_E*) vermehrt angereichert war verglichen mit den weiter entfernt liegenden Regionen (*Sox9_A* und *Sox9_C*). Die Aktivierung von Notch1 durch OHT hatte auf die Anreicherung dieser Modifikation in den untersuchten *Loci* keinen Einfluss. Die H3K4me2 Modifikation war nach Zugabe von OHT an den *Loci* *Sox9_D* und *Sox9_E* erhöht. Die H3K27me3 Modifikation zeigte in allen untersuchten *Loci* eine geringfügige Anreicherung nach der OHT induzierten Notch1-Aktivierung verglichen mit - OHT.

Im Fall von *Pax6* wurden die *Loci* *Pax6_A*, *Pax6_B*, *Pax6_C*, *Pax6_D* und *Pax6_E* analysiert. In jedem dieser *Loci* befand sich eine potenzielle RBP-J Bindungsstelle (s. Abb. 4.19 A). Dabei konnte in Abschnitt 4.3 dieser Arbeit gezeigt werden, dass es sich bei *Pax6_D* und *Pax6_E* um die signifikanten RBP-J Bindungsstellen 1 und 2 handelt (s. Abb. 4.11). Die Anreicherung der H3K4me3 und der H3K4me2 Modifikationen zeigte an keinem der untersuchten *Loci* im *Pax6*-Promotor eine eindeutige Veränderung nachdem Notch1 aktiviert wurde (s. Abb. 4.19 B). Die Anreicherung der H3K27me3 Modifikation war nach der Zugabe von OHT an allen *Loci* im *Pax6*-Promotor erhöht. Diese Erhöhung durch die OHT-induzierte Notch1-Aktivierung war an den beiden *Loci* *Pax6_D* und *Pax6_E* mit einem Anstieg um das Doppelte am stärksten.

Insgesamt lässt sich für die Zielgene *Hes5* und *Sox9* ohne die Aktivierung von Notch1 eine vermehrte Anreicherung von H3K4me3 in Richtung des Transkriptionsstarts beobachten, während H3K27me3 auf einem eher einheitlichen Niveau innerhalb der Promotoren verteilt ist.

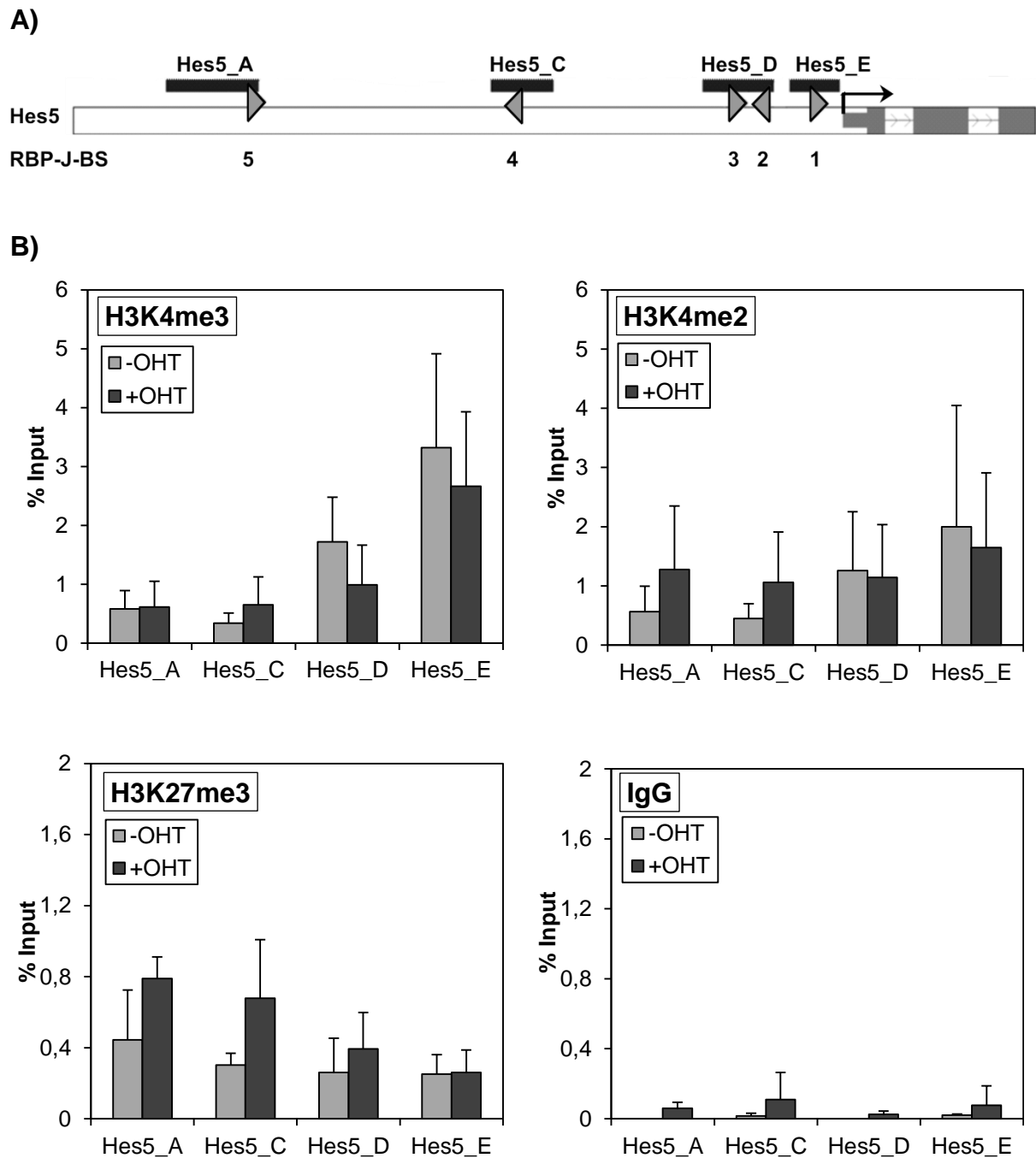
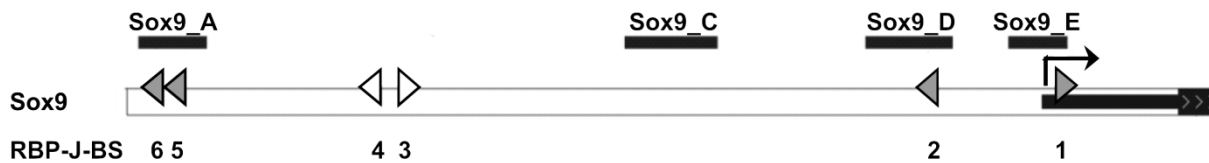


Abb. 4.17: Einfluss von Notch1 auf die Histon-Modifikationen in der regulatorischen Region des Notch1-Zielgens *Hes5*

A) Schematische Darstellung des regulatorischen Bereichs von *Hes5* (-2500 bp bis +500 bp relativ zum TSS (Transkriptionsstartpunkt, schwarzer Pfeil) mit den beschriebenen RBP-J Bindungsstellen 1, 2 und 3 (Ong *et al.*, 2006) und den potenziellen RBP-J Bindungsstellen 4 und 5 (RBP-J-BS, graue Pfeilköpfe). Die *Loci* Hes5_A, Hes5_C, Hes5_D und Hes5_E wurden in der *Real-Time PCR* analysiert.

B) Undifferenzierte EB5-Nert Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen gehalten, für 4 Stunden mit 500 nM OHT induziert und anschließend für den ChIP-Assay verwendet. Die H3K4me3, H3K4me2 und H3K27me3 Modifikationen und IgG wurden mittels *Real-Time PCR* an folgenden *Loci* bestimmt: Hes5_A, Hes5_C, Hes5_D und Hes5_E. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten relativ zum gesamten Input.

A)



B)

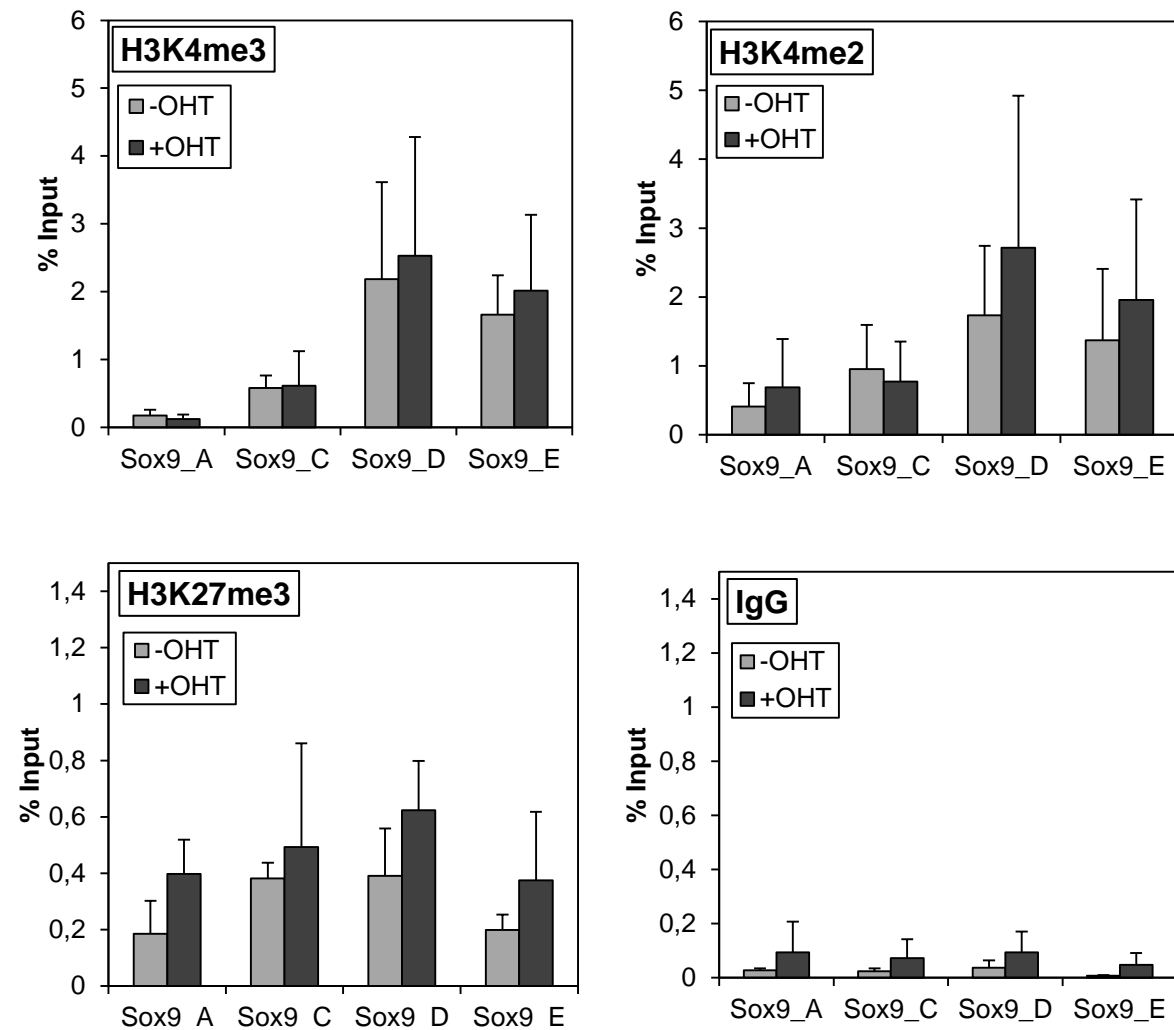


Abb. 4.18: Einfluss von Notch1 auf die Histon-Modifikationen in der regulatorischen Region des Notch1-Zielgens Sox9

A) Schematische Darstellung des regulatorischen Bereichs von *Sox9* (-2500 bp bis +500 bp relativ zum TSS, schwarzer Pfeil) mit den potenziellen RBP-J Bindungsstellen (RBP-J-BS, graue Pfeilköpfe). Zwei schwache Bindungsstellen sind als weiße Pfeilköpfe dargestellt. In der *Real-Time PCR* wurden die *Loci* Sox9_A, Sox9_C, Sox9_D und Sox9_E analysiert.

B) Undifferenzierte EB5-Nert Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen gehalten, für 4 Stunden mit 500 nM OHT induziert und anschließend für den ChIP-Assay verwendet. Die H3K4me3, H3K4me2 und H3K27me3 Modifikationen und IgG wurden mittels *Real-Time PCR* an folgenden *Loci* bestimmt: Sox9_A, Sox9_C, Sox9_D und Sox9_E. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten relativ zum gesamten Input.

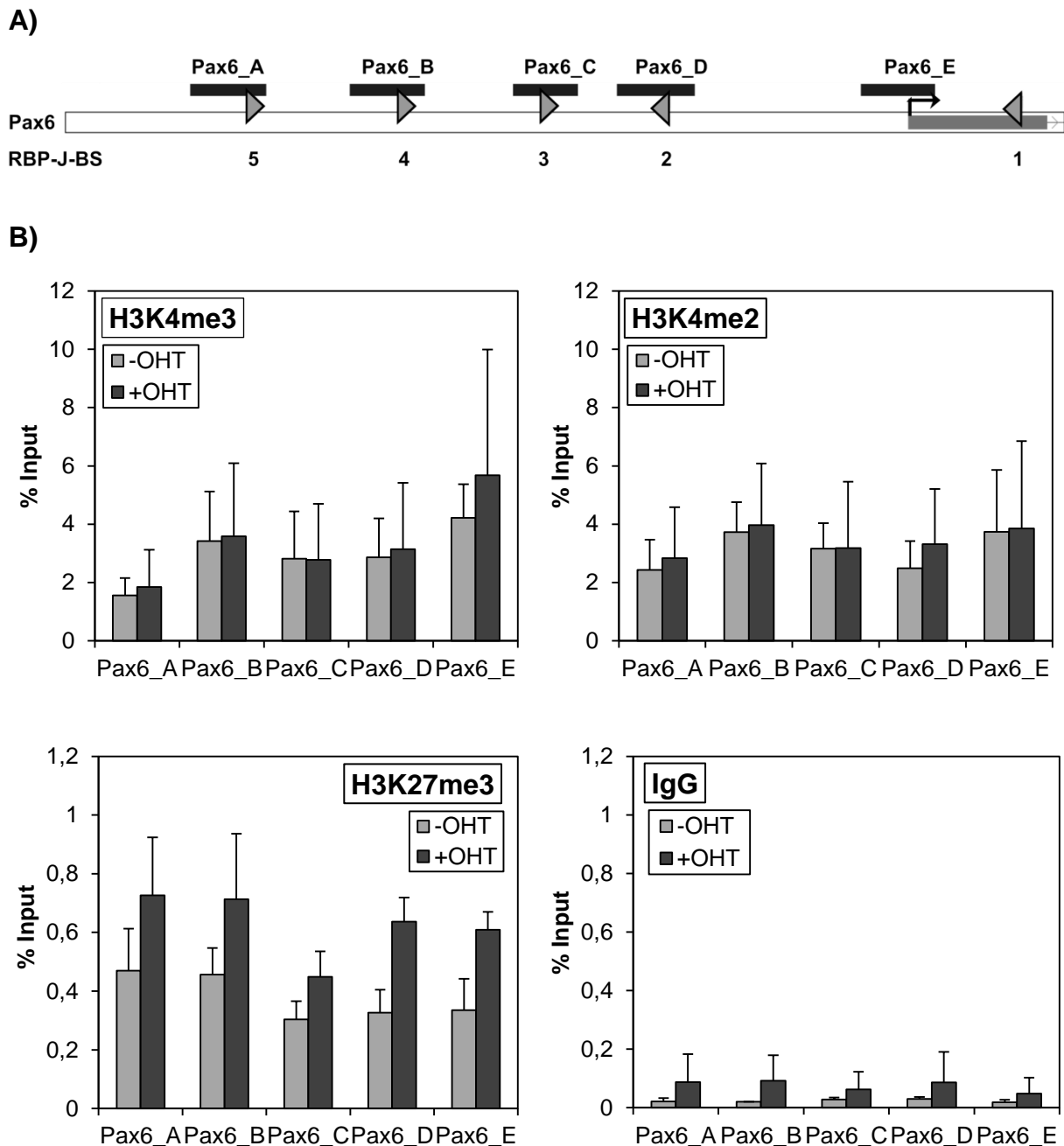


Abb. 4.19: Einfluss von Notch1 auf die Histon-Modifikationen in der regulatorischen Region des Notch1-Zielgens *Pax6*

A) Schematische Darstellung des regulatorischen Bereichs von *Pax6* (-2500 bp bis +500 bp relativ zum TSS, schwarzer Pfeil) mit den potenziellen RBP-J Bindungsstellen (RBP-J-BS, graue Pfeilköpfe) und den in der *Real-Time PCR* analysierten *Loci* Pax6_A, Pax6_B, Pax6_C, Pax6_D und Pax6_E.

B) Undifferenzierte EB5-Nert Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen gehalten, für 4 Stunden mit 500 nM OHT induziert und anschließend für den ChIP-Assay verwendet. Die H3K4me3, H3K4me2 und H3K27me3 Modifikationen und IgG wurden mittels *Real-Time PCR* an folgenden *Loci* bestimmt: Pax6_A, Pax6_B, Pax6_C, Pax6_D und Pax6_E. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten relativ zum gesamten Input.

4.6 Notch1 verändert verschiedene Histon-Modifikationen im Promotor von Notch1-Zielgenen in mesodermalen Vorläuferzellen

Die bisher untersuchten Histon-Modifikationen und deren Veränderung durch die Notch1-Aktivierung sollten anschließend in einem anderen zellulären Kontext untersucht werden. Dazu wurden EB5-Nert Zellen unter mesodermalen Differenzierungsbedingungen gehalten. Am Tag 5 der Differenzierung wurde die Anreicherung der Modifikationen H3K4me3, H3K4me2 und H3K27me3 vor und nach vierstündiger Notch1-Aktivierung anhand einer Chromatin-Immunopräzipitation ermittelt. Die Analyse erfolgte mittels *Real-Time PCR* an mehreren *Loci* im regulatorischen Bereich der Notch1-Zielgene *Hes5*, *Sox9* und *Pax6*.

Im ***Hes5*** Promotor kam es an dem *Locus* *Hes5_E* durch die Aktivierung von Notch1 zu einer fünffachen Erhöhung der H3K4me3 Modifikation. An dem *Locus* *Hes5_D* war eine Erhöhung von H3K4me3 um das Dreifache zu beobachten. Die Anreicherung der H3K4me2 Modifikation war ohne Notch1-Aktivierung entlang des untersuchten Bereiches des *Hes5* Promotors in Richtung des Transkriptionsstartpunkts bei *Hes5_D* und *Hes5_E* erhöht (s. Abb. 4.20). Das Niveau von H3K4me2 war nach Aktivierung von Notch1 im Bereich von *Hes5_D* um ein Drittel und im Bereich von *Hes5_E* um die Hälfte reduziert. Die Abnahme von H3K4me2 in denselben *Loci*, in denen H3K4me3 anstieg, ist zu erwarten, da diese Modifikationen die gleiche Aminosäure des Histons betreffen. Im Fall der H3K27me3 Modifikation kam es im gesamten untersuchten Promotorbereich von *Hes5* zu einem Rückgang der Anreicherung nach Aktivierung von Notch1. Dieser Effekt war am deutlichsten im Bereich von *Hes5_E*, wo es zu einer dreifachen Verringerung kam. In mesodermal differenzierten Zellen führte die Aktivierung von Notch1 zu einer Anreicherung der aktivierenden H3K4me3 Modifikation und zu einem Rückgang der reprimierenden H3K27me3 Modifikation im regulatorischen Bereich von *Hes5*.

In den *Loci* des ***Sox9*** Promotors war für die H3K4me3 Modifikation ein ähnliches Bild zu beobachten wie bei *Hes5*. Ohne Notch1-Aktivierung war diese Modifikation zum Transkriptionsstart hin stärker angereichert als die weiter weggelegenen Regionen (s. Abb. 4.21). Nachdem Notch1 aktiviert wurde, kam es zu einer deutlichen Zunahme von H3K4me3 in den Bereichen von *Sox9_D* und *Sox9_E*. Die H3K4me2 Modifikation war innerhalb des *Sox9* Promotors sowohl vor als auch nach der Aktivierung von Notch1 im *Loci* von *Sox9_D* am stärksten angereichert. Die Anreicherung der H3K4me2 Modifikation veränderte sich durch die Aktivierung von Notch1 an keinem der untersuchten *Loci* wesentlich. Die

Anreicherung der H3K27me3 Modifikation befand sich verglichen mit der H3K4me3 und der H3K4me2 Modifikation auf einem sehr geringen Niveau. Im Bereich von Sox9_C deutete sich nach der Aktivierung von Notch1 eine Abnahme von H3K27me3 an. In allen anderen *Loci* hatte die Aktivierung von Notch1 keinen Einfluss auf die Anreicherung von H3K27me3. Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass die Aktivierung von Notch1 in mesodermalen Zellen im *Sox9* Promotor einen anreichernden Einfluss auf die aktivierende H3K4me3 Modifikation hat.

Bei *Pax6* handelt es sich um ein Zielgen von Notch1, welches in mesodermalen Zellen nicht induziert wird. Es würde daher zu erwarten sein, dass sich bei *Pax6* durch die Zugabe von OHT keine Chromatin-Veränderungen ergeben. Zur Gegenüberstellung mit den induzierten Genen *Hes5* und *Sox9* wurden die Histon-Modifikationen im regulatorischen Bereich von *Pax6* vor und nach Notch1 Aktivierung analysiert. Im *Pax6* Promotor ließ sich zunächst der Effekt der erhöhten Anreicherung der Modifikationen zum Transkriptionsstart hin nicht beobachten (s. Abb. 4.22). Auch waren die ermittelten Werte der H3K4me3 und H3K4me2 Modifikationen im Vergleich zu den Werten aus der Analyse von *Hes5* und *Sox9* hier auf einem vergleichbaren Niveau mit der H3K27me3 Modifikation. Nach der Aktivierung von Notch1 kam es zu einer Anreicherung von H3K4me3 über den gesamten untersuchten Promotorbereich von *Pax6*. Die H3K4me2 Modifikation war im *Pax6* Promotor im Verhältnis zu der H3K4me3 Modifikation wesentlich prominenter vertreten als bei *Hes5* und *Sox9*. Notch1 hatte auf diese Modifikation keinen Einfluss. Die reprimierende H3K27me3 Modifikation war ohne Notch1-Aktivierung über den gesamten untersuchten Promotorbereich von *Pax6* im Vergleich zu der aktivierenden Modifikationen H3K4me3 stark angereichert. Nach der Aktivierung von Notch1 deutete sich eine leichte Abnahme der H3K27me3 Modifikation an. Zusammenfassend ließ sich für *Pax6* in mesodermalen Zellen mit einer geringen Anreicherung von H3K4me3 und einer hohen Anreicherung von H3K27me3 über den gesamten untersuchten Promotorbereich eine reprimierende Chromatin-Umgebung nachweisen.

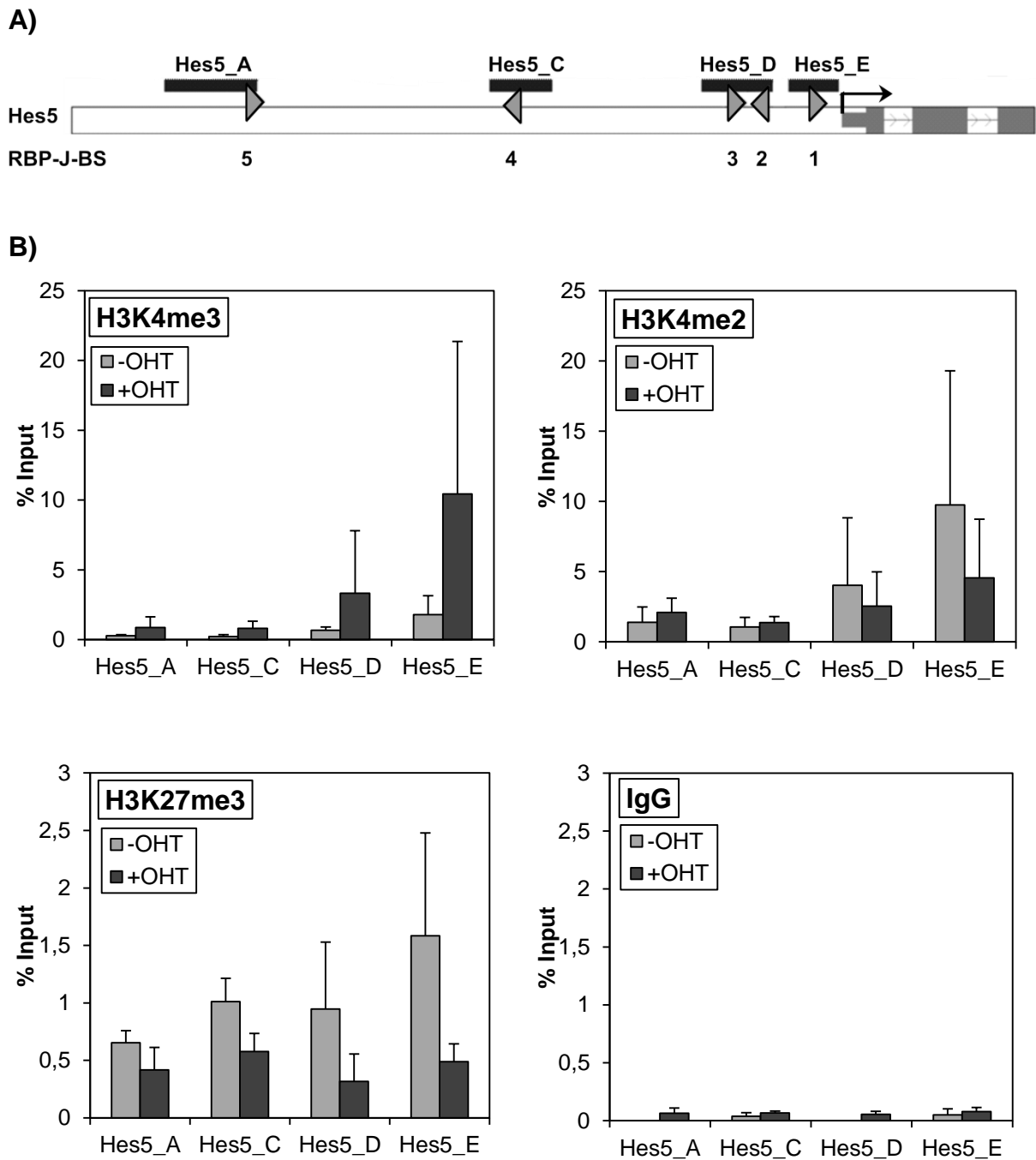


Abb. 4.20: Einfluss von Notch1 auf die Histon-Modifikationen in der regulatorischen Region des Notch1-Zielgens *Hes5* in mesodermal differenzierten Zellen

A) Schematische Darstellung des regulatorischen Bereichs von *Hes5* (-2500 bp bis +500 bp relativ zum TSS (Transkriptionsstartpunkt, schwarzer Pfeil) mit den beschriebenen RBP-J Bindungsstellen 1, 2 und 3 (Ong *et al.*, 2006) und den potenziellen RBP-J Bindungsstellen 4 und 5 (RBP-J-BS, graue Pfeilköpfe). Die *Loci* Hes5_A, Hes5_C, Hes5_D und Hes5_E wurden in der *Real-Time PCR* analysiert.

B) EB5-Nert Zellen wurden unter mesodermalen Differenzierungsbedingungen in *Embryoid Bodies* differenziert. An Tag 5 wurde Notch1 durch die Zugabe von 500 nM OHT für 4 Stunden induziert und anschließend wurden die Zellen für den ChIP-Assay verwendet. Die H3K4me3, H3K4me2 und H3K27me3 Modifikationen und IgG wurden mittels *Real-Time PCR* an folgenden *Loci* bestimmt: Hes5_A, Hes5_C, Hes5_D und Hes5_E. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten relativ zum gesamten Input.

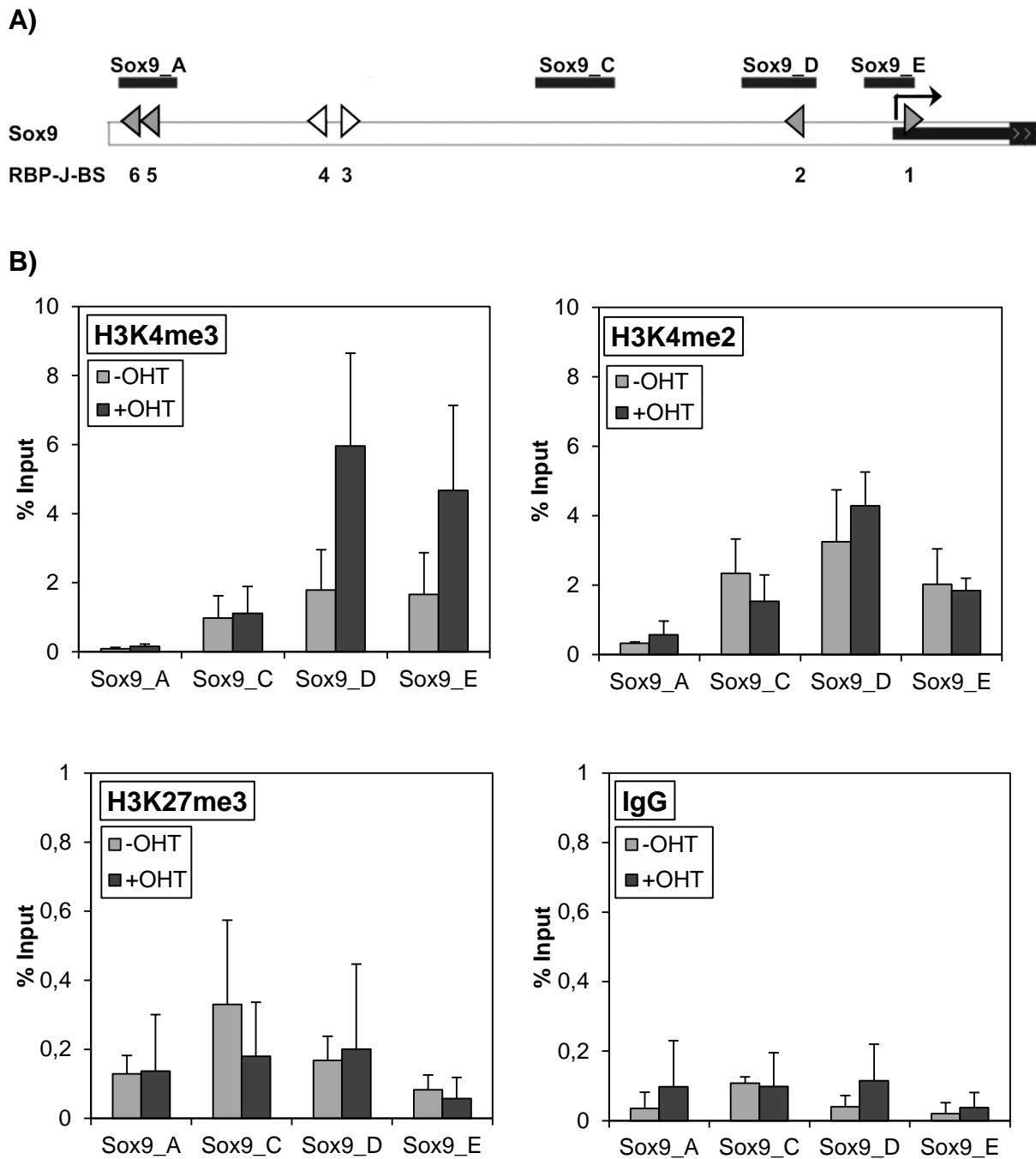


Abb. 4.21: Einfluss von Notch1 auf die Histon-Modifikationen in der regulatorischen Region des Notch1-Zielgens Sox9 in mesodermal differenzierten Zellen

A) Schematische Darstellung des regulatorischen Bereichs von Sox9 (-2500 bp bis +500 bp relativ zum TSS, schwarzer Pfeil) mit den potenziellen RBP-J Bindungsstellen (RBP-J-BS, graue Pfeilköpfe). Zwei schwache Bindungsstellen sind als weiße Pfeilköpfe dargestellt. In der *Real-Time PCR* wurden die *Loc*i Sox9_A, Sox9_C, Sox9_D und Sox9_E analysiert.

B) EB5-Nert Zellen wurden unter mesodermalen Differenzierungsbedingungen in *Embryoid Bodies* differenziert. An Tag 5 wurde Notch1 durch die Zugabe von 500 nM OHT für 4 Stunden induziert und anschließend wurden die Zellen für den ChIP-Assay verwendet. Die H3K4me3, H3K4me2 und H3K27me3 Modifikationen und IgG wurden mittels *Real-Time PCR* an folgenden *Loc*i bestimmt: Sox9_A, Sox9_C, Sox9_D und Sox9_E. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten relativ zum gesamten Input.

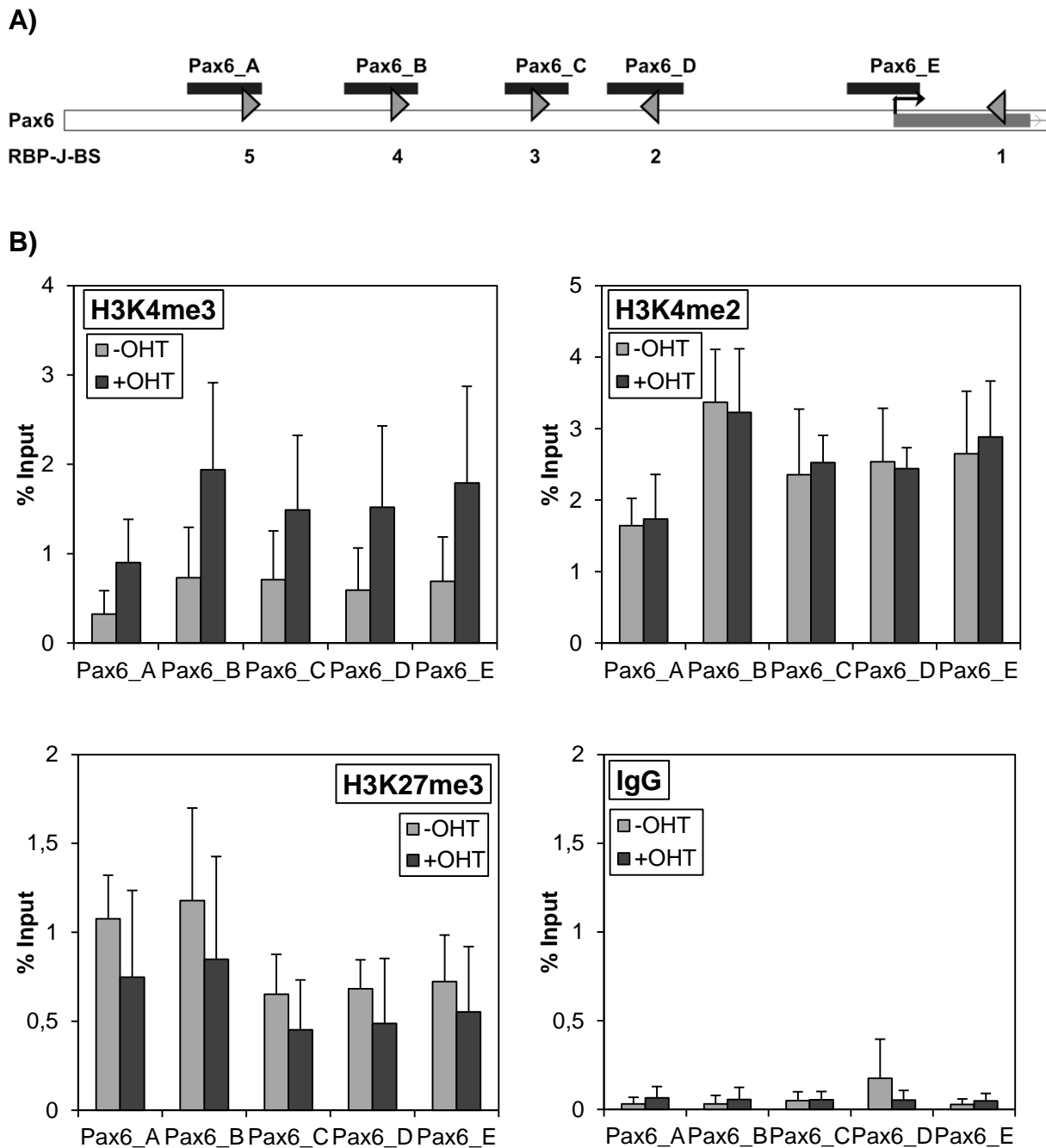


Abb. 4.22: Einfluss von Notch1 auf die Histon-Modifikationen in der regulatorischen Region des Notch1-Zielgens *Pax6* in mesodermal differenzierten Zellen

A) Schematische Darstellung des regulatorischen Bereichs von *Pax6* (-2500 bp bis +500 bp relativ zum TSS, schwarzer Pfeil) mit den potenziellen RBP-J Bindungsstellen (RBP-J-BS, graue Pfeilköpfe) und den in der *Real-Time PCR* analysierten *Loci* Pax6_A, Pax6_B, Pax6_C, Pax6_D und Pax6_E.

B) EB5-Nert Zellen wurden unter mesodermalen Differenzierungsbedingungen in *Embryoid Bodies* differenziert. An Tag 5 wurde Notch1 durch die Zugabe von 500 nM OHT für 4 Stunden induziert und anschließend wurden die Zellen für den ChIP-Assay verwendet. Die H3K4me3, H3K4me2 und H3K27me3 Modifikationen und IgG wurden mittels *Real-Time PCR* an folgenden *Loci* bestimmt: Pax6_A, Pax6_B, Pax6_C, Pax6_D und Pax6_E. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten relativ zum gesamten Input.

4.7 Kinetik ausgewählter Histon-Modifikationen im Promotor von Notch1-Zielgenen während der Notch1-Aktivierung in embryonalen Stammzellen

Die Auswirkungen von aktiviertem Notch1 auf die Histon-Modifikationen H3K4me3 und H3K27me3 waren in mesodermalen Zellen ausgeprägter als in ES-Zellen. Dies könnte zum einen an der Heterogenität der ES-Zellkultur zum anderen an einer unterschiedlichen Kinetik in der Reaktion auf extrinsische Signale liegen. Die Aktivierung von Notch1 erfolgte in den vorigen Versuchen durch die Zugabe von OHT für vier Stunden. Nach dieser Zeit lässt sich bereits eine deutliche Aktivierung der mRNA-Expression nachweisen. Die Modifikationen von Histonen können sich schon während des Prozesses der transkriptionellen Aktivierung verändern. Daher sollte im Folgenden der kurzfristige Einfluss von aktiviertem Notch1 auf die Modifikationen H3K4me3 und H3K27me3 untersucht werden. Hierfür wurde Notch1 in undifferenzierten EB5-Nert Zellen durch die Zugabe von OHT für 15 min, 30 min und 60 min aktiviert und anschließend eine Chromatin-Immunopräzipitation durchgeführt. Die Analyse der Histon-Modifikationen erfolgte mittels *Real-Time PCR* für mehrere *Loci* im regulatorischen Bereich der Notch1-Zielgene *Hes5*, *Sox9* und *Pax6*. Für die folgenden Versuche wurde das Messsystem für die *Real-Time PCR* umgestellt. Um die Spezifität der verwendeten Primer-Assays zu erhöhen, wurden jedem Ansatz spezifische Hydrolyse-Sonden zugefügt. Dies bedeutet, dass nicht alle bisher analysierten *Loci* überprüft wurden, da nicht für jeden *Locus* eine Sonde zur Verfügung stand. An welchen *Loci* eine Untersuchung erfolgte, wird jeweils in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Für *Hes5* wurden die beiden *Loci* *Hes5_A* und *Hes5_D* untersucht, wobei es sich bei *Hes5_A* um den Bereich der schwachen potenziellen RBP-J Bindungsstelle 5 handelte (s. Abb. 4.23 A). *Hes5_D* befand sich im Bereich der beiden Bindungsstellen 2 und 3, in welchen die Bindung von RBP-J nachgewiesen werden konnte (s. Abb 4.8). Bei Betrachtung der H3K4me3 Modifikation kam es im *Locus* von *Hes5_D* nach 15 minütiger Notch1 Aktivierung zu einer 3,8-fachen Anreicherung dieser Modifikation, die anschließend im weiteren Verlauf von 60 Minuten wieder zurückging (s. Abb. 4.23 B). Im Bereich von *Hes5_A* war die H3K4me3 Modifikation im Vergleich zu *Hes5_D* wesentlich geringer angereichert. Die Aktivierung von Notch1 schien keinen Einfluss auf die H3K4me3 Modifikation in diesem Bereich des *Hes5* Promotors zu haben. Die Anreicherung der H3K27me3 Modifikation war in den *Loci* *Hes5_A* und *Hes5_D* nach 15 Minuten der Notch1 Aktivierung verringert. Dieser Rückgang der H3K27me3 Modifikation blieb über den untersuchten Zeitverlauf unverändert.

Für **Sox9** wurden die *Loci* Sox9_B, Sox9_C, Sox9_D und Sox9_E analysiert (s. Abb. 4.24 A). Sox9_B lag im Bereich der schwachen Bindungsstellen 3 und 4. Sox9_C lag in einem Bereich ohne RBP-J Bindungsstelle. Sox9_D und Sox9_E umfassten jeweils eine für die Notch1/RBP-J vermittelte Aktivierung relevante RBP-J Bindungsstelle. Im Sox9 Promotor ließ sich in allen untersuchten *Loci* eine Erhöhung der H3K4me3 Anreicherung nach 15 minütiger Notch1 Aktivierung beobachten, die im Bereich von Sox9_B und Sox9_D im weiteren untersuchten Zeitverlauf wieder abnahm (s. Abb. 4.24 B). In den *Loci*, die weiter entfernt vom Transkriptionsstart lagen, Sox9_B und Sox9_C, war das Niveau der H3K4me3 Modifikation etwas niedriger als in den dem Transkriptionsstart nahen Bereichen von Sox9_D und Sox9_E. Die H3K27me3 Modifikation war ohne die Aktivierung von Notch1 auf einem gleichmäßigen Niveau über den Sox9 Promotor verteilt. Nach der Aktivierung von Notch1 kam es zu einem Rückgang der H3K27me3 Modifikation, der über den untersuchten Zeitraum anhielt.

Für **Pax6** wurden die *Loci* Pax6_A, Pax6_B, Pax6_C, Pax6_D und Pax6_E untersucht (s. Abb. 4.25 A). In jedem *Locus* befand sich jeweils eine potenzielle RBP-J Bindungsstelle. In den Bereichen von Pax6_D und Pax6_E befanden sich die signifikanten Bindungsstellen 1 und 2 (s. Abb. 4.11). Im Pax6 Promotor kam es nach der Aktivierung von Notch1 zu einer Anreicherung der H3K4me3 Modifikation in allen untersuchten Regionen, außer bei Pax6_C (s. Abb. 4.25 B). Besonders stark war dieser Effekt im *Locus* von Pax6_E zu erkennen. Weiterhin wurde deutlich, dass die Anreicherung von H3K4me3 im Pax6 Promotor nach Notch1 Aktivierung eine langsamere Kinetik zeigte, als bei *Hes5* und *Sox9*. Für H3K27me3 zeigte sich im Promotor von Pax6 eine relativ gleichmäßige Verteilung ohne Notch1 Aktivierung. Nachdem Notch1 aktiviert wurde, kam es in allen Regionen zu einem Rückgang dieser Modifikation über den gesamten untersuchten Zeitraum. Am stärksten war diese Reduktion von H3K27me3 im *Locus* von Pax6_E zu erkennen.

Insgesamt kam es in den Promotoren von *Hes5*, *Sox9* und *Pax6* nach der Aktivierung von Notch1 zu einem Anstieg der aktivierenden H3K4me3 Modifikation und zu einem Rückgang der reprimierenden H3K27me3 Modifikation. Des Weiteren ließ sich eine charakteristische Verteilung dieser Modifikationen innerhalb der Promotoren beobachten. Die H3K4me3 Modifikation war in der Nähe des Transkriptionsstarts vermehrt angereichert, während die H3K27me3 über den gesamten untersuchten Promotorbereich gleichmäßig angereichert war.

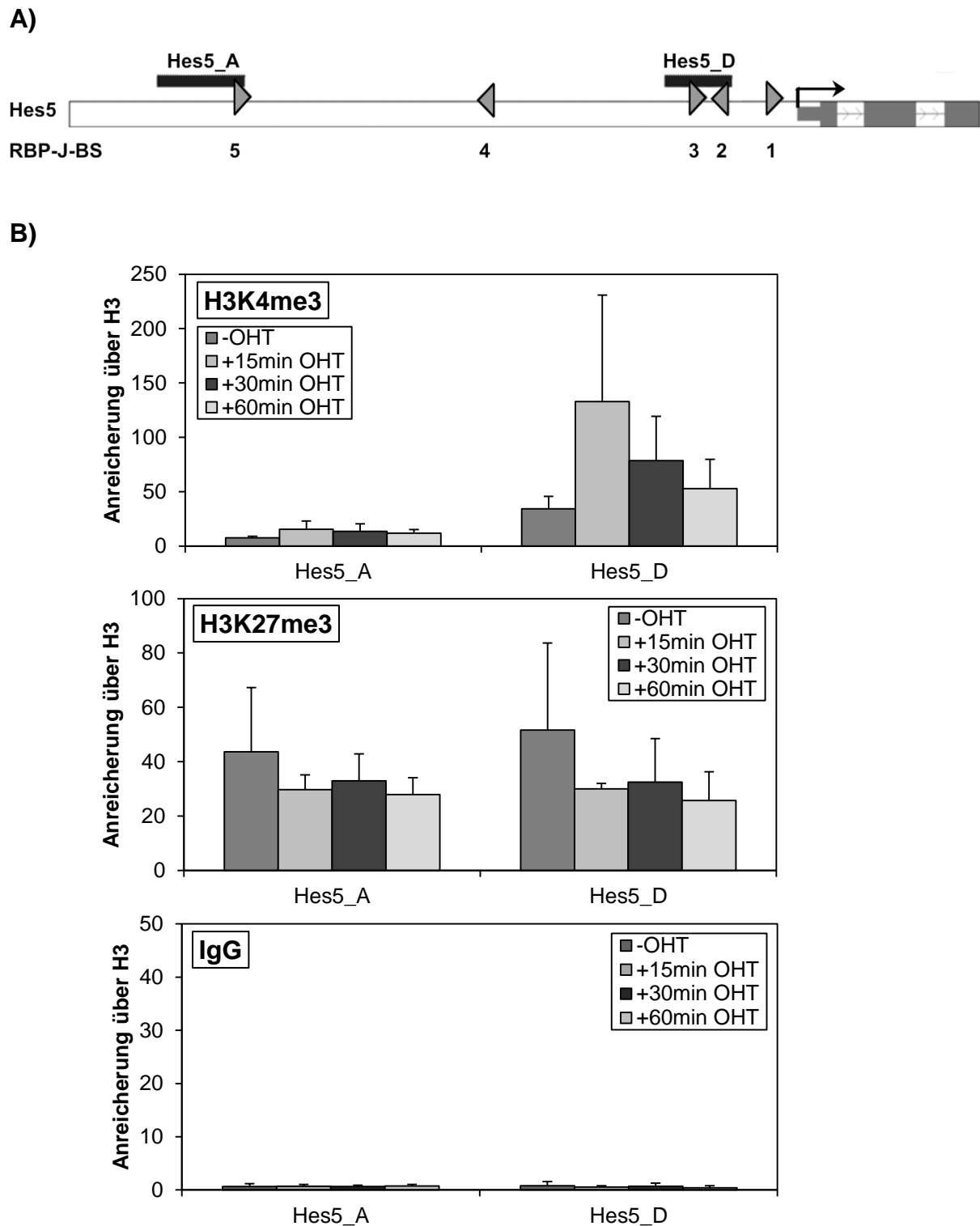
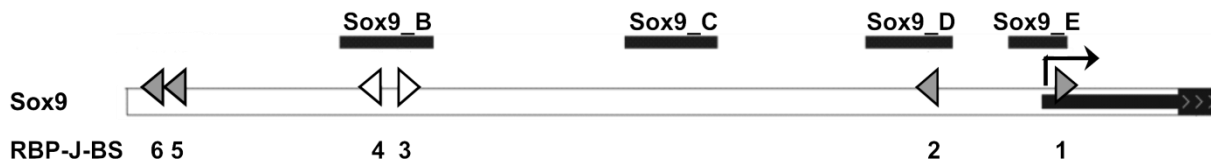


Abb. 4.23: Analyse der Histon-Modifikationen in der regulatorischen Region des Notch1-Zielgens *Hes5* zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Notch1-Aktivierung

A) Schematische Darstellung des regulatorischen Bereichs von *Hes5* (-2500 bp bis +500 bp relativ zum TSS (Transkriptionsstartpunkt, schwarzer Pfeil) mit den beschriebenen RBP-J Bindungsstellen 1, 2 und 3 (Ong *et al.*, 2006) und den potenziellen RBP-J Bindungsstellen 4 und 5 (RBP-J-BS, graue Pfeilköpfe). Die *Loci* *Hes5_A*, und *Hes5_D* wurden in der *Real-Time PCR* analysiert.

B) Undifferenzierte EB5-Nert Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen gehalten und für 15 min, 30 min und 60 min mit 500 nM OHT induziert und anschließend für den ChIP-Assay verwendet. Die H3K4me3 und H3K27me3 Modifikationen und IgG wurden mittels *Real-Time PCR* an folgenden *Loci* bestimmt: *Hes5_A* und *Hes5_D*. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten relativ zu gesamten H3.

A)



B)

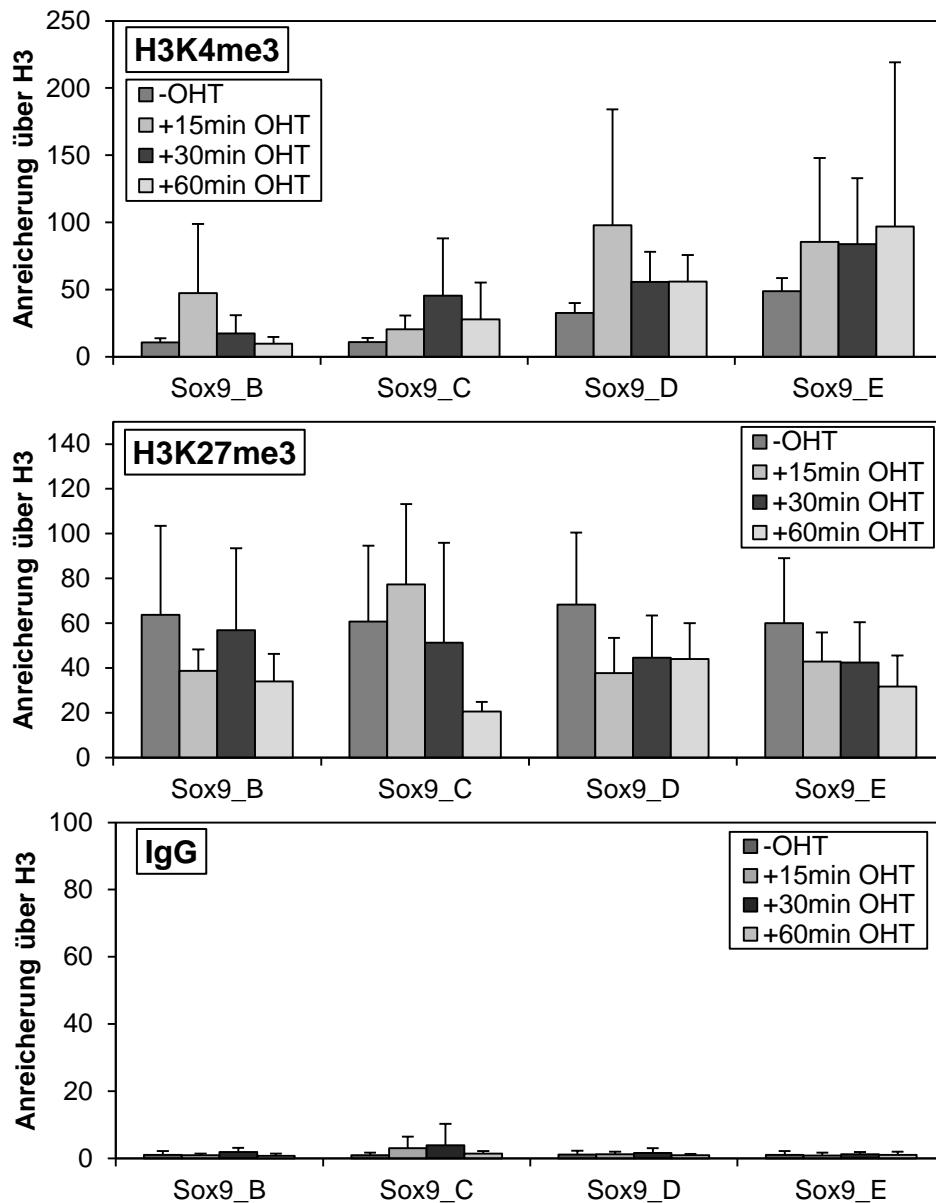
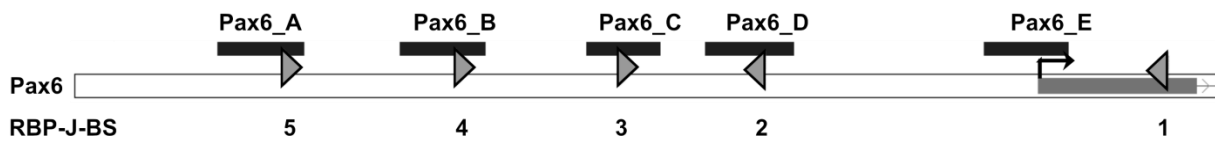


Abb. 4.24: Analyse der Histon-Modifikationen in der regulatorischen Region des Notch1-Zielgens Sox9 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Notch1-Aktivierung

A) Schematische Darstellung des regulatorischen Bereichs von *Sox9* (-2500 bp bis +500 bp relativ zum TSS, schwarzer Pfeil) mit den potenziellen RBP-J Bindungsstellen (RBP-J-BS, graue Pfeilköpfe). Zwei schwache Bindungsstellen sind als weiße Pfeilköpfe dargestellt. In der *Real-Time PCR* wurden die *Loci* Sox9_B, Sox9_C, Sox9_D und Sox9_E analysiert.

B) Undifferenzierte EB5-Nert Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen gehalten und für 15 min, 30 min und 60 min mit 500 nM OHT induziert und anschließend für den ChIP-Assay verwendet. Die H3K4me3 und H3K27me3 Modifikationen und IgG wurden mittels *Real-Time PCR* an folgenden *Loci* bestimmt: Sox9_B, Sox9_C, Sox9_D und Sox9_E. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten relativ zu gesamten H3.

A)



B)

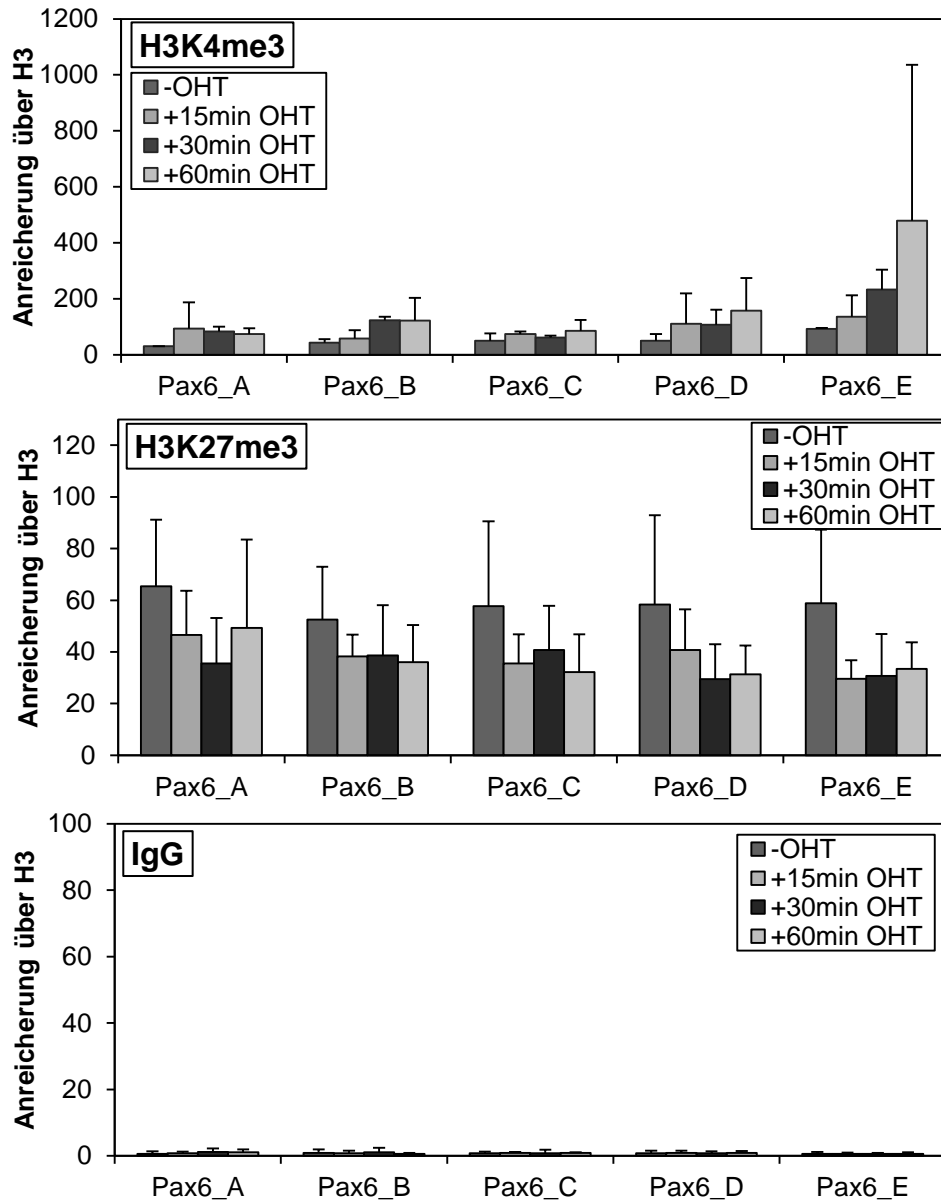


Abb. 4.25: Analyse der Histon-Modifikationen in der regulatorischen Region des Notch1-Zielgens *Pax6* zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Notch1-Aktivierung

A) Schematische Darstellung des regulatorischen Bereichs von *Pax6* (-2500 bp bis +500 bp relativ zum TSS, schwarzer Pfeil) mit den potenziellen RBP-J Bindungsstellen (RBP-J-BS, graue Pfeilköpfe) und den in der *Real-Time PCR* analysierten *Loci* Pax6_A, Pax6_B, Pax6_C, Pax6_D und Pax6_E.

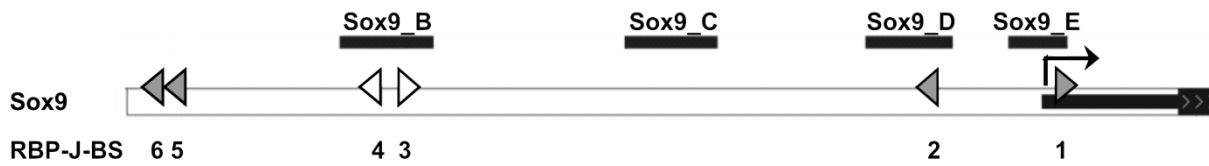
B) Undifferenzierte EB5-Nert Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen gehalten und für 15 min, 30 min und 60 min mit 500 nM OHT induziert und anschließend für den CHIP-Assay verwendet. Die H3K4me3 und H3K27me3 Modifikationen und IgG wurden mittels *Real-Time PCR* an folgenden *Loci* bestimmt: Pax6_A, Pax6_B, Pax6_C, Pax6_D und Pax6_E. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten relativ zu gesamten H3.

4.7.1 Effekt von Notch1 auf Histon-Modifikationen des Sox9-Promotors in hämatopoetischen Stammzellen

In einem nächsten Schritt sollte die zellkontextabhängige Wirkungsweise von Notch1 kontrolliert werden. Es wurden FDCP-Mix-Zellen verwendet, eine murine myeloische Stammzelllinie, die das NERT-Konstrukt stabil exprimiert (rNERTneo24) (Schroeder *et al.*, 2003b). Das Notch1-Zielgen *Sox9* ist in diesem zellulären Kontext durch Notch1 nicht induzierbar (Daten nicht gezeigt). Die Anreicherung der Modifikationen H3K4me3 und H3K27me3 sollte in undifferenziert gehaltenen FDCP-Mix-Zellen im *Sox9* Promotor vor und während der Notch1 Aktivierung untersucht werden. Dafür wurde Notch1 durch die Zugabe von OHT für 15, 30 und 60 Minuten aktiviert und anschließend eine Chromatin-Immunopräzipitation durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels *Real-Time PCR* an mehreren *Loci* im regulatorischen Bereich von *Sox9*. Es wurden die Bereiche Sox9_B, Sox9_C, Sox9_D und Sox9_E analysiert.

Wie Abbildung 4.26 darstellt, befand sich die aktivierende H3K4me3 Modifikation innerhalb des *Sox9* Promotors in FDCP-Mix-Zellen auf nahezu dem gleichen Niveau wie die reprimierende H3K27me3 Modifikation. Nach der Aktivierung von Notch1 deutete sich ein Rückgang dieser Modifikation an, während die H3K27me3 Modifikation unbeeinflusst blieb. Damit ergab sich im *Sox9* Promotor insgesamt eine reprimierende Chromatinumgebung, die im Einklang damit steht, dass *Sox9* in hämatopoetischen Stammzellen durch Notch1 nicht induzierbar ist.

A)



B)

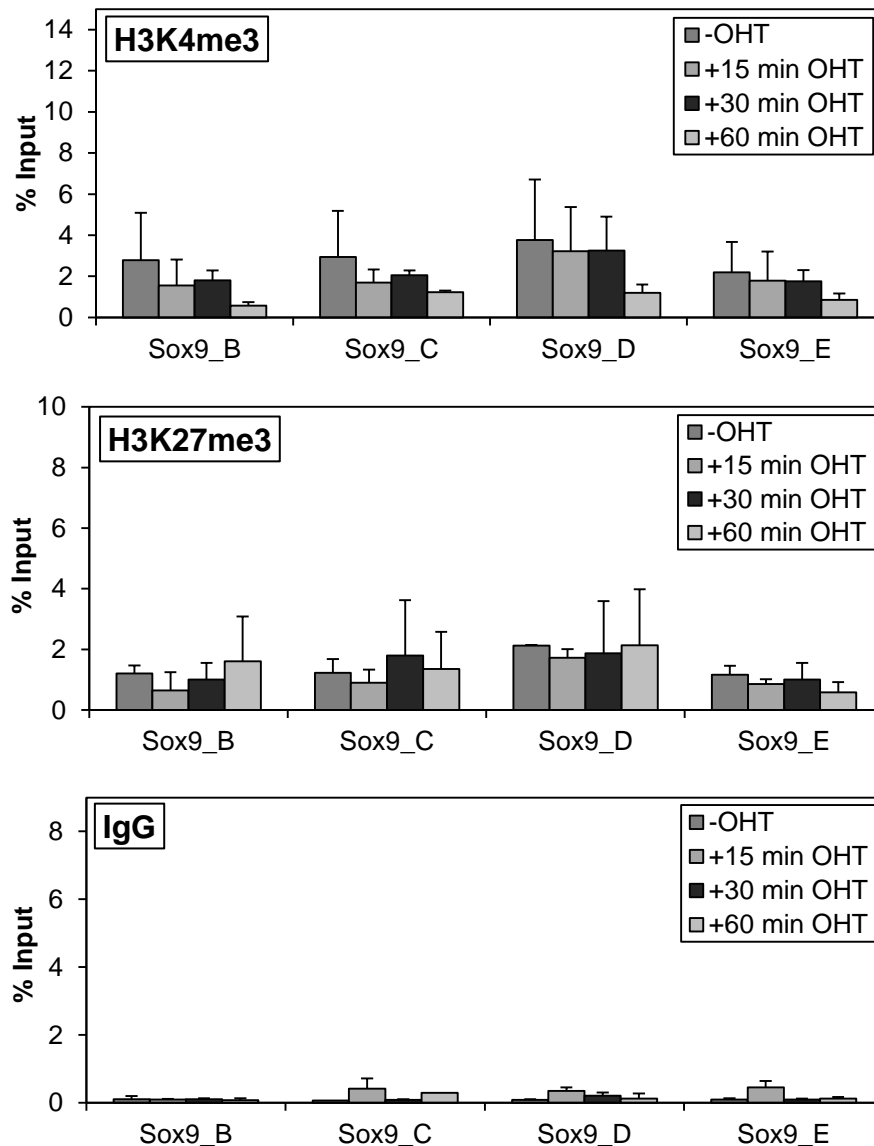


Abb. 4.26: Analyse der Histon-Modifikationen im Promotor von Sox9 in hämatopoetischen Stammzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Notch1-Aktivierung

A) Schematische Darstellung des regulatorischen Bereichs von Sox9 (-2500 bp bis +500 bp relativ zum TSS, schwarzer Pfeil) mit den potenziellen RBP-J Bindungsstellen (RBP-J-BS, graue Pfeilköpfe). Zwei schwache Bindungsstellen sind als weiße Pfeilköpfe dargestellt. In der *Real-Time PCR* wurden die *Loci* Sox9_B, Sox9_C, Sox9_D und Sox9_E analysiert.

B) Undifferenzierte FDCP-Mix-Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen gehalten und für 15 min., 30 min. und 60 min. mit 500 nM OHT induziert und anschließend für den ChIP-Assay verwendet. Die H3K4me3 und H3K27me3 Modifikationen und IgG wurden mittels *Real-Time PCR* an folgenden *Loci* bestimmt: Sox9_B, Sox9_C, Sox9_D und Sox9_E. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten relativ zum gesamten Input.

4.8 Analyse ausgewählter Histon-Modifikationen im Promotor von Notch1-Zielgenen in Abwesenheit von RBP-J

Die Aktivierung von Zielgenen erfolgt im kanonischen Notch1-Signalweg durch die Interaktion von NICD mit RBP-J. Sowohl die Ko-Repressor-Komplexe als auch die Ko-Aktivatoren, die mit RBP-J assoziieren weisen Histon-modifizierende Enzyme als Komponenten auf. Welche Rolle die Gegenwart von RBP-J bezogen auf die Anreicherung der Histon-Modifikationen H3K4me3 und H3K27me3 im Promotor von Notch1-Zielgenen spielt, sollte im Folgenden untersucht werden. Hierfür wurde mit ES-Zellen, welche kein RBP-J exprimieren (RBP-J^{-/-}) eine Chromatin-Immunopräzipitation mit spezifischen, gegen die Histon-Modifikationen gerichteten Antikörpern durchgeführt. Als Kontrolle wurden die entsprechenden Wildtyp-ES-Zellen D3 verwendet. Die Analyse erfolgte mittels *Real-Time-PCR* an mehreren *Loci* im regulatorischen Bereich der Notch1-Zielgene *Hes1*, *Hes5* und *Sox9*.

Wie aus Abbildung 4.27 hervorgeht, war die H3K4me3 Modifikation in den Wildtyp-ES-Zellen besonders stark im Bereich von Hes5_D im *Hes5* Promotor angereichert. Das gleiche galt für den Bereich von Sox9_D im *Sox9* Promotor. Auch in RBP-J^{-/-}-ES-Zellen war diese Modifikation in diesen Bereichen am stärksten vertreten, jedoch war das Niveau im Vergleich zu den Kontrollzellen um annähernd die Hälfte niedriger. Die H3K27me3 Modifikation war im *Hes5* Promotor in beiden untersuchten Bereichen in gleichem Maße angereichert, was der eher großflächigen Verteilung von H3K27me3 entspricht. In RBP-J^{-/-}-ES-Zellen konnte man verglichen mit den Wildtyp-ES-Zellen eine leichte Erhöhung dieser Modifikation in beiden Bereichen erkennen. Im *Sox9* Promotor war die H3K27me3 Modifikation in den Wildtyp-Zellen im Bereich von Sox9_D im Vergleich zu Sox9_B, Sox9_C und Sox9_E am stärksten angereichert. Diese Modifikation war im *Locus* von Sox9_D in den RBP-J^{-/-} ES-Zellen um das Doppelte im Vergleich zu den Wildtyp-ES-Zellen erhöht. Im Bereich von Sox9_B war in den RBP-J^{-/-}-ES-Zellen ebenfalls eine Erhöhung von H3K27me3 um die Hälfte verglichen mit den Wildtyp-ES-Zellen zu beobachten. Im *Hes1* Promotor zeigten sich keine Unterschiede in der Anreicherung von H3K4me3 und H3K27me3 zwischen den Wildtyp-ES-Zellen und den RBP-J^{-/-}-ES-Zellen

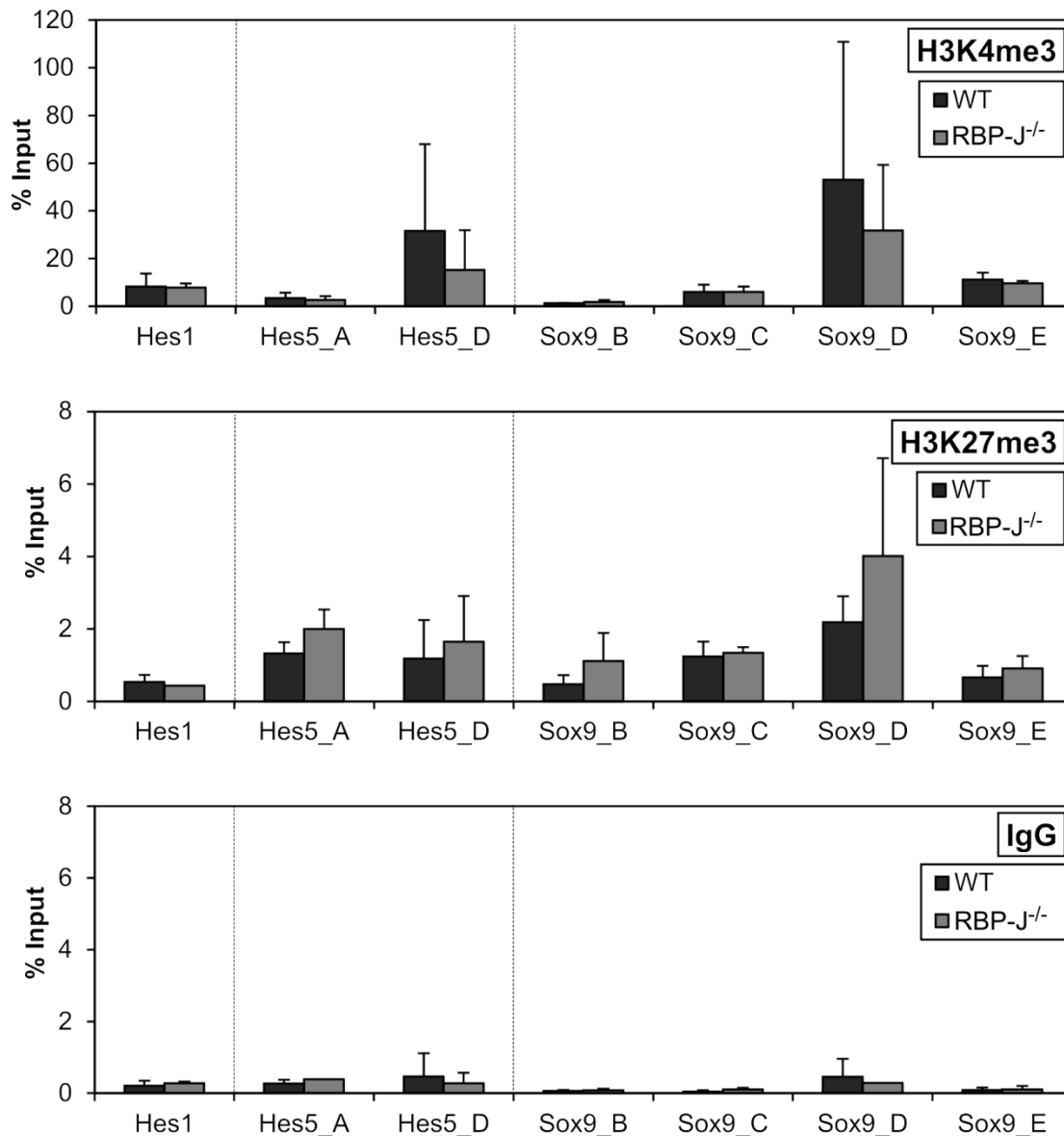


Abb. 4.27: Analyse der Histon-Modifikationen im Promotor der Notch1-Zielgene *Hes1*, *Hes5* und *Sox9* in RBP-J^{-/-} ES-Zellen

Undifferenzierte D3 ES-Zellen (WT) und RBP-J^{-/-} ES-Zellen (RBP-J^{-/-} #24) wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen gehalten und anschließend für den ChIP-Assay verwendet. Die H3K4me3 und H3K27me3 Modifikationen und IgG wurden mittels *Real-Time PCR* an folgenden *Loci* bestimmt: *Hes1*, *Hes5_A*, *Hes5_D*, *Sox9_B*, *Sox9_C*, *Sox9_D* und *Sox9_E*. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten relativ zum gesamten Input.

5. Diskussion

Der Notch-Signalweg spielt bei einer Vielzahl an zellulären Prozessen sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus eine zentrale Rolle. Er reguliert solche essentielle Vorgänge wie die Aufrechterhaltung des Stammzellstatus von Zellen, Zelllinienentscheidungen, Differenzierung und Apoptose (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Trotz des vergleichsweise einfachen Mechanismus der Signaltransduktion, in der keine *second messenger* involviert sind, reguliert Notch die Expression von einer Vielzahl an Genen. Diese Regulation geschieht in einer äußerst zellkontextabhängigen Art und Weise. Durch welche molekularen Mechanismen diese Zellkontextabhängigkeit hervorgerufen wird, ist wenig bekannt.

Grundlage der vorliegenden Arbeit bildet die Identifizierung und die funktionelle Charakterisierung der Rolle von Zielgenen, die abhängig vom zellulären Kontext durch Notch1 direkt reguliert werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde unter Verwendung eines konditionell aktivierbaren Systems eine Reihe bisher unbekannter direkter Notch1-Zielgene identifiziert (Schroeder *et al.*, 2006; Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Hierbei handelt es sich unter anderem um Transkriptionsfaktoren, die essentiell an der Differenzierung der drei Keimblätter beteiligt sind. In den regulatorischen Regionen dieser Zielgene sind mehrere potenzielle RBP-J Bindungsstellen zu finden. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Notch1/RBP-J abhängige Aktivierung über diese potenziellen RBP-J Bindungsstellen analysiert. Hierfür wurde die mRNA-Expression in Notch1-Zielgenen in ES-Zellen gemessen, welche kein RBP-J exprimieren. Desweiteren erfolgte eine Analyse der Bindung des RBP-J-Proteins an die potenziellen Bindungsstellen mittels Chromatin-Immunopräzipitation. Um die Funktionalität der potenziellen RBP-J Bindungsstellen während der Notch1-Aktivierung zu ermitteln, kamen Luziferase-Reporter-Konstrukte der regulatorischen Regionen der jeweiligen Gene zum Einsatz, in denen die einzelnen Bindungsstellen mutiert wurden. Bei der Analyse der Chromatin-Modifikationen in den Promotorregionen der neu identifizierten Notch1-Zielgene konnte das Auftreten sowohl von der aktivierende H3-Trimethylierung von Lysin 4 (H3K4me3) als auch von bivalenten Domänen, also das gleichzeitige Vorkommen von aktivierenden (H3K4me3) und reprimierenden (H3K27me3) Modifikationen, beobachtet werden (Schwanbeck *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die Aktivierung von Notch1 auf dieses spezifische Histon-Modifikationsmuster im regulatorischen Bereich dieser Zielgene hat. Dabei standen insbesondere die Bereiche von RBP-J Bindungsstellen im Fokus der Analyse.

Einfluss des Zellkontextes auf die Regulation der Transkription durch aktiviertes Notch1

Die am besten charakterisierten „klassischen“ Notch1-Zielgene von *D. melanogaster* bis zu den Säugetieren sind die basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren der *Hes*- und *Hey*-Familie. Bei diesen Genen handelt es sich hauptsächlich um transkriptionelle Repressoren. Obwohl die *Hes*- und *Hey*-Gene viele zentrale Funktionen in Notch-regulierten Prozessen erfüllen, bleibt es fraglich, ob sie ausreichen, um die vielfältigen Funktionen von Notch erklären zu können. Bisher wurde nur eine geringe Anzahl an weiteren direkten Zielgenen identifiziert. Darunter befinden sich beispielsweise *c-Myc* und *CyclinD1*, die bei der Proliferation eine wichtige Rolle spielen oder *Gata3*, welches in Zelllinienentscheidungen involviert ist (Borggreve und Oswald, 2009; Bray und Bernard, 2010). Eine genomweite Untersuchung in *D. melanogaster* erbrachte eine Reihe von weiteren direkten Notch-Zielgenen (Krejci *et al.*, 2009). Dabei handelt es sich um Gene, die in Zelldifferenzierung, Zelllinienentscheidungen, Morphogenese und auch in anderen Signalwegen involviert sind (Krejci *et al.*, 2009). In unserer Arbeitsgruppe wurde eine Anzahl an Zielgenen gefunden, die im murinen System direkt durch Notch1 reguliert sind (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Hierfür haben wir die zellkontext-abhängige Regulation von Notch1-Zielgenen mittels genomweiter Analysen in murinen embryonalen Stammzellen sowie in mesodermalen Zellen untersucht (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Die neu identifizierten Zielgene wurden in einer sehr zellkontextabhängigen Art und Weise durch Notch1 reguliert. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass durch die Aktivierung von Notch1 die Expression mehrerer Transkriptionsfaktoren hochreguliert wird, die eine zentrale Rolle bei unterschiedlichen Zelllinienentscheidungen während der frühen Entwicklung spielen, darunter *Sox9*, *Pax6*, *Runx1*, und *Myf5*. Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit validiert. Hierzu wurden embryonale Stammzellen, die das induzierbare NERT-Konstrukt tragen, mithilfe von *Embryoid Bodies* in die mesodermale Richtung differenziert. Der Einfluss von aktiviertem Notch1 auf die mRNA-Expression der untersuchten Zielgene wurde in den unterschiedlichen Stadien der Differenzierung gemessen. Es wurde bestätigt, dass *Sox9* sowohl in ES-Zellen als auch während der mesodermalen Differenzierung durch Notch1 reguliert wird. *Pax6* dagegen wird zwar in ES-Zellen durch Notch1 induziert, in mesodermalen Zellen jedoch nicht. Für *Myf5* und *Runx1* konnte eine Regulation durch Notch1 in mesodermalen Zellen, nicht aber in ES-Zellen festgestellt werden. Alle diese Transkriptionsfaktoren übernehmen eine Schlüsselrolle in verschiedenen Keimblättern während der embryonalen Entwicklung sowie im adulten Organismus. *Sox9* spielt in allen drei Keimblättern eine wichtige Rolle und ist

auch in allen von uns untersuchten Bedingungen durch Notch1 induziert, außer in hämatopoetischen Stammzellen (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Aus der Literatur sind mehrere Hinweise zu einem Zusammenhang zwischen Notch1 und der Regulation von *Sox9* bekannt. Bisher wurde eine direkte Regulation von *Sox9* durch Notch1 jedoch nicht beschrieben. Sowohl Notch1 als auch *Sox9* spielen eine zentrale Rolle in der Knorpelentwicklung (Hardingham *et al.*, 2006). Notch1 und weitere Komponenten des Notch-Signalweges sind während der frühen Phase der Chondrogenese exprimiert, während die konstitutive Aktivierung von Notch die Differenzierung zu Chondrozyten inhibiert (Watanabe *et al.*, 2003). *Sox9* wird während der Embryogenese in allen knorpelbildenden Regionen sowie in mesodermalen Knorpelvorläuferzellen exprimiert und reguliert die Expression knorpelspezifischer Matrixkomponenten (Wright *et al.*, 1995; Hardingham *et al.*, 2006). In einer Studie unserer Arbeitsgruppe konnten wir kürzlich die direkte Rolle von Notch1 bei der Regulation von *Sox9* während der *in vitro* Chondrogenese nachweisen (Haller *et al.*, 2012). Unter Einsatz des oben beschriebenen induzierbaren Notch1-Systems konnten wir zeigen, dass die temporäre Aktivierung von Notch1 zu Beginn der Chondrozytendifferenzierung zu einer vermehrten Bildung von Chondrozyten während der späten Chondrogenese führt. Eine dauerhafte Aktivierung von Notch1 führt dagegen zur vollständigen Inhibition der Chondrogenese. Dies bedeutet, dass Notch1 die Zelllinienentscheidung in Richtung der Chondrozytenspezifizierung begünstigt während die terminale Differenzierung blockiert wird. Gleichzeitig konnten wir durch die Aktivierung von Notch1 zu Beginn der Differenzierung die Hochregulation von *Sox9* beobachten. Wurde diese hochregulierte Expression unter Verwendung von *Sox9*-siRNA unterdrückt, blieb auch die vermehrte Bildung von Chondrozyten aus. Hiermit konnten wir zeigen, dass Notch1 die Zelllinienentscheidung und die Spezifizierung zu Chondrozyten über die direkte Regulation von *Sox9* vermittelt. In Übereinstimmung mit unseren Daten, konnten Zong *et al.* nachweisen, dass Notch1 in Leberzellen an den *Sox9*-Promotor bindet, was ebenfalls für eine direkte Regulation von *Sox9* spricht (Zong *et al.*, 2009). Eine Verbindung von Notch und *Sox9* konnte ebenso während der murinen Gliogenese beobachtet werden. So sorgt der Notch-Signalweg während der gliogenen Phase der Entwicklung des Rückenmarks *via* RBP-J für die Erhaltung der *Sox9* Expression (Taylor *et al.*, 2007). Bei der Entwicklung von Müller Gliazellen in der Retina reguliert Notch die Expression von *Sox8* und *Sox9* (Muto *et al.*, 2009). Jedoch wurde hier nicht untersucht, ob es sich um eine direkte oder indirekte Regulation handelt. Wir konnten *Sox9* während der neuroektodermalen Differenzierung, insbesondere bei der Gliadifferenzierung, als wichtigen Mediator von Notch1 identifizieren (Martini *et al.*, 2012).

Während der neuroektodermalen Differenzierung kommt es durch die frühe Aktivierung von Notch1 zu einer verstärkten Entwicklung von neuronalen Zellen, wobei Notch1 die Selbsterhaltung von neuronalen Stammzellen fördert, während die terminale Differenzierung zu Neuronen unterdrückt wird. Gleichzeitig wird durch aktiviertes Notch1 die Gliazelldifferenzierung und die Entwicklung der Neuralleistenzellen induziert. Dabei konnten wir zeigen, dass die Aktivierung von Notch1 während der neuroektodermalen Differenzierung die Expression von *Sox9* hochreguliert. Wurde diese hochregulierte Expression durch den Einsatz von *Sox9*-siRNA reprimiert, konnte die durch Notch1 induzierte gliale Differenzierung revertiert werden (Martini *et al.*, 2012). Hiermit konnten wir demonstrieren, dass *Sox9* ein wichtiger Mediator bei der Notch1-induzierten Spezifizierung der neuronalen Vorläuferzellen in Richtung Glia ist (Martini *et al.*, 2012). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen hier erste Einblicke in den Mechanismus der *Sox9* Aktivierung durch Notch1.

Der Transkriptionsfaktor *Pax6* ist an der Entwicklung neuroektodermaler Strukturen beteiligt und wurde von uns als direktes durch Notch1 hochreguliertes Gen in ES-Zellen identifiziert (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). *Pax6* spielt eine essentielle Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystems (Osumi *et al.*, 2008). Hier fördert *Pax6* abhängig vom zellulären Kontext einerseits die Proliferation und Expansion von neuronalen Stammzellen andererseits die neuronale Differenzierung (Osumi *et al.*, 2008). Dabei begünstigt *Pax6* die neuroektodermale Zelllinienentscheidung und die Differenzierung in radiale Gliazellen (Suter *et al.*, 2009). Notch1 kann die Differenzierung von mesodermalen Zellen inhibieren und somit die Zelllinienentscheidung Richtung neuroektodermaler Zellen begünstigen (Lowell *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2006). Die Wirkungsbereiche von *Pax6* während der embryonalen Entwicklung überschneiden sich teilweise mit denen von Notch1. Weiterhin konnte in *Xenopus* beobachtet werden, dass die Aktivierung von Notch die Expression von Genen induziert, die in der Augenentwicklung eine Rolle spielen, darunter *Pax6* (Onuma *et al.*, 2002). In einer kürzlich erschienenen Studie von Li *et al.* wurde *Pax6* als direktes Notch1-Zielgen in neuronalen Stammzellen bestätigt (Li *et al.*, 2012). Diese Daten deuten darauf hin, dass die durch Notch1 begünstigte Differenzierung in neuroektodermale Zelllinien über die direkte Aktivierung von *Pax6* vermittelt wird.

Für den Transkriptionsfaktor *Runx1* konnten wir in mesodermalen Zellen eine direkte Regulation durch Notch1 zeigen (Meier-Stiegen *et al.*, 2010 und diese Arbeit). *Runx1* ist für die Determinierung von mesodermalen Vorläuferzellen in die hämatopoetische Linie verantwortlich (Kurokawa, 2006). Es konnte schon mehrfach eine Notch1-abhängige *Runx1* Regulation während der Hämatopoese beobachtet werden. Im Zebrafisch induziert Notch1 die

Expression von *Runx1* und sorgt somit für die Spezifizierung der hämatopoetischen Stammzelllinie und weiterhin für die Aufrechterhaltung des hämatopoetischen Stammzellpools (Burns *et al.*, 2005). In der Maus ist *Runx1* dazu in der Lage, die Defekte in der Hämatopoese, die durch Notch1-Deletion verursacht werden, aufzuheben (Nakagawa *et al.*, 2006). Eine direkte Regulation von *Runx1* durch Notch1 wurde in diesen Studien jedoch nicht nachgewiesen. Da die *Runx1* Expression in unseren Zellen auch nach Inhibition der Proteinsynthese durch Notch1 hochreguliert wird, ist davon auszugehen, dass es sich um eine direkte Regulation handelt (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). So könnte Notch1 durch die direkte Hochregulierung von *Runx1* in mesodermalen Vorläuferzellen die Linienentscheidung in hämatopoetische Stammzellen steuern.

Bei *Myf5* handelt es sich um einen myogenen Transkriptionsfaktor, der zusammen mit *MyoD1*, *Myogenin* und *Myf6* die Entwicklung von Skelettmuskelzellen steuert (Arnold und Braun, 2000). In mesodermalen Zellen konnten wir *Myf5* als direktes Notch1-Zielgen identifizieren (Meier-Stiegen *et al.*, 2010 und diese Arbeit). Der Notch1-Signalweg ist an der Erhaltung von Muskelvorläuferzellen während der Embryogenese sowie von Satellitenzellen im adulten Organismus beteiligt (Vasyutina *et al.*, 2007). Bisher konnte gezeigt werden, dass Notch1 während der Myogenese für die Herunterregulierung von *MyoD1* sorgt und so zur Inhibierung der Muskeldifferenzierung führt (Kuroda *et al.*, 1999). Dies ist eine Möglichkeit wie Notch1 den Pool an Muskelstammzellen aufrechterhalten könnte. Da *Myf5* und *MyoD1* in verschiedenen Populationen von Muskelvorläuferzellen exprimiert werden, könnte Notch durch die direkte Hochregulierung von *Myf5* und gleichzeitiger Herunterregulierung von *MyoD1* zur Erhaltung eines *Myf5*-positiven Muskelvorläuferpools sorgen.

Diese Daten zeigen, dass Notch1 neben den prototypischen Zielgenen der *Hes*- und *Hey*-Familie die Expression von linienspezifischen Transkriptionsfaktoren reguliert. Hierzu gehören Faktoren, die bei der Differenzierung in alle drei Keimblätter eine Schlüsselrolle spielen. Das heißt, dass Notch1 seine Funktionen während der Differenzierung nicht allein über die Aktivierung transkriptioneller Repressoren steuert, sondern Zelllinienentscheidungen auch durch die direkte, zellkontextabhängige Induktion von zelllinienspezifischen Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Welche Mechanismen und Faktoren dieser Zellkontextabhängigkeit zugrunde liegen, ist aber noch weitestgehend unbekannt. Ein Aspekt, der im Folgenden näher betrachtet wird, ist die Tatsache, dass alle untersuchten Zielgene, die zeitlich und räumlich unterschiedlich reguliert werden, mehrere RBP-J Bindungsstellen in ihrem Promotor aufweisen.

RBP-J als Effektormolekül des kanonischen Notch1-Signalweges

Beim kanonischen Notch1-Signalweg erfolgt die Erkennung und Aktivierung von Notch1-Zielgenen durch die Interaktion der intrazellulären Domäne von Notch1 mit dem DNA-gebundenen Transkriptionsfaktor RBP-J. RBP-J wirkt in Abwesenheit von aktiviertem Notch1 als transkriptioneller Repressor. Hierbei interagiert RBP-J mit einer Reihe von Ko-Repressoren. Dazu gehören SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid receptor*)/N-CoR (*nuclear receptor corepressor*) und MINT (*Msx2-interacting nuclear target protein*) (Tanigaki und Honjo, 2010). Diese Komponenten wiederum sind für die Rekrutierung weiterer Ko-Repressor-Komplexe, wie beispielsweise CtBP (*C-terminal binding protein*), verantwortlich. Auf diese Weise werden unter anderem Histon-Deacetylasen rekrutiert, welche die Transkription von Genen in diesem Bereich reprimieren (Heitzler und Simpson, 1991; Kao *et al.*, 1998; Kurooka *et al.*, 1998; Morel *et al.*, 2001; Zhou und Hayward, 2001; Kuroda *et al.*, 2003; Oswald *et al.*, 2005). Durch die Interaktion der intrazellulären Domäne von Notch (NICD) mit RBP-J werden die Ko-Repressoren verdrängt und es kommt zur Rekrutierung von Ko-Aktivator-Komplexen. Hierbei handelt es sich um *Mastermind*, PCAF und GCN5, die die RBP-J-abhängige Transkription der Zielgene unterstützen (Kurooka *et al.*, 1998; Kurooka und Honjo, 2000; Wu *et al.*, 2000; Kitagawa *et al.*, 2001). Die Bindung von NICD an RBP-J erfolgt dabei hauptsächlich über die RAM-Domäne von Notch1. Die Ankyrin Wiederholungen sind auch in einem geringen Maße an der Bindung beteiligt (Tamura *et al.*, 1995; Kato *et al.*, 1997). In *D. melanogaster* führt das Fehlen des RBP-J Homologs Su(H) (*Suppressor of Hairless*) und Presenilin, einer Komponente des γ -Sekretase-Komplexes, zur Aufhebung der Repression und damit zu einer transienten Aktivierung von Notch1-Zielgenen (Koelzer und Klein, 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ebenfalls einen Anstieg der mRNA-Expression von Notch1-Zielgenen in ES-Zellen, die kein RBP-J exprimieren. Hierfür wurde die mRNA-Expression der Zielgene *Hes1*, *Hes5*, *Hey1*, *Hey2*, *Id4*, *Pax6* und *Sox9* analysiert. Wird RBP-J in diesen Zellen exogen von einem Transgen wieder exprimiert, wird die Repression der Zielgene wieder hergestellt. Bei der Expression einer konstitutiv transkriptionell aktiven Form von RBP-J (VP16-RBP-J), steigt das Expressionsniveau der Zielgene weiter an. Dies spiegelt den Effekt von aktivem Notch1 wider. Bei *Sox9* sind die Ergebnisse nicht ganz eindeutig. Hier wird kein Anstieg beobachtet, wenn RBP-J fehlt. Jedoch kann bei einem der RBP-J^{-/-} Klone durchaus eine Repression der Expression beobachtet werden, wenn RBP-J wieder eingebracht wird. In diesem RBP-J^{-/-} Klon kommt es auch zu einem Anstieg der *Sox9* mRNA-Expression bei transgener Expression der konstitutiv transkriptionell aktiven Form. Diese Daten legen nahe, dass es bei *Sox9* nicht

immer zu einer Repression durch RBP-J kommt. Der Effekt, dass Notch1-Zielgene nicht immer von RBP-J reprimiert werden, konnte auch in anderen Studien beobachtet werden. In *C. elegans* führt die Abwesenheit des RBP-J Homologs Lag-1 nicht zur Aktivierung von Zielgenen (Ghai und Gaudet, 2008). Auch die Expression des Notch1-Zielgens Ref-1 ist in diesem Modellorganismus nicht erhöht, wenn die RBP-J Bindungsstellen mutiert sind (Neves *et al.*, 2007). In Hautzellen von Säugern kommt es durch das Fehlen von RBP-J in Notch- oder Presenilin-Mutanten nicht zu einer Linderung des Phänotyps (Demehri *et al.*, 2008). Auch in T-Helferzellen hat die Abwesenheit von RBP-J keinen Effekt auf die Differenzierung (Ong *et al.*, 2008). Die Repression von Zielgenen über RBP-J ist offenbar nicht in allen Zellkontexten vorhanden. Da die *Sox9* Expression in einigen, aber nicht allen RBP-J^{-/-} Klonen nach der transgenen Expression von RBP-J oder der konstitutiv aktiven Form von RBP-J beeinflusst ist, könnte es sich bei der Repression von *Sox9* über RBP-J um einen dynamischen Vorgang handeln und abhängig von zusätzlichen Faktoren sein. Dieser Effekt stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Bindung von RBP-J an den Promotoren von Notch1-Zielgenen in *D. melanogaster* transient ist (Krejci und Bray, 2007). Sowohl in *D. melanogaster* als auch in Säugerzellen erhöht die Anwesenheit von NICD die Bindung von RBP-J an die DNA. Unabhängig davon, ob RBP-J als Repressor fungiert oder nicht, führt die Bindung von NICD an RBP-J zum transkriptionellen *Switch* und zur Aktivierung der Genexpression (Kopan und Ilagan, 2009).

Das RBP-J-Protein kann an der DNA an Bindungsstellen mit hoher (YGTGRGAA) oder mit niedriger (RTGRGAR) Affinität binden (Nellesen *et al.*, 1999). Einige gut charakterisierte Notch1 Zielgene weisen in ihrem Promotor gepaarte Bindungsstellen auf, die entweder die gleiche oder entgegengesetzte Direktionalität zeigen (Nellesen *et al.*, 1999). Dabei spielt die Richtung und auch der Abstand der Bindungsstellen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung durch Notch (Ong *et al.*, 2006). Im *Hes1* Promotor in Säugern ist eine solche gepaarte Bindungsstelle in einer *head-to-head* Anordnung mit einem Abstand von 16 Nukleotiden zu finden (Jarriault *et al.*, 1995). Auch die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es in ES-Zellen zu einer starken Anreicherung von RBP-J in diesem Bereich kommt. *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass an diesen Bindungsstellen eine kooperative Bindung von zwei RBP-J/NICD/MAM Komplexen erfolgt (Nam *et al.*, 2007). Jedoch ist unklar, ob die kooperative Bindung zweier Komplexe auch *in vivo* relevant ist und ob sich die Komplexe auch bilden, wenn der Abstand der zwei Bindungsstellen nicht optimal ist. Darüber hinaus wird *Hes1* trotz dieser charakteristisch gepaarten Bindungsstellen nicht in allen zellulären Kontexten durch Notch induziert. So konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt

werden, dass *Hes1* in undifferenzierten ES-Zellen, aber nicht in mesodermalen Vorläuferzellen Zellen durch Notch1 reguliert wird (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Des Weiteren sind in den regulatorischen Regionen von vielen Notch-Zielgenen diese gepaarten Bindungsstellen nicht zu beobachten. Der *Hes5* Promotor weist beispielsweise keine gepaarten Bindungsstellen auf (Ong *et al.*, 2006). Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass RBP-J in ES-Zellen an vier Bindungsstellen im *Hes5* Promotor bindet. Dabei ist die Anreicherung des RBP-J-Proteins an den ersten drei Bindungsstellen nahe des Transkriptionsstarts am stärksten. Hierbei muss aber bedacht werden, dass die zweite und dritte Bindungsstelle nicht getrennt voneinander untersucht werden konnten, da sie für die ChIP-Analyse zu dicht zusammen liegen. Bei diesen handelt es sich um eine hochaffine und eine niedrigaffine Bindungsstelle. Auch an der fünften Bindungsstelle kommt es zu einer Anreicherung von RBP-J, die aber in diesem Bereich etwas geringer ist. Hiermit wurde bestätigt, dass die beschriebenen RBP-J Bindungsstellen in den Promotoren von *Hes1* und *Hes5* in ES-Zellen von RBP-J besetzt sind. Das gilt sowohl für die gepaarten Bindungsstellen von *Hes1* als auch für die Bindungsstellen von *Hes5*, unabhängig davon, ob es sich um hoch oder niedrigaffine Bindungsstellen handelt. Dies steht im Einklang mit der Induzierbarkeit dieser Gene durch den Notch1/RBP-J Signalweg.

Grundlage für die Untersuchung der RBP-J Bindung im *Sox9* und *Pax6* Promotor in dieser Arbeit bilden kürzlich veröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe. Wir haben mithilfe einer *position weight matrix* von Ong *et al.* in den regulatorischen Regionen der neu identifizierten Notch1-Zielgene *Sox9* und *Pax6* mehrere potenzielle RBP-J Bindungsstellen gefunden (Ong *et al.*, 2006; Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Dabei wurden in den jeweiligen Promotoren Bereiche von +500 bp bis zu -2500 bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine Anreicherung von RBP-J an potenziellen Bindungsstellen im regulatorischen Bereich von *Sox9* und *Pax6* in ES-Zellen nachgewiesen werden. Sowohl bei *Sox9* als auch bei *Pax6* ergab sich eine signifikante Anreicherung von RBP-J an der Bindungsstelle, die sich vor dem Transkriptionsstartpunkt des jeweiligen Gens befindet. Diese Daten geben erste Hinweise auf die Verteilung von RBP-J im Promotorbereich der neu identifizierten Zielgene von Notch1 in ES-Zellen. *Sox9* und *Pax6* sind in ES-Zellen direkt durch den Notch1/RBP-J-Signalweg induzierbar (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen somit *Sox9* und *Pax6* als direkte Zielgene des Notch1/RBP-J Signalweges. Für *Pax6* wurde darüber hinaus auch in neuralen Stammzellen eine direkte Regulation durch Notch1 nachgewiesen (Li *et al.*, 2012). Weiterführende Untersuchungen der RBP-J Bindung, beispielsweise in neuralen

Stammzellen, könnten zeigen, ob RBP-J immer an den gleichen Bindungsstellen bindet, oder ob es abhängig vom Zellkontext an unterschiedlichen Regionen innerhalb des Promotors bindet. Des Weiteren ist die Bindung von RBP-J an die DNA als ein dynamischer Prozess charakterisiert worden (Krejci und Bray, 2007). Die Bindung von RBP-J ist bei Anwesenheit von NICD erhöht. Ko-Immunopräzipitationsanalysen könnten Aufschluss darüber geben, in welchem Kontext die hier untersuchten Bindungsstellen gleichzeitig von NICD gebunden werden.

In einem nächsten Schritt wurde die Funktionalität der einzelnen Bindungsstellen bei der Aktivierung von Notch1-Zielgenen analysiert. Hierfür wurde die Transaktivierung von Luziferase-Konstrukten, die den jeweiligen Promotorbereich der Zielgene *Sox9* und *Pax6* mit den entsprechenden RBP-J Bindungsstellen enthielten, untersucht. Die einzelnen RBP-J Bindungsstellen wurden dabei so mutiert, dass sie nicht mehr von RBP-J erkannt werden konnten. Somit wurden die mutierten Promotor-Konstrukte mit den Wildtyp Promotor-Konstrukten im Luziferase-Assay in ES-Zellen und im Falle von *Sox9* auch in neuroektodermal differenzierten Zellen verglichen. In ES-Zellen zeigt der *Sox9*-Promotor eine reduzierte Induzierbarkeit, wenn die Bindungsstellen 1 oder 2 mutiert sind. Diese Reduktion ist bei der Mutation der Bindungsstelle 2 stärker. Jedoch verbleibt in beiden Mutanten eine leichte Induzierbarkeit des *Sox9*-Promotors. Auch durch die doppelte Mutation der beiden Bindungsstellen 1 und 2 kommt es zu einer reduzierten Induzierbarkeit gegenüber dem Wildtyp. In neuroektodermal differenzierten Zellen dagegen zeigt die Mutation der einzelnen Bindungsstellen keine veränderte Induzierbarkeit im Vergleich zum Wildtyp. Hier ist jedoch die Induktion drastisch reduziert, wenn beide Bindungsstellen mutiert sind. Anders als in ES-Zellen scheint in den neuroektodermal differenzierten Zellen jeweils eine Bindungsstelle hinreichend für die Aktivierung zu sein. Darüber hinaus ist die grundlegende Expression des *Sox9*-Promotors, d.h. ohne Aktivierung von Notch1, in ES-Zellen erhöht, wenn die RBP-J Bindungsstellen 1 oder 2 mutiert sind. Dieser Effekt wird höchstwahrscheinlich durch die fehlende Repression durch RBP-J hervorgerufen. Interessanterweise stimmt dies nicht mit der Analyse der RBP-J-defizienten ES-Zellen überein, in denen die Expression von *Sox9* in einigen, aber nicht in allen Zellen im Vergleich zu den Wildtypzellen hochreguliert war. Diese Ergebnisse legen nahe, dass RBP-J in ES-Zellen nicht immer an der Repression von *Sox9* beteiligt ist. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Bindung von RBP-J an den Promotor von *Sox9* dynamisch ist (Krejci und Bray, 2007). In neuroektodermalen Zellen ist durch die Mutation von Bindungsstelle 1 oder 2 dagegen kein Anstieg der Expression in Abwesenheit von aktiviertem Notch1 im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Das heißt,

dass die Bindung von RBP-J an die ersten beiden Bindungsstellen des *Sox9* Promotors in neuroektodermalen Zellen keine reprimierende Wirkung hat, jedoch essentiell für die Induktion von *Sox9* durch Notch1 ist. Diese Ergebnisse zeigen eine eindeutige Beteiligung der ersten beiden RBP-J Bindungsstellen für die Notch1-vermittelte Regulation von *Sox9* in ES-Zellen als auch in neuroektodermalen Zellen auf. Des Weiteren deuten die Daten darauf hin, dass in unterschiedlichen Differenzierungsstadien verschiedene Bindungsstellen für die Notch vermittelte Aktivierung von Zielgenen verwendet werden. Ong *et al.* haben bei der Analyse der Notch1-abhängigen *Hes5* Aktivierung ähnliche Ergebnisse erhalten (Ong *et al.*, 2006). Hier wurden im *Hes5*-Promotor die beiden RBP-J Bindungsstellen nahe des Transkriptionsstarts mutiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung durch die Mutation der ersten Bindungsstelle völlig aufgehoben wird und bei Mutation der zweiten Bindungsstelle um die Hälfte reduziert wurde. Ein wichtiger Mechanismus um eine maximale Aktivierung zu gewährleisten ist demzufolge, die Kooperation der Bindung an mehreren RBP-J Bindungsstellen.

Einfluss der Chromatin-Struktur auf die transkriptionelle Regulation durch Notch1

Post-translationale, reversible Modifikationen der Histone spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Transkription von Notch1-Zielgenen. Die genauen Mechanismen dieser epigenetischen Regulation sind aber erst in Grundzügen bekannt (Borggreve und Oswald, 2009; Borggreve und Liefke, 2012). Die am besten charakterisierten Modifikationen, die an der Regulation von Notch1-Zielgenen beteiligt sind, sind Acetylierung und Methylierung. So ist die Deacetylierung von Histon 4 an Lysin 16 (H4K16) durch die Histondeacetylase SIRT1 entscheidend an der Repression von Notch1-Zielgenen beteiligt (Shogren-Knaak *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2011). Zum anderen ist schon seit langem bekannt, dass Histonacetyltransferasen wie GCN5/PCAF und p300 Teil des NICD Aktivator-Komplexes sind (Kurooka und Honjo, 2000; Oswald *et al.*, 2001). Auch die Methylierung von Histonen spielt eine wichtige Rolle bei der Transkription von Notch1-Zielgenen. In *D. melanogaster* ist die aktivierende Trimethylierung von H3 an Lysin 4 (H3K4me3) und gleichzeitig die Expression von Notch1-Zielgenen in Abwesenheit der H2B Ubiquitin Ligase Bre1 beeinträchtigt (Bray *et al.*, 2005). Die Monoubiquitinierung von H2B und die damit nachfolgende Trimethylierung von H3K4 sind daher entscheidend in die Regulation der Expression von Notch1-Zielgenen involviert. Eine weitere positive Rolle für H3K4me3 bei der Transkription von Notch1-Zielgenen wurde von Krejci und Bray gezeigt. So kommt es bei

D. melanogaster nach Notch-Aktivierung zu einem Anstieg der H3K4me3 Modifikation in *Enhancern* von Notch1-Zielgenen (Krejci und Bray, 2007). Dementsprechend führt die Demethylierung von H3K4 durch die Histon-Demethylase KDM5A, einer Komponente des RBP-J Repressor-Komplexes, zur Repression von Notch-Zielgenen (Liefke *et al.*, 2010). Hierbei konnten Liefke und Kollegen außerdem zeigen, dass die H3K4me3 Modifikation an der RBP-J-Bindungsstelle im Promotor von Notch1-Zielgenen dynamisch ist und durch Notch1 reguliert wird (Liefke *et al.*, 2010). Die reprimierende H3K27 Trimethylierung wurde ebenfalls mit der Regulation von Zielgenen durch den Notch1 Signalweg in Zusammenhang gebracht. In einem Notch1-ICD induzierten T-ALL-Mausmodell (*T cell acute lymphoblastic leukemia*), in dem die Überexpression von Notch1-ICD zur malignen Transformation von T-Zellen führt, kommt es nach Aktivierung von Notch1 zu einem Rückgang von H3K27me3 im Promotor von Notch1-Zielgenen (Ntziachristos *et al.*, 2012).

Dass die H3K4me3 und H3K27me3 Modifikationen bei der Regulation von Notch1-Zielgenen involviert sind, zeigen sowohl die vorliegende Arbeit als auch kürzlich veröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (Schwanbeck *et al.*, 2011). Anhand der Analyse dieser Chromatin-Modifikationen innerhalb der regulatorischen Bereiche von Genen, die in ES-Zellen direkt durch Notch1 reguliert werden, haben wir gezeigt, dass die H3K4me3 Modifikation bei fast 95% dieser Gene zu finden ist. Außerdem weisen viele der direkten Notch1-Zielgene sog. bivalente Domänen in der regulatorischen Region auf. Bei diesem Modifikationsmuster kommen aktivierende H3K4me3 und reprimierende H3K27me3 Modifikationen zusammen innerhalb desselben Nukleosoms vor (Azuara *et al.*, 2006; Bernstein *et al.*, 2006; Mikkelsen *et al.*, 2007). Bivalente Domänen im Promotor von Genen sorgen einerseits für die Repression dieser Gene, halten sie aber gleichzeitig in einem Zustand, aus dem sie sehr rasch aktiviert werden können. Dieses Modifikationsmuster ist besonders häufig an den Promotorenentwicklungsspezifischer Gene, insbesondere bei Transkriptionsfaktoren zu finden. Aufgrund dieser Beobachtungen könnte einerseits die H3K4 Trimethylierung eine Voraussetzung für die Aktivierbarkeit der Zielgene darstellen. Andererseits könnten auch die bivalenten Domänen durch Notch1 zu H3K4me3 aufgelöst werden und so zur Aktivierung der Genexpression führen. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die *Polycomb*-Proteine Ezh2 und Suz12, die Teil des *Polycomb* Repressor Komplex 2 sind, in den Promotorregionen der Notch1-Zielgene stark angereichert sind (Schwanbeck *et al.*, 2011). Bei diesen Proteinen handelt es sich um Methyltransferasen, die für die H3K27 Trimethylierung verantwortlich sind. Dies könnte bedeuten, dass bei dem Mechanismus der Aktivierung durch Notch1 die repressiven H3K27me3 Modifikationen aktiv entfernt werden

müssen. Diese Annahme wird durch eine Studie von Ntziachristos *et al.* bestätigt. Hier kommt es in humanen T-ALL Zellen nach *Knock-down* von Ezh2 und Suz12 zu einer Hochregulierung von Notch1-Zielgenen in der Abwesenheit von Notch1 (Ntziachristos *et al.*, 2012). Um zu prüfen, welchen Einfluss Notch1 auf die beiden Modifikationen der bivalenten Domäne, H3K4me3 und H3K27me3, hat, wurde in dieser Arbeit das Vorkommen dieser Markierungen im regulatorischen Bereich, insbesondere an RBP-J Bindungsstellen, der Notch1-Zielgene *Hes5*, *Sox9* und *Pax6* vor und über einen Zeitraum von vier Stunden nach Aktivierung durch Notch1 betrachtet. Um eventuelle Unterschiede in verschiedenen Zellkontexten aufzugreifen, wurde die Analyse sowohl in ES-Zellen als auch in mesodermal differenzierten Zellen sowie in hämatopoetischen Stammzellen durchgeführt. Alle diese Zellen exprimierten das Tamoxifen-induzierbare NERT-Konstrukt.

In ES-Zellen kommt es nach Notch1-Aktivierung zu einem sehr raschen Anstieg der aktivierenden H3K4me3 Modifikation an den RBP-J Bindungsstellen im Promotor der direkten Zielgene *Hes5*, *Sox9* und *Pax6*. Anschließend ist, außer bei *Pax6* ein genauso rascher Rückgang dieser Modifikation zu beobachten. Die Anreicherung der H3K27me3 Modifikation sinkt nach der Aktivierung von Notch1 und bleibt größtenteils auf diesem reduzierten Niveau. Des Weiteren kann auch das typische Verteilungsmuster der Modifikationen beobachtet werden. H3K4me3 tritt eher punktuell auf, insbesondere im Bereich des Transkriptionsstarts. Die H3K27me3 Modifikation zeigt eine eher großflächigere Verteilung über größere Bereiche des Promotors. Dementsprechend ist der Einfluss von Notch1 auf die H3K4me3 Modifikation lediglich im Bereich der RBP-J Bindungsstellen nachzuweisen, während die Veränderungen der H3K27me3 Modifikation im nahezu gesamten Promotorbereich zu beobachten sind. Nach vierstündiger Notch1-Aktivierung zeigt sich in ES-Zellen eine Revertierung der Modifikationen. Die hier ermittelten Daten zeigen, dass die Aktivierung von Notch1 in ES-Zellen zunächst zu einem Anstieg der aktivierenden H3K4me3 Modifikation und zu einem Rückgang der reprimierenden H3K27me3 führt. Notch1 könnte somit einen Einfluss für die Aufhebung der bivalenten Domänen an den RBP-J Bindungsstellen haben und dadurch für die Aktivierung der Transkription sorgen. Durch den relativ schnellen Rückgang der H3K4me3 Modifikation wäre es denkbar, dass bereits ein kurzfristiger Anstieg von H3K4me3 ausreicht, um die Transkription zu initiieren. Des Weiteren verfügt NICD über eine sehr kurze Lebensdauer aufgrund der Phosphorylierung der C-terminalen PEST-Domäne, was anschließend zur Ubiquitinierung führt und dadurch zur Degradation von NICD im Proteasom (Oberg *et al.*, 2001; Fryer *et al.*, 2004). Dadurch könnte es kurz nach der Aktivierung der Transkription zu einer refraktären Phase durch den

Rückgang von H3K4me3 kommen, in der das Zielgen dann für kurze Zeit nicht wieder aktiviert werden kann. Der Effekt von Notch1 auf den Rückgang der H3K27me3 Modifikation scheint langlebiger zu sein. Ähnliche Resultate zeigt eine Studie in T-ALL Zellen. Die Aktivierung von NICD führt zu einer starken Reduktion von H3K27me3, während NICD auf die H3K4me3 Modifikation hier nur einen geringen Einfluss hat, der vielmehr genspezifisch und weniger universell ist (Ntziachristos *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verringerung der reprimierenden H3K27me3 Modifikation relevanter oder eventuell sogar ausreichend für die erfolgreiche Aktivierung der Transkription in diesen schon mehr differenzierten Zellen ist.

In mesodermal differenzierten Vorläuferzellen ist noch vier Stunden nach der Notch1-Aktivierung ein Effekt auf die Histon-Modifikationen zu erkennen. Hier zeigt sich im Promotor der Zielgene *Hes5* und *Sox9* ein Anstieg der H3K4me3 Modifikation nach Notch1-Aktivierung. Im Fall der H3K27me3 Modifikation kommt es im *Hes5* Promotor zu einem Rückgang, nachdem Notch1 aktiviert wurde. Im *Sox9* Promotor ist H3K27me3 auf einem sehr geringen Niveau angereichert und die Aktivierung von Notch1 übt somit keinen Effekt auf diese Modifikation aus. Dies deutet zum einen darauf hin, dass auch in mesodermalen Zellen die Anreicherung der H3K4me3 Modifikation eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Zielgenen durch aktives Notch1 spielt. Zum anderen werden auch hier Unterschiede bei der Aktivierung von *Hes5* und *Sox9* durch Notch1 deutlich. Die Notch1 induzierte Verringerung von H3K27me3 spielt in mesodermalen Zellen bei der Aktivierung von *Sox9* keine Rolle. Dies wird dadurch bedingt, dass sich diese Modifikation schon vor der Notch1-Aktivierung auf einem minimalen Niveau befindet. Die Demethylierung von H3K27me3 könnte somit im *Sox9* Promotor Notch1 unabhängig sein, während die Aktivierung von *Sox9* durch Notch1 über die Anreicherung von H3K4me3 vermittelt wird.

Pax6 ist in mesodermalen Vorläuferzellen durch aktiviertes Notch1 nicht induzierbar (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Bei Betrachtung der Histon-Modifikationen im Promotorbereich von *Pax6* spiegelt sich das in einer reprimierende Chromatin-Umgebung wider. Die aktivierende H3K4me3 Modifikation ist in diesen Zellen im *Pax6* Promotor zu geringen Anteilen vertreten, im Vergleich zu der reprimierenden H3K27me3 Modifikation, welche in diesen Zellen stärker angereichert ist. Die Aktivierung von Notch1 führt zwar zu einem leichten Anstieg der H3K4me3 Modifikation. Aber diese Veränderungen passieren auf einem so geringen Niveau, dass ein tatsächlicher Effekt auf die Transkription unwahrscheinlich ist. Dieser scheinbare Anstieg der H3K4me3 Modifikation könnte auch durch eine gewisse Heterogenität der mesodermalen Vorläuferzellen hervorgerufen werden. Während der

Differenzierung in *Embryoid Bodies* entstehen immer Vorläuferzellen aller drei Keimblätter. In den hier verwendeten Differenzierungsbedingungen werden die mesodermalen Zellen zwar stark angereichert, um eine reine mesodermale Population handelt es sich jedoch nicht. Es ist darüber hinaus zu beobachten, dass die Aktivierung von Notch1 in mesodermalen Vorläuferzellen im Promotorbereich von *Hes5* und *Sox9* auch noch nach vier Stunden einen messbaren Effekt auf H3K4me3 und bei *Hes5* auch auf H3K27me3 hat, während in ES-Zellen nach dieser Zeitspanne keine Veränderungen durch Notch1 mehr zu sehen waren. Es ist wahrscheinlich, dass verschiedene Zelltypen mit einer unterschiedlichen Kinetik auf extrinsische Signale reagieren und sich dies auch auf Chromatin-Ebene widerspiegelt.

Die Untersuchung der Histon-Modifikationen im Promotorbereich von *Sox9* in hämatopoetischen Stammzellen bestätigt das Verteilungsmuster der H3K4me3 und der H3K27me3 Modifikationen für durch Notch1 nicht induzierbare Gene. Im *Sox9* Promotor kann man für beide Modifikationen keine bedeutende Anreicherung erkennen, sowohl vor als auch nach der Notch1 Aktivierung. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass *Sox9* in diesen Zellen nicht exprimiert wird.

In RBP-J defizienten ES-Zellen kommt es an den signifikanten RBP-J Bindungsstellen im *Hes5* und im *Sox9* Promotor zu einer Reduktion der aktivierenden H3K4me3 Modifikation und zu einer Erhöhung der reprimierenden H3K27me3 Modifikation gegenüber den Wildtyp ES-Zellen. Diese Beobachtung korreliert nicht mit bisher veröffentlichten Daten. Liefke *et al.* haben gezeigt, dass die Demethylase KDM5A in Abwesenheit von aktiviertem Notch an RBP-J bindet und für die Demethylierung von H3K4me3 sorgt, wodurch es zur Repression von Notch1-Zielgenen beiträgt (Liefke *et al.*, 2010). Des Weiteren ist in den RBP-J-defizienten Zellen die Expression von *Hes5* im Vergleich zu Wildtyp-Zellen erhöht. Die Expression von *Sox9* wird dagegen in den RBP-J defizienten Zellen im Vergleich zu Wildtyp Zellen nicht eindeutig hochreguliert. In diesem Fall kann die Erhöhung von H3K27me3 und der Rückgang von H3K4me3 zu einer RBP-J unabhängigen Repression beitragen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Histon-Modifikationen H3K4me3 und H3K27me3 durch die Aktivierung von Notch1 in unterschiedlichen Zelltypen beeinflusst werden. In ES-Zellen führt die Aktivierung von Notch1 im Promotor seiner direkten Zielgene *Hes5*, *Sox9* und *Pax6* zu einem vorwiegend kurzfristigen Anstieg der H3K4me3 Modifikation, während die Anreicherung der H3K27me3 Modifikation längerfristig reduziert wird. Dieser Notch1 Effekt steht im Einklang mit der Induzierbarkeit dieser Gene in ES-Zellen durch Notch1. Im Zellkontext der mesodermalen Zellen sorgt die Notch1 Aktivierung im *Hes5* Promotor ebenfalls für einen Anstieg der H3K4me3 Modifikation und für einen Rückgang der

H3K27me3 Modifikation. Im *Sox9* Promotor kommt es zwar zu einem Anstieg der H3K4me3 Modifikation nach der Aktivierung von Notch1, jedoch wird die H3K27me3 Modifikation hier nicht beeinflusst. Darüber hinaus ist die H3K27me3 Modifikation im *Sox9* Promotor auf einem so geringen Niveau angereichert, dass es sich hier nicht um eine bivalente Domäne handelt. Dies steht im Einklang mit der Regulierbarkeit der Expression von *Sox9* durch Notch1. Der *Pax6* Promotor ist in mesodermalen Zellen durch ein reprimierendes Histon-Modifikationsmuster gekennzeichnet. Dies korreliert mit der Tatsache, dass *Pax6* in mesodermalen Zellen durch Notch1 nicht induziert wird (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Notch1 in ES-Zellen bei der Auflösung der bivalenten Domäne involviert ist. In differenzierten Zellen, wenn keine bivalenten Domänen vorhanden sind, stellt die Anwesenheit der H3K4 Trimethylierung die Voraussetzung für die Aktivierung der Notch1-Zielgene dar.

Molekulare Mechanismen der Zellkontextabhängigkeit des Notch1-Signalweges

In unserer Arbeitsgruppe konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Aktivierung des Notch1-Signalweges zur Induktion zelllinienspezifischer Transkriptionsfaktoren führt (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Auf diese Weise determiniert Notch1 während der frühen Entwicklung die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in bestimmte Zelllinien. Welche Transkriptionsfaktoren dabei in welchen Zellen während der Entwicklung exprimiert werden, hängt von anderen kontextspezifischen Faktoren, also weiterer spezifischer Transkriptionsfaktoren, ab sowie vom Chromatinstatus in den regulatorischen Regionen der Zielgene. Über die genauen molekularen Mechanismen dieser Zellkontextabhängigkeit ist bisher wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit bietet erste Erkenntnisse über die Bedeutung von unterschiedlichen Histon-Modifikationen für die Notch1-Aktivierung.

Neben den zelllinienspezifischen Transkriptionsfaktoren, welche für die Differenzierung in einen bestimmten Zelltyp sorgen, werden durch das Notch1-Signal auch die klassischen Zielgene der Hes/Hey-Familie induziert. Diese Proteine vermitteln die transkriptionelle Repression zelllinienspezifischer Transkriptionsfaktoren. Auf diese Art und Weise kommt es nach der Aktivierung von Notch zu einer negativen Rückkopplungsschleife. Diese gleichzeitige Induktion von Zielgenen und deren Inhibitoren wurde von Bray *et al.* als inkohärente Logik bezeichnet (Krejci *et al.*, 2009). Es wird vermutet, dass hierdurch ein zeitliches Fenster geöffnet wird, in dem der spezifische Transkriptionsfaktor die Zellen für die Differenzierung in eine bestimmte Linie determiniert. Die gleichzeitige Hochregulierung der *Hes/Hey*-Gene wirkt aber einer endgültigen Differenzierung entgegen. Weitere wichtige

Faktoren bei der Regulierung solcher negativen Rückkopplungsschleifen stellen microRNAs (miRNA) dar. Bei den miRNAs handelt es sich um kurze, ca. 22 Nukleotid lange RNA-Sequenzen, die an der post-transkriptionalen Regulation von Genen beteiligt sind (Ichimura *et al.*, 2011). Sie binden an die komplementäre mRNA und verhindern deren Translation. Auf diese Weise sind miRNAs an der Regulation des Notch-Signalweges beteiligt (Wang *et al.*, 2010). In *D. melanogaster* wurden mehrere miRNA Bindungsstellen in der untranslatierten Region von Notch-Zielgenen gefunden (Lai *et al.*, 2005). Dies stellt eine weitere Regulationsmöglichkeit für die Feinabstimmung des Notch-Signalweges dar.

Welche zelllinienspezifischen Transkriptionsfaktoren in welchen Zellen induziert werden, ist dann von der Chromatinumgebung der Zielgene abhängig, die die Bindung von NICD und die Etablierung eines funktionellen NICD/RBP-J Aktivator-Komplexes erlaubt. Dabei stellen das Auftreten der H3K4me3 Modifikation und somit eine offene Chromatinstruktur oder die bivalenten Domänen die entscheidenden Voraussetzungen für die Bindung von NICD dar (s. Abb. 5.1). Des Weiteren könnte NICD in ES-Zellen aktiven Einfluss auf die Demethylierung von H3K27me3 nehmen, um so die Aktivierung von Zielgenen zu initiieren. In diesem Zusammenhang spielt auch das Auftreten von DNA-Methylierung eine entscheidende Rolle. Viele der Notch-Zielgene weisen CpG-Inseln innerhalb ihrer Promotoren auf. Die DNA-Methylierung an CpG-Inseln korreliert mit der Stilllegung von Genen (Deaton und Bird, 2011). Es konnte beobachtet werden, dass die H3K4 Trimethylierung oft an unmethylierten CpG-Inseln zu finden ist (Thomson *et al.*, 2010). Die H3K4 Trimethylierung an CpG Inseln wird durch die Inaktivierung von Notch kaum beeinflusst (Liefke *et al.*, 2010). Dies könnte bedeuten, dass die Etablierung von H3K4me3 unabhängig von aktivem Notch erfolgt. Dadurch wird das Modell unserer Arbeitsgruppe bestätigt, dass die Anwesenheit von H3K4me3 die Voraussetzungen für die Aktivierbarkeit durch Notch schafft und so den intrinsischen zellulären Kontext definiert (s. Abb. 5.1) (Schwanbeck *et al.*, 2011).

Ein weiterer Aspekt ist die Präsenz von RBP-J. Es ist bisher noch unklar, ob RBP-J ein unterschiedliches Bindungsverhalten in unterschiedlichen Zellen desselben Organismus zeigt. Daten dieser Arbeit legen nahe, dass während der Notch1 vermittelten Aktivierung von Zielgenen verschiedene RBP-J Bindungsstellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien verwendet werden. Die mögliche zelltypspezifische Bindung von RBP-J an die DNA liefert einen weiteren Hinweis auf die kontextabhängige Wirkungsweise von Notch. Eine genomweite Analyse von Wang *et al.* zeigt, dass ca. ein Drittel der RBP-J gebundenen Regionen nicht innerhalb von Promotoren liegen, sondern möglicherweise *Enhancer* darstellen (Wang *et al.*, 2011). *Enhancer*-Regionen zeigen im Gegensatz zu Promotoren ein

stark zelltypabhängiges Histon-Modifikationsmuster (Heintzman *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang ist die genomweite Analyse sowohl der Bindung von RBP-J sowie weiteren Transkriptionsfaktoren als auch des Chromatin-Charakters in diesen Regionen unerlässlich. Des Weiteren wird aus dieser Studie deutlich, dass nicht alle RBP-J Bindungsstellen auch von NICD gebunden werden. Dies könnte bedeuten, dass RBP-J nicht immer in der Lage ist, NICD zu rekrutieren. So wäre es denkbar, dass NICD mit den bereits gebundenen Repressor-Komplexen in Konkurrenz steht. Dadurch könnte die Bildung eines funktionellen Ko-Aktivator-Komplex unter bestimmten Umständen durch die Anwesenheit von Repressor-Komplexen verhindert werden. Andererseits könnte auch eine geeignete Chromatinumgebung an diesen Bindungsstellen die entscheidenden Voraussetzungen für die Bindung von NICD und die Etablierung des Aktivator-Komplexes schaffen.

Der Notch Signalweg reguliert die Expression seiner Zielgene in einer stark zellkontextabhängigen Art und Weise, die durch positive und negative Rückkopplungsschleifen abgestimmt wird. Insgesamt gibt die vorliegende Arbeit einen ersten Einblick in die molekularen Mechanismen der zellkontextabhängigen Wirkungsweise von Notch. Diese kontextabhängige Spezifität wird dabei nicht von einem einzelnen Faktor vermittelt, sondern von der An- bzw. Abwesenheit von bestimmten Transkriptionsfaktoren, DNA-Methylierung und dem Chromatinstatus bestimmt.

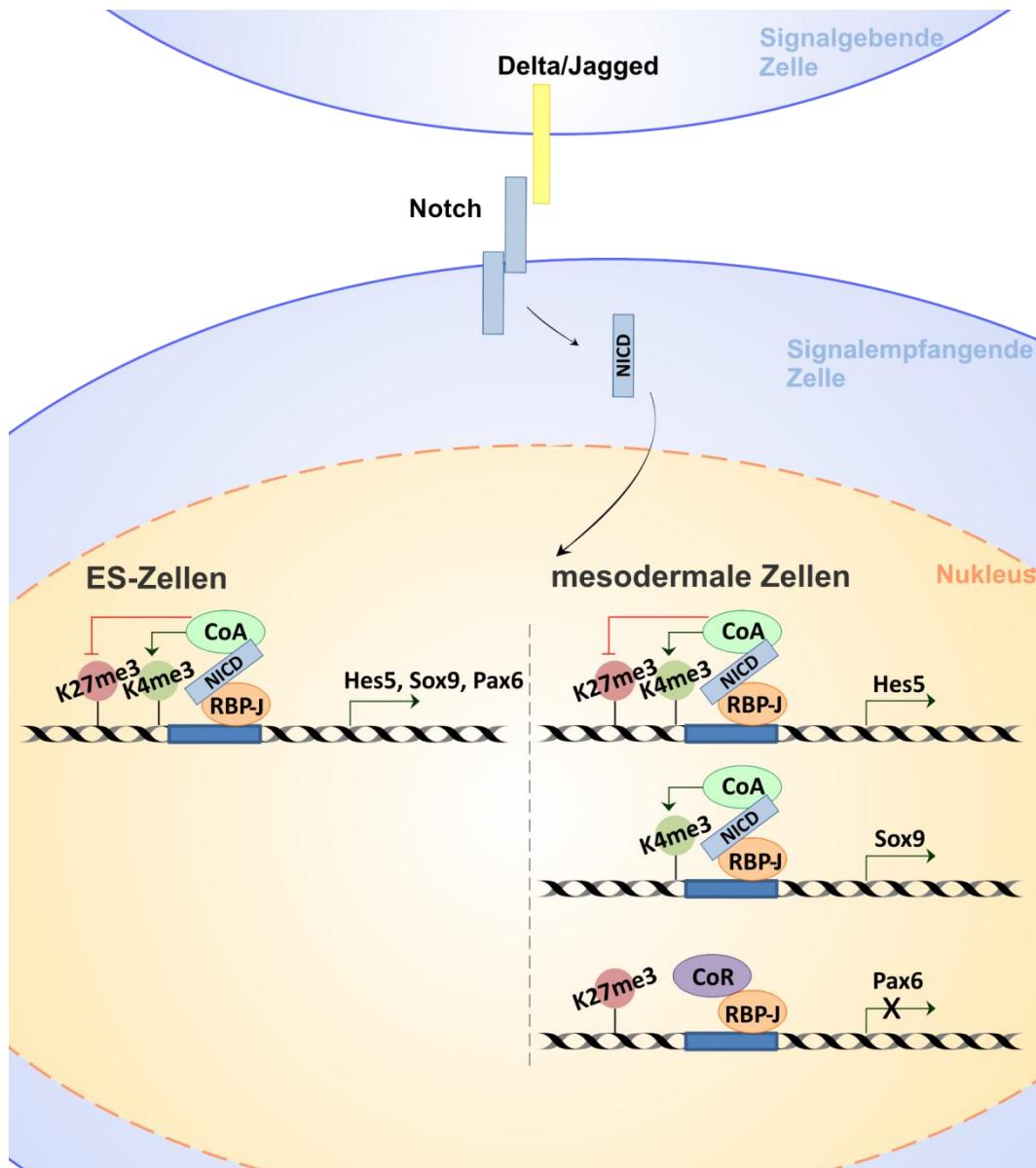


Abb. 5.1: Modell der zellkontextabhängigen Aktivierung von Notch1-Zielgenen

Durch die Bindung des Liganden (Delta oder Jagged) auf der benachbarten Zelle kommt es zur proteolytischen Spaltung des Notch1-Rezeptors. Hierdurch wird die intrazelluläre Domäne von Notch1 (NICD) freigesetzt und transloziert in den Nucleus. In ES-Zellen tragen die zelltypdeterminierenden Transkriptionsfaktoren bivalente Domänen. NICD rekrutiert Co-Aktivatoren (CoA), die dafür sorgen, dass die bivalente Domäne zugunsten der aktivierenden H3K4me3 Modifikation aufgelöst werden, was zur Aktivierung der Expression der Zielgene führt. In differenzierten Zellen sind die durch Notch1 induzierbaren Gene durch die Anwesenheit von H3K4me3 gekennzeichnet. Die Bindung von NICD an RBP-J und die Rekrutierung von Ko-Aktivatoren sorgt für die Anreicherung dieser aktivierenden Modifikation und so zur Aktivierung der Expression der Zielgene. An Genen, die keine H3K4me3 Modifikation tragen, werden die Co-Repressoren (CoR) durch NICD nicht verdrängt und die Expression wird nicht induziert.

6. Literaturverzeichnis

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., Edel, M., Boue, S., and Izpisua Belmonte, J.C. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26, 1276-1284.
- Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhata, R., Shilatifard, A., Workman, J., and Zhang, Y. (2007). New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 131, 633-636.
- Ariyoshi, M., and Schwabe, J.W. (2003). A conserved structural motif reveals the essential transcriptional repression function of Spen proteins and their role in developmental signaling. *Genes Dev* 17, 1909-1920.
- Arnold, H.H., and Braun, T. (2000). Genetics of muscle determination and development. *Curr Top Dev Biol* 48, 129-164.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776.
- Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jorgensen, H.F., John, R.M., Gouti, M., Casanova, M., Warnes, G., Merckenschlager, M., and Fisher, A.G. (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol* 8, 532-538.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2005). Reversing histone methylation. *Nature* 436, 1103-1106.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21, 381-395.
- Bedford, M.T., and Clarke, S.G. (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* 33, 1-13.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S.L., and Lander, E.S. (2006). A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell* 125, 315-326.
- Bernstein, B.E., and Schreiber, S.L. (2002). Global approaches to chromatin. *Chem Biol* 9, 1167-1173.
- Blank, V., Kourilsky, P., and Israel, A. (1992). NF-kappa B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends Biochem Sci* 17, 135-140.
- Bolos, V., Grego-Bessa, J., and de la Pompa, J.L. (2007). Notch signaling in development and cancer. *Endocr Rev* 28, 339-363.
- Borggreffe, T., and Liefke, R. (2012). Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway. *Cell Cycle* 11.
- Borggreffe, T., and Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci* 66, 1631-1646.
- Bray, S., and Bernard, F. (2010). Notch targets and their regulation. *Curr Top Dev Biol* 92, 253-275.
- Bray, S., Musisi, H., and Bienz, M. (2005). Bre1 is required for Notch signaling and histone modification. *Dev Cell* 8, 279-286.
- Bray, S.J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 678-689.
- Brooker, R., Hozumi, K., and Lewis, J. (2006). Notch ligands with contrasting functions: Jagged1 and Delta1 in the mouse inner ear. *Development* 133, 1277-1286.
- Burns, C.E., Traver, D., Mayhall, E., Shepard, J.L., and Zon, L.I. (2005). Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. *Genes Dev* 19, 2331-2342.

- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298, 1039-1043.
- Cau, E., and Blader, P. (2009). Notch activity in the nervous system: to switch or not switch? *Neural Dev* 4, 36.
- Chastagner, P., Israel, A., and Brou, C. (2008). AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. *PLoS One* 3, e2735.
- Chi, N., and Epstein, J.A. (2002). Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet* 18, 41-47.
- Christ, B., and Ordahl, C.P. (1995). Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl)* 191, 381-396.
- Cinquin, O. (2007). Understanding the somitogenesis clock: what's missing? *Mech Dev* 124, 501-517.
- Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 78, 273-304.
- Creyghton, M.P., Cheng, A.W., Welstead, G.G., Kooistra, T., Carey, B.W., Steine, E.J., Hanna, J., Lodato, M.A., Frampton, G.M., Sharp, P.A., Boyer, L.A., Young, R.A., and Jaenisch, R. (2010). Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 21931-21936.
- Creyghton, M.P., Markoulaki, S., Levine, S.S., Hanna, J., Lodato, M.A., Sha, K., Young, R.A., Jaenisch, R., and Boyer, L.A. (2008). H2AZ is enriched at polycomb complex target genes in ES cells and is necessary for lineage commitment. *Cell* 135, 649-661.
- Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25, 1010-1022.
- Demehri, S., Liu, Z., Lee, J., Lin, M.H., Crosby, S.D., Roberts, C.J., Grigsby, P.W., Miner, J.H., Farr, A.G., and Kopan, R. (2008). Notch-deficient skin induces a lethal systemic B-lymphoproliferative disorder by secreting TSLP, a sentinel for epidermal integrity. *PLoS Biol* 6, e123.
- Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., and Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells* 26, 2467-2474.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Ferres-Marco, D., Gutierrez-Garcia, I., Vallejo, D.M., Bolivar, J., Gutierrez-Avino, F.J., and Dominguez, M. (2006). Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature* 439, 430-436.
- Fryer, C.J., White, J.B., and Jones, K.A. (2004). Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell* 16, 509-520.
- Fujikura, J., Hosoda, K., Iwakura, H., Tomita, T., Noguchi, M., Masuzaki, H., Tanigaki, K., Yabe, D., Honjo, T., and Nakao, K. (2006). Notch/Rbp-j signaling prevents premature endocrine and ductal cell differentiation in the pancreas. *Cell Metab* 3, 59-65.
- Ghai, V., and Gaudet, J. (2008). The CSL transcription factor LAG-1 directly represses hih-6 expression in *C. elegans*. *Dev Biol* 322, 334-344.
- Gupta-Rossi, N., Le Bail, O., Gonen, H., Brou, C., Logeat, F., Six, E., Ciechanover, A., and Israel, A. (2001). Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. *J Biol Chem* 276, 34371-34378.
- Haller, R., Schwanbeck, R., Martini, S., Bernoth, K., Kramer, J., Just, U., and Rohwedel, J. (2012). Notch1 signaling regulates chondrogenic lineage determination through Sox9 activation. *Cell Death Differ* 19, 461-469.

- Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, M.P., Steine, E.J., Cassady, J.P., Foreman, R., Lengner, C.J., Dausman, J.A., and Jaenisch, R. (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133, 250-264.
- Hardingham, T.E., Oldershaw, R.A., and Tew, S.R. (2006). Cartilage, SOX9 and Notch signals in chondrogenesis. *J Anat* 209, 469-480.
- Heintzman, N.D., Hon, G.C., Hawkins, R.D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L.F., Ye, Z., Lee, L.K., Stuart, R.K., Ching, C.W., Ching, K.A., Antosiewicz-Bourget, J.E., Liu, H., Zhang, X., Green, R.D., Lobanenko, V.V., Stewart, R., Thomson, J.A., Crawford, G.E., Kellis, M., and Ren, B. (2009). Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 459, 108-112.
- Heitzler, P., and Simpson, P. (1991). The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64, 1083-1092.
- Henning, K., Schroeder, T., Schwanbeck, R., Rieber, N., Bresnick, E.H., and Just, U. (2007). mNotch1 signaling and erythropoietin cooperate in erythroid differentiation of multipotent progenitor cells and upregulate beta-globin. *Exp Hematol* 35, 1321-1332.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., and Monk, M. (1987). HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326, 292-295.
- Hsieh, J.J., Zhou, S., Chen, L., Young, D.B., and Hayward, S.D. (1999). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 23-28.
- Ichimura, A., Ruike, Y., Terasawa, K., and Tsujimoto, G. (2011). miRNAs and regulation of cell signaling. *FEBS J* 278, 1610-1618.
- Iso, T., Kedes, L., and Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 194, 237-255.
- Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl, 245-254.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R., and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377, 355-358.
- Jehn, B.M., Dittert, I., Beyer, S., von der Mark, K., and Bielke, W. (2002). c-Cbl binding and ubiquitin-dependent lysosomal degradation of membrane-associated Notch1. *J Biol Chem* 277, 8033-8040.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Jones, P.A., and Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293, 1068-1070.
- Just, U., Boettiger, D., Kan, O., Dexter, T.M., and Spooner, E. (2000). Insertional mutagenesis as a route to identifying genes involved in self renewal of haemopoietic stem cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 251, 27-34.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H., and Imayoshi, I. (2009). Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells. *Curr Opin Cell Biol* 21, 733-740.
- Kanai, Y., and Koopman, P. (1999). Structural and functional characterization of the mouse Sox9 promoter: implications for campomelic dysplasia. *Hum Mol Genet* 8, 691-696.
- Kao, H.Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C.R., Evans, R.M., and Kadesch, T. (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* 12, 2269-2277.
- Kato, H., Taniguchi, Y., Kurooka, H., Minoguchi, S., Sakai, T., Nomura-Okazaki, S., Tamura, K., and Honjo, T. (1997). Involvement of RBP-J in biological functions of mouse Notch1 and its derivatives. *Development* 124, 4133-4141.

- Kato, N., and Aoyama, H. (1998). Dermomyotomal origin of the ribs as revealed by extirpation and transplantation experiments in chick and quail embryos. *Development* *125*, 3437-3443.
- Kitagawa, M., Oyama, T., Kawashima, T., Yedvobnick, B., Kumar, A., Matsuno, K., and Harigaya, K. (2001). A human protein with sequence similarity to *Drosophila* mastermind coordinates the nuclear form of notch and a CSL protein to build a transcriptional activator complex on target promoters. *Mol Cell Biol* *21*, 4337-4346.
- Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* *31*, 89-97.
- Koelzer, S., and Klein, T. (2006). Regulation of expression of Vg and establishment of the dorsoventral compartment boundary in the wing imaginal disc by Suppressor of Hairless. *Dev Biol* *289*, 77-90.
- Kopan, R., and Ilagan, M.X. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* *137*, 216-233.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* *128*, 693-705.
- Kovall, R.A., and Blacklow, S.C. (2010). Mechanistic insights into Notch receptor signaling from structural and biochemical studies. *Curr Top Dev Biol* *92*, 31-71.
- Krejci, A., Bernard, F., Housden, B.E., Collins, S., and Bray, S.J. (2009). Direct response to Notch activation: signaling crosstalk and incoherent logic. *Sci Signal* *2*, ra1.
- Krejci, A., and Bray, S. (2007). Notch activation stimulates transient and selective binding of Su(H)/CSL to target enhancers. *Genes Dev* *21*, 1322-1327.
- Ku, M., Koche, R.P., Rheinbay, E., Mendenhall, E.M., Endoh, M., Mikkelsen, T.S., Presser, A., Nusbaum, C., Xie, X., Chi, A.S., Adli, M., Kasif, S., Ptaszek, L.M., Cowan, C.A., Lander, E.S., Koseki, H., and Bernstein, B.E. (2008). Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet* *4*, e1000242.
- Kuroda, K., Han, H., Tani, S., Tanigaki, K., Tun, T., Furukawa, T., Taniguchi, Y., Kurooka, H., Hamada, Y., Toyokuni, S., and Honjo, T. (2003). Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity* *18*, 301-312.
- Kuroda, K., Tani, S., Tamura, K., Minoguchi, S., Kurooka, H., and Honjo, T. (1999). Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. *J Biol Chem* *274*, 7238-7244.
- Kurokawa, M. (2006). AML1/Runx1 as a versatile regulator of hematopoiesis: regulation of its function and a role in adult hematopoiesis. *Int J Hematol* *84*, 136-142.
- Kurooka, H., and Honjo, T. (2000). Functional interaction between the mouse notch1 intracellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5. *J Biol Chem* *275*, 17211-17220.
- Kurooka, H., Kuroda, K., and Honjo, T. (1998). Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region. *Nucleic Acids Res* *26*, 5448-5455.
- Lai, E.C. (2002). Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Rep* *3*, 840-845.
- Lai, E.C. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* *131*, 965-973.
- Lai, E.C., Tam, B., and Rubin, G.M. (2005). Pervasive regulation of *Drosophila* Notch target genes by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class microRNAs. *Genes Dev* *19*, 1067-1080.
- Lan, F., and Shi, Y. (2009). Epigenetic regulation: methylation of histone and non-histone proteins. *Sci China C Life Sci* *52*, 311-322.
- Le Gall, M., and Giniger, E. (2004). Identification of two binding regions for the suppressor of hairless protein within the intracellular domain of *Drosophila* notch. *J Biol Chem* *279*, 29418-29426.

- Lewis, S.L., and Tam, P.P. (2006). Definitive endoderm of the mouse embryo: formation, cell fates, and morphogenetic function. *Dev Dyn* 235, 2315-2329.
- Li, Y., Hibbs, M.A., Gard, A.L., Shylo, N.A., and Yun, K. (2012). Genome-wide analysis of N1ICD/RBPJ targets in vivo reveals direct transcriptional regulation of Wnt, SHH, and hippo pathway effectors by Notch1. *Stem Cells* 30, 741-752.
- Liefke, R., Oswald, F., Alvarado, C., Ferres-Marco, D., Mittler, G., Rodriguez, P., Dominguez, M., and Borggrefe, T. (2010). Histone demethylase KDM5A is an integral part of the core Notch-RBP-J repressor complex. *Genes Dev* 24, 590-601.
- Lindl, T. (2002). Zell- und Gewebekultur : Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Spektrum, Akad. Verl.: Heidelberg {[u.a.]}
- Lowell, S., Benchoua, A., Heavey, B., and Smith, A.G. (2006). Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biol* 4, e121.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., Plath, K., and Hochedlinger, K. (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1, 55-70.
- Maillard, I., Weng, A.P., Carpenter, A.C., Rodriguez, C.G., Sai, H., Xu, L., Allman, D., Aster, J.C., and Pear, W.S. (2004). Mastermind critically regulates Notch-mediated lymphoid cell fate decisions. *Blood* 104, 1696-1702.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.
- Martini, S., Main, H., Lendahl, U., Bernoth, K., Just, U., and Schwanbeck, R. (2012). A critical role for Sox9 in Notch-induced gliogenesis. in revision.
- McGill, M.A., and McGlade, C.J. (2003). Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem* 278, 23196-23203.
- Meier-Stiegen, F., Schwanbeck, R., Bernoth, K., Martini, S., Hieronymus, T., Ruau, D., Zenke, M., and Just, U. (2010). Activated Notch1 target genes during embryonic cell differentiation depend on the cellular context and include lineage determinants and inhibitors. *PLoS One* 5, e11481.
- Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454, 49-55.
- Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.K., Koche, R.P., Lee, W., Mendenhall, E., O'Donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., Nusbaum, C., Lander, E.S., and Bernstein, B.E. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448, 553-560.
- Mohr, O.L. (1919). Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics* 4, 275-282.
- Morel, V., Lecourtois, M., Massiani, O., Maier, D., Preiss, A., and Schweisguth, F. (2001). Transcriptional repression by suppressor of hairless involves the binding of a hairless-dCtBP complex in *Drosophila*. *Curr Biol* 11, 789-792.
- Moshkin, Y.M., Kan, T.W., Goodfellow, H., Bezstarosti, K., Maeda, R.K., Pilyugin, M., Karch, F., Bray, S.J., Demmers, J.A., and Verrijzer, C.P. (2009). Histone chaperones ASF1 and NAP1 differentially modulate removal of active histone marks by LID-RPD3 complexes during NOTCH silencing. *Mol Cell* 35, 782-793.
- Mukherjee, A., Veraksa, A., Bauer, A., Rosse, C., Camonis, J., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Regulation of Notch signalling by non-visual beta-arrestin. *Nat Cell Biol* 7, 1191-1201.

- Mulligan, P., Yang, F., Di Stefano, L., Ji, J.Y., Ouyang, J., Nishikawa, J.L., Toiber, D., Kulkarni, M., Wang, Q., Najafi-Shoushtari, S.H., Mostoslavsky, R., Gygi, S.P., Gill, G., Dyson, N.J., and Naar, A.M. (2011). A SIRT1-LSD1 corepressor complex regulates Notch target gene expression and development. *Mol Cell* 42, 689-699.
- Muto, A., Iida, A., Satoh, S., and Watanabe, S. (2009). The group E Sox genes Sox8 and Sox9 are regulated by Notch signaling and are required for Muller glial cell development in mouse retina. *Exp Eye Res* 89, 549-558.
- Nakagawa, M., Ichikawa, M., Kumano, K., Goyama, S., Kawazu, M., Asai, T., Ogawa, S., Kurokawa, M., and Chiba, S. (2006). AML1/Runx1 rescues Notch1-null mutation-induced deficiency of para-aortic splanchnopleural hematopoiesis. *Blood* 108, 3329-3334.
- Nam, Y., Sliz, P., Pear, W.S., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2007). Cooperative assembly of higher-order Notch complexes functions as a switch to induce transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2103-2108.
- Nellesen, D.T., Lai, E.C., and Posakony, J.W. (1999). Discrete enhancer elements mediate selective responsiveness of enhancer of split complex genes to common transcriptional activators. *Dev Biol* 213, 33-53.
- Neves, A., English, K., and Priess, J.R. (2007). Notch-GATA synergy promotes endoderm-specific expression of ref-1 in *C. elegans*. *Development* 134, 4459-4468.
- Ng, S.S., Yue, W.W., Oppermann, U., and Klose, R.J. (2009). Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell Mol Life Sci* 66, 407-422.
- Nishikawa, S., Jakt, L.M., and Era, T. (2007). Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 502-507.
- Nishikawa, S.I., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N., and Kodama, H. (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, 1747-1757.
- Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development* 134, 635-646.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 12, 2048-2060.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-376.
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., and Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123, 917-929.
- Ntziachristos, P., Tsirigos, A., Van Vlierberghe, P., Nedjic, J., Trimarchi, T., Flaherty, M.S., Ferres-Marco, D., da Ros, V., Tang, Z., Siegle, J., Asp, P., Hadler, M., Rigo, I., De Keersmaecker, K., Patel, J., Huynh, T., Utro, F., Poglio, S., Samon, J.B., Paietta, E., Racevskis, J., Rowe, J.M., Rabadan, R., Levine, R.L., Brown, S., Pflumio, F., Dominguez, M., Ferrando, A., and Aifantis, I. (2012). Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 18, 298-301.
- Oberg, C., Li, J., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M., and Lendahl, U. (2001). The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol Chem* 276, 35847-35853.
- Oka, C., Nakano, T., Wakeham, A., de la Pompa, J.L., Mori, C., Sakai, T., Okazaki, S., Kawaichi, M., Shiota, K., Mak, T.W., and Honjo, T. (1995). Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development* 121, 3291-3301.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257.

- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* *448*, 313-317.
- Olivera-Martinez, I., Thelu, J., and Dhouailly, D. (2004). Molecular mechanisms controlling dorsal dermis generation from the somitic dermomyotome. *Int J Dev Biol* *48*, 93-101.
- Ong, C.T., Cheng, H.T., Chang, L.W., Ohtsuka, T., Kageyama, R., Stormo, G.D., and Kopan, R. (2006). Target selectivity of vertebrate notch proteins. Collaboration between discrete domains and CSL-binding site architecture determines activation probability. *J Biol Chem* *281*, 5106-5119.
- Ong, C.T., Sedy, J.R., Murphy, K.M., and Kopan, R. (2008). Notch and presenilin regulate cellular expansion and cytokine secretion but cannot instruct Th1/Th2 fate acquisition. *PLoS One* *3*, e2823.
- Onuma, Y., Takahashi, S., Asashima, M., Kurata, S., and Gehring, W.J. (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*, 2020-2025.
- Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K., and Maekawa, M. (2008). Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells* *26*, 1663-1672.
- Oswald, F., Kostezka, U., Astrahantseff, K., Bourteele, S., Dillinger, K., Zechner, U., Ludwig, L., Wilda, M., Hameister, H., Knochel, W., Liptay, S., and Schmid, R.M. (2002). SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. *EMBO J* *21*, 5417-5426.
- Oswald, F., Tauber, B., Dobner, T., Bourteele, S., Kostezka, U., Adler, G., Liptay, S., and Schmid, R.M. (2001). p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Mol Cell Biol* *21*, 7761-7774.
- Oswald, F., Winkler, M., Cao, Y., Astrahantseff, K., Bourteele, S., Knochel, W., and Borggreffe, T. (2005). RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes. *Mol Cell Biol* *25*, 10379-10390.
- Parks, A.L., Huppert, S.S., and Muskavitch, M.A. (1997). The dynamics of neurogenic signalling underlying bristle development in *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev* *63*, 61-74.
- Radtke, F., Schweisguth, F., and Pear, W. (2005). The Notch 'gospel'. *EMBO Rep* *6*, 1120-1125.
- Rampal, R., Arboleda-Velasquez, J.F., Nita-Lazar, A., Kosik, K.S., and Haltiwanger, R.S. (2005). Highly conserved O-fucose sites have distinct effects on Notch1 function. *J Biol Chem* *280*, 32133-32140.
- Rechsteiner, M. (1988). Regulation of enzyme levels by proteolysis: the role of pest regions. *Adv Enzyme Regul* *27*, 135-151.
- Roca, C., and Adams, R.H. (2007). Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev* *21*, 2511-2524.
- Salat, D., Liefke, R., Wiedenmann, J., Borggreffe, T., and Oswald, F. (2008). ETO, but not leukemogenic fusion protein AML1/ETO, augments RBP-Jkappa/SHARP-mediated repression of notch target genes. *Mol Cell Biol* *28*, 3502-3512.
- Schroeder, T., Fraser, S.T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Oka, C., Bornkamm, G.W., Honjo, T., and Just, U. (2003a). Recombination signal sequence-binding protein Jkappa alters mesodermal cell fate decisions by suppressing cardiomyogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 4018-4023.
- Schroeder, T., and Just, U. (2000). Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. *EMBO J* *19*, 2558-2568.
- Schroeder, T., Kohlhof, H., Rieber, N., and Just, U. (2003b). Notch signaling induces multilineage myeloid differentiation and up-regulates PU.1 expression. *J Immunol* *170*, 5538-5548.

- Schroeder, T., Meier-Stiegen, F., Schwanbeck, R., Eilken, H., Nishikawa, S., Hasler, R., Schreiber, S., Bornkamm, G.W., and Just, U. (2006). Activated Notch1 alters differentiation of embryonic stem cells into mesodermal cell lineages at multiple stages of development. *Mech Dev* 123, 570-579.
- Schwanbeck, R., Martini, S., Bernoth, K., and Just, U. (2011). The Notch signaling pathway: molecular basis of cell context dependency. *Eur J Cell Biol* 90, 572-581.
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W.L., Fischer, K.D., Schuh, A.C., Schwartz, L., Bernstein, A., and Rossant, J. (1997). A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89, 981-990.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.
- Shaye, D.D., and Greenwald, I. (2005). LIN-12/Notch trafficking and regulation of DSL ligand activity during vulval induction in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 132, 5081-5092.
- Shen, M.M. (2007). Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* 134, 1023-1034.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., and Casero, R.A. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R., and Peterson, C.L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311, 844-847.
- Sponcer, E., Heyworth, C.M., Dunn, A., and Dexter, T.M. (1986). Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Differentiation* 31, 111-118.
- Stadtfield, M., Brennand, K., and Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol* 18, 890-894.
- Stahl, M., Uemura, K., Ge, C., Shi, S., Tashima, Y., and Stanley, P. (2008). Roles of Pofut1 and O-fucose in mammalian Notch signaling. *J Biol Chem* 283, 13638-13651.
- Stalsberg, H., and DeHaan, R.L. (1969). The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev Biol* 19, 128-159.
- Stanley, P. (2007). Regulation of Notch signaling by glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* 17, 530-535.
- Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 435-459.
- Steventon, B., Carmona-Fontaine, C., and Mayor, R. (2005). Genetic network during neural crest induction: from cell specification to cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 16, 647-654.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Strobl, L.J., Hofelmayr, H., Stein, C., Marschall, G., Brielmeier, M., Laux, G., Bornkamm, G.W., and Zimmer-Strobl, U. (1997). Both Epstein-Barr viral nuclear antigen 2 (EBNA2) and activated Notch1 transactivate genes by interacting with the cellular protein RBP-J kappa. *Immunobiology* 198, 299-306.
- Suganuma, T., and Workman, J.L. (2011). Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annu Rev Biochem* 80, 473-499.
- Surani, M.A., Hayashi, K., and Hajkova, P. (2007). Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 128, 747-762.
- Suter, D.M., and Krause, K.H. (2008). Neural commitment of embryonic stem cells: molecules, pathways and potential for cell therapy. *J Pathol* 215, 355-368.

- Suter, D.M., Tirefort, D., Julien, S., and Krause, K.H. (2009). A Sox1 to Pax6 switch drives neuroectoderm to radial glia progression during differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 27, 49-58.
- Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* 2, 3081-3089.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T., and Honjo, T. (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol* 5, 1416-1423.
- Tanigaki, K., and Honjo, T. (2010). Two opposing roles of RBP-J in Notch signaling. *Curr Top Dev Biol* 92, 231-252.
- Taylor, M.K., Yeager, K., and Morrison, S.J. (2007). Physiological Notch signaling promotes gliogenesis in the developing peripheral and central nervous systems. *Development* 134, 2435-2447.
- Thomson, J.P., Skene, P.J., Selfridge, J., Clouaire, T., Guy, J., Webb, S., Kerr, A.R., Deaton, A., Andrews, R., James, K.D., Turner, D.J., Illingworth, R., and Bird, A. (2010). CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature* 464, 1082-1086.
- Tsuji, M., Shinkura, R., Kuroda, K., Yabe, D., and Honjo, T. (2007). Msx2-interacting nuclear target protein (Mint) deficiency reveals negative regulation of early thymocyte differentiation by Notch/RBP-J signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1610-1615.
- Ustanina, S., Carvajal, J., Rigby, P., and Braun, T. (2007). The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification. *Stem Cells* 25, 2006-2016.
- Vakoc, C.R., Mandat, S.A., Olenchok, B.A., and Blobel, G.A. (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* 19, 381-391.
- VanderWielen, B.D., Yuan, Z., Friedmann, D.R., and Kovall, R.A. (2011). Transcriptional repression in the Notch pathway: thermodynamic characterization of CSL-MINT (Msx2-interacting nuclear target protein) complexes. *J Biol Chem* 286, 14892-14902.
- Vasyutina, E., Lenhard, D.C., and Birchmeier, C. (2007). Notch function in myogenesis. *Cell Cycle* 6, 1451-1454.
- Wallberg, A.E., Pedersen, K., Lendahl, U., and Roeder, R.G. (2002). p300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro. *Mol Cell Biol* 22, 7812-7819.
- Wang, H., Zou, J., Zhao, B., Johannsen, E., Ashworth, T., Wong, H., Pear, W.S., Schug, J., Blacklow, S.C., Arnett, K.L., Bernstein, B.E., Kieff, E., and Aster, J.C. (2011). Genome-wide analysis reveals conserved and divergent features of Notch1/RBPJ binding in human and murine T-lymphoblastic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14908-14913.
- Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Ahmad, A., Banerjee, S., and Sarkar, F.H. (2010). Cross-talk between miRNA and Notch signaling pathways in tumor development and progression. *Cancer Lett* 292, 141-148.
- Watanabe, N., Tezuka, Y., Matsuno, K., Miyatani, S., Morimura, N., Yasuda, M., Fujimaki, R., Kuroda, K., Hiraki, Y., Hozumi, N., and Tezuka, K. (2003). Suppression of differentiation and proliferation of early chondrogenic cells by Notch. *J Bone Miner Metab* 21, 344-352.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324.

- Wobus, A.M., Wallukat, G., and Hescheler, J. (1991). Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 48, 173-182.
- Wright, E., Hargrave, M.R., Christiansen, J., Cooper, L., Kun, J., Evans, T., Gangadharan, U., Greenfield, A., and Koopman, P. (1995). The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* 9, 15-20.
- Wu, G., Lyapina, S., Das, I., Li, J., Gurney, M., Pauley, A., Chui, I., Deshaies, R.J., and Kitajewski, J. (2001). SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Mol Cell Biol* 21, 7403-7415.
- Wu, L., Aster, J.C., Blacklow, S.C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S., and Griffin, J.D. (2000). MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet* 26, 484-489.
- Yang, X.J., and Seto, E. (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 26, 5310-5318.
- Yang, X.J., and Seto, E. (2008). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 206-218.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, II, and Thomson, J.A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- Zanotti, S., and Canalis, E. (2010). Notch and the skeleton. *Mol Cell Biol* 30, 886-896.
- Zhou, S., and Hayward, S.D. (2001). Nuclear localization of CBF1 is regulated by interactions with the SMRT corepressor complex. *Mol Cell Biol* 21, 6222-6232.
- Zong, Y., Panikkar, A., Xu, J., Antoniou, A., Raynaud, P., Lemaigre, F., and Stanger, B.Z. (2009). Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development* 136, 1727-1739.
- Zorn, A.M., and Wells, J.M. (2009). Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 221-251.

7. Publikationen

Teile der vorliegenden Doktorarbeit wurden in den folgenden Artikeln veröffentlicht:

Meier-Stiegen F, Schwanbeck R, Bernoth K, Martini S, Hieronymus T, Ruau D, Zenke M, Just U (2010) *Activated Notch1 target genes during embryonic cell differentiation depend on the cellular context and include lineage determinants and inhibitors*. PLoS One 5:e11481.

Schwanbeck R, Martini S, Bernoth K, Just U (2011) *The Notch signaling pathway: Molecular basis of cell context dependency*. Eur J Cell Biol 90:572-581.

Haller R, Schwanbeck R, Martini S, Bernoth K, Kramer J, Just U, Rohwedel J (2012) *Notch1 signaling regulates chondrogenic lineage determination through Sox9 activation*. Cell Death Differ 19:461-469.

8. Abkürzungsverzeichnis

BMP	Bone morphogenic protein
BS	Bindungsstelle
CBF1	C protein binding factor 1
CBP	CREB binding protein
Cdx2	caudal type homeobox 2
CoREST	Cofactor for RE1 silencing transcription factor
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CSL	C protein binding factor 1/ Suppressor of Hairless/Lag-1
CtBP	C-Terminal Binding Protein
CtIP	C-Terminal Binding Protein Interacting Protein
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNMT	DNA Methyltransferase
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FDCPmix	Factor dependent cell from Paterson institute with mixed differentiation potential
FGF	Fibroblast growth factor
Flk-1	Fetal liver kinase 1
GCN5	General Control nonderepressable 5
GNAT	Gcn5-related N-Acetyltransferase
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
Hes	Hairy/Enhancer of split
Hey	Hairy/Enhancer of split related with YRPW motif
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
Klf4	Krüppel-like factor 4
LIF	Leukemia inhibitory factor
MBP	Methyl-CpG-bindendes Protein
miRNA	microRNA
mRNA	messengerRNA
n.m.	nicht messbar
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NERT	Fusionsprotein von NICD und der Hormonbindungs domäne des humanen Östrogenrezeptors

NICD	Notch intrazelluläre Domäne
Oct4	Octamer binding transcription factor 4
OHT	4-Hydroxytamoxifen
Pax	Paired box gene
PCAF	p300/CBP assoziierter Faktor
PCR	Polymerase chain reaction
PEST	Prolin-Glutamin-Serin-Threonin-reich
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RBP-J	Recombination recognition sequence binding protein at the J κ site
Runx	Runt related transcription factor
SHARP/MINT	SMRT/HDAC1-associated repressor protein/Msx2 interacting nuclear target
siRNA	small interfering RNA
SMART	Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor
Sox	SRY-box containing gene
SWI/SNF	SWItch/Sucrose NonFermentable
T-ALL	T-Zell-Akut-Lymphatische-Leukämie
TGF	Transforming growth factor
Wnt	Wingless-related MMTV integration site

9. Lebenslauf

Name: Kristina Bernoth
Geburtsdatum: 19.10.1982 in Bad Segeberg
Geburtsort: Bad Segeberg
Nationalität: deutsch

Universitäre Ausbildung

Seit 01/2009 Anfertigung der vorliegenden Arbeit im Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. U. Just

07/2012 – 09/2012 Forschungsaufenthalt am zell- und molekularbiologischen Institut des Karolinska Instituts in Stockholm/Schweden

11/2008 Abschluss des Studiums mit dem Titel Diplom-Biologin

01/2008 – 11/2008 Anfertigung der Diplomarbeit im Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. U. Just

2002 – 2008 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Schulbildung

2002 Abitur

08/1999 – 06/2002 Gymnasium „Elly-Heuss-Knapp-Schule“ in Neumünster

08/1993 – 07/1999 Realschule „Realschule am Seminarweg“ in Bad Segeberg

10. Danksagung

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

Frau Prof. Dr. Ursula Just möchte ich ganz besonders sowohl für die Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit sowie für die hilfreichen fachlichen Ratschläge und Diskussionen danken.

Herrn Prof. Dr. T. Roeder danke ich für die Bereitschaft, das zweite Gutachten zu übernehmen.

Bei Herrn Dr. Ralf Schwanbeck bedanke ich mich für die große Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Hinweise und für das Korrigieren dieser Doktorarbeit.

Besonders möchte ich mich auch bei Katharina Macha, Melanie Boss und Silke Horn für die äußerst hilfreiche Unterstützung bei molekularbiologischen Experimenten bedanken.

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

Bei Dr. Robert Häsler, Dorina Oelsner und Tanja Wesse vom Institut für Klinische Molekularbiologie bedanke ich mich für die Möglichkeit der Nutzung des Real-Time PCR Gerätes.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die unentwegte Unterstützung sowohl während des Studiums als auch während der Dissertation.

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Kristina Bernoth, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Quellen und Hilfsmittel unter Anleitung meiner akademischen Lehrer und unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt habe.

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

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

Kiel,

Kristina Bernoth