

Aus dem Pathologischen Institut der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

**Biochemische Charakterisierung der humanen Notch 1 und Notch 3 Rezeptoren  
und Analyse der Expression des humanen Notch 1 Rezeptors auf Zell-Linien und  
histologischen Präparaten**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Martina Schüller  
aus Starnberg  
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dr. h.c. R. Huss

Mitberichterstatter: Prof. Dr. B. Emmerich

Prof. Dr. R. Rupp

Prof. Dr. M. Götz

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. B. Ehring

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2006

**Meinen Eltern**





## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Der Notch Signaltransduktionsweg .....	1
1.2	Notch-Funktionen .....	3
1.2.1	Laterale Hemmung/Spezifikation .....	3
1.2.2	Induktion.....	4
1.3	Struktur des Notch Rezeptors .....	5
1.3.1	Die extrazelluläre Notch Domäne N(EZ) .....	6
1.3.2	Die Notch Transmembran Untereinheit N(TM).....	7
1.4	Liganden des Notch Rezeptors .....	8
1.5	Die Notch Signaltransduktion .....	10
1.5.1	Prozessierung des Notch Rezeptors nach Ligandenbindung.....	10
1.5.2	Signaltransduktion innerhalb der Zelle .....	12
1.5.3	Zielgene .....	13
1.6	Modulatoren des Notch Signalweges .....	13
1.6.1	Fringe .....	14
1.6.2	Numb .....	14
1.6.3	Deltex.....	15
1.6.4	Posttranslationale Regulation durch Ubiquitinierung.....	15
1.7	Der Notch Signalweg und Krankheiten.....	16
1.7.1	Mit Notch Rezeptoren assoziierte Erkrankungen .....	16
1.7.1.1	Assoziiert mit Notch 1 .....	17
1.7.1.2	Assoziiert mit Notch 2 .....	17
1.7.1.3	Assoziiert mit Notch 3 .....	18
1.7.1.4	Assoziiert mit Notch 4 .....	18
1.7.2	Mit Notch Liganden assoziierte Erkrankungen .....	19
1.7.2.1	Jagged 1 .....	19
1.7.2.2	Delta-like 3 .....	19
1.7.3	Notch und Tumorentstehung.....	20
1.8	Zielsetzung der Arbeit .....	21

---

<b>2</b>	<b>Material</b> .....	<b>23</b>
2.1	Chemikalien und Reagenzien .....	23
2.2	Enzyme .....	24
2.3	Antikörper.....	24
2.4	Reagenzien für die Immunhistochemie .....	25
2.5	Geräte .....	26
2.6	Bakterienstämme und Medien.....	26
2.7	Plasmide, DNS und Nukleotide .....	27
2.8	Eukaryontische Zellen und Medien .....	28
2.9	RT- und PCR-Primer .....	29
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>30</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden .....	30
3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien.....	30
3.1.1.1	Mini-Präparation.....	30
3.1.1.2	Isolierung von Plasmid-DNS mit dem Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit von BIO-RAD .....	30
3.1.1.3	Isolierung mit Qiagen Plasmid Mini und Midi Kit .....	31
3.1.2	Isolierung von Gesamt-RNS.....	31
3.1.3	Herstellung kompetenter Bakterien zur Transformation .....	32
3.1.4	Transformation kompetenter Zellen .....	32
3.1.5	Aufbewahrung von <i>E.coli</i> als Glycerinkultur .....	33
3.1.6	Reinigung von PCR-Primern über Sephadex G-25.....	33
3.1.7	Reverse Transkription .....	34
3.1.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	34
3.1.9	DNS-Gelelektrophorese .....	35
3.1.10	Isolierung von DNS aus Agarosegelen .....	36
3.1.11	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration .....	36
3.1.12	Restriktionsverdau von DNS und Plasmiden.....	37
3.1.13	Dephosphorylierung von DNS mit alkalischer Phosphatase .....	37
3.1.14	DNS-Reinigung nach enzymatischen Reaktionen.....	37
3.1.15	Ligation von PCR-Fragmenten mit pGEM-T Vektoren .....	37

---

3.1.16	Ligation zur Klonierung in den Expressionsvektor pQE-60 .....	38
3.2	Proteinchemische Methoden .....	39
3.2.1	Expression des rekombinanten Proteins .....	39
3.2.2	Test auf Proteinexpression.....	39
3.2.3	Test der Löslichkeit des rekombinanten Proteins.....	39
3.2.4	Protein-Reinigung .....	40
3.2.5	Präparation der „inclusion bodies“ nach Maniatis.....	41
3.2.5.1	Zell-Lyse .....	41
3.2.5.2	Präparation Methode A .....	42
3.2.5.3	Präparation Methode B .....	42
3.2.6	Dialyse von proteinhaltigen Lösungen .....	42
3.2.7	Zell-Lyse-Puffer für Western-Blot .....	43
3.2.8	TCA-Triton-Fällung von Proteinen aus wässrigen Lösungen .....	43
3.2.9	Protein-Bestimmung.....	44
3.2.10	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	44
3.2.11	Färbung von Proteingelen.....	45
3.2.11.1	Coomassie-Färbung.....	45
3.2.11.2	Kolloidale Coomassie-Färbung .....	46
3.2.12	Proteintransfer von Gelen auf Membranen (Blotten).....	46
3.2.12.1	Semidry-Blot .....	46
3.2.12.2	Tank-Blot.....	46
3.2.13	Anfärbung von Proteinen auf Nitrozellulose mit Ponceau-S.....	47
3.2.14	Inhibition der Proteinglykosylierung.....	47
3.2.15	Hemmung der Proteinsynthese mit Cycloheximid (CHX).....	47
3.2.16	Hemmung des Proteintransports mit Brefeldin A .....	48
3.3	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen .....	48
3.3.1	Auftauen und Einfrieren von Zellen .....	48
3.3.2	Ablösen adhärenter Zellen .....	48
3.3.2.1	Ablösen adhärenter Zellen mit Trypsin 0,25% .....	48
3.3.2.2	Ablösen adhärenter Zellen mit EDTA.....	49
3.3.3	Isolierung mononukleärer Zellen aus Blut über Dichtegradienten .....	49
3.3.4	Präparation von Zellen aus Knochenmark .....	49

---

3.3.5	Einfrieren von mononukleären Zellen.....	50
3.3.6	Transiente Transfektionen adhärenter Zellen.....	50
3.3.6.1	Calcium-Phosphat-Präzipitation.....	50
3.3.6.2	Transiente Transfektion von Säugerzellen mit Lipofectamin.....	51
3.3.7	$\beta$ -Galactosidase Färbung CMV-lacZ transfizierter Zellen.....	51
3.4	Immunologische Methoden .....	52
3.4.1	Immunomagnetische Anreicherung von CD34 <sup>+</sup> Zellen.....	52
3.4.2	Antikörper-Markierung von Zellen zum Sorten und zur FACS-Analyse.....	52
3.4.3	Immuno-Färbung von geblotteten Proteinen (Western Blot) .....	53
3.4.3.1	Colorimetrische Detektion.....	54
3.4.3.2	Chemilumineszenz.....	54
3.4.4	Wiederverwendung von Immunoblots.....	54
3.4.5	Immunhistologie .....	55
3.4.5.1	Einbetten und Schneiden (Paraffinschnitt-Technik) .....	55
3.4.5.2	Entparaffinieren.....	56
3.4.5.3	Andauung.....	56
3.4.5.4	Inkubation mit primärem Antikörper .....	57
3.4.5.5	APAAP-Markierung .....	57
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
4.1	Klonierung eines 1581 bp-Fragments der extrazellulären Domäne des humanen Notch 1 Rezeptors zur rekombinanten Proteinexpression.....	59
4.1.1	Vorüberlegungen zur RT-PCR von Notch mRNA .....	59
4.1.2	Klonierung.....	62
4.2	Proteinexpression.....	64
4.2.1	Test auf Löslichkeit .....	66
4.2.2	Optimierung der Proteinreinigung .....	67
4.2.3	Präparation der „inclusion bodies“ .....	68
4.2.4	Test der Antikörper .....	72
4.2.5	Neue Proteinreinigung .....	74
4.2.6	Test und Auswahl der anti-Notch extrazellulären Antikörper .....	76

---

4.2.6.1	Die Sensitivität bzw. Nachweisgrenze der Antikörper gegen die extrazelluläre Notch 1 Domäne ist deutlich niedriger als die eines Vergleich-Antikörpers (4B2) gegen die intrazelluläre Domäne.....	77
4.2.6.2	Einfluß der Western Blot Bedingungen (Lysepuffer/ Inkubationszeit/ Blotdauer) auf die Antigenerkennung .....	80
4.2.6.3	Hemmung der Glykosilierung von Notch 1 führt nicht zur besseren Erkennung durch die Antikörper im Western Blot.....	82
4.2.6.4	Die extrazellulären Antikörper binden nicht an natives Notch .....	84
4.3	Expression von Notch 1.....	85
4.3.1	Expression von Notch 1 auf Zell-Linien.....	86
4.3.1.1	Expression von Notch 1 auf T-Zell-Linien .....	86
4.3.1.2	Expression von Notch 1 auf B-Zell-Linien .....	87
4.3.1.3	Expression von Notch auf Zell-Linien der Myeloischen Reihe .....	87
4.3.1.4	Weitere Zell-Linien .....	88
4.3.2	Notch 1 Expression auf primären Zellen .....	88
4.4	Notch 3.....	90
4.4.1	Expression von Notch 3 .....	90
4.4.1.1	Notch 3 Expression auf T-Zell-Linien .....	91
4.4.1.2	Notch 3 Expression auf Zellen der myeloischen Reihe .....	91
4.4.1.3	Notch 3 Expression auf B-Zellen.....	92
4.4.1.4	Notch 3 Expression auf Stroma-Zell-Linien.....	93
4.4.1.5	In T-Zell-Linien werden Notch 1 und Notch 3 exprimiert .....	93
4.4.2	Charakterisierung der Notch 3 Prozessierung.....	94
4.4.2.1	Auch Notch 3 wird als „full-length“ Vorläuferprotein gebildet und anschließend prozessiert .....	94
4.4.2.2	Die S1 Spaltung von Notch 3 findet wie bei Notch 1 im Golgi-Apparat statt.....	95
4.5	Notch 1 Immunhistologische Färbungen auf normalem und Tumorgewebe.....	96
4.5.1	Etablierung der Methode.....	96
4.5.2	Notch 1 Färbung auf Paraffinschnitten von normalem- und Tumorgewebe .....	100

---

4.5.2.1	Im Karzinom der Haut ist im Gegensatz zur normalen Haut keine Notch1 Expression mehr nachweisbar .....	100
4.5.2.2	Notch 1 wird in einem tubulären Kolon-Adenom exprimiert .....	102
4.5.2.3	In normalem Zervixgewebe wird Notch 1 in der Membran von Schleimhautzellen exprimiert .....	103
4.5.2.4	Notch 1 Expression im Epithel von Blutgefäßen .....	104
4.5.2.5	In den Leydig Zwischenzellen des Hodens wird Notch 1 exprimiert .....	105
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>106</b>
5.1	Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des humanen Notch 1 Rezeptors .....	106
5.2	Expression von Notch1 und Notch 3 auf Zell-Linien und primären Zellen ...	108
5.3	Immunhistochemischer Nachweis der Notch 1 Expression in normalem und in Tumorgewebe .....	110
5.3.1	Etablierung der APAAP-Färbemethode .....	110
5.3.2	Notch 1 Expression in normalen Geweben und in Tumoren.....	111
5.3.2.1	Notch 1 Expression im Kolon .....	111
5.3.2.2	Notch 1 Expression in normalem Zervix-Gewebe .....	112
5.3.2.3	Notch 1 Expression in Blutgefäß-Endothel .....	113
5.3.2.4	Notch 1 Expression im Hoden .....	114
5.3.2.5	Notch 1 Expression im Karzinom der Haut.....	114
5.4	Mögliche Therapie-Ansätze .....	116
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>141</b>

**Abkürzungen**

$\lambda$	Wellenlänge
°C	Grad Celsius
$\mu$	micro
Ak	Antikörper
AMP	Ampicillin
AP	Auftragpuffer bzw. alkalische Phosphatase
As	Aminosäure/n
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum Albumin
c	centi
CD	Cluster of Differentiation
cDNS	zu RNS komplementäre DNS
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (hier:dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
DOC	Deoxycholat
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	englisch: enhanced Chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n) bzw. human

---

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalaktopyranosid
k	Kilo
KAN	Kanamycin
kb	Kilobasen
Da	Dalton
l	Liter
LB	Luria Broth
m	milli
$\mu$	micro
M	mol/l
mA	Milli-Ampère
mAb	monoklonaler Antikörper
min	Minute(n)
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
n	nano
NBT	Nitroblautetrazolium
NTA	englisch: nitrilo-tri-acetic acid
OD	optische Dichte
p	pico
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidiumjodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute



---

RT	Raumtemperatur bzw. reverse Transkription
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
Triton X-100	PEG(9-10) <i>p-t</i> -Octylphenol
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Unit
üN	über Nacht
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid



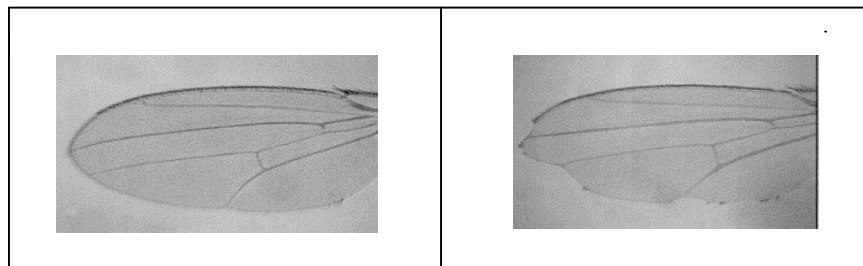
# 1 Einleitung

## 1.1 Der Notch Signaltransduktionsweg

Nach der Entschlüsselung des humanen Genoms ist bekannt, dass der Mensch über ca. 30.000 Gene verfügt, die für ein Vielfaches an Proteinen kodieren (Venter *et al.*, 2001; Lander *et al.*, 2001). Es ist offensichtlich, dass es zum Aufbau und Erhalt eines so komplexen vielzelligen Organismus, wie es der Mensch mit seinen ca. 60 Billionen Zellen mit 200 verschiedenen Typen ist, einer Reihe verschiedener fein aufeinander abgestimmter Signale bedarf. Ein Signalweg, der an zahlreichen Entwicklungsprozessen und Zellschicksalsentscheidungen bei einer Vielzahl von Zelltypen während unterschiedlicher Entwicklungsstadien beteiligt ist, ist der Notch Signalweg. Hier wurde eine Rolle bei so zentralen Mechanismen wie Apoptose, Proliferation, Differenzierung, Erhalt von Stammzellen und der Ausbildung von Gewebegrenzen (Übersicht von Simpson, 1998; Miele und Osborne, 1999) nachgewiesen, sowie eine Beteiligung z. B. an Myogenese, Neurogenese und Gliogenese (Lardelli *et al.*, 1996; Kuroda *et al.*, 1999; Tanigaki *et al.*, 2001) festgestellt.

Dabei fungiert der Notch-Rezeptor als membranständiger Transkriptionsfaktor, der nach Ligandenbindung durch zwei proteolytische Prozesse freigesetzt wird und in den Zellkern wandert, wo er mit Transkriptionsfaktoren interagiert und zur Transkription von Zielgenen führt.

Zum erstenmal wurde 1919 von O. L. Mohr das Gen Notch in der Frucht-Fliege *Drosophila melanogaster* beschrieben, bei der heterozygote Individuen mit nur einem funktionstüchtigen Allel (Haploinsuffizienz) verschiedene Entwicklungsstörungen aufweisen, z. B. Kerben (Kerbe= engl. notch) am Flügelrand (siehe Abb. 1).



**Abb. 1: *Drosophila* Phänotyp mit mutiertem Notch Gen**

*Drosophila* Flügel normal (links) und mit Kerben (notches) am Flügelrand (rechts); nach Allman *et al.*, 2002.

In *Drosophila* gibt es einen Notch Rezeptor und zwei Liganden: Delta und Serrate. Nach der Beschreibung des Notch Gens von *Drosophila* (Wharton *et al.*, 1985; Kidd *et al.*, 1986) wurden in Vertebraten bei Mensch und Maus vier verschiedene Notch Orthologe identifiziert (Ellisen *et al.*, 1991; Weinmaster *et al.*, 1991; Weinmaster *et al.*, 1992; Lardelli *et al.*, 1994; Uyttendaele *et al.*, 1996). Die Notch Rezeptor Familie sowie deren Liganden und Regulatoren sind in der Evolution stark konserviert (siehe Tab. 1) und werden in allen Metazoen gefunden. Notch Rezeptoren werden in Organen aller drei Keimblätter exprimiert.

Typisch für die Notch Signaltransduktion sind lokale Zell-Zell Interaktionen zwischen Rezeptor und Liganden benachbarter Zellen (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995; Simpson, 1997a; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Fortini, 2001). Dabei ist das exakte Zusammenspiel der verschiedenen Rezeptoren, Liganden und Modifikatoren miteinander noch ungeklärt.

Störungen im Notch Signaltransduktionsweg haben Entwicklungsstörungen, Erkrankungen und Onkogenese zur Folge.

<u>Konservierte Elemente des Notch Signalweges</u>		
	<u><i>Drosophila</i></u>	<u>Menschen/Mäuse</u>
Rezeptor	Notch	Notch 1-4
Liganden	Delta	Delta like (Dll) 1,3,4
	Serrate	Jagged 1,2
Transkriptionsfaktoren	Su(H)	CBF-1/ RBP-Jκ
Zielgene	E(spl)	Hairy/E(spl) HES 1,5,6, HERP

**Tab. 1: Komponenten des Notch Signalweges**

Wichtige konservierte Elemente des Notch Signalweges in *Drosophila* und Säugetieren

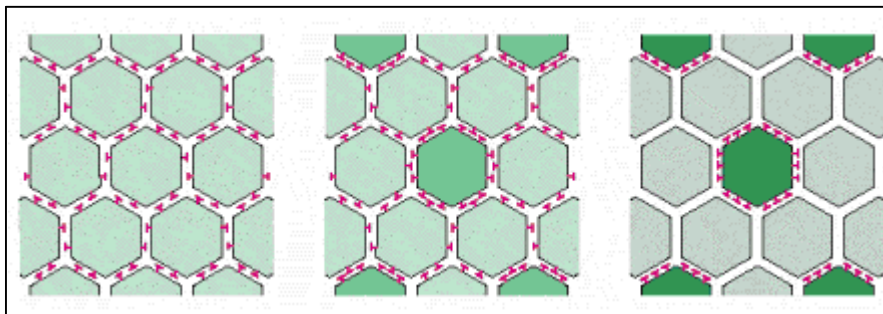
## 1.2 Notch-Funktionen

Die Notch Signalübertragung spielt sowohl bei Zell Schicksalsentscheidungen von äquivalenten benachbarten Vorläuferzellen eine Rolle (laterale Inhibition/ Spezifikation), als auch bei Zelltypen verschiedener Art (induktive Signalgebung) (Übersicht in Simpson, 1997b).

### 1.2.1 Laterale Hemmung/Spezifikation

Anfänglich gleichartige Vorläuferzellen exprimieren sowohl Notch Rezeptor als auch Liganden. Durch Verstärkung geringer stochastischer Mengen-Unterschiede in den Levels von Rezeptor oder Ligand durch negative Rückkopplung differenzieren diese ursprünglich gleichen Zelltypen zu zwei verschiedenen Populationen: einer mit viel Notch Rezeptoren und einer mit wenig Notch Rezeptoren (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999) (siehe Abb. 2). Untersuchungen an Fliegen und Würmern zeigten, dass dazu bereits die zweifache Menge an Notch Rezeptor oder Ligand ausreichend sein kann (Greenwald, 1998).

Das klassische Beispiel hierfür ist die Entwicklung von *Drosophila* Sinneszellen, die aus Vorläuferzellen entweder zu epithelialen Zellen (mit viel Notch Rezeptor) oder zu Sinneszellen Vorläuferzellen (mit wenig Notch Rezeptor) differenzieren.

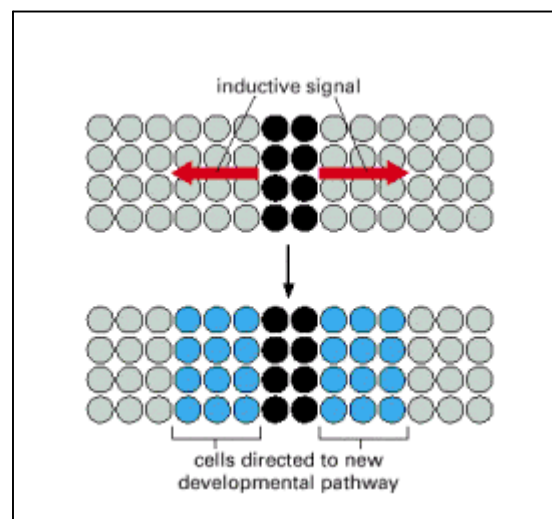


**Abb. 2: Laterale Hemmung (aus: Alberts *et al.*, 2002)**

Zu Beginn senden alle Zellen eines Verbandes in gleicher Weise hemmende Signale (rote Symbole) über den Notch Signaltransduktionsweg aus und unterbinden damit gegenseitig ihre Differenzierung. Sobald eine Zelle stärkere hemmende Signale an ihre Nachbarn sendet, werden diese daran gehindert, im Gegenzug auch weiterhin hemmende Signale zu senden. Diese Wirkung ist selbst verstärkend. Damit kann die eine Zelle aus der Gruppe eine bestimmte Differenzierung (dunkelgrün) einschlagen, während die anderen Zellen eine andere Entwicklung nehmen (graugrün).

### 1.2.2 Induktion

Beim induktiven Signalweg sind zwei verschiedene Zelltypen beteiligt, die entweder Rezeptor oder Ligand exprimieren. Die Rezeptor tragende Zelle reagiert auf die Stimulation durch den Liganden mit Auslösen einer Zell Schicksalsentscheidung, abhängig vom entsprechenden Liganden (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999) (siehe Abb. 3).



**Abb. 3: Induktion (aus: Alberts *et al.*, 2002)**

Ein bestimmter Teil einer Gruppe von Zellen, die initial den gleichen Entwicklungszustand aufweisen, empfängt von benachbarten Zellen ein induktives Signal und schlägt daraufhin eine andere Differenzierung ein. Dabei ist dieses Signal räumlich und zeitlich begrenzt, so dass nur ein Teil der Population den neuen Weg nimmt.

Der Notch Signalweg kann auch Zell-Zyklus, Apoptose und Proliferation (Berry *et al.*, 1997; Johnston und Edgar, 1998; Deftos *et al.*, 1998; Miller und Cagan, 1998; Jehn *et al.*, 1999) beeinflussen und ist an der Ausbildung bestimmter Gewebegrenzen beteiligt.

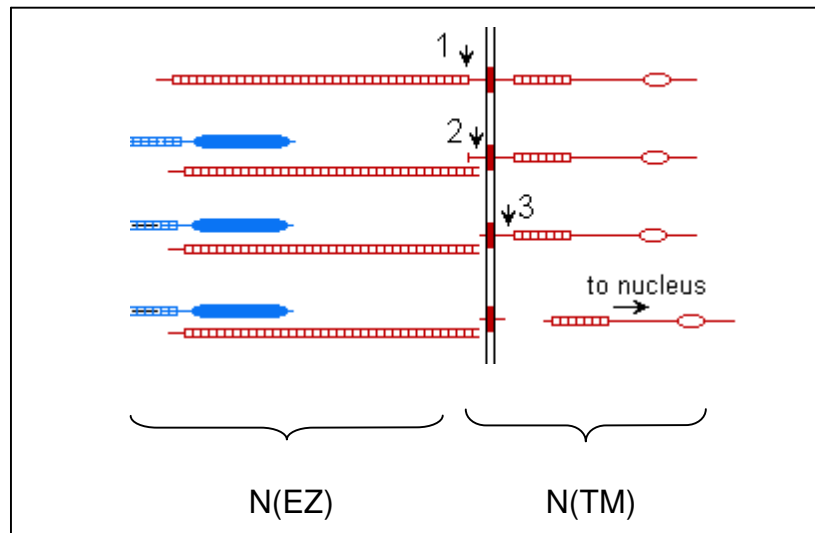
Da bei Säugetieren die Notch- Rezeptoren und Liganden in zahlreichen Geweben exprimiert werden, ist anzunehmen, dass bei der Entstehung von komplexen Organismen alle Mechanismen eine Rolle spielen. Die zahlreichen Wirkungen der

Notch Signalgebung hängen daher vermutlich vom jeweiligem Entwicklungszustand ab und beruhen auf zeitlichen und räumlichen Unterschieden der Expression verschiedener Rezeptor-Liganden Paarungen sowie auf unterschiedlicher Signalstärke.

### 1.3 Struktur des Notch Rezeptors

Das humane Notch 1 Protein besteht aus 2556 Aminosäuren (As) und hat ein Molekulargewicht von 272.550 Da. Es fungiert als Rezeptor für die ebenfalls membranständigen Liganden der Jagged- und Delta- Familie.

Notch Rezeptoren sind Typ 1 Transmembranproteine, das heißt, sie besitzen nur eine Transmembrandomäne und der N-Terminus liegt im extrazellulären Bereich. Das Protein wird im Endoplasmatischen Retikulum als 300 kDa Vorläuferprotein (p300) synthetisiert und im trans-Golgi Netzwerk an der sogenannten S1 Stelle durch eine Furin-ähnliche Konvertase ca. 70 As außerhalb der Transmembrandomäne proteolytisch gespalten (Logeat *et al.*, 1998) bevor es die Plasmamembran erreicht. Der Notch Rezeptor liegt also an der Zelloberfläche als Heterodimer vor, das sich aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne ECN (oder N(EZ)) von ca. 180 kDa (p180) und einem daran nicht-kovalent gebundenem C-terminalen Transmembranteil N(TM) von ca. 120 kDa (p120) zusammensetzt, welches aus dem intrazellulären Teil ICN (oder N(IZ)), einer Transmembrandomäne und einem kurzen extrazellulären Rest besteht (Blaumueller *et al.*, 1997) (siehe Abb. 4). Dieser heterodimäre Aufbau liegt möglicherweise nicht bei Notch Homologen in allen Spezies vor (Kidd und Lieber, 2002).



**Abb. 4: Aufbau der Notch-Rezeptoren**

Aufbau der Notch-Rezeptoren am Beispiel von humanem Notch 1 (aus [www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm736/devsig.htm](http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm736/devsig.htm))

Durch proteolytische Spaltung an der S1 Schnittstelle durch Furin entstehen 2 Untereinheiten, N(EZ) und N(TM), die außerhalb der Zellmembran nicht kovalent miteinander verbunden sind. S2 und S3 sind die Stellen, an denen nach Aktivierung durch Ligandenbindung proteolytische Spaltung stattfindet. Details dazu folgen in den kommenden Abschnitten.

### 1.3.1 Die extrazelluläre Notch Domäne N(EZ)

Die extrazelluläre Domäne der Notch Rezeptoren 1-4 besteht größtenteils aus einer unterschiedlichen Anzahl von „epidermal growth factor-like“ (EGF) ähnlichen Tandemwiederholungen (siehe Abb. 5). Notch 1 und 2 haben 36, Notch 3 hat 34 (Lardelli *et al.*, 1994) und Notch 4 hat 29 EGF Wiederholungen (Uyttendaele *et al.*, 1996; Gallahan und Callahan, 1997). Innerhalb dieser Abschnitte liegen die Ligandenbindungsstellen (Rebay *et al.*, 1991).

Zwischen den EGF Bereichen und der Transmembrandomäne befinden sich 3 LNR (Lin-12/Notch-repeats) Wiederholungen, welche eine von Liganden unabhängige Rezeptor Aktivierung unterdrücken sollen. Sie halten den Rezeptor in einer ruhenden Konformation vor der Liganden induzierten Aktivierung (Lieber *et al.*, 1993; Greenwald, 1994; Lyman und Young, 1993). Für die Aufrechterhaltung der Struktur dieser Abschnitte ist Calcium nötig (Aster *et al.*, 1999). Entfernung des Calciums durch 0.1% SDS oder Chelatoren wie EDTA führt zur Aktivierung des Rezeptors in Zell-Linien (Rand *et al.*, 2000).



### 1.3.2 Die Notch Transmembran Untereinheit N(TM)

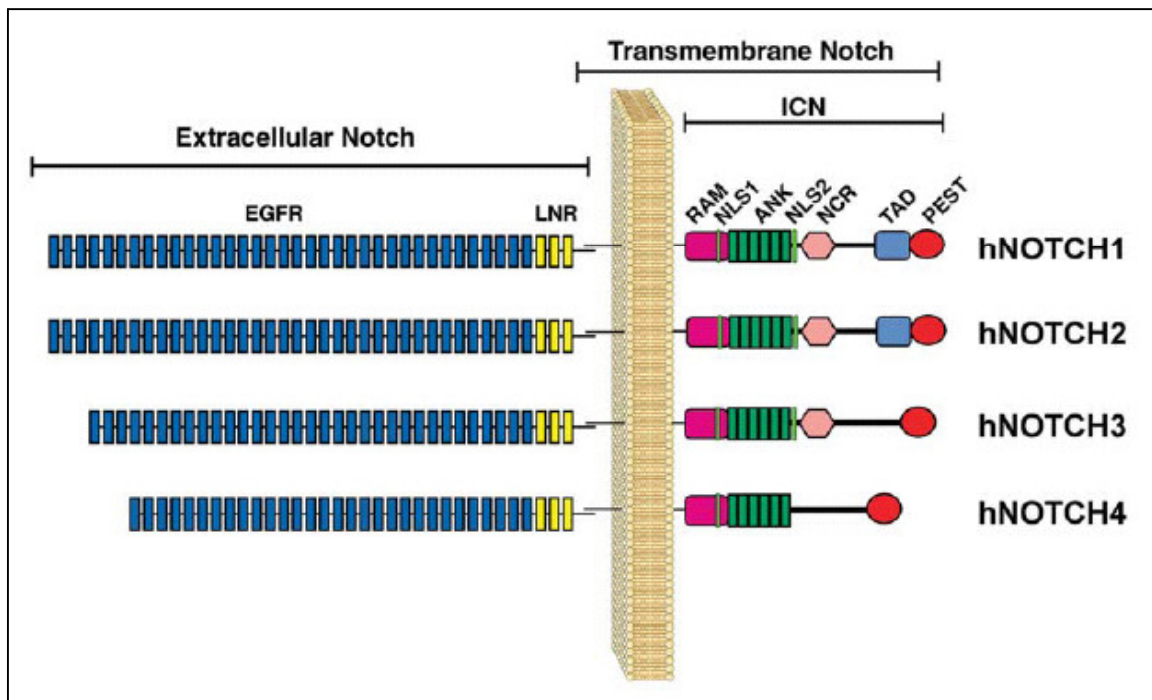
Die Notch Transmembran Untereinheit N(TM) besteht aus einem kurzen extrazellulären Abschnitt, einer einzigen Transmembrandomäne und einem großen intrazellulären Teil ICN (siehe Abb. 5).

Die intrazelluläre Domänen der Notch Rezeptoren enthalten verschiedene Motive, die die Notch Signalgebung vermitteln. An die Transmembrandomäne schließt sich intrazellulär die RAM- Domäne (RBP-Jκ assoziiertes Modul) an, eine ungefähr 100 Aa umfassende Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor CBF-1 (C Promotor Bindungsfaktor 1)/ RBP-Jκ (Rekombinationssignal Bindungsprotein J-kappa) (Tamura *et al.*, 1995), der das humane Homolog zu *Drosophila* Suppressor of Hairless Su(H) bildet. Im Anschluss an die RAM Domäne folgen, flankiert von zwei NLS (nuclear localisation signals), 6 cdc10/ Ankyrin Wiederholungen (ANK) (Zweifel und Barrick, 2001), die charakteristisch für Protein-Protein-Interaktionen sind und den am stärksten konservierten Bereich der Notch Rezeptoren darstellen. Sie sind essenziell für die Notch Signaltransduktion (Rebay *et al.*, 1993 a; Rebay *et al.*, 1993 b; Lieber *et al.*, 1993; Kopan *et al.*, 1994; Roehl *et al.*, 1996) und können mit CBF-1 interagieren (Fortini und Artavanis-Tsakonas, 1994). Die ANK Wiederholungen können auch Deltex und Mastermind binden, Modulatoren von Notch.

Die NCR (notch cytokine response) Domäne von *Drosophila* Notch und Säuger Notch 1-3 integriert Zytokin Signale und/oder bindet den transkriptionellen Ko-Aktivatoren p300 (Bigas *et al.*, 1998; Oswald *et al.*, 2001). Sie ist an der Vermittlung der unterschiedlichen Wirkungen von Notch 1 und 2 bei myeloischer Differenzierung beteiligt (Bigas *et al.*, 1998).

Weiter C-terminal liegt bei *Drosophila* Notch und bei Säuger Notch 1 eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne TAD, die bei Notch 2 etwas schwächer ausgeprägt ist und bei Notch 3 und 4 fehlt. Sie ist nötig für die Transkription einiger Zielgene (Kurooka *et al.*, 1998).

C-terminal befinden sich OPA, eine Glutamin reiche Region (nicht abgebildet) und eine PEST Sequenz (Prolin-, Glutamat-, Serin-, Threonin- reiche Domäne), die den Protein Umsatz reguliert (Rogers *et al.*, 1986) und bei Proteinen gefunden wird, die einem schnellen intrazellulären Abbau unterliegen (Wharton *et al.*, 1985; Kidd *et al.*, 1986).



**Abb. 5: Schematische Darstellung der humanen Notch Rezeptoren (hNotch 1-4) (nach Allenspach *et al.*, 2002)**

Die Proteine werden an der Zelloberfläche als Heterodimere exprimiert, welche sich aus nicht-kovalent miteinander verbundenen extrazellulären und Transmembran- Untereinheiten zusammensetzen. Alle Notch Rezeptoren bestehen aus 29-36 EGF Wiederholungen (epidermal growth factor like repeats (EGFR)), Lin12 Notch Wiederholungen (LNR), einer RAM23 Domäne (RAM), Ankyrin Wiederholungen (ANK), PEST (P) Sequenzen, und 2 nukleären Lokalisierungssignalen (NLS1, NLS2). Humanes Notch 1,2,3 enthalten C-terminal der ANK-Wiederholungen Zytokin Response (NCR) Sequenzen. Humanes Notch 1 und humanes Notch 2 enthalten auch starke bzw. Notch 2 schwache transkriptionelle Aktivierungsdomänen (TAD) zwischen den NCR und PEST Sequenzen.

#### 1.4 Liganden des Notch Rezeptors

Bei den Notch Liganden handelt es sich ebenfalls um Typ I Transmembran Glykoproteine. In *Drosophila* wurden zwei Liganden, Delta und Serrate, identifiziert, in Vertebraten zwei Liganden Familien: Serrate ähnliche Liganden mit Jagged 1 und 2 (Lindsell *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1997) sowie Delta ähnliche Liganden (engl. Delta like Dll) Dll 1-4. Allerdings wurde Delta 2 bisher nur in *Xenopus* beschrieben

(Bettenhausen *et al.*, 1995; Dunwoodie *et al.*, 1997; Jen *et al.*, 1997; Shutter *et al.*, 2000).

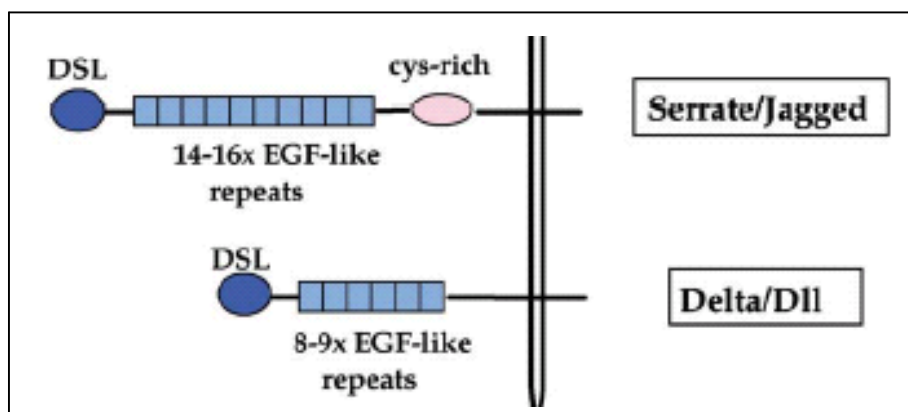
Alle Liganden bestehen, ähnlich dem Notch Rezeptor, im extrazellulären Teil aus EGF ähnlichen Wiederholungen sowie einer DSL-Domäne (Delta, Serrate, Lag2) (Weinmaster, 1997) in der Nähe des N-Terminus, welcher für die Bindung an den Notch Rezeptor nötig ist (siehe Abb. 6).

Serrate, Jaged 1 und 2 enthalten zusätzliche EGF Wiederholungen sowie eine cysteinreiche Region, die bei Liganden der Delta Familie fehlt.

Die EGF-ähnlichen Bereiche und die DSL Domäne sind beide an der Bindung an den Notch Rezeptor beteiligt (Shimizu *et al.*, 1999; Lieber *et al.* 1992), allerdings ist die DSL Domäne die wichtigste minimale Einheit für Bindung (Shimizu *et al.*, 1999) und Aktivierung der Notch Rezeptoren (Fitzgerald und Greenwald, 1995; Henderson *et al.*, 1997).

Die intrazellulären Bereiche der Liganden sind relativ klein und im Gegensatz zum Notch Rezeptor weit weniger konserviert. Dennoch scheinen sie wichtige Funktionen auszuüben, da ihre Entfernung zu einem dominant negativen Phänotyp führt.

Verkürzte Versionen von Notch Liganden wirken außerdem dominant negativ, wenn sie in einer sekretierten Form vorliegen (Sun und Artavanis-Tsakonas, 1996; Hukriede *et al.*, 1997; Sun und Artavanis-Tsakonas, 1997). Das weist darauf hin, dass die Liganden zur Aktivierung von Notch in einer zellgebundenen Form vorliegen müssen.



**Abb. 6: Notch Liganden**

Schematisierte Darstellung der Notch-Liganden Familien Serrate/Jagged und Delta/Delta-like (aus Guidos, 2002)

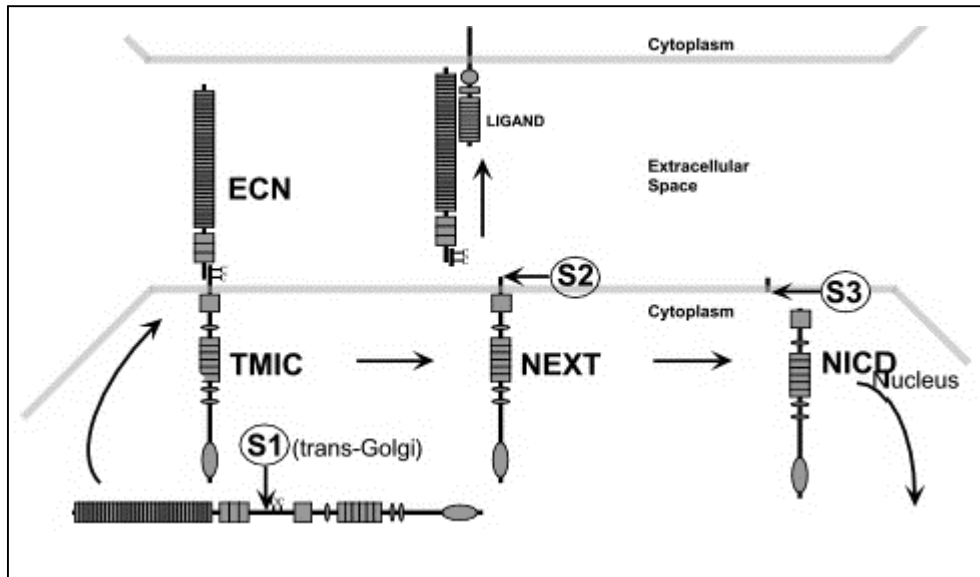
## 1.5 Die Notch Signaltransduktion

### 1.5.1 Prozessierung des Notch Rezeptors nach Ligandenbindung

Der Notch Rezeptor wird durch Bindung von Liganden aktiviert, wodurch zwei proteolytische Prozesse eingeleitet werden, die zur Freisetzung der intrazellulären Domäne von Notch NICD (N(IZ)) aus der Zellmembran und Translokation in den Zellkern führen (Struhl und Adachi, 1998; Lecourtois und Schweisguth, 1998; Schroeter *et al.*, 1998). Dort finden Interaktionen mit transkriptionell regulierenden Faktoren statt (Übersicht in Fortini, 2002). Diese Entstehung eines nukleären Signals durch regulierte intramembranäre Proteolyse (RIP) des Rezeptors spielt z. B. auch bei der Prozessierung des  $\beta$ -amyloid Vorläufer Proteins APP (Ebinu und Yankner, 2002) eine Rolle.

Die erste Spaltung von Notch erfolgt an der sogenannten S2 Stelle 12 As aminoterminal zur Transmembrandomäne. Sie wird vermittelt durch TACE (Tumor-necrosis-faktor (TNF)-alpha converting enzyme)/ ADAM17 (Brou *et al.*, 2000; Mumm *et al.*, 2000), ein Mitglied der ADAM Familie der Metalloproteasen. Das *Drosophila* Homolog ist Kuzbanian (Pan und Rubin, 1997; Sotillos *et al.*, 1997; Lieber *et al.*, 2000). Dadurch wird der extrazelluläre Teil entfernt und es entsteht die sogenannte *notch extracellular truncation* (NEXT), bestehend aus dem intrazellulären Teil NICD, der Transmembrandomäne TM und den 12 AS der restlichen extrazellulären Domäne. Diese Spaltung ähnelt der Spaltung von amyloid precursor protein (APP) durch  $\alpha$ -Secretase (Sisodia *et al.*, 1999; Sisodia und St George-Hyslop, 2002) (siehe Abb. 7).

Die zweite proteolytische Spaltung findet innerhalb des Transmembranbereichs an der sogenannten S3 Stelle statt und wird vermittelt durch einen  $\gamma$ -Sekretase Komplex, an dem Presenilin und Nicastrin beteiligt sind. Dadurch wird das intrazelluläre cytoplasmatische Notch Fragment NICD N(IZ) freigesetzt und kann zum Zellkern wandern, wo es über Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, den CSL Proteinen (Säuger CBF1; *Drosophila* Su(H), *C.elegans* LAG-1) (Roehl *et al.*, 1996; Tamura *et al.*, 1995; Hsieh *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1997) die Transkription von Zielgenen aktiviert (Weinmaster, 2000; Chan und Jan, 1999).



**Abb. 7: Proteolytische Spaltungen des Notch Rezeptors (Mumm und Kopan, 2000)**

Durch proteolytische Spaltung von Notch an der S1 Stelle im trans-Golgi Netzwerk entsteht das Rezeptor Heterodimer, das sich aus ECN (extracellulärer Notch) und TMIC (transmembraner und intracellulärer Bereich, auch p120 genannt) zusammensetzt. Nach Bindung eines Liganden an den Rezeptor unterliegt dieser vermutlich einer durch Endozytose geförderten Konformationsänderung, durch die die proteolytische Schnittstelle S2 freigelegt wird. Das resultierende C-terminale Produkt, NEXT (Notch extracelluläre Truncation) wird intramembranär an S3 konstitutiv prozessiert, was zu Translokation von NICD (Notch intracellulärer Bereich) in den Zellkern führt und zur Aktivierung der Notch transkriptionellen Antwort.

Für die Übermittlung von Notch Signalen sind zumindest bei *Drosophila* auch Endozytose Prozesse erforderlich (Poodry, 1990). Für die Aktivierung der Notch Signalgebung ist eine dynamin-abhängige Endozytose in der Signal gebenden Zelle nötig (Seugnet *et al.*, 1997). Endozytose des Liganden unterstützt dabei die Dissoziation des Notch Heterodimers und führt zu Trans-Endozytose des ECN in die Liganden exprimierende Zelle (Parks *et al.*, 2000).

Weiterhin wurde gezeigt, dass der intrazelluläre Teil von Notch Liganden-unabhängig konstitutiv aktiv wirkt (Lieber *et al.*, 1993; Struhl *et al.*, 1993).

### 1.5.2 Signaltransduktion innerhalb der Zelle

Nach der letzten Spaltung wandert N(IZ) in den Zellkern, wo es an einen ubiquitären basischen helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktor der CSL-Familie (CBF1/RBP-Jk in Säugern, **S**uppressor of hairless Su(H) in *Drosophila*, Lag-1 in *C. elegans*) bindet (Fortini und Artavanis-Tsakonas, 1994; Jarriault *et al.*, 1995). Dadurch werden Zielgene transkriptionell aktiviert (siehe Abb. 8, Seite 16).

Ohne Notch Signalaktivierung sind CSL Proteine mit einem Ko-Repressor-Komplex assoziiert, der aktiv die Transkription unterdrückt. Daran beteiligt sind unter anderem Histondeacetylase 1 (HDAC-1) (Kao *et al.*, 1998; Kurooka *et al.*, 1998), SMRT, N-CoR (nuclear receptor co-repressor) (Kao *et al.*, 1998), CIR (CBF-interacting repressor) (Hsieh *et al.*, 1999), SKIP (Ski-interacting protein) (Zhou *et al.*, 2000) und SHARP (Oswald *et al.*, 2002).

Die intrazelluläre Notch Domäne entfernt die Ko-Repressoren von RBP und führt Ko-Aktivatoren heran. Dadurch wird die Transkription von Promotoren, die CSL Bindeelemente haben, aktiviert. So z.B. HES-1 und HES-5, die eine Rolle spielen bei der Differenzierungsregulierung (de la Pompa *et al.*, 1997; Kuroda *et al.*, 1999; Ohtsuka *et al.*, 1999). ICN bindet dabei über die RAM und Ankyrin Domänen an CSL.

An diesem Ko-Aktivator Komplex, einem großen Proteinkomplex von ca. 1,5 MDa, sind verschiedene HATs (Histon Acetyltransferasen) beteiligt, wie z. B. p300/CBP, (Oswald *et al.*, 2001) oder PCAF/GCN5 (Kurooka und Honjo, 2000; Wallberg *et al.*, 2002).

Die Verbindung von CSL und ICN an der DNA wird dabei von einem Protein der nukleären mastermind (MAM) Familie (humanes MAM-1,-2,-3, Homolog zu *Drosophila* mastermind Proteinen) als Ko-Aktivator stabilisiert (Jeffries *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2000; Fryer *et al.*, 2002).

Ein weiterer Bestandteil des Ko-Aktivator-Komplexes ist SKIP, das ja auch über CBF-1 und SMRT mit dem Ko-Repressor Komplex interagiert und dessen Umwandlung zu einem Aktivator unterstützt (Zhou *et al.*, 2000).

Es scheint auch eine CSL/RBP-J unabhängige, über Deltex vermittelte Notch Signalübertragung zu geben (Zecchini *et al.*, 1999; Bush *et al.*, 2001), deren Einzelheiten allerdings noch unklar sind (Shawber *et al.*, 1996; Matsuno *et al.*, 1997;

Ordentlich *et al.*, 1998; Nofziger *et al.*, 1999; Wesley, 1999; Aster *et al.*, 2000; Kurata *et al.*, 2000; Kishi *et al.*, 2001; Romain *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001; Aster *et al.*, 1997).

### 1.5.3 Zielgene

Die primären Ziele der Notch Signalgebung sind die basischen helix-loop-helix (bHLH) transkriptionellen Repressoren des *Enhancer of Split* [*E(Spl)*] Komplexes in *Drosophila* und die *HES* (*Hairy/Enhancer of Split*) und HERP (HES-related repressor protein: Hey, HRT, Hesr, CHF, gridlock)) Genfamilie bei Säugetieren (Übersicht von Davis und Turner, 2001). Die Aktivierung der HES Transkription durch Notch führt zur Repression von nachgeschalteten HES Zielgenen, wie gewebespezifischen transkriptionellen Aktivatoren (Übersicht von Iso *et al.*, 2003). So antagonisiert z. B. HES1 bHLH Gene wie MASH1 (Kageyama und Ohtsuka, 1999; Kageyama *et al.*, 2000) und MyoD (Kuroda *et al.*, 1999; Hirsinger *et al.*, 2001), die an Neurogenese bzw. Myogenese beteiligt sind.

Sonstige Zielgene sind Mediatoren des Zellzyklus wie p21<sup>cip1/waf1</sup> (Rangarajan *et al.*, 2001) und Cyclin D1 (Ronchini und Capobianco, 2001), sowie Transkriptionsfaktoren der NF-κB Familie (Cheng *et al.*, 2001) und der PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) Familie (Garces *et al.*, 1997; Nickoloff *et al.*, 2002).

Weitere nicht transkriptionelle Wirkungen von Notch existieren, etwa die Hemmung der JNK (c-Jun N-terminal kinase) Aktivierung und Hemmung des Transkriptionsfaktors E47 (Ordentlich *et al.*, 1998; Zecchini *et al.*, 1999).

Die Notch Signalkaskade hat also ganz verschiedene Zielgene ja nach Zelltyp und Differenzierungsstadium.

## 1.6 Modulatoren des Notch Signalweges

Zusätzlich zu den Liganden-Rezeptor Interaktionen wird der Notch Signalweg durch Modulatoren beeinflusst, die die Empfindlichkeit gegenüber Liganden regulieren und den Abbau von intrazellulären Notch Fragmenten kontrollieren.

### 1.6.1 Fringe

Fringe Proteine regulieren posttranslational über Modifikationen des extrazellulären Teils von Notch die Sensitivität des Rezeptors gegenüber den Liganden Delta und Serrate (Panin *et al.*, 1997; Irvine, 1999).

Einige EGF Abschnitte des Notch Rezeptors sind durch Hinzufügen von Fucose an Serin und Threonin Reste verändert (Moloney *et al.*, 2000 a; Moloney *et al.*, 2000 b). Fringe Proteine sind Glycosyltransferasen ( $\beta$ 1,3-N-acetylglycosylaminyl Transferasen), die im Golgi Apparat das Anheften von N-Acetylglucosamin an diese O-Fucose katalysieren (siehe Abb. 8) (Bruckner *et al.*, 2000; Hicks *et al.*, 2000; Moloney *et al.* 2000 a; Munro und Freeman, 2000). Dadurch wird die extrazelluläre Domäne von Notch so verändert, dass Liganden der Delta Familie, nicht aber der Serrate/Jagged Familie den Signalweg auslösen können (Panin *et al.*, 1997; Bruckner *et al.*, 2000; de Celis und Bray, 2000; Hicks *et al.*, 2000; Moloney *et al.*, 2000 b). Es sind 3 Säuger fringe Gene bekannt: lunatic, manic und radical fringe (Übersicht von Moloney *et al.*, 2000 b). Am Beispiel von Notch 2 wurde beobachtet, dass diese verschiedenen Gene unterschiedliche EGF Abschnitte des Notch Rezeptors zu modifizieren scheinen (Shimizu *et al.*, 2001).

### 1.6.2 Numb

Numb ist ein zytoplasmatisches, den Notch Signalweg negativ regulierendes Protein (Lu, *et al.*, 1998). Bei *Drosophila* führt während der Entwicklung des peripheren Nervensystems eine asymmetrische Verteilung von Numb auf die Tochterzellen zu unterschiedlichen Zellschicksalen: In Zellen mit Numb wird die Notch Signaltransduktion unterdrückt und so neuronale Differenzierung eingeleitet (Übersicht von Jan und Jan, 1998). Auch bei Mäusen hemmt eine asymmetrische Verteilung von Numb in Tochterzellen dort jeweils die Notch Aktivität (Shen *et al.*, 2002) und induziert dadurch ebenfalls neuronale Differenzierung. Numb bindet an NIC und alpha-Adaptin, ein Protein, das an Rezeptor vermittelter Endozytose beteiligt ist (Berdnik *et al.*, 2002).



### 1.6.3 Deltex

Deltex (DTX) wurde als vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiertes Protein beschrieben, das in *Drosophila* die Notch Signalgebung verstärkt. Es bindet an die ANK Wiederholungen und ist vermutlich an der CSL-unabhängigen Form der Notch Signalgebung beteiligt (Matsuno *et al.*, 1995; Romain *et al.*, 2001; Yamamoto und Yamamoto, 2001). Im Gegensatz zu *Drosophila* kann Deltex bei anderen Spezies aber auch die Notch Signalgebung unter bestimmten Umständen hemmen (Sestan *et al.*, 1999; Izon *et al.*, 2002). Beim Menschen wurden DTX- 1,2,3 beschrieben.

### 1.6.4 Posttranslationale Regulation durch Ubiquitinierung

Der Notch-Signalweg wird durch mehrere E3 Ubiquitin Ligasen reguliert, die entweder den Notch Rezeptor selbst oder Komponenten des Signalwegs betreffen (Übersicht von Lai, 2002) und so durch Ubiquitinierung zur Proteasomen abhängigen Degradation der Proteine führen.

Sel-10 (suppressor/enhancer of lin-12) bewirkt Ubiquitinierung und Abbau der nukleären, phosphorylierten intrazellulären Notch Domäne (siehe Abb. 8) und fungiert somit als negativer Notch Regulator (Wu *et al.*, 2001).

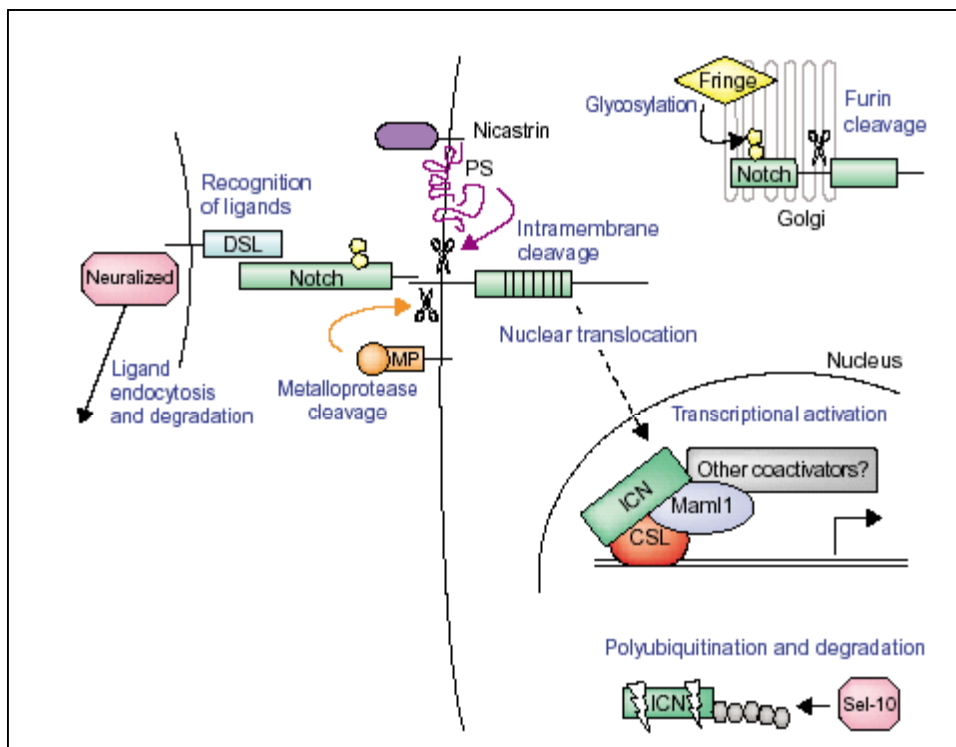
Die E3 Ubiquitin Ligase Su(dx)/Itch bindet an den N-terminalen Teil der Notch intrazellulären Domäne und fördert so deren Abbau (Qiu *et al.*, 2000).

Membrangebundener Notch 1 Rezeptor unterliegt einem Ubiquitin abhängigen Abbau durch c-Cbl (Jehn *et al.*, 2002).

Für die Endozytose des Liganden Delta und die anschließende Degradation wird Neuralized (Neur) (siehe Abb.8) benötigt (Lai und Rubin, 2001; Yeh *et al.*, 2001). Dies scheint eine Voraussetzung für die Delta-Notch Signalgebung zu sein, bei der Trans-Endozytose des Liganden Delta zusammen mit der Notch extrazellulären Domäne eine Rolle spielt (Übersicht in Lai, 2002; Deblandre *et al.*, 2001; Pavlopoulos *et al.*, 2001; Kramer, 2001).

Numb wird von LNX, ebenfalls eine E3 Ubiquitin Ligase, ubiquitiniert (Nie *et al.*, 2002). Durch den Proteasom-abhängigen Abbau von Numb können die Notch Signalgebung verstärkt und asymmetrische Zellteilung und Zellschicksalsentscheidungen beeinflusst werden.

Die Ubiquitinierung von Notch und der damit verbundene rasche Abbau könnte ein Grund dafür sein, dass Notch im Zellkern so schlecht nachweisbar ist.



**Abb. 8: Notch Signalkaskade**

Übersicht über die wichtigsten Komponenten des Notch-Signalweges (aus Nam *et al.*, 2002), Einzelheiten siehe Text

## 1.7 Der Notch Signalweg und Krankheiten

### 1.7.1 Mit Notch Rezeptoren assoziierte Erkrankungen

Bei allen Tiermodellen führten Mutationen im Notch Rezeptor zu Entwicklungsstörungen. Auch beim Menschen führen Notch Mutationen zu Erkrankungen (Joutel *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997).

### 1.7.1.1 Assoziiert mit Notch 1

Humanes Notch wurde zuerst aufgrund seiner Beteiligung an einer T-Zell Leukämie als TAN-1 (translokations-assoziiertes Notch Homolog 1) beschrieben: Durch eine chromosomale Translokation t(7;9)(q34;q34.3) innerhalb 100 bp eines Notch 1 Introns wird das 3'-Ende von Notch an die J $\beta$  Region des T-Zell Rezeptors  $\beta$  (TCR- $\beta$ ) fusioniert. Dadurch werden verschiedene Transkripte in der Größe von 100-125 kDa codiert, die alle den intrazellulären Teil von Notch 1 enthalten, jedoch nicht die extrazelluläre Domäne. Das führt zu einer verkürzten konstitutiv aktiven Variante von Notch 1, die in einer Untergruppe von akuter T-Zell lymphoblastischen Leukämie (T-ALL) gefunden wurde (Ellisen *et al.*, 1991).

Bei Mäusen kann eine T-Zell Leukämie durch die provirale Integration von Moloney murine leukaemia virus (MuLV) in das Notch 1 Gen verursacht werden. Dabei kommt es unter dem Einfluß eines viralen Promoters zu einer Überexpression der zytoplasmatischen Notch 1 Domäne (Girard und Jolicoeur, 1998).

Bei Mäusen wurde auch eine Notch 1 Beteiligung an epithelialen Tumoren beschrieben (Dievart *et al.*, 1999). Der Maus Notch 1 Locus ist ein Ziel für MMTV (mouse mammary tumor virus) Integration, was zur Expression von Notch 1-IC führt und für die Entwicklung von Brust-Tumoren in diesen Mäusen verantwortlich zu sein scheint. Da 3' verkürzte Notch 1 intrazelluläre Fragmente *in vitro* HC11 murine Brust Epithelzellen transformieren können, ist das ein Hinweis, dass auch in diesem System das N-terminal verkürzte Notch 1 intrazelluläre Protein als Onkogen wirkt.

Außerdem wurde eine starke Notch 1 Expression in neoplastischen Läsionen von humanem Zervix sowie in einem Kolon Adenokarzinom (Zagouras *et al.*, 1995) beschrieben.

### 1.7.1.2 Assoziiert mit Notch 2

Neben Notch 1 wurde auch eine Überexpression von Notch 2 in Adenokarzinomen des Kolons berichtet (Zagouras *et al.*, 1995).

Eine Überexpression von intrazellulärem nukleärem aktivierten Notch 2 unter dem Promotor eines Katzen Leukämie Virus (feline leukemia virus FeLV) verursacht eine

T-Zell Leukämie (Rohn *et al.*, 1996), ähnlich wie die Insertion von MMTV in murines Notch 1 (siehe 1.6.1.1).

#### 1.7.1.3 Assoziiert mit Notch 3

Mutationen im Notch 3 Gen scheinen für das Krankheitsbild CADASIL (Cerebral autosomal dominante Arteriopathie mit subcorticalen Infarkten und Leukoencephalopathie) verantwortlich zu sein. Die Mehrzahl der Patienten weist Punktmutationen in den cysteinreichen EGF Abschnitten auf, was zur Deletion oder Addition eines Cysteins führt (Joutel *et al.*, 1997) und damit über Störung der Disulfid Brücken Bildung zu einer gestörten Faltung führen könnte. Da auch eine Anhäufung der Notch 3 extrazellulären Domäne stattfindet (Joutel *et al.*, 2000 a; Joutel *et al.*, 2000 b), könnte es sich um einen toxischen Effekt handeln.

Eine durch einen Ick Promotor bewirkte Überexpression von intrazellulärem Notch 3 in transgenen Mäusen führte zur Entwicklung von T-Zell Lymphomen (Bellavia *et al.*, 2000).

Beim humanen Nierenzellkarzinom (engl: renal-cell carcinoma (RCC)) wurde eine im Vergleich zu normalem Gewebe verstärkte Expression einiger Transkripte, unter anderem auch von Notch 3, beschrieben. Eine Rolle bei der Pathogenese wurde dabei nicht untersucht (Rae *et al.*, 2000).

#### 1.7.1.4 Assoziiert mit Notch 4

Notch 4 wurde zuerst bei Mäusen identifiziert. Die früher als int-3 bezeichnete Integrationsstelle für den Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) stellte sich als die onkogene Form von Notch 4 heraus. Durch die Virusintegration wird die intrazelluläre Domäne von Notch 4 überexprimiert (Uyttendaele *et al.*, 1996; Gallahan und Callahan, 1997; Robbins *et al.*, 1992). Die Expression dieses Notch 4-IC/int-3 Gens beeinflusst die Zell Differenzierung und führt zu neoplastischer Transformation von Brust- und Speicheldrüsen (Jhappan *et al.*, 1992; Gallahan *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1995). Beim Menschen konnte eine ursächliche Rolle von intrazellulärem Notch 4 bei Brustkrebs bislang nicht gezeigt werden.

Eine aufgrund von Kopplungsanalysen des Notch 4 Locus diskutierte mögliche Beteiligung von Notch 4 an der Suszeptibilität für Schizophrenie (Wei und Hemmings, 2000) konnte ebenfalls bisher nicht bewiesen werden.

## 1.7.2 Mit Notch Liganden assoziierte Erkrankungen

### 1.7.2.1 Jagged 1

Bei dem autosomal dominant vererbten Alagille Syndrom, der häufigsten genetischen Ursache für chronische Lebererkrankungen in der Kindheit (1 auf 70.000 Lebendgeburten) findet man in über 70% der Patienten Mutationen in Jagged 1 (Li *et al.*, 1997; Krantz *et al.*, 1998; Oda *et al.*, 1997). Mutationen im extrazellulären Bereich (Crosnier *et al.*, 2001; Colliton *et al.*, 2001) führen zu Entwicklungsstörungen verschiedener Organe, was auf Haploinsuffizienz zurückzuführen sein könnte (Spinner *et al.*, 2001).

Ferner wurde auch eine Jagged 1 „missense“ Mutation mit einer vererbaren Form von Taubheit in Verbindung gebracht (Le Caignec *et al.*, 2002).

### 1.7.2.2 Delta-like 3

Mäuse, die kein funktionierendes Delta-like 3 (Dll 3) Gen haben, zeigen einen sogenannten *pudgy* Phänotyp. Sie haben durch Segmentierungsstörungen hervorgerufene schwere axiale Störungen des Skeletts (Dunwoodie *et al.*, 2002; Dunwoodie *et al.* 1997). Da dieser Phänotyp den Defekten bei der spondylokokostalen Dysostose ähnelt, einer genetisch bedingten Erkrankung mit Segmentierungsstörungen, wurde die Rolle von humanem Dll 3 bei der Krankheitsentstehung untersucht. Es konnten Mutationen im humanen Dll 3 Gen identifiziert werden, die als homozygote Mutationen für Fälle von autosomal rezessiver spondylokokostalen Dysostose verantwortlich sind (Dunwoodie *et al.*, 2002; Sparrow *et al.*, 2002). Die Ursache dafür ist eine verzögerte und irreguläre Somiten Formation, die zu Fehlbildungen des Skeletts führt (Bulman *et al.*, 2000).

Notch Rezeptor oder Ligand	Erkrankung oder Beteiligung beim Menschen
Notch 1	T-Zell akute lymphoblastische Leukämie
	div. Karzinome?
Notch 2	nicht bekannt
	div. Karzinome?
Notch 3	CADASIL
	Überexpression aufgrund chromosomaler Translokation führte zu Lungenkrebs
Notch 4	Mögliche Assoziation mit Schizophrenie
	Mögliche Assoziation mit Alopecia areata
	N4 <sup>IC</sup> Genprodukte fanden sich vermehrt in humanen Tumor Zell-Linien
DII-1	nicht bekannt
DII-3	Spondylokostale Dysostose
DII-4	nicht bekannt
Jagged-1	Alagille Syndrom

**Tab. 2: Notch Signalweg und Erkrankungen**

Übersicht: Beteiligungen eines gestörten Notch Signalweges an humanen Erkrankungen  
(verändert nach Harper *et al.*, 2003)

### 1.7.3 Notch und Tumorentstehung

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, gibt es einige Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Funktion bzw. einer Störung der Notch Funktion und der Entstehung von Tumoren. Dabei könnte eine konstitutive Aktivierung von Notch für die gestörte Differenzierung und anhaltende Fehlregulierung der Zellproliferation verantwortlich sein, was möglicherweise zu neoplastischer Transformation führt. Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung des Notch Signalweges bei der Entstehung von Tumoren ergibt sich aus der Beobachtung, dass die Gene für Notch 1,2,3 innerhalb chromosomaler Bereiche liegen, bei denen es sich um Regionen mit Neoplasie assoziierten Translokationen handelt (Larsson *et al.*, 1994).

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

### Ausgangspunkt:

Der humane Notch 1 Rezeptor wurde zuerst in T-Zell- Leukämie/Lymphom Zellen mit einer chromosomalen Translokation beschrieben unter der Bezeichnung TAN-1 (translokations-assoziiertes Notch Homolog 1) (Ellisen *et al.*, 1991). Außerdem wurde eine Beteiligung von Notch an Hämatopoese vermutet, da Notch 1 auf CD34<sup>+</sup> oder CD34<sup>+</sup> lin<sup>-</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen gefunden worden war (Milner *et al.*, 1994). Ferner existieren verschiedene Hinweise auf eine Beteiligung der Notch Rezeptoren an weiteren Tumoren.

### Zielsetzung:

Da zuerst Auswirkungen von Notch im hämatopoetischen System beschrieben worden waren (Leukämie) und eine Notch-Expression auf CD34<sup>+</sup> Zellen, sollten andere Zellen des hämatopoetischen Systems auf ihre Notch-Expression hin untersucht werden, um einen Hinweis auf eine mögliche Regulation zu finden. Dazu sollten monoklonale Antikörper gegen den humanen Notch 1 Rezeptor als Werkzeug für weitergehende Untersuchungen hergestellt werden. Dies würde eine Markierung von Zellen des hämatopoetischen Systems und anschließende Trennung mittels FACS nach verschiedenen Kriterien im Einzel-Zell-Sorter ermöglichen. Parallel dazu könnte die Expression von Notch 1 mittels Western Blot auf Zell-Linien, und je nach Verfügbarkeit auch auf primären Zellen untersucht werden, um einen Hinweis auf eventuelle Regulation zu finden: Auf welchen Linien ist Notch 1 exprimiert, wie steht es mit der Notch 1 Expression auf primären hämatopoetischen Zellen?

Da die Möglichkeit in Aussicht gestellt wurde, auch anti-Notch 3 Antikörper zur Verfügung gestellt zu bekommen, sollte je nach Verfügbarkeit und zeitlichen Möglichkeiten die parallele Expression dieser beiden Proteine der Notch Familie untersucht werden, sowie evtl. Notch 3 weiter charakterisiert werden: Findet man parallele Expression von Notch 1 und Notch 3, unterliegt Notch 3 ähnlichen Prozessierungsmechanismen wie Notch 1 ?

Je nach Verfügbarkeit sollte schließlich die Notch 1 Expression in histologischen Schnitten humaner normaler und/oder Tumorgewebe untersucht werden, um auf

---

Proteinebene einen Anhaltspunkt über Verteilung und Beteiligung der Notch Proteinexpression in gesundem Gewebe oder auch an der Entstehung von Tumoren zu bekommen. Dazu sollte eine immunhistochemische Notch 1 Färbemethode etabliert werden.

Die daraus erhaltenen Ergebnisse könnten weitere Hinweise auf eine Beteiligung des Notch Signalweges an der Entstehung verschiedener Tumore liefern und damit als Grundlage für weitergehende funktionelle molekularbiologische Untersuchungen dienen.



## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid	Bio-Rad, München
Agar	Difco, Detroit USA
Agarose Seakem LE	FMC BioProducts, Rockland USA
Bacto Trypton	Difco, Detroit USA
Bacto-Pepton	Difco, Detroit USA
Coomassie Brillant Blue G und R250	Serva, Heidelberg
Percoll	Biochrom, Berlin
Hefeextrakt	Difco, Detroit USA
Protein A und Protein G Sepharose	Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein-Molekulargewichtsstandard (SeeBlue Pre-Stained Standard)	Anamed, Offenbach
Sephadex G-25 DNA Grade Superfine	Pharmacia Biotech, Freiburg
TEMED	Bio Rad, München
Chemilumineszenz-Reagenzien (Super signal, Super signal ultra)	Pierce, Rockford, USA
LipofectAMINE Reagenz	Gibco-BRL Life Technologies, Eggenstein
Brefeldin A	Sigma, Deisenhofen
Cyclohexemid	Sigma, Deisenhofen
Tunicamycin	Sigma, Deisenhofen
Dynabeads	Dynal, Hamburg
DETACHaBEADS	Dynal, Hamburg
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Pefabloc Sc	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen

Alle übrigen Chemikalien stammten von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), ICN Biomedicals (Eschwege), oder Fluka (Neu-Ulm) im Reinheitsgrad „pro analysi“.

## 2.2 Enzyme

Taq Polymerase	Promega, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St Leon-Rot Roche Diagnostics, Mannheim
Reverse Transkriptase Superscript II	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Trypsin 0,25 %	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
T4 DNS Ligase (3 u/μl)	Promega, Mannheim
Lysozym	Boehringer Ingelheim Bioprodukts, Heidelberg
RNase A	Qiagen, Hilden
RNase H	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
DNase RQ1	Promega, Mannheim

## 2.3 Antikörper

Maus anti His	Geschenk von Dr. Ehring, GSF Institut für Experimentelle Hämatologie, München
Ratte anti humanes Notch 3	Geschenk von Dr. Kempkes, GSF Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, München

Fluorochrom markierte Antikörper:

CD19 RPE clone HD 37	Dako, Hamburg
CD33 FITC clone WM 54	Dako, Hamburg
CD8 RPE clone DK 25	Dako, Hamburg
CD4 FITC clone MT 310	Dako, Hamburg

## Sekundäre Antikörper:

Alkalische Phosphatase konjugierte anti-Ratte IgG	Sigma, Deisenhofen
Peroxidase konjugierte Ziege anti Ratte IgG+IgM	Dianova, Hamburg
Peroxidase konjugierte anti-Maus IgG	Sigma, Deisenhofen
Alkalische Phosphatase konjugierte anti-Maus IgG	Sigma, Deisenhofen
Peroxidase konjugierte Ziege anti Maus IgG	Sigma, Deisenhofen

**2.4 Reagenzien für die Immunhistochemie**

Kaninchen anti Ratte Immunglobuline (Z455) („Brücken“-Antikörper)	Dako, Hamburg
APAAP Ratte monoklonal (DO488) (Immunkomplex)	Dako, Hamburg
Gereinigte Ratten IgG <sub>2a,κ</sub> monoklonaler Immunglobulin Isotyp Standard	BD-Pharmingen, Heidelberg
TRS pH 6,1 (Target Retrieval Solution 10x)	Dako, Hamburg
TRS pH 9,0 (Target Retrieval Solution 10x)	Dako, Hamburg
Glyca Antigen Retrieval Solution 10x	Innovative Diagnostik- Systeme Dr. Sartori, Hamburg
ProTexII Antigenverstärker	Quartett GmbH, Berlin
Protease XXIV	InnoGenex/San Ramon USA
Pronase E	Sigma, Deisenhofen
Saponin	Sigma, Deisenhofen
Fast Red Tabletten	Sigma, Deisenhofen
Hämalaun	Sigma, Deisenhofen

## 2.5 Geräte

Semidry-Blot	Bio-Rad (Trans-Blot SD), München
Tank-Blot	Bio-Rad, München
Spektralphotometer	Beckman Instruments, München
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg Heraeus, Hanau
Proteinelektrophorese	Bio-Rad (Mini-Protean II), München
Geltrockner	Hofer Scientific Instruments, San Francisco
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Napco, USA
Ultraschallgerät	Bandelin (Sonoplus GM70), Berlin

## 2.6 Bakterienstämme und Medien

Bakterienstämme:

*E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  [ $F^-$ ,  $\phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ (*lacZYA-argKV169*), *end* A1, *rec* A1, *hsd* R17( $r_K^-$   $m_K^-$ ), *deo* R, *sup* E44, *thi*-1,  $\lambda^-$ , *gyr* A96, *rel* A1]

*E. coli* M15[pREP4] von Qiagen, Hilden

*LB-Medium* (1l:)

10 g Bacto-Trypton  
5 g Bacto-Hefe-Extrakt  
5 g NaCl  
pH 7,0

Zur Anzucht von Bakterien auf Platten wurde LB-Medium mit 2 % Agar hergestellt und in 60 cm<sup>2</sup> Petrischalen gegossen.

Weitere Zusätze:

Ampicillin: 100 µg/ml Endkonzentration (Stammlösung 100 mg/ml in H<sub>2</sub>O)  
Kanamycin: 25 µg/ml Endkonzentration (Stammlösung 25 mg/ml in H<sub>2</sub>O)  
IPTG: 0,5 mM IPTG (Stammlösung: 0,1 M in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert)  
X-Gal: 80 µg/ml Endkonzentration (Stammlösung 100 mg in 2 ml N, N'-Dimethyl-formamid)

## 2.7 Plasmide, DNS und Nukleotide

GFP-Vektor	pEGFP-N1; Clontech; Heidelberg
pcDNA3AMP	Invitrogen, Groningen, NL
pcDNA1AMP/hN1	Geschenk von Dr. Strobl, GSF Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, München
CMV lacZ Vektor	Geschenk von Dr. Kempkes, GSF Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, München
pQE60	Qiagen, Hilden
pGEM-T Vektor System	Promega, Mannheim
dNTPs [20mM]	Pharmacia, Freiburg
DNS-Längenstandard	MBI Fermentas, St. Leon-Rot Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

## 2.8 Eukaryontische Zellen und Medien

Zell-Linien:

Jurkat	lymphoid, T-Zell-Leukämie
GE-LCL	humane lymphoblastoide B-Zelllinie, mit BA-95 EBV transformiert
HEK 293	humane embryonale Nierenzellen transformiert mit Adenovirus 5
HL-60	humane akute promyelozytäre Leukämie
KG1 $\alpha$	humane akute myeloische Leukämie
HPB-ALL	humane lymphoblastoide T-Zell-Linie
CEM	humane akute lymphoblastische Leukämie
COS-1	Fibroblasten, SV-40 transformiert aus Affen-Niere
L87/4	humane SV-40 transformierte stromale Zell-Linie
LW/SO	humane acute myeloische Leukämie (aus Knochenmark)
Nalm 6	humane prä-B-Zell-Leukämie

Die Zell-Linien stammten aus der Sammlung des Instituts für Experimentelle Hämatologie der GSF, München

RPMI 1640	Gibco-BRL Life Technologies, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco-BRL Life Technologies, Eggenstein
Penicillin-Streptomycin (5000 IU/ml, 5000 $\mu$ g/ml).	Gibco-BRL Life Technologies, Eggenstein
L-Glutamin 200 mM	Gibco-BRL Life Technologies, Eggenstein
DMEM	Gibco-BRL Life Technologies, Eggenstein
Optimem	Gibco-BRL Life Technologies, Eggenstein

Cos-Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glucose angezogen, alle anderen Linien mit RPMI 1640. Den Medien wurde jeweils Penicillin 100 U/ml und Streptomycin 100 mg/ml sowie 10 % FCS und L-Glutamin (2 mM Endkonzentration) zugesetzt.

## Primäre Zellen:

HS-27: humane primäre Haut-Fibroblasten

B-Zellen: aus humanen Tonsillen: Dr. Kremer GSF Institut für Experimentelle Hämatologie, München

Nabelschnurvenenblut: Dr. Reisbach GSF Institut für Experimentelle Hämatologie, München

Humanes Knochenmark: aus dem Klinikum Großhadern, München; über Frau E. Spitzer, GSF Institut für Experimentelle Hämatologie

**2.9 RT- und PCR-Primer**

PCR-Primer für humanes Notch 1 (GenBank AC:M73980):

für RT: 3tan2 5' GGT GCT GCT GAG T 3'  
(bp 5533-5545)

für cDNA-Amplifikation (Fragment, 1618 bp):

5tan1-1 5' CTA CTG TGA GGA CCT GGT GGA C 3'  
(bp 3423-3444)3tan6 5' CTC CAG GTA GAC GAT GGA GC 3'  
(bp 5021-5040)

Klonierungsprimer zur Proteinexpression mit Klonierungsschnittstellen:

Nco I 5KF1 5' GAG AGA C↓CA TGG GAT ACT GTG AGG ACC TGG TGG ACG 3'  
(bp 3424 – 3445)Bgl II 3KF2 5' ATG ATC A↓GA TCT GTC CAG CTC CCT CCG CCG CCG 3'  
(bp 4984 – 5004)

An jeden Primer zur Klonierung des Notch 1 Fragments als (His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein in den Expressionsvektor pQE60 (mit C-terminalem His-Tag) wurde zur Optimierung der Aktivität der Restriktionsenzyme ein Überhang von 6 Basen angefügt.

Die Primer liefern ein Notch 1-Amplifikat von 1581 bp, das für 527 Aminosäuren codiert.

Die Primer wurden von der Arbeitsgemeinschaft BIODV der GSF synthetisiert und als ungereinigte Lyophilisate zur Verfügung gestellt.

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien

##### 3.1.1.1 Mini-Präparation

Diese sogenannte Koch-Methode eignet sich besonders zur raschen Präparation von DNS, die keinen besonders hohen Reinheitsanforderungen genügen muss. Dafür wurden 5 ml einer üN Kultur in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl STET-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 10 µl einer frischen Lysozym Lösung (10 mg/ml in H<sub>2</sub>O) gevortext. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in kochendem Wasser 1-2 min inkubiert. Das Lysat wurde bei RT 10 min mit 12.000 g zentrifugiert und danach das Pellet (Zellschrott) mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Der Überstand wurde mit 40 µl einer 2,5 M Natriumacetat Lösung pH 5,2 und 420 µl Isopropanol versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Die Plasmid -DNS wurde durch 5 min Zentrifugation mit 12.000 g bei 4°C pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach Verdunstung des restlichen Ethanols wurde die DNS in 100 µl H<sub>2</sub>O gelöst und zur Entfernung von RNS mit 5 µl RNase A (0,1 µg/ml) 10 min bei 37°C inkubiert.

*STET-Puffer:*           0,1 M NaCl  
                              10 mM Tris/HCl pH 8,0  
                              1 mM EDTA pH 8,0  
                              5 % Triton X-100

##### 3.1.1.2 Isolierung von Plasmid-DNS mit dem Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit von BIO-RAD

Der Kit (Cat. No. 732-6100) wurde nach Herstellerangaben verwendet: Nach alkalischer Lyse der Zellen, wodurch die Bakterien-DNS denaturiert wurde, und einem anschließendem Neutralisierungsschritt zur Renaturierung der Plasmid-DNS wird das entstandene Präzipitat pelletiert und die DNS-Binde Matrix (aus dem



Siliziumdioxid Exoskelett von Kieselalgen) zu dem Überstand pipettiert. Die Suspension mit der gebundenen DNS wird auf die im Kit enthaltenen Filtereinsätze in Eppendorfröhrchen übertragen, zentrifugiert und zweimal gewaschen. Die Plasmid-DNS kann dann mit Wasser eluiert werden.

### 3.1.1.3 Isolierung mit Qiagen Plasmid Mini und Midi Kit

Bei der Miniprep Methode (Qiagen Cat. No. 12123) werden die Zellen zuerst mit einem alkalischen, SDS- und RNaseA- haltigen Puffer lysiert. Anschließend erfolgt in einem Schritt die Neutralisation und das Einstellen von Hochsalz-Bedingungen, wodurch die im vorangegangenen Schritt denaturierten Proteine, Zellschrott, chromosomale DNS und SDS präzipitiert werden, die Plasmid-DNS jedoch renaturiert. Die renaturierte Plasmid-DNS verbleibt im Überstand und bindet unter diesen Bedingungen an eine Silica-Gel Matrix. Die DNS kann dann nach einem Waschschrift mit Niedrigsalz-Puffer oder H<sub>2</sub>O eluiert werden.

Bei Anwendung des Midi-Kits (Qiagen Cat. No. 12143) erfolgt die Bindung der Plasmid-DNS nach alkalischer Lyse unter Niedrigsalz-Bedingungen an eine Anionen Austauscher Matrix, wobei das negativ geladene Phosphat-Rückgrat der DNS mit den positiv geladenen DEAE (Diethylaminoethanol)-Gruppen an der Matrix-Oberfläche interagiert. Nach dem Waschen mit Mittelsalz-Puffer zum Entfernen von RNS- und Proteinresten wird die Plasmid-DNS mit Hochsalz-Puffer eluiert und über eine Isopropanol-Fällung entsalzt und konzentriert.

### 3.1.2 Isolierung von Gesamt-RNS

Zur Isolation von RNS aus eukaryontischen Zellen und Geweben wurde der RNeasy Mini Kit von Qiagen (Cat. No. 74104) laut Herstellerprotokoll verwendet. Dabei werden die Zellen in einem GITC (Guanidinisothiocyanat)-haltigen Puffer lysiert, wodurch RNasen und andere Proteine denaturiert werden. Mit Hilfe der QIAshredder-Säulchen wurden die Zell-Lysate homogenisiert und hochmolekulare DNS zerschert. Nach Zugabe von Ethanol zur Einstellung optimaler Bindebedingungen wurde die Lösung auf eine Silica-Gel Membran aufgetragen.

Unter Hochsalzbedingungen binden RNS-Moleküle, die mehr als 200 Basen enthalten, an die Membran. Nach dem Auswaschen von Kontaminationen kann die RNS mit Wasser eluiert werden.

### 3.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien zur Transformation

Hier wurde die Rubidiumchlorid-Methode verwendet, eine Variante der Calciumchlorid-Methode, um die Zellmembran von Bakterien chemisch so zu manipulieren, dass sie permeabel für DNS wird. Dazu wurden 5 ml einer üN Kultur in 100 ml LB (und Kanamycin 25 µg/ml bei Verwendung des Stammes M15[pREP4]) angesetzt und bei 37°C im Schüttler bei 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 herangezogen. Die Zellen wurden 10 min bei 4°C mit 400 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen vorsichtig in 30 ml kaltem TFB1 Puffer resuspendiert und 90 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zellen nochmals abzentrifugiert und das Pellet in eiskaltem TFB2 Puffer aufgenommen. 500 µl Aliquots der nun kompetenten Zellen wurden kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

*Puffer TFB1:* 100 mM RbCl  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
30 mM Kaliumacetat  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
15 % Glyzerin  
pH 5,8 sterilfiltriert

*TFB2:* 10 mM MOPS  
10 mM RbCl  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
15 % Glyzerin  
pH 8,0 sterilfiltriert

### 3.1.4 Transformation kompetenter Zellen

Zu 4 µl Ligationsansatz oder entsprechender Plasmidmenge wurden 200 µl kompetente Zellen pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme von DNS in die Bakterien wurde beendet indem die Zellen 90 s einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen wurden, wodurch sich die „Poren“ wieder schließen. Danach wurden die

Bakterien sofort für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 800 µl S.O.C. Medium wurden die Zellen 1,5 h bei 37°C mit ca. 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen kurz abzentrifugiert, in 300 µl Medium resuspendiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen auf LB-Agar Platten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen plattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

*S.O.C. Medium* (100 ml):

2,0 g Trypton  
0,5 g Hefe-Extrakt  
1 ml 1M NaCl  
0,25 ml 1M KCl

autoklavieren, dann Zugabe von

1 ml 2 M Mg<sup>2+</sup>- Stammlösung (1 M MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O/ 1 M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,  
sterilfiltriert)  
1 ml 2 M Glukose, sterilfiltriert  
H<sub>2</sub>O ad 100 ml, sterilfiltrieren

### 3.1.5 Aufbewahrung von *E.coli* als Glycerinkultur

Übernachtulturen von Bakterien wurden mit 20% sterilem Glycerin gemischt, kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 3.1.6 Reinigung von PCR-Primern über Sephadex G-25

Mit Kleenex abgedichtete, sterile Pasteur-Glaspipetten wurden bis ca. 2 cm unter dem Rand mit sterilem Sephadex G25 in TE pH 7,5 aufgefüllt. Die lyophilisierten Primer wurden in 50 µl TE pH 7,5 gelöst und auf die vorbereiteten Säulen aufgetragen. Nach dem Einsickern in das Gelbett wurden 500 µl TE auf die Säule gegeben und gewartet bis die Säule trockengelauten war. Mit 600 µl TE wurden die gereinigten Primer eluiert. Nach Messung der OD wurden die Primer mit sterilem H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt.

*TE-Puffer:* 10 mM Tris-HCl  
1 mM EDTA  
pH 7,5

### 3.1.7 Reverse Transkription

Für die RT-Reaktion wurden die SuperScriptII Reverse Transkriptase, eine Transkriptase ohne RNaseH Aktivität, von Gibco BRL verwendet, einschließlich des mitgelieferten 5x Erststrangpuffers (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>) und 0,1 M DTT's.

Ein Ansatz aus

Primer (genspezifisch)	10 pmol (oder Oligo (dT) 500µg/ml)
Gesamt RNS	5 µg
H <sub>2</sub> O	ad 12 µl

wurde 10 min auf 70 °C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von

5xErststrangpuffer	4µl
0,1 M DTT	2µl
10 mM dNTP Mix	1µl

wurde die Reaktion 2 min auf 42 °C erhitzt und dann

SuperScript II	1µl
----------------	-----

hinzupipettiert. Die Reaktion wurde 50 min bei 42 °C durchgeführt und durch 15 min Erhitzen auf 70 °C beendet. Um RNS aus RNS-DNS Hybriden zu entfernen, wurden 2 units (1 µl) RNaseH zugefügt und für 20 min bei 37 °C inkubiert.

Programm für die reverse Transkription:

10 min 70 °C	Aufschmelzen von Sekundärstrukturen
55 min 42 °C	cDNS Synthese
15 min 70 °C	Beenden der Synthese
25 min 37 °C	Inkubation mit RNaseH
∞ 4 °C	

### 3.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der PCR lassen sich DNS-Abschnitte fast beliebig amplifizieren. Dazu wird der DNS-Doppelstrang durch Erhitzen auf 95 °C getrennt (Denaturierung). Während des sogenannten „annealings“ lagern sich die spezifischen Primer (kurze Oligonukleotide) an Strang und Gegenstrang an. Die Temperatur dafür ist primerabhängig. Sie wird rechnerisch ermittelt und gegebenenfalls über einen Gradienten optimiert. Die Primer bilden so den Startpunkt für eine thermostabile Polymerase zur Amplifikation der kompletären Sequenzen (Elongation bei 72 °C). Durch Wiederholen der Zyklen lassen sich DNS-Stücke exponentiell vervielfältigen.

Folgende Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert:

cDNS	2	µl
10xPuffer (Promega)	2,5	µl
dNTP-Mix [je 10mM]	0,5	µl
3' Primer [10µM]	1	µl
5' Primer [10µM]	1	µl
MgCl <sub>2</sub> (Promega)	2	µl (=2,0 mM im Ansatz)
Taq Polymerase (Promega)	0,1	µl
H <sub>2</sub> O	ad 25	µl

Hot-start Programm für die PCR zur Amplifikation des Notch1 Fragments:

Bei Durchführung einer hot-start PCR wurde die Polymerase erst während der 80°C Phase nach der initialen Denaturierung dem Reaktionsmix zugegeben. Dadurch sollte die Amplifikation unspezifischer Produkte durch Fehlhybridisierung der Primer und Primerdimer-Bildung verhindert werden.

5 min 95°C	Auftrennung des DNS-Doppelstranges	} 40 Zyklen
10 min 80°C	Zugabe der Polymerase zu bereits denaturierter DNS	
1 min 95°C	Auftrennung des DNS-Doppelstranges	
1 min 65°C	Anlagerung der Primer an die DNS	
1,5 min 72°C	Elongation	
10 min 72°C	letzter Amplifikationsschritt	
∞ 4°C		

Die Amplifikate wurden mittels DNS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

### 3.1.9 DNS-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNS wurden 0,8% bis 1,2% Agarosegele gegossen. Als Lösungsmittel für die Agarose und Laufpuffer diente 1x TBE. Die Proben und der Längenstandard wurden mit 0,1 Volumen 10x Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die Gele wurden nach dem Lauf (5-10 V/cm) in 1x TBE mit 1 µg/l Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml), das in die DNS interkaliert, ca. 20 min gefärbt und die DNS-Banden unter UV-Licht (312 nm) betrachtet und dokumentiert oder ausgeschnitten.

<i>1x TBE:</i>	Trizmabase	89	mM
	Borsäure	89	mM
	Na-EDTA	2	mM

*10x-Auftragspuffer für Agarose-Gel-Elektrophorese:*

25 % Ficoll  
0,1 % Bromphenolblau

### 3.1.10 Isolierung von DNS aus Agarosegelen

DNS-Banden wurden unter UV-Licht aus Agarosegelen ausgeschnitten und nach der Herstellervorschrift mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Cat. No. 28704) der Firma Qiagen isoliert. Dabei wird die Agarose in einem entsprechenden Hochsalzpuffer bei 50°C zur Freisetzung der DNS geschmolzen und die Lösung nach Isopropanolzugabe auf eine Silica-Gel-Membran aufgetragen. Die DNS adsorbiert unter diesen Bedingungen bei einem pH-Wert unter 7,5 an die Membran, während durch Waschen mit einem Ethanol-haltigen Puffer Kontaminationen entfernt werden. Die DNS wurde mit Wasser eluiert.

### 3.1.11 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration

Die DNS-, RNS- und Primerkonzentrationen wurden am Photometer bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren bevorzugt Nukleinsäuren. Zur Konzentrationsbestimmung gelten folgende Werte:

1 OD<sub>260</sub> ≅ 50 µg/ml doppelsträngige DNS  
≅ 40 µg/ml einzelsträngiger RNS/DNS  
≅ 30 µg/ml Oligonukleotide

Bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen, so dass durch Bildung des Quotienten aus OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> die Reinheit der Nukleinsäuren ermittelt werden kann. Ein Wert von 1,8 – 2,0 entspricht je nach Aufreinigungsmethode reinen Nukleinsäuren.

### 3.1.12 Restriktionsverdau von DNS und Plasmiden

Pro  $\mu\text{g}$  DNS wurden 2-10 Units (Einheiten) Enzym eingesetzt und der Restriktionsansatz mit entsprechendem Puffer 1-2 h bei 37°C inkubiert. Musste bei DNS aus Plasmid-Mini-Präparationen noch RNS entfernt werden, wurde pro Ansatz 10 ng RNaseA zugefügt.

### 3.1.13 Dephosphorylierung von DNS mit alkalischer Phosphatase

Um die Religation eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die Phosphatgruppen am 5'-Ende enzymatisch entfernt. Dazu wurde die Vektor-DNS 1h bei 37°C mit alkalischer Phosphatase (Boehringer) laut Herstellerprotokoll in einem vom Hersteller mitgelieferten zinkhaltigen Puffer inkubiert. Die DNS wurde anschließend über einen PCR-Purification Kit (Qiagen) gereinigt (siehe 3.1.14).

### 3.1.14 DNS-Reinigung nach enzymatischen Reaktionen

Zur Entfernung von Enzymen, Oligonukleotiden und Nukleotiden wurde die DNS mittels QIAquick PCR Purification Kit (Cat. No. 28104) der Firma Qiagen gereinigt. Der Methode liegt das gleiche Prinzip wie der unter 3.1.10 beschriebenen Gel-extraktionsmethode zugrunde. Nur wird hier die DNS-haltige Lösung gleich mit einem Puffer versetzt, der für die Bindung von DNS einer Länge von 100 bp bis zu 10 kb optimiert wurde.

### 3.1.15 Ligation von PCR-Fragmenten mit pGEM-T Vektoren

Diese Vektoren ermöglichen das direkte Klonieren von PCR-Fragmenten in einen vom Hersteller bereits linearisierten Vektor, der an den 3'-Enden ein überhängendes Thymidin enthält. Taq-Polymerasen haben die Eigenschaft, am 3'-Ende des amplifizierten Fragments ein Desoxyadenin anzuhängen. Dadurch werden AT-

Paarungen ermöglicht, die die Ligation wesentlich effizienter werden lassen. Durch eine erfolgreiche Ligation wird die kodierende Sequenz der  $\beta$ -Galactosidase unterbrochen. Da  $\beta$ -Galactosidase durch IPTG induzierbar ist und X-Gal in blaues 5-Brom-4-chlor-indigo spaltet, können rekombinante Klone auf einem Agar, dem X-Gal und IPTG zugesetzt wurde, anhand der weißen Färbung von den blauen  $\beta$ -Galactosidase produzierenden Kolonien unterschieden werden.

Vektor- und Insert-DNS wurden im molaren Verhältnis von 3:1 und 1:3 angesetzt. Zur Positiv-Kontrolle wurde die mitgelieferte DNS eingesetzt und zur Bestimmung des unspezifischen Hintergrundes wurde nur Vektor-DNS ohne Insert ligiert.

T4 DNS-Ligase 10x Puffer	1	$\mu$ l
pGEM-T Vektor (50 ng)	1	$\mu$ l
PCR-Produkt	x	$\mu$ l
T4 DNS-Ligase (3 Weiss units/ $\mu$ l)	1	$\mu$ l
H <sub>2</sub> O ad	10	$\mu$ l

Die Reaktion zur Verknüpfung von Plasmid mit Fragment mittels überstehender A und T Nukleotide verlief ün bei 4 °C.

Zur Selektion positiver Klone wurden die Transformanten auf Ampicillin-haltige LB-Agar Platten aufgetragen, die zusätzlich X-Gal und IPTG zur Transkriptionsinduktion der  $\beta$ -Galactosidase enthielten.

### 3.1.16 Ligation zur Klonierung in den Expressionsvektor pQE-60

Die Ligation wurde parallel mit und ohne dephosphoryliertem Vektor durchgeführt und zur Kontrolle des Hintergrundes nur Vektor-DNS ohne Insert ligiert. Es wurden mehrere Ligationen mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen von Vektor- zu Insert-DNS angesetzt.

Vektor	50	ng
Insert DNS	x	$\mu$ l
10x Ligationspuffer	1,5	$\mu$ l
T4 Ligase	1	$\mu$ l
H <sub>2</sub> O ad	15	$\mu$ l

Die Reaktion verlief ün bei 16 °C.



## 3.2 Proteinchemische Methoden

### 3.2.1 Expression des rekombinanten Proteins

Der Expressionsvektor pQE-60 verfügt über einen starken T5 Promotor, der nur durch große Mengen an lac Repressor Protein reprimiert werden kann. Daher wird dieser Vektor zusammen mit dem *E. coli* Stamm M15[pREP4] verwendet. Das Plasmid pREP4 exprimiert konstitutiv das lac Repressor Protein und verleiht Resistenz gegenüber Kanamycin.

Eine üN-Kultur transformierter *E.coli* M15[pREP4] wurde im Verhältnis 2:50 in LB-Medium mit Ampicillin und Kanamycin angesetzt und bei 37 °C im Bakterienschüttler mit 200 rpm inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,7 – 0,9 wurde nach Entnahme einer Probe für den 0-Wert mit IPTG (1 mM Endkonzentration) 3h die Proteinexpression induziert. Die Bakterien wurden 15 min bei 4.000 g abzentrifugiert und das Pellet bei -20 °C eingefroren.

### 3.2.2 Test auf Proteinexpression

Aus einer üN-Kultur von transformierten *E.coli* M15[pREP4] wurden 400 µl mit 3,6 ml frischem LB-AMP-KAN Medium angesetzt und die Proteinexpression bei einer OD<sub>600</sub> von 0,7 – 0,9 mit IPTG 2 mM Endkonzentration aus einer 0,1 M Stammlösung induziert. Vor Induktion (= 0-Wert) und nach 1,2,3 Stunden wurde je 1ml abgenommen und abzentrifugiert. Die Pellets wurden bei 4 °C oder üN bei -20 °C aufbewahrt. Zur Lyse der Bakterien wurden die Pellets in 200 µl Harnstoffpuffer (siehe 3.2.4) aufgenommen und 10 min resuspendiert bis die Lösung klar wurde. Je 20 µl davon wurden mit 3 µl 10x Auftragspuffer 10 min im Wasserbad bei 95 °C denaturiert und auf ein 12% PAA-Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie Blau gefärbt und anschließend die nicht gebundene Farbe mit Entfärbelösung ausgewaschen (siehe 3.2.11).

### 3.2.3 Test der Löslichkeit des rekombinanten Proteins

Ein Bakterienpellet aus 15 ml Kultur wurde in 1 ml PBS aufgenommen. 400 µl davon wurden 2 bis 3 mal 30 s mit Ultraschall behandelt bis die Lösung klar wurde.

Anschließend wurde 5 min bei 12.000 g abzentrifugiert, der Überstand (lösliche Fraktion) abgenommen und das Pellet (unlösliche Fraktion) in 100 µl Harnstoffpuffer resuspendiert.

*PBS:*                                    140 mM NaCl  
    2,7 mM KCl  
    8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
    1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
    pH 7,4

### 3.2.4 Protein-Reinigung

Die Reinigung des (His)<sub>6</sub>-Fusionsproteins wurde über eine Ni-NTA Agarose der Firma Qiagen (Cat. No. 30210) durchgeführt. Bei dieser Metall-Affinitäts-Chromatographie erfolgt die Bindung des 6xHis-Tag über zwei freie Nickelbindungsstellen an die Matrix. Waschen und Elution des rekombinanten Proteins erfolgt über Senkung des pH-Wertes, was zur Protonierung von Histidinen und letztlich zur Dissoziation des 6xHis-Tags von der Ni-NTA Matrix führt. Mit Imidazol, welches mit den Histidinen um die Bindungsstellen konkurriert, kann das Protein ebenfalls eluiert werden. Es wurde das Protokoll für die Reinigung unlöslicher Proteine unter denaturierenden Bedingungen zugrunde gelegt. Zum Test der Proteinreinigung im kleinen Maßstab wurde auch der Ni-NTA Spin Kit (Cat. No. 31314) verwendet, bei dem die Bindung an eine Ni-NTA Silica Matrix in vorgefertigten Zentrifugenröhrchen erfolgt.

Die einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) untersucht. Da Guanidinhydrochlorid mit SDS präzipitiert, wurden die entsprechende Proben vor dem Gelauftrag einer TCA-Triton-Fällung (s. 3.2.8) unterzogen.

#### Solubilisierungs- und Waschpuffer:

*Puffer A*                                    6 M Guanidinhydrochlorid  
    0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
    0,01 M Tris  
    pH 8,0

*Puffer B (Harnstoffpuffer)*    8 M Harnstoff  
    0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
    0,01 M Tris  
    pH 8,0

Waschpuffer:

*Puffer C* Puffer B mit pH 6,3

Elutionspuffer:

*Puffer D* Puffer B mit pH 5,9

*Puffer E* Puffer B mit pH 4,5

Puffer zum Entfernen sämtlicher Proteinreste von der Ni-NTA-Agarose:

*Puffer F* 6 M Guanidinhydrochlorid  
0,2 M Eisessig

Puffer A, B, C, D, E wurden auch mit 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol verwendet, um eine Vernetzung des rekombinanten Proteins mit bakteriellen Proteinen über Disulfidbrücken zu verhindern. Desweiteren wurden Puffer B und C auch mit 20 mM Imidazol zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen an die Matrix verwendet.

### 3.2.5 Präparation der „inclusion bodies“ nach Maniatis

Die Überexpression rekombinanter Proteine in Bakterien kann zur Aggregation und Bildung unlöslicher „inclusion bodies“ führen. Aufgrund ihrer Dichte können diese nach Lyse der Zellen durch Lysozym und Detergenz mittels Zentrifugation isoliert werden und verschiedene Solubilisierungsmethoden getestet werden.

#### 3.2.5.1 Zell-Lyse

Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien wurden alle folgenden Arbeiten auf Eis durchgeführt. Pro Gramm *E.coli* Pellet wurden 3 ml Lyse-Puffer zugefügt und das Pellet resuspendiert. Pro Gramm Bakterien wurden dann 8  $\mu$ l 50 mM PMSF und 80  $\mu$ l Lysozym (10 mg/ml) zugesetzt und 20 min mit gelegentlichem Rühren inkubiert. Unter fortwährendem Rühren wurden 4 mg DOC pro Gramm *E. coli* zupipetiert. Sobald das Lysat klar wurde, wurde unter Rühren bei 37°C 20  $\mu$ l RQ1 DNase (1mg/ml) pro Gramm Bakterien zugefügt. Das Lysat wurde bei RT inkubiert, bis es nicht mehr viskös war.

*Lyse-Puffer:* 50 mM TrisHCl, pH 8,0  
1 mM EDTA  
100 mM NaCl

Anschließend wurden die „inclusion bodies“ nach den folgenden Methoden präpariert:

#### 3.2.5.2 Präparation Methode A

Das Zell-Lysat wurde 15 min bei 4°C mit 12.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 9 Volumen Lyse-Puffer (0,5% Triton X-100, 100 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4°C mit 12.000 g für 15 min wurde der Überstand aufbewahrt und das gewaschene Pellet in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Je 10 µl von Pellet und Überstand wurden mit SDS-PAGE auf ihren Gehalt an rekombinantem Protein untersucht.

#### 3.2.5.3 Präparation Methode B

Das Lysat wurde 15 min bei 4°C mit 12.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml H<sub>2</sub>O pro Gramm aufgenommen und davon vier 100 µl Aliquots abgenommen. Die Aliquots wurden erneut pelletiert und die Pellets in jeweils 100 µl 0,1 M Tris/HCl pH 8,5 mit folgenden Harnstoffkonzentrationen aufgenommen: 0,5 M; 1 M; 2 M; 5 M. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen und die Pellets in jeweils 100 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Je 10 µl der Überstände und resuspendierten Pellets wurden mit SDS-PAGE auf Proteingehalt untersucht.

#### 3.2.6 Dialyse von proteinhaltigen Lösungen

Die Dialyseschläuche wurden vor Gebrauch nach Herstelleranleitung in destilliertem Wasser gekocht, dann autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt. Die Probe wurde mehrmals üN unter langsamem Rühren bei 4°C und mehrmaligem Pufferwechsel

(vorgekühlt auf 4°C) gegen ein 100- bis 1000-faches Volumen des neuen Puffers dialysiert.

### 3.2.7 Zell-Lyse-Puffer für Western-Blot

#### *Harnstoffpuffer:*

8 M Harnstoff  
1 M NaCl  
15% Glyzerin  
1% Triton X-100

#### *0,1% RIPA-Puffer:*

150 mM NaCl  
0,1% v/v Nonidet P40  
0,25% v/v DOC  
0,1% v/v SDS  
50 mM Tris pH 8,0

#### *TNT-Puffer:*

50 mM TrisHCl pH 8,0  
200 mM NaCl  
0,5% Nonidet P40  
1 mM Pefabloc SC

#### Proteaseninhibitoren:

Aprotinin 5 mg/ml in H<sub>2</sub>O

Pefabloc SC 0,5 M in 20 mM Tris pH 6,9

Leupeptin 1 mg/ml in H<sub>2</sub>O

je 1 µl dieser Inhibitoren wurde zu 1 ml Lyse-Puffer gegeben

PMSF [100mM] in Isopropanol

6 µl pro ml Lyse-Puffer

### 3.2.8 TCA-Triton- Fällung von Proteinen aus wässrigen Lösungen

Die Proteine wurden mit 0,23 Volumen einer 55%igen TCA-Lösung und mit 0,14 Volumen 1% Triton X-100 versetzt und mindestens 10 min auf Eis gehalten. Die gefällten Proteine wurden mit 12.000 g abzentrifugiert und das Pellet mit 1-2

Volumen Aceton gewaschen. Die Pellets wurden getrocknet und in mit TE-Puffer verdünntem Auftragspuffer (siehe 3.2.10) resuspendiert.

### 3.2.9 Protein-Bestimmung

Proteinkonzentrationen wurden mit der Pierce BCA Protein Assay Methode laut Protokoll durchgeführt. Dabei werden  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen durch Aminosäuren des Proteins zu  $\text{Cu}^{1+}$  oxidiert. Eine anschließende Reaktion von BCA (Bicinchoninic acid) mit Kupfer führt zur Bildung eines wasserlöslichen lilafarbenen  $\text{BCA-Cu}^{1+}$  Komplexes. Dadurch kann der Proteingehalt spektrophotometrisch bei 562 nm bestimmt werden. Als Standard wurden verschiedene Konzentrationen BSA Fraktion V in entsprechendem Puffer verwendet.

### 3.2.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS denaturiert Proteine und bildet mit ihnen negativ geladene Komplexe mit konstantem Verhältnis von Masse zu Ladung, so dass sie im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können. Es wurden 6 %ige und 12 %ige Trenngele mit vorgeschalteten 5%igen Sammelgelen verwendet. Die Proteine wurden mit Auftragspuffer 5 min bei 95°C erhitzt (Imidazol-haltige Lösungen 10 min bei 37°C, da sonst säureempfindliche Bindungen hydrolysiert werden könnten) und mit 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer im elektrischen Feld aufgetrennt. Dabei wurden elektrische Spannung und Laufzeit entsprechend der Herstellerangaben (Bio-Rad Minigel Kammern) gewählt.

*Auftragspuffer (10x) für SDS-PAGE:*

214 mM	Tris-HCl pH 6,8
7,6 % w/v	SDS
33 % v/v	Glyzerin
16,5% v/v	$\beta$ -Mercaptoethanol
etwas	Bromphenolblau

<i>Laufpuffer:</i>	192 mM 25 mM 0,1 % w/v	Glyzin Tris SDS
<i>Sammelgel 5% (5 ml):</i>	1,22 ml 0,63 ml 3,4 ml 40 µl 4 µl	30% Acrylamid-Bisacrylamid Mix (30:0,8) 1,0 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4% v/v SDS H <sub>2</sub> O 10% APS TEMED
<i>Trenngel 6% (10 ml):</i>	2,0 ml 2,5 ml 5,5 ml 50 µl 5 µl	30% Acrylamid-Bisacrylamid Mix (30:0,8) 1,5 M Tris pH 8,8; 0,4 % v/v SDS H <sub>2</sub> O 10 % APS TEMED
<i>Trenngel 12% (10 ml):</i>	4,0 ml 2,5 ml 3,5 ml 50 µl 5 µl	30% Acrylamid-Bisacrylamid Mix (30:0,8) 1,5 M Tris pH 8,8; 0,4 % v/v SDS H <sub>2</sub> O 10 % APS TEMED

### 3.2.11 Färbung von Proteingelen

#### 3.2.11.1 Coomassie-Färbung

Die Gele wurden nach dem Lauf ca. 30 min in Färbelösung inkubiert und überschüssiger Farbstoff ÜN mit Entfärbelösung ausgewaschen. Die Detektionsgrenze liegt bei ca. 0,5 µg Protein.

<i>Färbelösung:</i>	0,2% w/v 45% v/v 10% v/v	Coomassie Blau R Methanol Essigsäure
<i>Entfärbelösung:</i>	10% v/v 45% v/v	Essigsäure Methanol

Zur Dokumentation wurden die Gele getrocknet. Vor dem Trocknen wurden sie 1 h in H<sub>2</sub>O mit 5 – 10% Glycerin inkubiert, um Rißbildung zu verhindern.

### 3.2.11.2 Kolloidale Coomassie Färbung

Vor der Färbung wurden die Gele 20 min mit 12% TCA fixiert und dann über Nacht gefärbt. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 1 ng.

*Färbelösung:*           80 ml 10%NH<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>/ 2%H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
                              20 ml Methanol  
                              1 ml 5% Coomassie G in H<sub>2</sub>O

*Entfärber:*             25 % Methanol

### 3.2.12 Proteintransfer von Gelen auf Membranen (Blotten)

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Membran transferiert. Zur Kontrolle der Blot-Effizienz wurden die Gele nach dem Blotten mit Coomassie nachgefärbt.

#### 3.2.12.1 Semidry-Blot

Diese Methode ist besonders für Proteine mit einem Molekulargewicht bis zu ca. 180 kDa geeignet. Es wurde die Semidry Transfer Cell von Bio Rad nach Herstellervorschrift verwendet.

*Transferpuffer Semidry Blot:*    390 mM Glycin  
  480 mM Tris  
  0,37% SDS  
  20 % Methanol

#### 3.2.12.2 Tank-Blot

Für Proteine mit höherem Molekulargewicht ist diese Methode besser geeignet. Durch Verringern des Abstandes der beiden Plattenelektroden läßt sich die Transfer-Effektivität noch steigern.



*Blotpuffer Tank-Blot:*      25% Methanol  
                                     57,6 g Glyzin  
                                     40 ml 20% SDS  
                                     12 g Tris  
                                     ad 4 l H<sub>2</sub>O

### 3.2.13 Anfärbung von Proteinen auf Nitrozellulose mit Ponceau-S

Proteinbanden können nach dem Blotten auf Nitrocellulose mit dieser Färbung sichtbar gemacht werden. Dazu wurde die Membran kurz in Färbelösung geschwenkt und anschließend der Farbstoff mit Wasser solange vorsichtig ausgewaschen bis die Proteinmarkierung gut sichtbar war. Die Färbung konnte mit TBS-Puffer vollständig entfernt werden.

*Färbelösung:*            0,5 % Ponceau S Rot  
                                     3 % TCA

*TBS:*                    10 mM Tris/HCl pH 7,5  
                                     150 mM NaCl

### 3.2.14 Inhibition der Proteinglykosylierung

Die Bildung von Glykoproteinen kann durch Tunicamycin unterbunden werden. Tunicamycin hemmt den ersten Schritt bei der Bildung von N-gebundenen Oligosacchariden (an Aparagin). Ca. 1 Million Zellen pro ml Medium wurden mit 100 ng – 1000 ng Tunicamycin pro ml im Brutschrank für 24 h inkubiert.

*Tunicamycin:* 1mg/ml in DMSO

### 3.2.15 Hemmung der Proteinsynthese mit Cycloheximid (CHX)

Cycloheximid verhindert die Proteinexpression in Eukaryonten durch Bindung an das 80S Ribosom. Dazu wurden die Zellen für 3 h mit 20 – 50 µg CHX pro ml Medium im Brutschrank inkubiert.

*CHX-Stammlösung:* 10 mg/ml

### 3.2.16 Hemmung des Proteintransports mit Brefeldin A

Brefeldin A hemmt die Proteinsekretion in eukaryontischen Zellen durch Blockierung des Transports vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi Apparat. Die Zellen wurden bei 37°C bis zu 24 h inkubiert. Brefeldin A wurde mit einer Endkonzentration von 10 – 50 µg/ml eingesetzt.

*Brefeldin A Stammlösung* : 10 mg/ml in EtOH

## 3.3 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

Zur Kultivierung wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.3.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Zell-Linien wurden mit einer Konzentration von 5-10x10<sup>6</sup> Zellen/ml in 1 ml Einfriermedium zuerst 24 h bei -80°C dann in flüssigem Stickstoff eingefroren.

*Einfriermedium:*     RPMI 1640  
                          50 % FCS  
                          10 % DMSO

Zum Auftauen wurden die Zellen zügig im Wasserbad bei 37°C erhitzt bis das Medium geschmolzen war und in 5 ml Medium mit 20% FCS im Brutschrank inkubiert

### 3.3.2 Ablösen adhärenter Zellen

#### 3.3.2.1 Ablösen adhärenter Zellen mit Trypsin 0,25%

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, dann kurz mit Trypsin bei 37°C inkubiert und durch Klopfen abgelöst. Durch Zugabe von Medium mit 10% FCS wurde die Wirkung des Trypsins inhibiert.

### 3.3.2.2 Ablösen adhärenter Zellen mit EDTA

Zur Erhaltung von Oberflächenproteinen, wie z.B. Rezeptoren, wurden die Zellen kurz mit 1 mM EDTA in PBS pH 7,4 inkubiert und vorsichtig vom Kulturgefäß abgelöst.

### 3.3.3 Isolierung mononukleärer Zellen aus Blut über Dichtegradienten

Das frisch entnommene, heparinisierte venöse Blut bzw. Nabelschnurblut wurde 1:1 mit Medium oder PBS verdünnt. Je 10 -15 ml Percoll wurden mit 20 ml davon überschichtet. Der Gradient wurde 30 min bei RT mit 1.800 rpm ohne Bremse zentrifugiert (Heraeus Minifuge). Die in der Interphase zwischen Serum und Percoll befindlichen mononukleären Zellen wurden mit der Pipette abgenommen und zweimal mit PBS, Medium oder Zitratpuffer gewaschen.

*Zitratpuffer:* 0,6% Zitrat  
2% BSA

### 3.3.4 Präparation von Zellen aus Knochenmark

Bei der Knochenmarkentnahme werden Metallsiebe verwendet, um z. B. mitaspirierte Knochenbälkchen zu entfernen. Diese Siebe mit den darin befindlichen restlichen Knochenmarkszellen wurden in Puffer (PBS, 5% FCS+P/S) aufbewahrt. Mit Zellschaber, Spritze und Pipette wurden die Zellen gründlich mit PBS aus den Sieben ausgespült und die Zellsuspension in Falcon Röhrchen überführt. Nachdem sich verbleibende Gewebeaggregate abgesetzt hatten, wurden die Zellen im Überstand in neue Falcon Röhrchen gegeben und 10 min bei 1.200 rpm zentrifugiert (Heraeus Minifuge). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml PBS resuspendiert und über ein steriles Nylon-Sieb (BD Falcon) in ein neues Röhrchen überführt. Mit dieser Zellsuspension wurden 20 ml Percoll überschichtet und wie unter 3.3.3 angegeben verfahren.

### 3.3.5 Einfrieren von mononukleären Zellen

Maximal  $10^8$  Zellen in 1,5 ml Einfriermedium wurden zuerst üN in  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren und dann in Stickstoff überführt

*Einfriermedium:*     90 % FCS  
                          10 % DMSO

### 3.3.6 Transiente Transfektionen adhärenter Zellen

#### 3.3.6.1 Calcium-Phosphat-Präzipitation

Bei dieser Methode werden DNS, Calciumchlorid und ein Phosphatpuffer (HBS) gemischt, so dass sich ein feiner kristalliner Niederschlag bildet, mit welchem die Zelle die einzubringende DNS über Endocytose aufnimmt.

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen gesplittet, so dass sie bei der Transfektion eine Konfluenz von 50 – 70 % erreicht hatten.

Zur Transfektion wurden Präzipitate für Platten mit 10 cm Durchmesser hergestellt.

Je Ansatz

500  $\mu\text{l}$  2xHBS  
5-10  $\mu\text{g}$  DNS  
5-10  $\mu\text{g}$  Heringssperma DNS  
 $\text{H}_2\text{O}$  ad 950  $\mu\text{l}$

Pro Ansatz wurden 50  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  [2,2 M] hinzupipettiert und sofort gemischt. Der Mix wurde 30 min bei RT stehengelassen, nochmals kurz gemischt und anschließend das Präzipitat tropfenweise zu den Zellen gegeben. Am darauffolgenden Morgen wurde das Medium gewechselt und die Zellen am zweiten oder dritten Tag nach der Transfektion gefärbt oder geerntet.

*2xHBS:*           280 mM NaCl  
                      1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$   
                      50 mM HEPES  
                      pH-Werte 6,8; 6,9; 7,0; 7,1; 7,2  
                      steril filtriert

### 3.3.6.2 Transiente Transfektion von Säugerzellen mit Lipofectamin

Das Einbringen von DNS in die Zelle geschieht hier durch Fusion DNS-haltiger Liposomen mit der Zellmembran.

Die Zellen wurden am Vortag mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  (in 6-well Platten) in 2 ml Medium, bzw.  $1 \times 10^6$  (10 cm Platte) in 10 ml Medium, ausgebracht. Nach 24 h wurden sie transfiziert. Ansätze für 6-well Platten (5-facher Ansatz für 10 cm Schälchen): 1,25  $\mu\text{g}$  (6,25  $\mu\text{g}$ ) DNS in 100  $\mu\text{l}$  (500  $\mu\text{l}$ ) Optimem (ein serumfreies Medium) mit 1% Glutamin (ohne P/S). 6  $\mu\text{l}$  (30  $\mu\text{l}$ ) Lipofectamin in 100  $\mu\text{l}$  (500  $\mu\text{l}$ ) Optimem. Beide Ansätze wurden zusammenpipettiert (0,2 bzw. 1 ml) und 30 min bei RT stehengelassen. Von den Zellen wurde das Medium entfernt und mit Optimem +Gln gespült. Der Transfektionsansatz wurde mit Optimem auf ein Volumen von 1 ml (5 ml) gebracht und die Zellen damit 5 h inkubiert. Anschließend wurde 1 ml (5 ml) Optimem+Gln+20% FCS (Endkonzentration 10%) zupipettiert und die Zellen  $\text{üN}$  inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und das Medium gewechselt. Je nach Versuch mit Medium +P/S+FCS oder mit Optimem +Gln+P/S ohne Serum. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen geerntet.

Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit einem GFP-Plasmid transfiziert, so dass transfizierte Zellen am Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden konnten.

### 3.3.7 $\beta$ -Galactosidase Färbung CMV-lacZ transfizierter Zellen

Die transfizierten adhärennten Zellen wurden in der Kulturschale mit PBS bei RT gewaschen und anschließend 5 min bei 25 °C in 0,5 % Glutaraldehyd in PBS fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS bei RT für jeweils 5 min wurden die Zellen bei 37 °C mit X-Gal-Puffer inkubiert, bis durch Spaltung des Substrats X-Gal durch das Enzym  $\beta$ -Galactosidase (codiert durch das lacZ Gen) eine Blaufärbung der Zellen auftrat (ca. 30 min bis  $\text{üN}$ ).

Stammlösungen:    PBS pH 7,4  
                      100 mM Kaliumferricyanid  
                      100 mM Kaliumferrocyanid  
                      X-Gal 40 mg/ml in DMSO

*X-Gal -Puffer:*

1 mg/ml X-Gal  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM Kaliumferricyanid  
5 mM Kaliumferrocyanid  
in PBS pH 7,4

**3.4 Immunologische Methoden****3.4.1 Immunomagnetische Anreicherung von CD34<sup>+</sup> Zellen**

CD34<sup>+</sup> Zellen binden bei dieser Methode an CD34 Antikörper, die kovalent mit paramagnetischen Kügelchen, den Dynabeads, gekoppelt sind.

Mononukleäre Zellen aus Knochenmark wurden im Verhältnis 1:1 mit in Isolierpuffer gewaschenen Dynabeads M-450 CD34 gemischt und 30 min bei 4°C im Probenmischer über Kopf gedreht. Die CD34<sup>+</sup> Zellen wurden von den CD34<sup>-</sup> Zellen durch viermaliges Waschen mit kaltem Isolierpuffer und Trennen mit einem Dynal MPS Magneten separiert. Zur Entfernung der Beads wurden pro 4x10<sup>7</sup> Zellen 100 µl DETACHaBEAD zupipettiert und 15 min bei 37°C mit leichtem Schütteln inkubiert, Anschließend wurden die Zellen durch 3 maliges Waschen mit je 2 ml Isolierpuffer (RT) und Trennen durch den Magneten von den beads isoliert. Die isolierten Zellen wurden mit Isolierpuffer gewaschen, dann weiterverwendet oder bis zur Verwendung bei 4°C in Serum aufbewahrt.

*Isolierpuffer:* 2 % BSA  
0,6 % Citrat  
100 IU/ml P/S  
in PBS pH 7,4

**3.4.2 Antikörper-Markierung von Zellen zum Sorten und zur FACS-Analyse**

Die zu markierenden Zellen wurden in 500 µl PBS aufgenommen und mit 10 µl farbstoffkonjugiertem Antikörper 30 min bei 4°C inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen entfernt, die Zellen in 3 ml PBS oder Medium aufgenommen und zur Entfernung von Zellklumpen durch ein Sieb mit 80 µm Maschenweite gesiebt. Zur Markierung toter Zellen wurde 1 µl Propidiumjodid (PI)-

Puffer (1 mg/ml PI in PBS) zugegeben. Propidiumjodid kann nur durch geschädigte Membranen in die Zellen dringen und bindet dort spezifisch an Nukleinsäuren, bevorzugt an doppelsträngige genomische DNS.

Bei Verwendung nicht markierter Antikörper wurden die Zellen nach dem primären Antikörper noch mit sekundärem farbstoffgebundenen Antikörper in PBS 30 min bei 4 °C inkubiert.

### 3.4.3 Immuno-Färbung von geblotteten Proteinen (Western Blot)

Der Nachweis von geblotteten Proteinen auf Nitrozellulose- oder PVDF Membranen wurde entweder über mit Peroxidase oder alkalischer Phosphatase konjugierte sekundäre Antikörper geführt. Nach dem Blotten wurde die Membran zwei mal 5 min in TBS-T gewaschen und freie Bindungsstellen ca. 1 h mit Blockierungspuffer abgesättigt. Anschließend wurde der Blot 1 h bis über Nacht mit primärem Antikörper in Blockierungspuffer inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimal 5 min Waschen mit TBS-T entfernt und die Membran 1 h mit in Blockierungspuffer verdünntem sekundärem Antikörper inkubiert. Nach erneutem gründlichem Waschen konnten die Proteine durch Zugabe der entsprechenden Substrate durch Chemiluminiszenz oder colorimetrisch nachgewiesen werden. Bei Verwendung von Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpern muss die Inkubation in Abwesenheit von Natrium-Azid erfolgen, da Natrium-Azid die Enzymaktivität inhibieren würde.

*TBS:*                    10    mM    Tris/HCl pH 7,5  
                             150    mM    NaCl

*TBS-T:*                0,05 % w/v    Triton X-100 in TBS

*Blockierungspuffer:* 7     % w/v    Magermilchpulver  
                             0,05 % w/v    Tween 20  
                             0,05 % w/v    NaN<sub>3</sub>  
                             in TBS

### 3.4.3.1 Colorimetrische Detektion

Alkalische Phosphatase (gekoppelt an Antikörper) führt bei Anwesenheit des Substrats BCIP und des Chromogens NBT zur Bildung eines blauen Farbstoffs. Für die Reaktion werden 66 µl NBT (50 mg/ml in 70% Dimethylformamid) und 33 µl BCIP (50 mg/ml in 100% Dimethylformamid) in 10 ml Substratpuffer gemischt und der Blot darin bis zur Farbreaktion inkubiert.

*Substratpuffer:*      100 mM Tris/HCl pH 9,5  
                             100 mM NaCl  
                             5 mM MgCl<sub>2</sub>

Die Reaktion wurde durch Inkubation in PBS pH 7,5 gestoppt.

### 3.4.3.2 Chemiluminiszenz

Peroxidase, gekoppelt an Antikörper, bewirkt bei Zugabe der entsprechenden Substrate ein Reaktion, bei der Licht emittiert wird, so dass ein Film belichtet werden kann. Dazu wurden die Systeme ECL stable und ECL ultra (Firma Pierce) verwendet, welche unterschiedliche Sensitivitäten aufweisen. Das System besteht aus zwei Lösungen (Peroxid und Luminol). Das benötigte Volumen wird vor Gebrauch aus beiden Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt.

### 3.4.4 Wiederverwendung von Immunoblots

Der Blot wurde bis zur Wiederverwendung in Waschpuffer bei 4°C aufbewahrt. Um die Antikörperkomplexe zu entfernen, wurde der Blot 30 min bei 60°C mit sogenanntem „Strip“-Puffer im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-T wurde der Blot zur Kontrolle mit ECL-Lösungen inkubiert und ein Film aufgelegt. Anschließend wurde wieder zweimal 10 min gewaschen und 30 min bis 60 min mit Blockierungspuffer freie Bindungsstellen gesättigt. Dann konnte der Blot von Neuem mit Antikörper inkubiert werden.

*„Strip“- Puffer:*    2 % w/v    SDS  
                             62,5 mM    Tris/HCl pH6,8  
                             100 mM    β-Mercaptoethanol



### 3.4.5 Immunhistologie

Als Methode für Markierungen von Antigen mittels monoklonaler Antikörper aus Zellkulturüberständen wurde die APAAP-Markierung (alkalische Phosphatase, anti-alkalische Phosphatase) als best geeignete Methode ermittelt.

Prinzip:

Nach Bindung des primären Antikörpers an das Antigen wird ein Zweitantikörper (sogenannter „Brücken“-Antikörper; hier anti Ratten IgG) im Überschuß zugegeben, so dass nur einer der Fab-Arme an den ersten Antikörper bindet. Anschließend wird mit einem präformierten löslichen Komplex aus Enzym (zwei Moleküle alkalische Phosphatase) und dagegen gerichtetem Antikörper inkubiert (Enzym-Immunkomplex). Der Antikörper dieses Komplexes muss aus der gleichen Spezies wie der primäre Antikörper stammen, so dass er an den freien Fab-Arm des Erstantikörpers gebunden werden kann. Durch wiederholtes abwechselndes Inkubieren mit „Brücken“-Antikörper und Enzym-Immunkomplex werden weitere Enzymmoleküle an die Antigenbindungsstelle gebunden und somit bei der anschließenden Färbung ein stärkeres Signal erzielt.

#### 3.4.5.1 Einbetten und Schneiden (Paraffinschnitt-Technik)

Zum Austesten der Antikörper auf Schnitten wurden jeweils  $5 \times 10^7$  Zellen in Agar eingebettet und 3 Stunden bei RT in 4 %igem PBS gepufferten Formalin fixiert. Nach dem Fixieren wird überschüssiges Formalin mit Wasser ausgewaschen. Mit einem Einbettautomaten (Hypercenter; Firma Shandon, Frankfurt am Main) wurden die Proben vollautomatisch entwässert und anschließend in Paraffin ausgegossen. Zur immunhistochemischen Beurteilung von Gewebeschnitten wurde auf in Paraffin eingebettetes Archivmaterial aus dem Pathologischen Institut der Universität München zurückgegriffen.

Die Paraffinblöcke wurden vor dem Schneiden mit dem Schlitten-Mikrotom mindestens 30 min oder üN bei  $-20^\circ\text{C}$  gekühlt und die ca. 2-3  $\mu\text{m}$  dicken Schnitte auf Objektträger (SuperFrost) aufgezogen. Die Schnitte wurden üN bei  $52^\circ\text{C}$  im Brutschrank getrocknet.

### 3.4.5.2 Entparaffinieren

Für immunhistologische Färbungen in wässrigem Medium mußten die Schnitte entparaffiniert und in Wasser überführt werden. Dazu wurde das Paraffin durch Inkubation in Xylol gelöst (15-30 min RT). Anschließend wurden die Schnitte jeweils 5 min in absolutem EtOH, 96 % EtOH, 70 % EtOH inkubiert und zuletzt 10 min in H<sub>2</sub>O dest. Überführt oder gewässert. Dabei wurden die Schnitte jeweils durch 4 Küvetten gezogen und in der letzten 5 min inkubiert.

### 3.4.5.3 Andauung

Die Andauung dient der Permeabilisierung von Geweben zum besseren Eindringen der Antikörper sowie der Demaskierung von Antigenen durch Aufbrechen von Formalin-Quervernetzungen, die aufgrund des Fixationsprozesses entstanden sind. Man unterscheidet verschiedene Methoden:

Zum Andauen der Schnitte in der Mikrowelle wurden Citratpuffer sowie TRS (Target Retrieval Solution) (pH 6,1), TRS (pH 9,0), Glyca Antigen Retrieval (ein Andauer auf Glycin Basis mit niedrigem pH) und ProTexII Antigenverstärker (jeweils in H<sub>2</sub>O dest. auf einfache Konzentration verdünnt) verwendet. Die Schnitte wurden in Kunststoff-Küvetten mit Deckel in der entsprechenden Lösung zusammen mit Siedeperlen 15 min in der Mikrowelle (MW) bei 800 W gekocht. Nach dem Kochen läßt man die Küvetten 20 min bei RT mit offenem Deckel abkühlen und ersetzt eventuell verdunstete Andauerlösung.

*Zitratpuffer:* 9 ml Stammlsg. A (10,5 g Zitronensäure auf 500 ml H<sub>2</sub>O dest.)  
41 ml Stammlsg. B (14,7g Na-Zitrat auf 500 ml H<sub>2</sub>O dest.)  
450 ml H<sub>2</sub>O dest.

Zur enzymatischen Andauung wurden Protease XXIV und Pronase E (ein Gemisch aus verschiedenen Proteasen) jeweils als 0,1 %ige Lösung in TBS-Puffer pH 7,5 verwendet. Mit Protease XXIV wurden die Schnitte in der feuchten Kammer 30 min bei RT inkubiert, mit Pronase E erfolgte die Inkubation 30 min bei 37°C in der feuchten Kammer, wobei die Objektträger mit Parafilm oder Deckgläsern bedeckt wurden.

Mit Saponin (0,05% in H<sub>2</sub>O) wurden die Schnitte 30 min bei RT in einer Standkuvette inkubiert.

Nach dem Andauen wurden die Proben zweimal 5 min in TBS pH 7,5 gewaschen.

*TBS-Puffer:*           4,5 g     Trisbase  
                  34,25 g    TrizmaHCL  
                  43,9 g     NaCl  
                  H<sub>2</sub>O bidest. ad 1 l; pH 7,5 mit HCl

#### 3.4.5.4 Inkubation mit primärem Antikörper

Verschiedene Antikörperverdünnungen wurden in selbst hergestelltem Verdünnungsmedium (siehe unten) oder DAKO Verdünnungsmedium angesetzt. Auf die Schnitte wurden mindestens 100 µl primärer Antikörperverdünnung verteilt, mit Parafilm oder Deckglas abgedeckt und üN (=22h) bei 4°C in einer feuchten Kammer mit Deckel inkubiert. Zur Verstärkung des Signals wurden die Schnitte noch eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch zweimal 5 min waschen in Tris-Brij35 (senkt die Oberflächenspannung) entfernt.

*Verdünnungsmedium:*   25 ml inaktiviertes Rinderserum, FCS  
                              25 ml RPMI ohne Glutamin  
                              225 ml H<sub>2</sub>O bidest.  
                              0,25 g Na-Azid  
                              pH 7,4  
                              bei 4°C aufbewahren

*TBS-Brij35:*           5 ml Brij-Verdünnung (60 ml TBS-Puffer, 20 ml Brij-Konzentrat 30 %)  
                              auf 5l TBS-Puffer

#### 3.4.5.5 APAAP-Markierung

„Brücken“-Antikörper und Komplex wurden mit Verdünnungsmedium angesetzt. Die Schnitte sollten bei der Markierung immer mit mindestens 100 µl Flüssigkeit bedeckt sein.

Zuerst wurden die Schnitte mit 100 µl „Brücken“-Antikörper 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der nicht gebundene Zweit-Antikörper durch zweimal 5 min

spülen in TBS-Brij entfernt. Als nächstes wurde der Komplex aufpipettiert und wiederum 30 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBS-Brij für zwei mal 5 min wurden diese beiden Schritte noch zweimal wiederholt, allerdings mit Inkubationszeiten von 10 min.

*„Brücken“-Antikörper anti Ratte IgG 1:50:*

- 7 ml Verdünnungsmedium (siehe 3.4.5.4.)
- 1 ml humanes Serum (Sigma); 2 h bei 60 °C inaktiviert, bei –20 °C lagern
- 160 µl anti Ratte Immunglobuline

*Komplex 1:50:*

- 8 ml Verdünnungsmedium (siehe 3.4.5.4.)
- 160 µl APAAP-Ratte

APAAP Färbung:

Durch das Enzym Alkalische Phosphatase der Enzym-Immunkomplexe wird das Substrat Naphtholphosphatester zu Phenolkomponenten und Phosphaten hydrolysiert. Die Phenole reagieren mit einem Chromogen zu einem roten unlöslichen Azofarbstoff.

Die Färbung der Schnitte erfolgte mit Fast Red für 10 min. Dazu wurden die Fast Red Tabletten (enthalten Naphtolphosphat, Levamisol und Puffer) laut Vorschrift in H<sub>2</sub>O bidest. vollständig gelöst und mindestens 100 µl auf jeden Schnitt gegeben. In den Tabletten ist auch Levamisol zur Blockierung endogener alkalischer Phosphatase Aktivität enthalten. Die Schnitte wurden 10 min fließend gewässert, um überschüssigen Farbstoff auszuwaschen. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hämalaun gegengefärbt und erneut 10 min fließend gewässert. Durch dieses sogenannte „Bläuen“ wird die Färbung des Hämalauns intensiviert. Die fertigen Schnitte wurden mit Glycerin-Gelatine eingedeckt. Die so gefärbten Schnittpräparate wurden anschließend mit einem Zeiss Mikroskop (Axioskop) durchmustert und semiquantitativ beurteilt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klonierung eines 1581 bp-Fragments der extrazellulären Domäne des humanen Notch 1 Rezeptors zur rekombinanten Proteinexpression

Aus der Literatur war bereits durch „RNase protection assays“ bekannt, dass in Jurkat Zellen Notch 1 transkribiert wird (Ellisen *et al.*, 1991). Über RT-PCR sollte daher aus Jurkat RNS die cDNS eines Teils der extrazellulären Domäne des humanen Notch 1 Rezeptors amplifiziert werden.

#### 4.1.1 Vorüberlegungen zur RT-PCR von Notch mRNS

Bei der Wahl der Primer für die reverse Transkription und anschließende PCR waren folgende Besonderheiten des Notch Rezeptors zu berücksichtigen: Zum einen ist die zu erwartende Notch cDNS mit 7332 bp (genbank AC M73980) relativ lang, so dass bei Verwendung eines poly-dT Primers die Gefahr besteht, dass die cDNS Synthese nicht bis zum gewünschten extrazellulären Bereich erfolgt. Ferner sollte die Synthese von cDNS von Notch-Homologen vermieden werden, um Kreuzreaktionen bei der darauffolgenden PCR zu verhindern. Weiter besteht der extrazelluläre Bereich von Notch unter anderem aus 36 EGF- (epidermal growth factor) ähnlichen Domänen. Dabei handelt es sich um konservierte ca. 40 As enthaltene cysteinreiche Abschnitte, die Disulfidbrücken bilden und auch auf anderen Genen, z.B. Zytokinen, vorkommen. Um daher Probleme mit anderen EGF-Bereiche enthaltenden Genen bei der PCR auszuschließen und um oben genannte Probleme zu vermeiden, wurde für die reverse Transkription auf einen poly-dT Primer verzichtet und ein für Notch 1 spezifischer Primer 3tan2 gewählt, der im Abstand von 261 bp von der Transmembranregion (bp 5209-5271) im intrazellulären Teil (bp 5533-5545) bindet. Aufgrund der besonderen Struktur des extrazellulären Bereichs von Notch fiel die Wahl zur weiteren Amplifikation mittels PCR auf einen Abschnitt, der nur einen Teil der konservierten EGF-Wiederholungen einschließt, sowie die Lin-12/Notch (LNR) Motive und die dazwischen liegenden nicht konservierten Sequenzbereiche (siehe Abb. 9). Damit sollte das Risiko vermindert werden, Teile anderer Notch-Rezeptoren zu amplifizieren. Dafür wurden die Notch Primer 5tan1-1, welcher in der Sequenz liegt, die für As 1142 codiert (entspricht der 29. EGF-Wiederholung) und 3tan6

verwendet, der beim Codon für As 1668 bindet, das sich zwischen der Transmembran Region und dem Beginn der konservierten LNR Bereiche befindet.

```

hNotch1      GIHCENNTPDCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYCQHVVN-ECDSRPCLLGGT 1036
hNotch2      GVHCENNINECTESSCFNGGTCVDGINSFSLCPVGTGSEFLHEIN-ECSSHPCLNEG 1039
hNotch3      GFHCEQDLPCDPSSECFNGGTCVDGVNSFSLCRPGYTGAHCQHEAD-PCLSRPCLHGGV 976
hNotch4      -----CFNGGTCVNRPGTFSCLCAMGFQGRCEGKLRPSCADSPCRNRAT 820
                *****: .:*.*** *: *. * * * . ** ..
    
```

```

hNotch1      CQDGRGLHRCTCPQGYTGPNCQNLVHWCDS SPCKNNGGKCWQHTHTQYRCECPSGWTGLYCD 1096
hNotch2      CVDGLGTYRCSPLGYTGKNCQTLVNLCSRSFCKNKGTCVQKKAESQCLCPSGWAGAYCD 1099
hNotch3      CSAAHPGFRCTCLESFTGPGCQTLVDWCSRQPCQNGGRCVQTG--AYCLCPPGWSGRLCD 1034
hNotch4      CQDSPQGRCLCPTGYTGGSCQTLMDLCAQKPCPRNSHCLQTGSPSFHCLCLQGWGTGPLCN 880
                * . ** * .:**.***.:. * .** . . * *, * * **: * *:
    
```

```

hNotch1      VPSVSEVAAQRQGVDFVARLCQHGGCLVDAGNTHHCRCQAGYTGSYCEDLVDECSPPSPCQ 1156
hNotch2      VPNVSCDIAASRRGVLEHLCQHSVCINAGNTHYCQCPLGYTGSYCEEQLDECASNPCQ 1159
hNotch3      IRSLPCREAAAQIGVRLQQLCQAGGQCVDDESSHYCVCPEGRTGSHCEQEVDPCLAQPCQ 1094
hNotch4      LPLSSCQKAALSQGIDVSSLCHNGGLCVDSGPSYFCHCPPGFQGSCLQDHNVPCESRPCQ 940
                : . * ** *: : **: . * *:: . :. * * * ** *:: : : * . ***
    
```

```

hNotch1      NGATCTDYLGGSCKCVAGYHGVNCSEEIDECLSHPCQNGGTCLDLNPNTYKCS CPRGTQG 1216
hNotch2      HGATCSDFIGGRCECVPGYQGVNCEYEVDECQNQPCQNGGTCIDLNVHFKCSCPPGTRG 1219
hNotch3      HGGTCRGMGGYMCECLPGYNGDNCEDDVECASQPCQHGGSCLDLVARYLCS CPPGTLG 1154
hNotch4      NGATCMAQPSGYLQCAPGYDGNCSKELDACQSQPCHN----- 979
                :*.** .** *:* **. * ** . ::* * .:***:
    
```

```

hNotch1      VHCEINVDDCNPPVDPVSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPPGFVGERCEGDVNECLSNP 1276
hNotch2      LLCEENIDDC-----ARGPHCLNGGQCMDRIGGYSCRCLPGFAGERCEGDINECLSNP 1272
hNotch3      VLCEINEDDCGPG-PPLDSGPRCLHNGTCVDLVGGFRCTCPPGYTGLRCEADINECRSGA 1213
hNotch4      -----HGTCTPKPGGFHCACPPGFVGLRCEGDVDECLDQP 1014
                * * **: * * **:. * **.*:*** . .
    
```

```

hNotch1      CDARGTQNCVQRVN-DFHCECRAGHTGRRCESVINGCKGKPKNGGTCAVASNTARG--F 1333
hNotch2      CSSEGLDLCIQLTN-DYLCVCRSAFTGRHCETFVDVCPQMPCLNGGTCAVASNMPDG--F 1329
hNotch3      CHAAHTRDCLQDPGGFRCLCHAGFSGPRCQTVLSPCESQPCQHGQCRPSPGPGGGLTF 1273
hNotch4      CHPTGTAACHSLAN-AFYCQCLPGHTGQWCEVEIDPCHSQPCFHGGTCEATAGSPLG--F 1071
                * . : * . . : * * ...:* *: :. * ** :** * :.. * *
    
```

```

hNotch1      ICKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTCISGPRS---PTCLCLGPFPTGPECQFPASS 1390
hNotch2      ICRCPPGFSGARCQS---SCGQVKCRKGEQCVHTASG---PRCFPCSPRD---CESGCAS 1380
hNotch3      TCHCAQPFWGP RCERVARSCRELQCPVGVPCQQTTPRG---PRCACPPGLSGPSCRSPFGS 1330
hNotch4      ICHCPKGFEGPTCSHRAPSCGFHHCHHGGCLPSPKPGFPPRCACLSGYGGPDCLTPPAP 1131
                *:*. * *. * . :* :* * * . * * * * * ..
    
```

```

hNotch1      P-----CLGGNPCYNQGTCEPTS--ESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFSGGAGRDIP 1442
hNotch2      -----SPCQHGGSCHPQR--QPPYYSQCAPPFSGSRCELYT-----AP 1417
hNotch3      PPGASNASC AAAPCLHGGSCRAP--LAPFFRCACAQGWGTGRCEAPA-----AAP 1379
hNotch4      KG-----CGPPSPCLYNGSCSETTLGGPGFRCSCHSPGPRCQKPG----- 1174
                ** *:* * : * * . * * .
    
```

hNotch1	PPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFS	1502
hNotch2	PSTPPATCLSQYCADKARDGVCDEACNSHACQWDGGDCSLTMENPWANCSSPLPCWDYIN	1477
hNotch3	EVSEEPRCPraACQAKRGDQRCDRECNSPGCGWDGGDCSLSVGDPWRQC-EALQCWRLFN	1438
hNotch4	-----AKGCEGRSGDGACDAGCSGPGGNWDGGDCSLGVPDPWKGCP SHSRCWLLFR	1225
	* : * . * . . ***** . : ** * . ** :	
hNotch1	DGHCDSDQCNsAGCLFDGFDcQRA--EGQCnPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGL	1560
hNotch2	N-QCDELcNTVECLFDNFECQGN--SKTCK--YDKYCADHFkDNHCNQCNSSEECGWDGL	1532
hNotch3	NSRCDPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEKYCADHFADGRCDQGCNTEECGWDGL	1498
hNotch4	DGQCHPQCDSEECCLFDGYDCETP---PACTPAYDQYCHDHFHNGHCEKGCNTAECGWDGG	1282
	: : * . * . : ** : * . : * . * * * : : * : * * * : * * * *	
hNotch1	DCAEHVPERLAAGTLVVVVLMpPEQLRNSSFFHLRELSRVLHTNVVFKRDAHGQQMIFPY	1620
hNotch2	DCAADQPENLAEGTLVIVVLMpPEQLLQDARSFLRALGTLTLLHTNLRIKRDSQGELMVYPY	1592
hNotch3	DCASEVPALLARGVlVLTvLLPPEELLRSSADFLQRLSAI LRTSLRFRLDAGHQAMVFPY	1558
hNotch4	DCRPEDGDPEWGPslALLVVLSPpALDQQLFALARVLSLTLRVGLWVRKDRDGRDMVYPY	1342
	** . * . : * : * . * . . : : * . * : * . : : * . * : * * :	
hNotch1	YGREEELRKHP IKRAAEGWAAPDALLGQVKASLLP GGSEGGRRRRELDpMDVRGSIVYLE	1680
hNotch2	YGEKSAAMK-----QRMTRRSLPGEQE-----QEVAGSKVFLE	1626
hNotch3	HRPSPGSEPR-----ARRELAP-----EVIGSVVMLE	1585
hNotch4	PGARAEKLG-----TRDPTYQERAAPQTQPLGKET-----DSLsAGFVVVMG	1386
	* * * :	
hNotch1	IDNRQCVQ--ASSQCFQsATDVAaFLGALASLGSLN--IPYKIEAVQSEtVEPPPPAQLH	1736
hNotch2	IDNRQCVQ--DSDHCFKNTDAAAALLASHAIQGTLS--YP--LVSVVSESLTP---ERTQ	1677
hNotch3	IDNRLCLQSPENDHCFpDAQSAADYLGA LS AVERLD--FPYPLRDVRGEPLEPPE-PSVP	1642
hNotch4	VDLSRCGPDPHPASRCpWDPGLLLRF LAAMA AVGALEPLLPGLLAVHPhAGTAPPANQLP	1446
	: * * . : * . . * : : * . * : * . . .	
hNotch1	FMVYAAAaFVLLFFVG--CGVLLSRKRRRQHqQLWfPEGFkVS-EASKKK--RREPLGE	1790
hNotch2	LLYLLAVAVVIlFI I---LLGVIMAKRKRKHGSLWLPegFTLRRDASNHK--RREPVGQ	1732
hNotch3	LLPLLVAGAVLLLVIL---VLGVMVARRKREHSTLWfPEGFSLHKDVASGHKGRREPVGQ	1699
hNotch4	WPVLCSPVAGVILLALGALLVLQLIRRRRREHGALWLPpGFTRRPRTQsAPHRRRPPLGE	1506
	: : : . : : * : * . * * * * . . . * * * * :	

**Abb. 9: Ausschnitt des Alignments der humanen Proteine Notch1-4:**

Farbig dargestellt ist der zur rekombinanten Expression amplifizierte Notch 1 Bereich.

Extrazelluläre Domäne: As 19-1736; intrazelluläre Domäne: ab As 1755

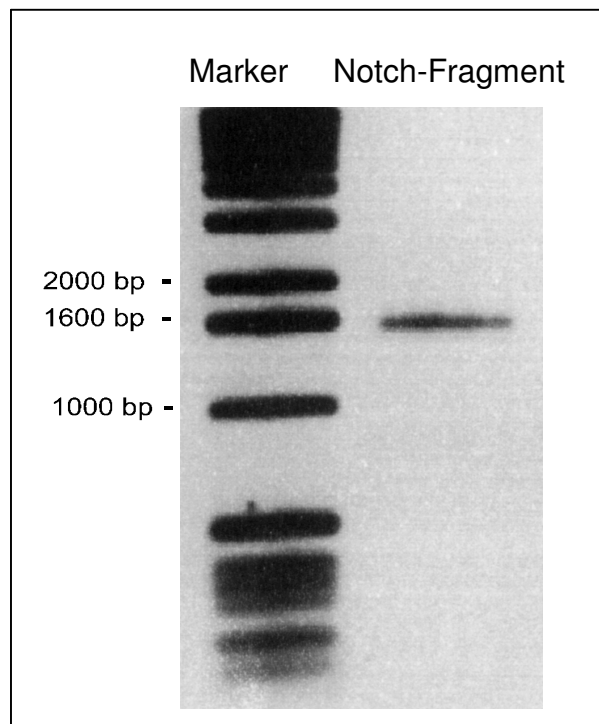
rot: S1 Spaltung durch Furin ähnliche Protease As 1665/1666

blau: Transmembrandomäne 1737-57

grün: S2 Spaltung: zwischen Ala und Val: Entstehung von NEXT (Notch extracellular truncation)

rosa: S3 Spaltung: zwischen Gly-1754 and Val-1755; Freisetzung der intrazellulären Domäne

Über RT-PCR wurde erfolgreich mit den Primern 5tan1-1 und 3tan6 ein 1618 bp Fragment (bp 3423- bp 5040) amplifiziert (siehe Abb. 10).



**Abb. 10: Amplifikation von Notch über RT-PCR**

RT-PCR von Jurkat cDNS (RT-Primer 3tan2) mit hNotch1 Primern 5tan1-1 und 3tan6

Zur Verifizierung des PCR-Produkts wurde das Amplifikat über TA-Klonierung in den Vektor pGEM-T kloniert und durch Sequenzierung (Firma Toplab, Martinsried) bestätigt, dass tatsächlich cDNS mit der Sequenz des humanen Notch 1 Rezeptors (siehe Anhang) amplifiziert worden war.

#### 4.1.2 Klonierung

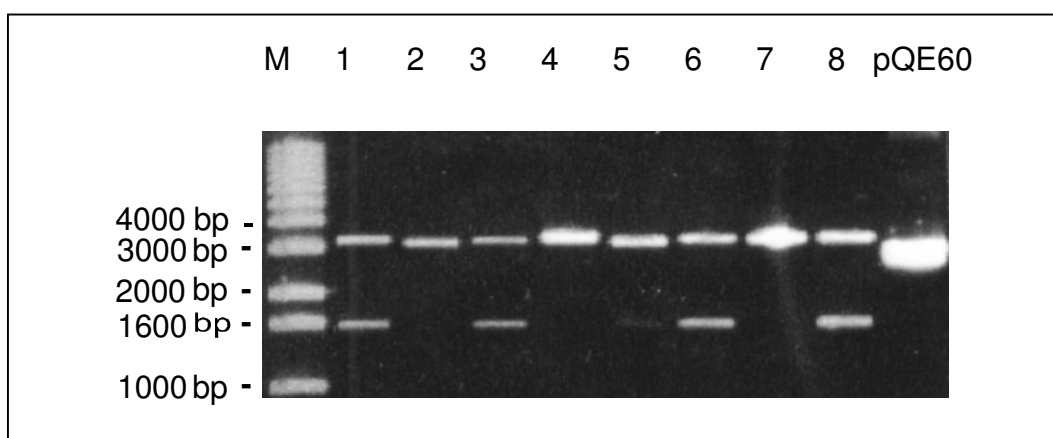
Zur Klonierung in den bakteriellen Expressionsvektor pQE60 über die Schnittstellen Nco I am N-Terminus und Bgl II am C-terminalen Ende mit C-terminalem 6xHis Anhang wurden mit den Klonierungsprimern 5KF1 und 3KF2 die entsprechenden Schnittstellen eingefügt. Zusätzlich wiesen die Primer einen Überhang von 6 bp auf, um eine größere Effizienz der Restriktionsenzyme zu erreichen. Mit diesen Primern



konnte ein 1581 bp Fragment amplifiziert werden (zwischen bp 3424 und bp 5004 von Notch 1), das 527 As entspricht.

Die PCR-Fragmente wurden vor Beginn der Klonierungsarbeiten ansequenziert und nacheinander mit den Enzymen Nco I und Bgl II verdaut. Zur Vorbereitung für die Klonierung wurde der Expressionsvektor pQE60 ebenfalls mit den Restriktionsenzymen Bgl II und Nco I geschnitten. Die erfolgreiche Linearisierung des Vektors wurde über Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Um unspezifische Religation des Vektors zu vermeiden (zum Beispiel im Falle von unvollständig, also mit nur einem Enzym geschnittener Vektor-DNS) wurde im Vorversuch ein Aliquot mit Phosphatase behandelt und das andere ohne vorausgehende Dephosphorylierung ligiert. Die Kontrollreligation von Phosphatase behandeltem Vektor lieferte eine Kolonie im Vergleich zu unbehandeltem Vektor, bei dem 100 Kolonien wuchsen. Der Ligationsansatz mit Notch Fragment erbrachte ohne Phosphatase Behandlung des Zielvektors ca. 130 Kolonien, mit Phosphatase Behandlung dagegen nur 8 Kolonien.

Aus diesen 8 Klonen wurde Plasmid DNS präpariert und die Richtigkeit der Inserts durch Verdau mit den Enzymen EcoR I und Hind III geprüft. Bei richtiger Identität der Inserts betrug die Größe der erwarteten Fragmente 1,6 und 3,3 kb (siehe Abb. 11). 5 der 8 Klone zeigten das erwartete Bandenmuster. Zum Vergleich wurde auf das Gel ungeschnittener Vektor aufgetragen.



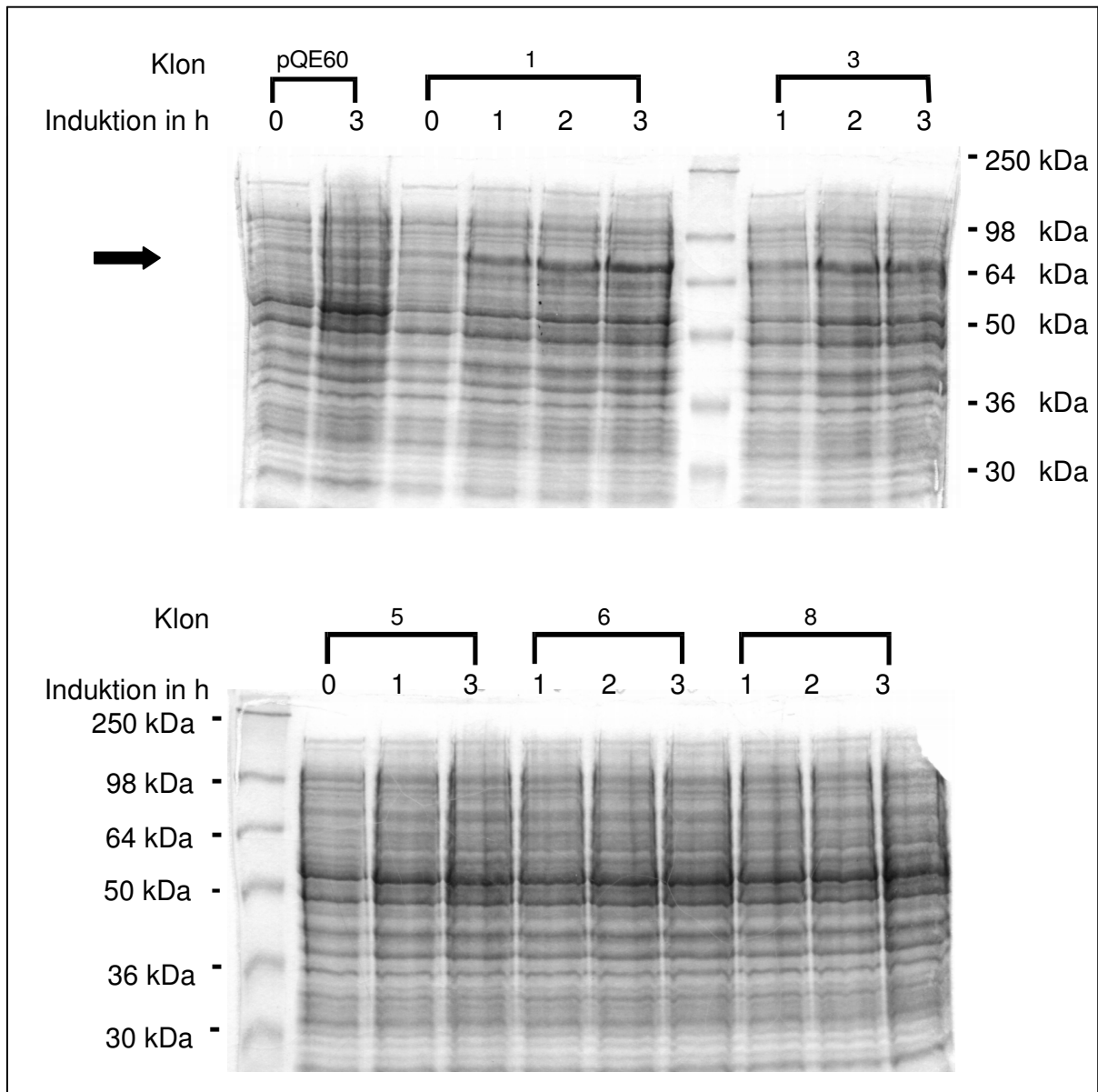
**Abb. 11: Restriktionsverau zur Analyse der Klonierung**

Restriktionsverdau der Plasmid DNS mit EcoR I und Hind III nach Ligation des PCR-Produkts in pQE60. Klone Nr. 1,3,5,6,8 zeigen die erwarteten Banden bei 1,6 und 3,3 kb.

M. Marker; pQE60: ungeschnittener Vektor

## 4.2 Proteinexpression

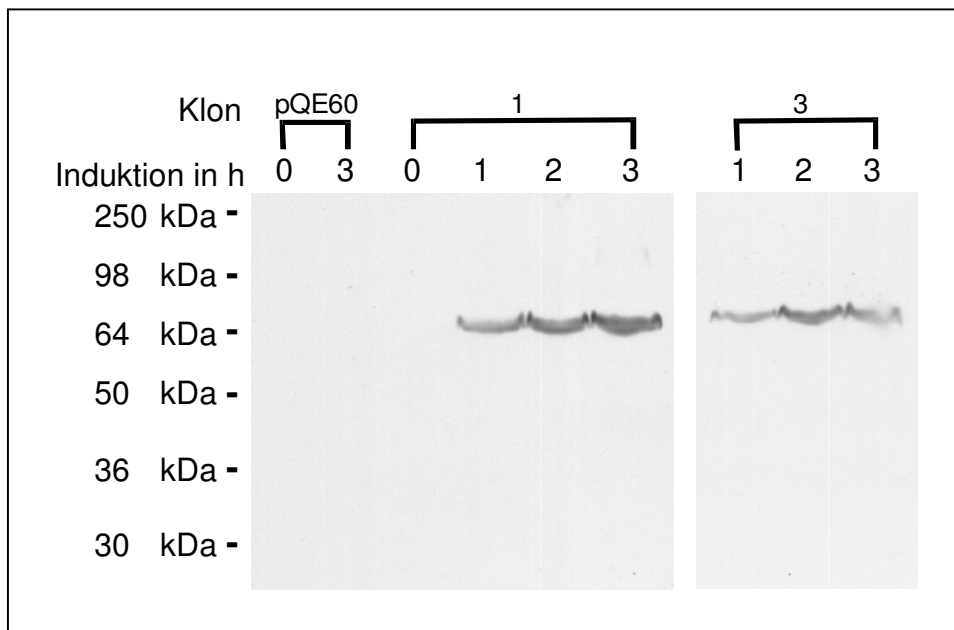
Zur Proteinexpression wurden Bakterien des Stammes M15[pREP4] mit Plasmid DNS der positiven Klone und zur Kontrolle mit leerem Vektor transformiert und die Proteinexpression durch 1mM IPTG im Medium 3 Stunden lang induziert (siehe Abb. 12). Bei Klon 1 und 3 war im Commassie gefärbten Gel von Gesamt-Zellextrakten nach einer Stunde Induktion bereits die verstärkte Expression eines Proteins mit einem Molekulargewicht zwischen 64 und 98 kDa sichtbar. Das rekombinante Protein von 527 AS sollte ein Molekulargewicht mit den 6 Histidinen von ca. 58 kDa haben. Die Kalkulation des Molekulargewichts mit ExPASy ((Expert Protein Analysis System) Proteomics Server of the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) (<http://expasy.cbr.nrc.ca/>)) ergibt ein MW von 57 kDa +His=58 kDa. Laut dem Hersteller Qiagen ist es nicht ungewöhnlich, dass 6xHis-Tag Proteine im SDS Gel langsamer laufen als erwartet.



**Abb.12: Test-Expression verschiedener Klone**

Coomassie gefärbtes Gel: *E.coli* Extrakte von verschiedenen Klonen vor und nach Induktion der Proteinsynthese zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Klone 1 und 3 exprimieren nach Induktion vermehrt ein ca. 70 kDa Protein (Pfeil).

Zum Nachweis, dass es sich bei dem im Coomassie gefärbten Gel tatsächlich um das rekombinante Notch-His Fusionsprotein handelt, wurde von den induzierten Klonen ein Western Blot angefertigt und das rekombinante Protein mit einem anti-His Antikörper detektiert (siehe Abb. 13). Dazu wurde der His -Ak 1:10 verdünnt auf eine Konzentration von ca.1 µg/ml. Der sekundäre Antikörper wurde 1:10.000 verdünnt. Der Nachweis erfolgte mittels Chemilumineszenz (ECL).



**Abb. 13: Nachweis der Expression von rekombinantem Notch-HIS Protein im Western Blot mit anti-His Ak**

Proteinexpression der Klone 1 und 3 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion. Als Negativkontrolle dienten mit leerem Vektor pQE60 transformierte Bakterien .

Die Ergebnisse von Coomassie-Gel und Western Blot stimmen überein: Klon 1 und 3 exprimieren nach Induktion das rekombinante Notch Protein.

Mit der Plasmid DNS der Klone F1 und F3 wurden nochmals Bakterien transformiert und einzelne Klone gepickt und induziert, um den Klon mit der stärksten Expression zu finden.

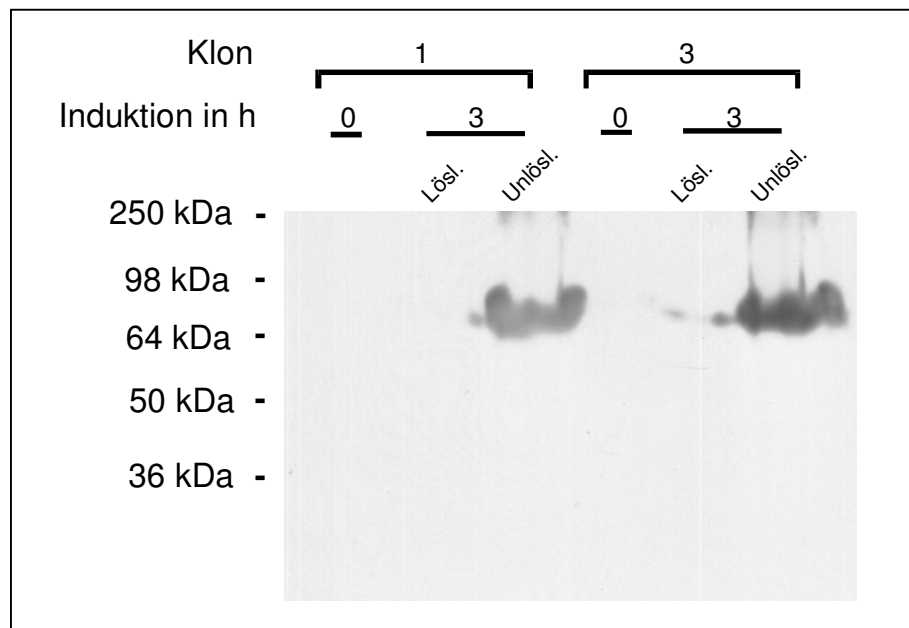
#### 4.2.1 Test auf Löslichkeit

Um eine geeignete Methode zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins wählen zu können, wurde erst die Löslichkeit des rekombinanten Proteins untersucht.

Dazu wurde als Starterkultur eine üN-Kultur der Bakterien angesetzt und am nächsten Morgen mit Medium verdünnt. Für optimales Bakterienwachstum erwies sich ein Ansatz der Übernachtskultur im Verhältnis 2:50 günstiger, als die im Protokoll (Qiagen) angegebenen 1:50.

Die Gesamt-Zellextrakte wurden nach Induktion der Proteinexpression in eine lösliche und unlösliche Fraktion geteilt und das rekombinante Protein im Western

Blot nachgewiesen (siehe Abb. 14). Es zeigte sich, dass das Protein tatsächlich nur nach Induktion exprimiert wird und überwiegend in der unlöslichen Fraktion der Klone 1-5 sowie 3-1 vorkommt.



**Abb. 14: Western Blot mit anti-His Ak**

Das rekombinante Notch 1 Protein findet sich in der unlöslichen Fraktion der *E. coli* Extrakte.

#### 4.2.2 Optimierung der Proteinreinigung

Die Reinigung des rekombinanten Notch 1 Proteins wurde mit dem Ni-NTA Spin Kit und in größerem Maßstab im „batch“ nach dem Herstellerprotokoll (Qiagen) zur Reinigung unlöslicher Proteine unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bei Befolgung des Standardprotokolls, nämlich Solubilisierung mit Guanidinhydrochlorid (Puffer A) oder Harnstoff (Puffer B), Waschen mit den angegebenen Volumina der Puffer A, B, C, und Elution mit Puffer D und E, das rekombinante Notch-His Protein unvollständig an das Säulenmaterial gebunden hatte, und in Puffer E nur mit starken Verunreinigungen und nicht vollständig eluierte.

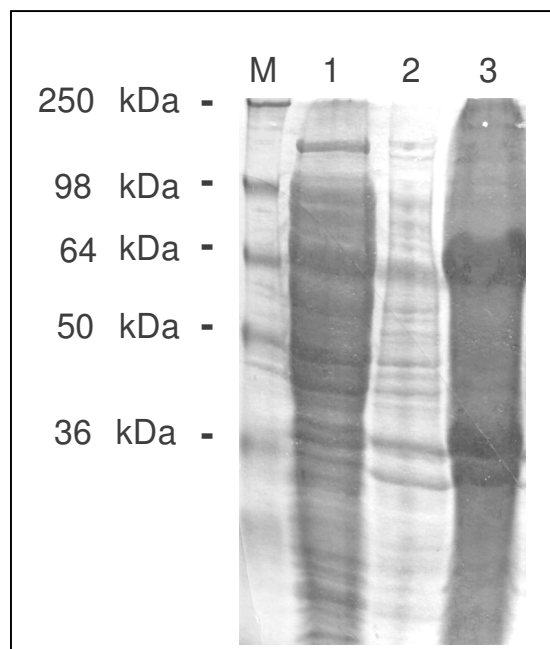
Die Proteinlöslichkeit ließ sich auch durch Reduktion der Anzuchttemperatur der Bakterien auf 30°C und damit einhergehende Verringerung des Expressionslevels nicht erhöhen. Auch die Zugabe von 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol in die Puffer zur Unterdrückung von unspezifischen Disulfid-Bindungen mit bakteriellen Proteinen konnte die Reinigung nicht verbessern.

Da mit keiner dieser Modifikationen eine zufriedenstellende Ausbeute an rekombinantem Protein erzielt werden konnte und das Protein offenbar in Form von zytoplasmatischen „inclusion bodies“ („Einschlusskörperchen“) in den Bakterien vorlag, wurden diese direkt isoliert.

#### 4.2.3 Präparation der „inclusion bodies“

Die induzierten, pelletierten Bakterien wurden nach Protokoll (aus Maniatis) lysiert und dann mit unterschiedlichen Methoden weiterverarbeitet. Bei der einen Methode (A) werden die inclusion bodies mit Triton-X-haltigem Puffer gewaschen, bzw. versucht zu solubilisieren (siehe Abb. 15). Bei der zweiten Methode (B) werden unterschiedliche Konzentrationen Harnstoff eingesetzt (siehe Abb. 16). Man erkennt deutlich, dass die größte Menge an rekombinantem Protein im Pellet, also als inclusion bodies, vorliegt. Durch direkte Präparation der inclusion bodies konnte die Ausbeute an rekombinantem Protein stark angereichert werden.

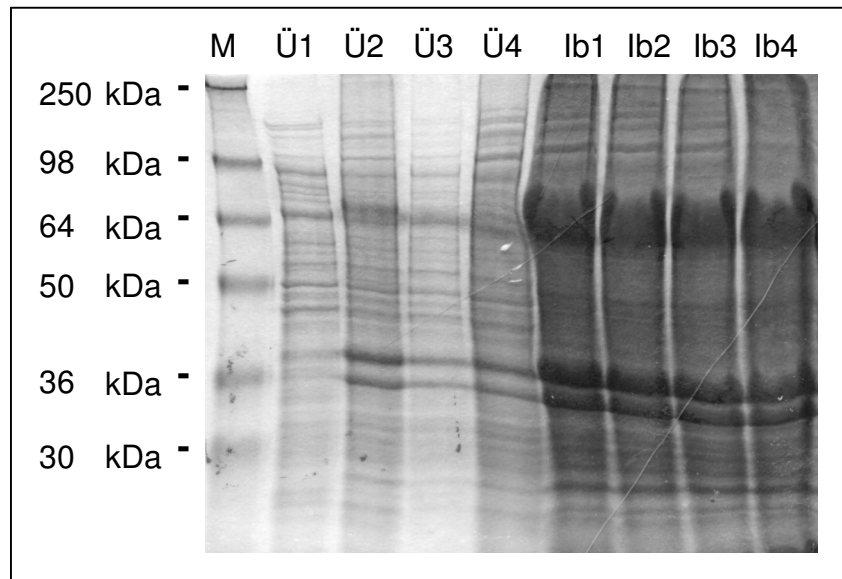
Proben: Methode A:



**Abb. 15: Reinigung der inclusion bodies nach Methode A**

Coomassie gefärbtes Proteingel: M: Marker; 1: Überstand nach Bakterien-Lyse; 2: Überstand nach Resuspendierung (Waschen) des Pellets; 3: Inclusion bodies

Bei Methode B ergibt sich das gleiche Resultat: Unabhängig von der eingesetzten Harnstoffkonzentration wird eine starke Anreicherung des rekombinanten Notch-His Proteins erreicht.



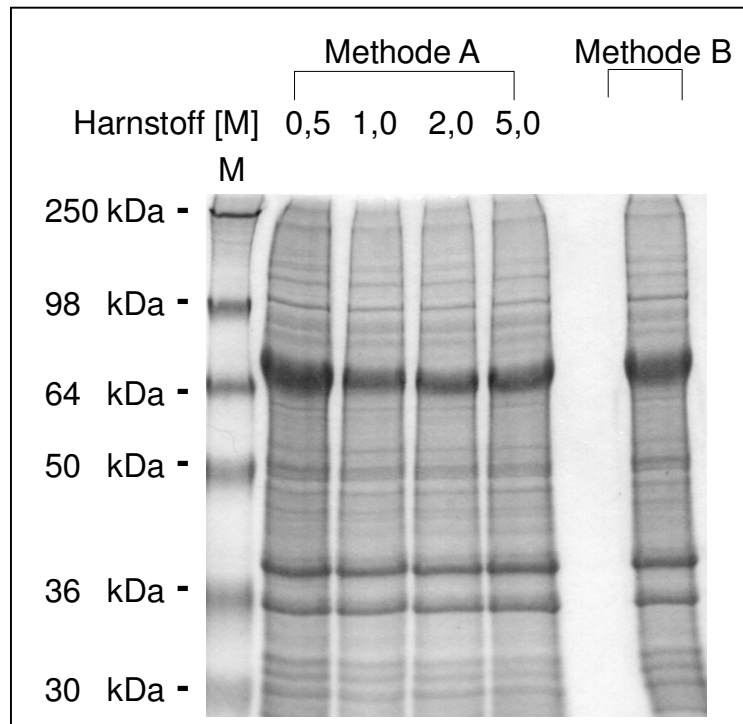
**Abb. 16: Präparation der inclusion bodies (Ib) nach Methode B**

Coomassie gefärbtes Proteingel: Überstände (Ü1-Ü4) nach Aufnahme der Pellets in Puffer mit unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen. Ib: Mit unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen re-suspendierte Pellets

Die inclusion bodies ließen sich mit Harnstoff nicht solubilisieren und auch nicht signifikant unterschiedlich reinigen.

Beide Methoden erwiesen sich als geeignet und es zeigte sich kein bedeutsamer Unterschied bei der Verwendung unterschiedlicher Harnstoffmolaritäten.

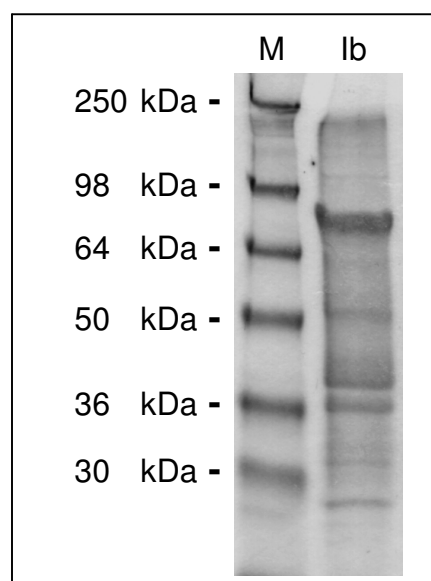
Zum Vergleich wurde noch einmal je 1µl jeder Präparation auf ein Gel aufgetragen und Coomassie gefärbt (siehe Abb. 17).



**Abb. 17: Vergleich der präparierten Inclusion bodies**

Methode A mit unterschiedlichen Konzentrationen Harnstoff und Methode B

Das nach Methode B isolierte Protein wurde noch einmal mit 5M Harnstoff gewaschen (siehe Abb. 18) und zur Immunisierung von Ratten zur Gewinnung monoklonaler Antikörper (durchgeführt von Frau Dr. Kremmer, GSF, München) verwendet.



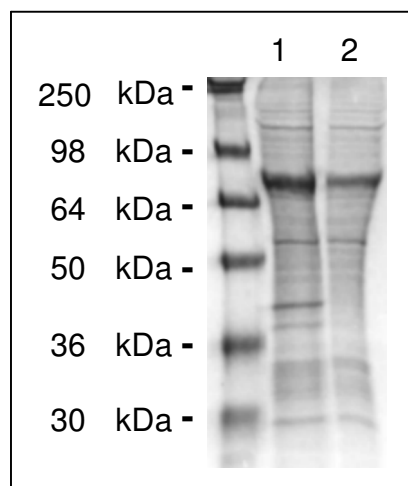
**Abb. 18: Inclusion bodies zur Immunisierung von Ratten**

Mit 5 M Harnstoff gewaschene „inclusion bodies“ nach Methode B zur Immunisierung von Ratten



Die Tatsache, dass bei der direkten Präparation der Einschlusskörperchen zwar rekombinantes Protein in ausreichender Menge erhalten wurde, dieses aber auch mit bakteriellen Proteinen verunreinigt war, wurde in Kauf genommen. Antikörper gegen bakterielle Proteine sollten dann beim Testen der Spezifität aussortiert werden.

Beim ersten Austesten der monoklonalen Antikörper (Dr. Kremmer, GSF) mittels ELISA trat das Problem auf, dass die „inclusion bodies“ nicht an ELISA Platten hafteten. Daher wurde mit 8M Harnstoffpuffer versucht, sie wenigstens teilweise zu solubilisieren. Ca. 1g Pellet wurde dazu in 30 ml Puffer B (ohne Tris, mit Mercaptoethanol) resuspendiert, 5h unter Rollen inkubiert und anschließend 5 min mit 3.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, der gelöstes Protein enthalten soll, wurde zum Entfernen des Harnstoffs gegen PBS dialysiert. Danach war das Protein flockig ausgefallen. Davon wurde eine Probe abgenommen, 10 min bei 10.000 g zentrifugiert, und 20 µl auf ein Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt (siehe Abb. 19).



**Abb. 19: Rekombinantes Protein nach Solubilisierungsversuch und Dialyse**

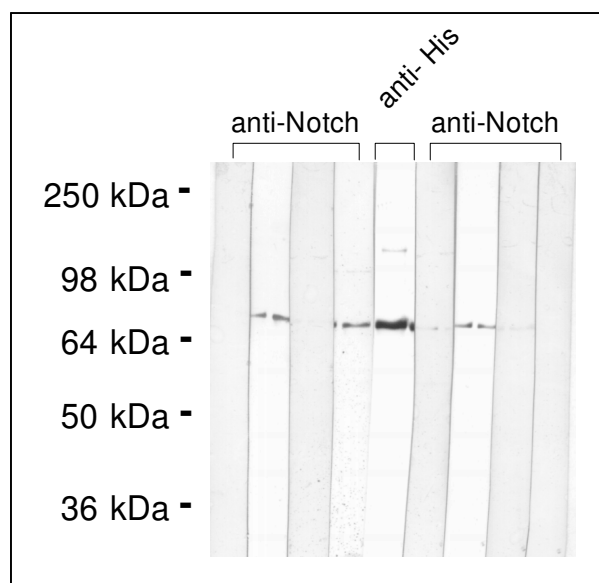
1: abzentrifugierte „inclusion bodies“ nach Dialyse

2: Überstand der „inclusion bodies“ nach Dialyse

Das so erhaltene Protein band an die ELISA-Platten.

#### 4.2.4 Test der Antikörper

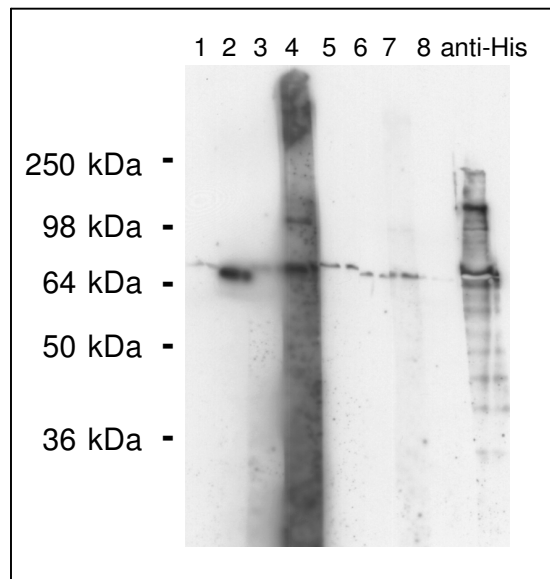
Aus der ersten Immunisierung wurden 8 monoklonale Antikörper (EZF 1-8) erhalten und gegen das rekombinante Notch-His Protein getestet (siehe Abb. 20). Der Nachweis erfolgte colorimetrisch im Western Blot und zeigte bei dieser Methode eine Bande bei 3 Antikörpern. Zur Verifizierung der richtigen Proteingröße wurde das Protein mit einem anti-HIS Antikörper nachgewiesen (mittlere Spur).



**Abb. 20: Test monoklonaler anti-Notch Antikörper**

Detektion des rekombinanten Notch-His Proteins mit monoklonalen anti-Notch Antikörpern sowie einem anti-His Ak als Positiv-Kontrolle

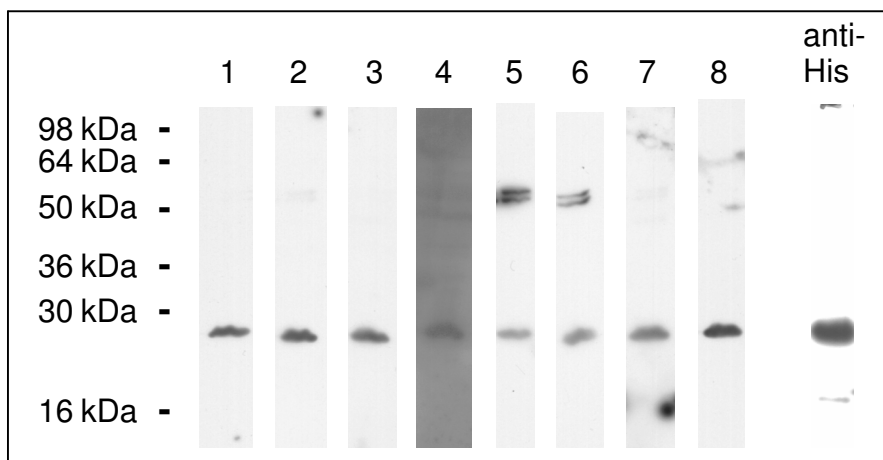
Die anti-Notch Antikörper wurden auch mit der sensitiveren Chemiluminiszenz-Detektion nachgewiesen (siehe Abb. 21). Dabei war bis auf Nr. 8 bei allen Antikörpern eine Reaktivität auf Höhe des Proteins zu sehen.



**Abb. 21: Western Blot mit rekombinatem Notch Protein**

Nachweis des rekombinanten Notch-His Proteins mit monoklonalen anti-Notch Antikörpern (1-8) sowie einem anti-His Antikörper als Positiv-Kontrolle im Western Blot mit Chemiluminiszenz

Als Kontrolle der Spezifität wurden die Antikörper gegen ein anderes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa ebenfalls mit C-terminalem His-Tag getestet. Dabei reagierten alle Antikörper positiv (siehe Abb. 22). Die Reaktion erfolgte also über Bindung an die Histidine oder an, aufgrund der Vektorsequenz noch vorhandene, andere Aminosäuren. Die Reaktion mit dem Notch Fusionsprotein war daher nicht als spezifisch anzusehen.



**Abb.22: Test der Notch Antikörper auf Spezifität**

Test der Notch Antikörper im Western Blot gegen ein 25 kDa Protein mit C-terminalem His-Tag: Die Antikörper sind nicht Notch spezifisch.

Darauf wurden weitere 35 Antikörper jeweils gegen das Notch-His-Protein und ein weiteres Protein mit C-terminalem His getestet.

Die Antikörper, die aufgrund der Immunisierung der Ratten mit den inclusion bodies erhalten worden waren, erwiesen sich allesamt als nicht gegen das Notch Protein gerichtet. Daher wurde ein neuer Ansatz zur Proteinreinigung mit dem Ziel, saubereres Protein zu erhalten, gestartet.

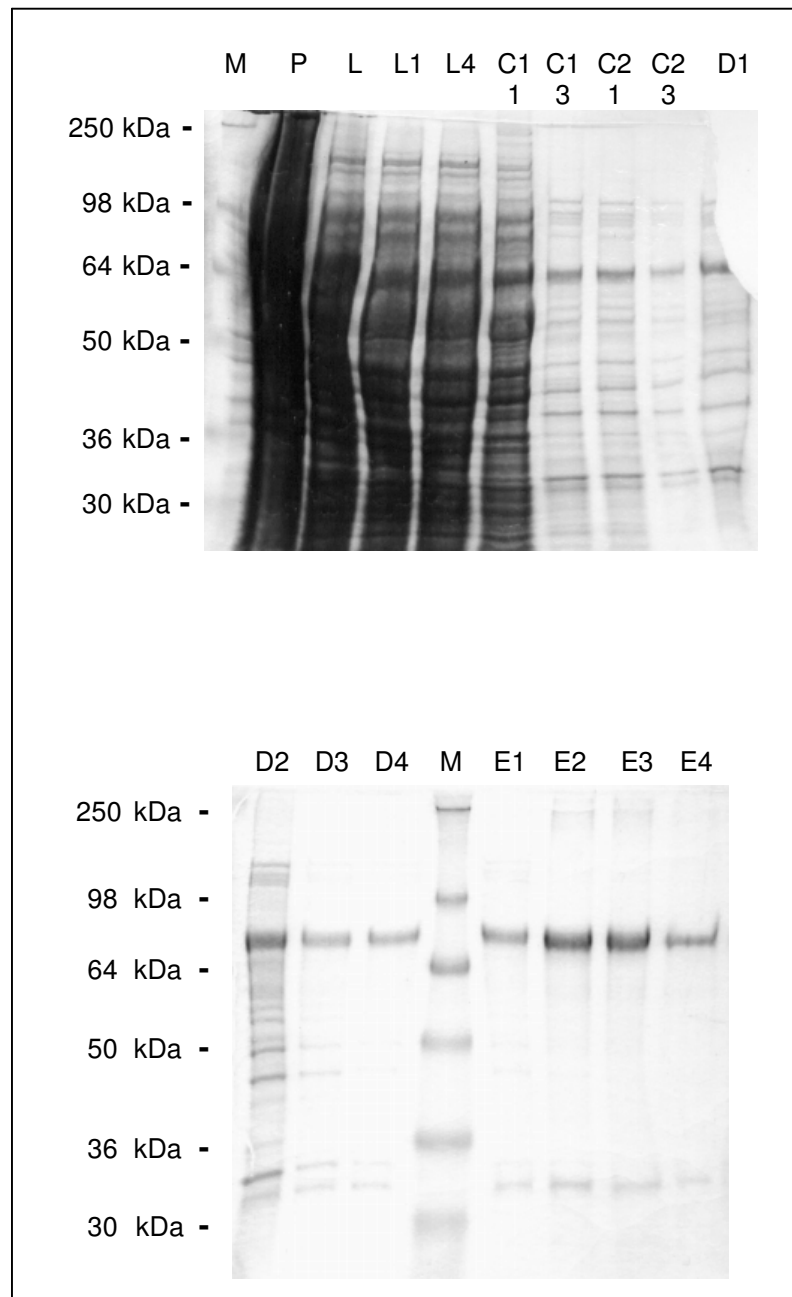
#### 4.2.5 Neue Protein-Reinigung

Zur Behebung der Probleme wurde eine neue Reinigungsstrategie angewandt und erneut versucht, das rekombinante Notch-His Protein über Chromatographie aufzureinigen (siehe Abb. 23). Um die Bildung unspezifischer Disulfid-Brücken mit anderen Proteinen zu unterdrücken, wurde dem Lysepuffer B 20 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt. Zur Vermeidung von unpezifischen Bindungen bakterieller Proteine an die Ni-NTA-Matrix und zur Erhöhung der Stringenz wurde der Waschpuffer C mit 20mM Imidazol versetzt.

Eine effektivere Bindung des rekombinanten Proteins an die Matrix sollte auch dadurch verbessert werden, dass nach dem Laden des geklärten Bakterienlysates der Durchfluss 4 mal neu auf die Säule gegeben wurde.

Daraus resultierte das folgende Protokoll:

- Lyse von 0,6 g Bakterienpellet Puffer B +20 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol
- 75 min bei RT rollern
- 20 min zentrifugieren bei 10.000 g, Überstand ist geklärtes Lysat  
1 ml 50 % Ni- NTA Agarose mit Puffer B äquilibrieren und 0,75 ml zu Lysat geben
- 1,5 h bei RT rollern
- Säule beladen, Durchlauf sammeln und 4 mal neu laden
- 2 mal mit 3 ml Puffer C +20 mM Imidazol waschen
- 4 mal mit 0,4 ml Puffer D waschen
- 4 mal mit 0,4 ml Puffer E eluieren



**Abb. 23: Einzelne Schritte der Proteinreinigung, Gel mit Coomassie gefärbt**

P: Bakterienpellet in Puffer B mit 20mM  $\beta$ -Me; L: geklärtes Lysat; L1 und L4: geklärtes Lysat nach erstem Durchfluss über Säule bzw. nach vierstem Durchlauf; C1: Waschen mit Puffer C plus 20 mM Imidazol, Fraktion 1 bzw. 3 des ersten und zweiten Waschschritts; D1-4: waschen mit Puffer D; E1-4: Eluat mit Puffer E, M: Marker

Imidazol-haltige Proben wurden mit Auftragspuffer vor dem Gelauftrag 10 min bei 37°C erhitzt

Mit diesem Protokoll konnte sauberes rekombinantes Protein erhalten werden. Das Eluat wurde gegen PBS dialysiert und damit erneut Ratten immunisiert.

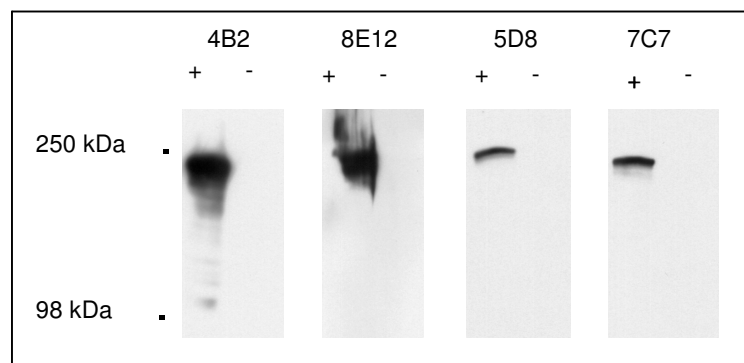
#### 4.2.6 Test und Auswahl der anti-Notch extrazellulären Antikörper

Nach der neuen Immunisierung wurden 25 Antikörper getestet. Als Testsystem wurden mit humanem Notch 1 (Vektor: pcDNA1-AMP) transfizierte Zellen und mit leerem Vektor transfizierte Cos 1 Zellen gewählt. Dieser Vektor ist geeignet, da kein His-Tag enthalten ist und somit tatsächlich Bindung an Notch festgestellt werden kann.

Die Transfektion erfolgte transient mit der Calcium-Phosphat Methode. Die Optimierung der Transfektionsbedingungen wurde anhand der Transfektion eines LacZ Gens unter CMV-Promotor Kontrolle und anschließender X-Gal Färbung der Zellen zur Ermittlung der Effizienz durchgeführt. Unter optimalen Bedingungen wurde dabei mit 2xHBS Puffer pH 7,2 eine Transfektionseffizienz von über 70% erreicht.

Cos Zellen erwiesen sich als geeignet, da in untransfizierten Zellen mit den Antikörpern kein eventuell vorhandenes endogenes Notch-Protein nachzuweisen war. Dies wurde getestet mit einem gegen den intrazellulären Teil gerichteten Notch Antikörper 4B2. Wie mit dem monoklonalen Kontrollantikörper 4B2 gegen intrazelluläres Notch 1 sichtbar ist, wird nur wenig humanes Notch in Cos Zellen prozessiert.

Dabei wurden die monoklonalen anti-Notch Antikörper 8E12, 5D8 und 7C7 ausgewählt (siehe Abb. 24) und rekloniert (Dr. E. Kremmer, GSF, München). Zu erkennen ist eine ca. 250-300 kDa Bande, die dem unprozessierten Notch-Vorläufer Protein entspricht.



**Abb. 24: Test der monoklonalen anti Notch 1 Antikörper auf transfizierten Cos-Zellen**

+: mit Notch transfiziert; -: mit leerem Vektor pcDNAIII-AMP transfiziert. Es handelt sich um verschiedene Blots mit verschiedenen langen Belichtungszeiten, so dass anhand dieser Abbildung keine Aussage über die Qualität der Antikörper gemacht werden kann.

Es zeigte sich, dass die Sensitivität der extrazellulären Antikörper weitaus geringer ist, als die der Antikörper gegen den intrazellulären Notch Teil.

#### 4.2.6.1 Die Sensitivität bzw. Nachweisgrenze der Antikörper gegen die extrazelluläre Notch 1 Dömäne ist deutlich niedriger als die eines Vergleich-Antikörpers (4B2) gegen die intrazelluläre Domäne

Um die Verwendbarkeit und Eigenschaften der Antikörper zu testen, wurden die Antikörper in einer Verdünnungsreihe von Gesamtzell-Lysat der Zell-Linie HPB-ALL mit unterschiedlichen Gesamtproteinmengen getestet. Als positive Kontrolle diente bei den Zellextrakten der Antikörper 4B2.

Die Vergleiche wurden parallel dazu benutzt eine methodische Optimierung der Western Blots, nämlich das „Strippen“ (Entfernen von Antikörpern) und Wiederverwenden (Reprobe) zu testen (siehe Abb. 25 a-c). Die Blots wurden „gestrippt“, das erfolgreiche Strippen wurde kontrolliert, und anschließend wurden die Membranen wieder mit Antikörper inkubiert.

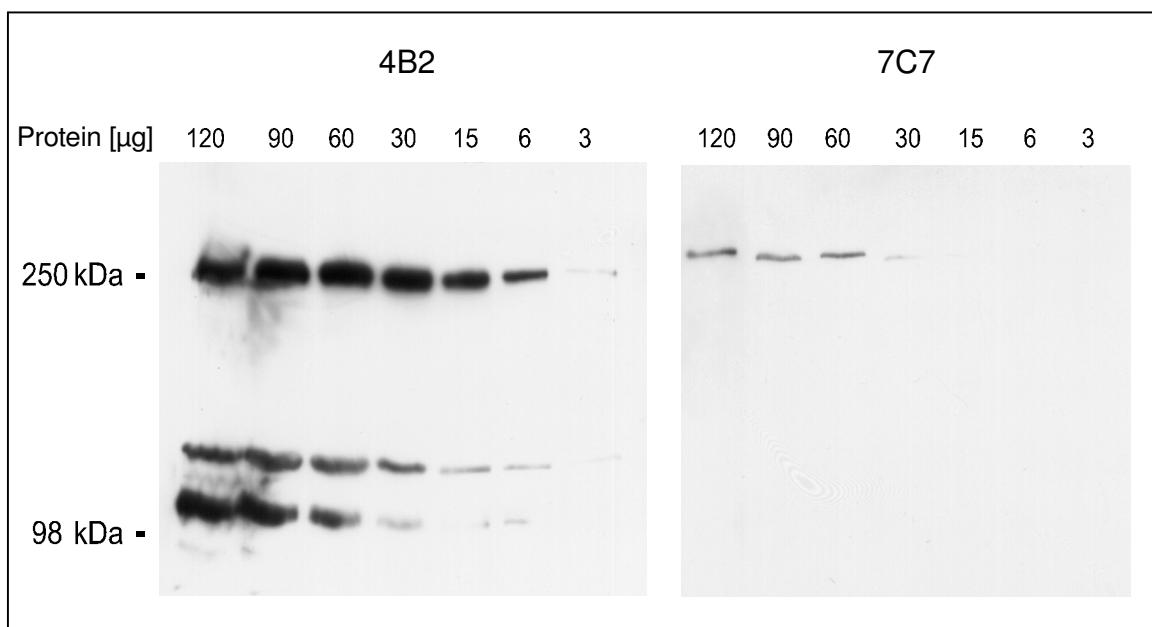


Abb. 25 a

Strip/Reprobe:

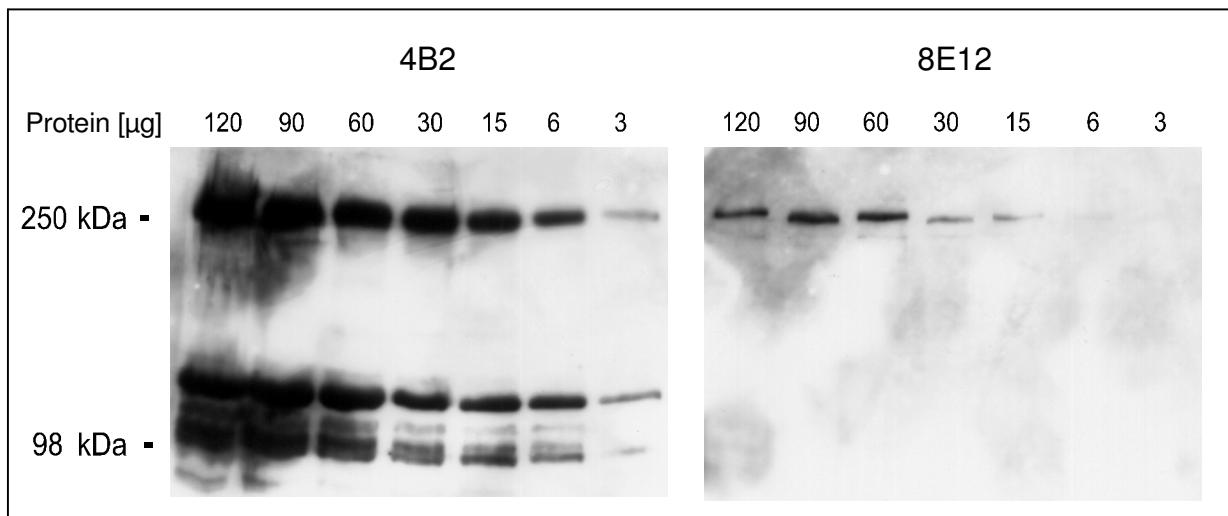


Abb. 25 b

Strip/Reprobe:

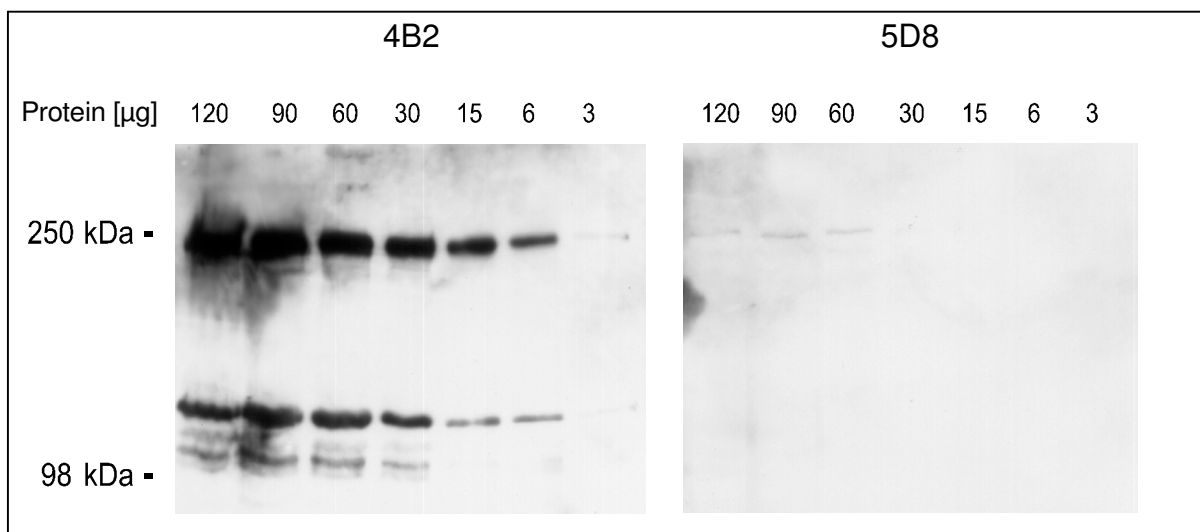


Abb. 25 c

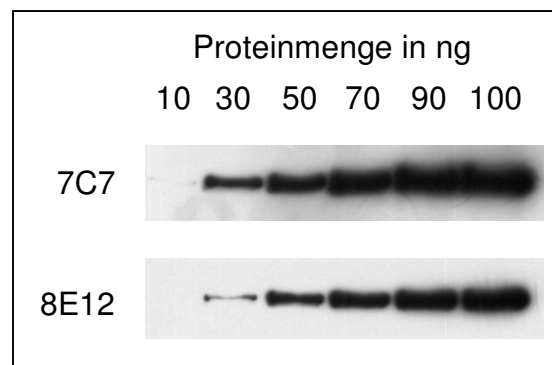
**Abb. 25 a – c: Vergleich von extrazellulär (7C7, 8E12, 5D8) und intrazellulär (4B2) bindenden Notch Antikörpern**

Lysate (diverse Proteinmengen) der Zellen HPB-ALL. Western Blot mit intrazellulärem Antikörper 4B2 und extrazellulären Antikörpern 7C7, 8E12, 5D8.

Mit dem Kontrollantikörper 4B2 war bei allen Blots ein deutliches Signal bei 6  $\mu$ g Protein zu erkennen und ein schwächeres, aber noch klar sichtbares Signal bei 3  $\mu$ g. Das Wiederverwenden der Blots war also problemlos möglich. Es zeigte sich ein



starker Unterschied in der Sensitivität der extrazellulären Antikörper im Vergleich zu 4B2. Antikörper 8E12 zeigte nur bei 15  $\mu\text{g}$  noch ein halbwegs deutliches Signal. Antikörper 5D8 lieferte auch bei 120  $\mu\text{g}$  kein befriedigendes Resultat. 7C7 lieferte nur bei 60  $\mu\text{g}$  ein ausreichendes Resultat. Es war ein deutlicher Unterschied zwischen den EZF Antikörpern zu erkennen: 5D8 ergab auch bei 120  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein kein zufriedenstellendes Ergebnis im Western Blot. Daraufhin wurde der Antikörper 5D8 nicht mehr verwendet und die verbleibenden Antikörper auf einer Verdünnungsreihe von gereinigtem rekombinatem Notch-His getestet (siehe Abb. 28).

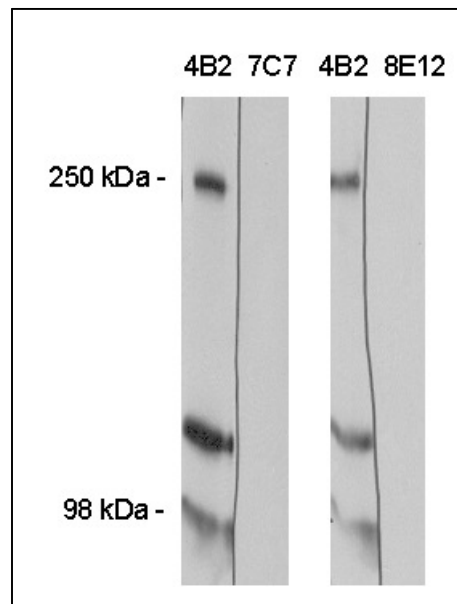


**Abb. 26: Western Blot mit Antikörpern 7C7 und 8E12**

Test der Sensitivität der Antikörper anhand unterschiedlicher Proteinmengen im Western Blot: 10 – 100 ng gereinigtes rekombinantes Notch-His-Protein

Von Antikörper 7C7 werden 30 ng noch sehr gut nachgewiesen, bei 10 ng ist noch eine schwache Bande zu erkennen. Antikörper 8E12 erkennt auch noch 30 ng Protein, liefert aber kein Signal mehr bei 10 ng.

Die extrazellulären Antikörper 7C7 und 8E12 wurden jeweils auf demselben Gel mit Antikörper 4B2 verglichen (siehe Abb. 27). Unter Bedingungen, bei denen mit 4B2 gute Ergebnisse erzielt werden, sind die extrazellulären Antikörper nicht zum Nachweis von endogenem Notch Protein geeignet.



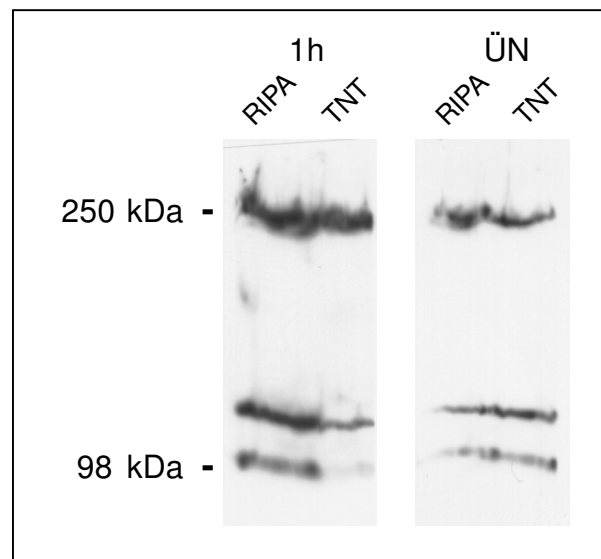
**Abb. 27: Western Blot mit Zellextrakt**

Test der anti-Notch Antikörper auf Jurkat-Zellextrakt

Die bisherigen Resultate zeigten deutlich, dass die extrazellulären Antikörper im Vergleich zu 4B2 eine deutlich geringere Sensitivität aufweisen.

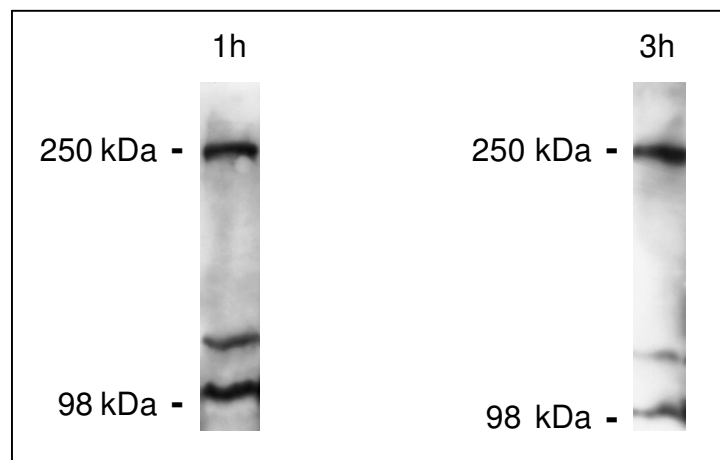
#### 4.2.6.2. Einfluss der Western Blot Bedingungen (Lysepuffer/ Inkubationszeit/ Blotdauer) auf die Antigenerkennung

Um die Signale der Blots zu verbessern, wurde versucht einige Parameter zu optimieren. Die Lysepuffer TNT (enthält nichtionisches Detergenz ) und 0,1% RIPA (enthält ionisches- und nichtionisches Detergenz) wurden verglichen, sowie verschiedene Inkubationszeiten der Blots mit primärem Antikörper: 1h und über Nacht (siehe Ab. 28). Weiter wurde die Blotdauer variiert zwischen 1 und 3 Stunden (siehe Abb. 29).



**Abb. 28: HBP-ALL Extrakte in RIPA oder TNT-Puffer**

Inkubation mit primärem Antikörper 4B2 1 Stunde oder über Nacht



**Abb. 29: Vergleich verschiedener Blot-Zeiten**

Western Blot von HBP-ALL Extrakten in 0,1% RIPA-Puffer; Antikörper: ICN 4B2; Tank-Blot 1h und 3h

Zusammenfassend zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den verwendeten Lysepuffern bestand und eine Inkubations- und Blotdauer von 1 Stunde ausreichend war. Längere Inkubations- und Blotzeiten brachten keine Verbesserung des Resultats. Bei der Blotting-Methode handelte es sich um Tank-Blotten, da dieses Verfahren für höher molekulare Proteine geeigneter ist, als das Semidry-Blotten.

#### 4.2.6.3 Hemmung der Glykosilierung von Notch 1 führt nicht zur besseren Erkennung durch die Antikörper im Western Blot

Da Notch ein Glykoprotein ist, wurde untersucht, ob die Bindung der extrazellulären Antikörper vielleicht durch die Glykosilierung gestört sein könnte und darin die Ursache für die unzureichende Sensitivität liegt. Im klonierten Bereich (siehe Abb. 30; As 1142- 1668) finden sich folgende potentielle Glykosilierungsstellen (rot unterlegt), bei denen es sich um N (Asparagin) gekoppelte Oligosaccharide handelt: Asparagin an den Positionen 1180,1242, 1490, 1588.

1141 Ser Tyr Cys Glu Asp Leu Val Asp Glu Cys Ser Pro Ser Pro Cys 1155  
1156 Gln Asn Gly Ala Thr Cys Thr Asp Tyr Leu Gly Gly Tyr Ser Cys 1170  
1171 Lys Cys Val Ala Gly Tyr His Gly Val **Asn** Cys Ser Glu Glu Ile 1185  
1186 Asp Glu Cys Leu Ser His Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Leu 1200  
1201 Asp Leu Pro Asn Thr Tyr Lys Cys Ser Cys Pro Arg Gly Thr Gln 1215  
1216 Gly Val His Cys Glu Ile Asn Val Asp Asp Cys Asn Pro Pro Val 1230  
1231 Asp Pro Val Ser Arg Ser Pro Lys Cys Phe Asn **Asn** Gly Thr Cys 1245  
1246 Val Asp Gln Val Gly Gly Tyr Ser Cys Thr Cys Pro Pro Gly Phe 1260  
1261 Val Gly Glu Arg Cys Glu Gly Asp Val Asn Glu Cys Leu Ser Asn 1275  
1276 Pro Cys Asp Ala Arg Gly Thr Gln Asn Cys Val Gln Arg Val Asn 1290  
1291 Asp Phe His Cys Glu Cys Arg Ala Gly His Thr Gly Arg Arg Cys 1305  
1306 Glu Ser Val Ile Asn Gly Cys Lys Gly Lys Pro Cys Lys Asn Gly 1320  
1321 Gly Thr Cys Ala Val Ala Ser Asn Thr Ala Arg Gly Phe Ile Cys 1335  
1336 Lys Cys Pro Ala Gly Phe Glu Gly Ala Thr Cys Glu Asn Asp Ala 1350  
1351 Arg Thr Cys Gly Ser Leu Arg Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ile 1365  
1366 Ser Gly Pro Arg Ser Pro Thr Cys Leu Cys Leu Gly Pro Phe Thr 1380  
1381 Gly Pro Glu Cys Gln Phe Pro Ala Ser Ser Pro Cys Leu Gly Gly 1395  
1396 Asn Pro Cys Tyr Asn Gln Gly Thr Cys Glu Pro Thr Ser Glu Ser 1410  
1411 Pro Phe Tyr Arg Cys Leu Cys Pro Ala Lys Phe Asn Gly Leu Leu 1425  
1426 Cys His Ile Leu Asp Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Ala Gly Arg Asp 1440  
1441 Ile Pro Pro Pro Leu Ile Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys 1455  
1456 Gln Glu Asp Ala Gly Asn Lys Val Cys Ser Leu Gln Cys Asn Asn 1470  
1471 His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn 1485  
1486 Asp Pro Trp Lys **Asn** Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp Lys Tyr 1500  
1501 Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly Cys 1515  
1516 Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu Gly Gln Cys Asn 1530  
1531 Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His 1545  
1546 Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu 1560  
1561 Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu 1575  
1576 Val Val Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg **Asn** Ser Ser 1590  
1591 Phe His Phe Leu Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val 1605

```

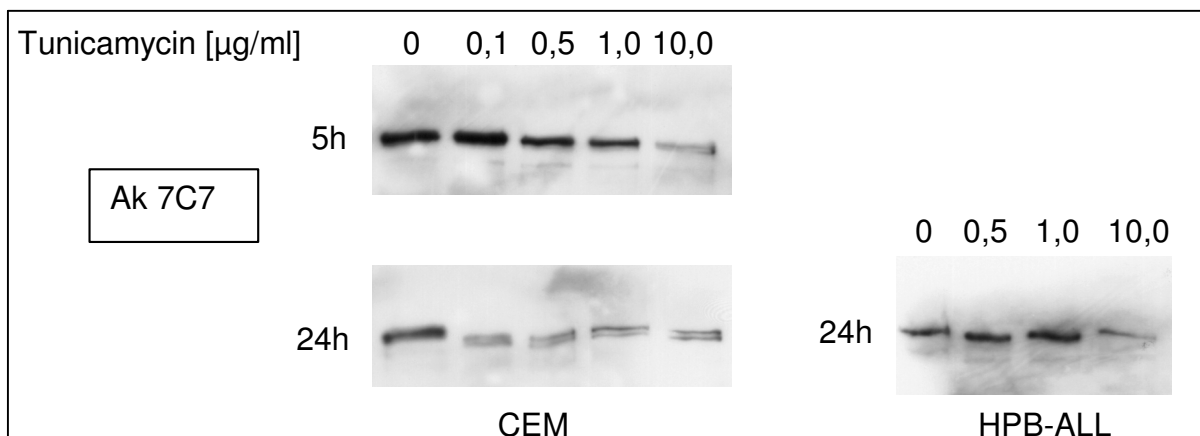
1606 Val Phe Lys Arg Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr 1620
1621 Tyr Gly Arg Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala 1635
1636 Ala Glu Gly Trp Ala Ala Pro Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys 1650
1651 Ala Ser Leu Leu Pro Gly Gly Ser Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg 1665
1666 Glu Leu Asp

```

**Abb. 30: Aminosäuresequenz (SWISS-PROT: P46531) aus dem Bereich des klonierten Notch 1 Fragments.**

Unterstrichen sind die erste und letzte Aminosäure des rekombinant exprimierten Proteins. Details siehe Text

Eine Glykosylierung sollte durch Inkubation der Zellen in Anwesenheit von Tunicamycin unterbunden werden. Tunicamycin hemmt die im Golgiapparat der Zelle ablaufende ko- und posttranslationale N-gekoppelte Glykosylierung durch Hemmung der Synthese von Dolichol Diphosphat. Allerdings kann dadurch auch eine Retention der Proteine im ER bewirkt werden wo sie dann abgebaut werden. Das muss aber nicht der Fall sein, da die Proteine auch normal an die Zelloberfläche gelangen können. Die Zellen wurden unterschiedlich lange mit unterschiedlichen Konzentrationen Tunicamycin inkubiert und anschließend Gesamtzellextrakte zur Verwendung im Western Blot hergestellt (siehe Abb. 31).



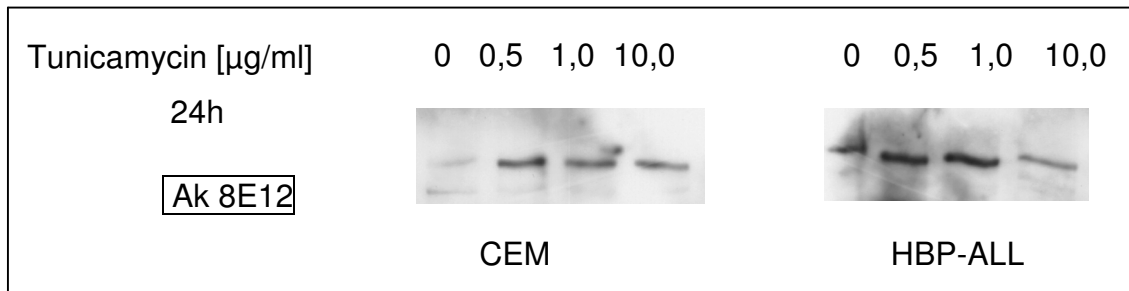
**Abb. 31: Inkubation mit Tunicamycin**

CEM und HBP-ALL Zellen wurden 5h bzw. 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Tunicamycin inkubiert. Zellextrakte wurden hergestellt und Notch mit extrazellulärem Antikörper 7C7 detektiert.

Mit zunehmender Inkubationsdauer auch bei geringeren Mengen Tunicamycin bzw. kürzerer Inkubationsdauer aber steigender Tunicamycinkonzentration ergibt sich keine bessere Erkennung des Antigens durch den Antikörper, lediglich eine

Abnahme der Antigenmenge ist zu beobachten. Nach 24 h Inkubation wird mit zunehmender Dosis eine Doppelbande sichtbar, die das entglykosilierte Protein repräsentieren könnte. Der Effekt ist jedoch nur schwach und nicht mit einer besseren Antikörperbindung verbunden.

Der gleiche Versuch wurde auch mit Antikörper 8E12 durchgeführt (siehe Abb. 32).



**Abb. 32: Inkubation mit Tunicamycin**

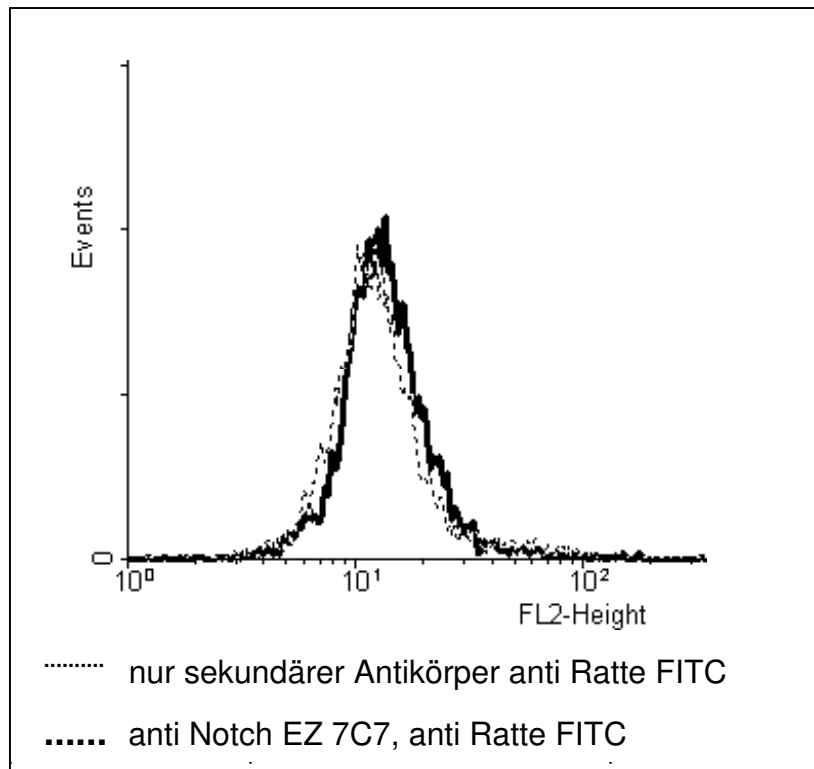
CEM und HBP-ALL Zellen wurden 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Tunicamycin inkubiert. Zellextrakte wurden hergestellt und Notch mit extrazellulärem Antikörper 8E12 detektiert.

Eine Hemmung der N-Glykosylierung führt auch nach längerer Zeit (24h) nicht zu einer besseren Erkennung durch die Antikörper.

#### 4.2.6.4 Die extrazellulären Antikörper binden nicht an natives Notch

Nach Austestung der Verwendbarkeit der Antikörper im Western Blot wurde geprüft, ob die extrazellulären Antikörper an nativen Notch Rezeptor binden und im FACS eingesetzt werden können (siehe Abb. 33).

Zellen der Linie HPB-ALL wurden mit Antikörper 7C7 markiert und im FACS untersucht.



**Abb. 33: FACS Analyse mit anti Notch Antikörper**

FACS Analyse der Zellen HPB-ALL mit anti Notch Antikörper und Kontrolle

Im Vergleich zu Zellen, die nur mit sekundärem Antikörper inkubiert wurden, zeigte sich kein Unterschied. Das heißt, dass der Antikörper auch nicht an den nativen Rezeptor bindet und somit nicht für FACS und Zell-Sortierung eingesetzt werden kann.

#### 4.3 Expression von Notch 1

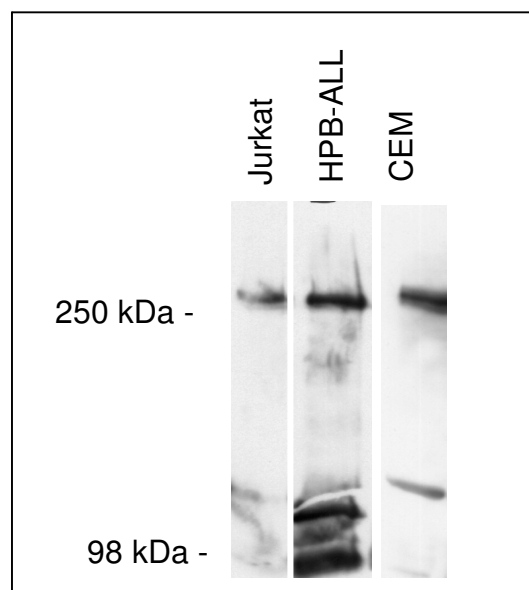
Da die gegen die extrazelluläre Domäne von humanem Notch 1 gerichteten Antikörper im Western Blot und FACS nicht zufriedenstellend einzusetzen sind, wurden die weiteren Untersuchungen mit dem gut funktionierenden Antikörper 4B2 durchgeführt, der gegen die intrazelluläre Domäne von humanem Notch 1 gerichtet ist. Im Western Blot werden damit das unprozessierte Notch mit einem MW von ca. 300 kDa und die intrazellulären Notch Domänen mit ca. 120 kDa nachgewiesen.

#### 4.3.1 Expression von Notch 1 auf Zell-Linien

Mit Hilfe der Antikörper sollte die Expression von Notch 1 auf verschiedenen Zell-Linien untersucht werden. Aufgrund der Beteiligung von Notch 1 an einer T-Zell Leukämie (T-ALL) waren besonders T-Zell-Linien von Interesse. Daneben wurden auch B-Zellen und Vertreter der myeloischen Reihe betrachtet. Es waren immer das 300 kDa und 120 kDa Notch Fragment zu erkennen.

##### 4.3.1.1 Expression von Notch 1 auf T-Zell-Linien

Es standen die Linien Jurkat, HPB-ALL und CEM zur Verfügung (siehe Abb. 34).



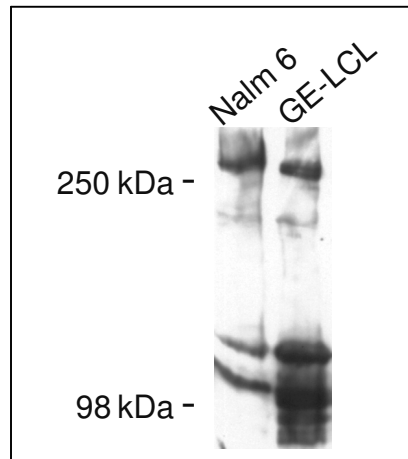
**Abb. 34: Western Blot mit T-Zell-Linien**

Nachweis der Notch 1 Expression mit Ak 4B2 auf den Zell-Linien Jurkat, HBP-ALL und CEM.



#### 4.3.1.2 Expression von Notch 1 auf B-Zell-Linien

Die B-Zell-Linien GE-LCL und Nalm6 wurden untersucht (siehe Abb35).

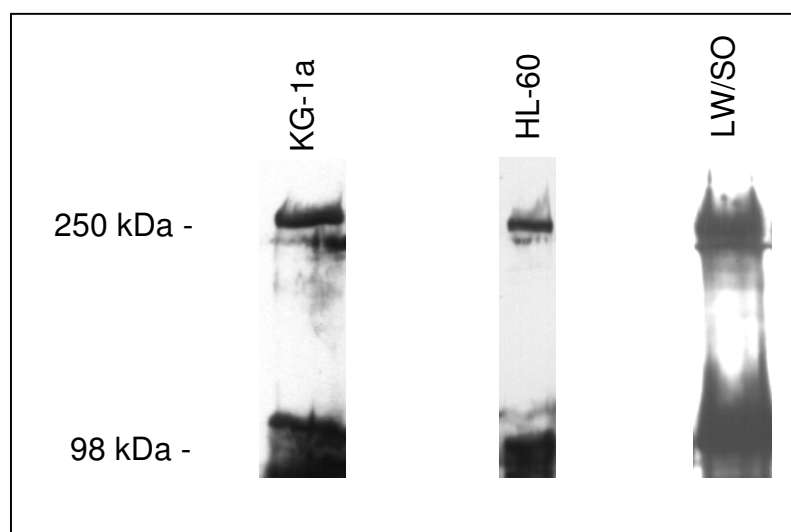


**Abb. 35: Western Blot mit B-Zell-Linien**

Nachweis der Notch 1 Expression mit Ak 4B2 auf den Zell-Linien NALM6 und GE-LCL.

#### 4.3.1.3 Expression von Notch auf Zell-Linien der Myeloischen Reihe

Die Zell-Linien KG-1a, HL60 und LW/SO standen zur Verfügung (siehe Abb. 36)

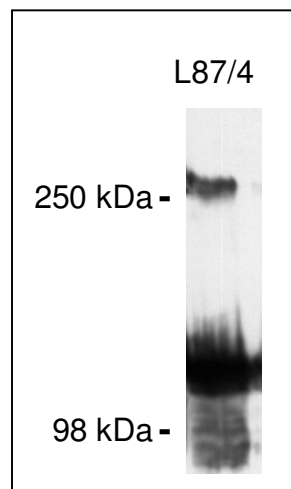


**Abb. 36: Western Blot mit Zellen der myeloischen Reihe**

Nachweis der Notch 1 Expression mit Ak 4B2 auf den Zell-Linien KG-1a, HL60 und LW/SO

#### 4.3.1.4 Weitere Zell-Linien

Da Knochenmarkstroma essentiell zur Reifung und Differenzierung von Blutzellen ist, war interessant, ob auch dort Notch Rezeptor vorhanden ist. Die stromalen Zelllinie L87/4 (Thalmeier *et al.*, 1996; Thalmeier *et al.*, 1994) wurde analysiert (siehe Abb. 37).



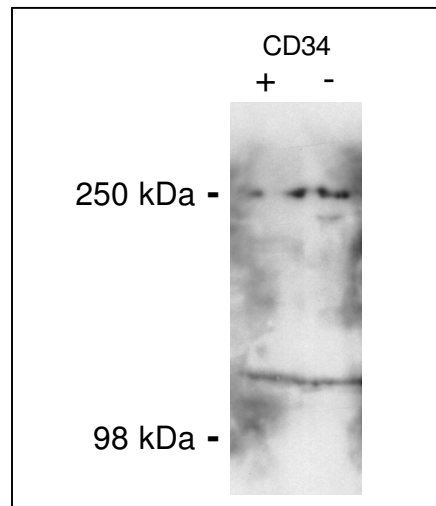
**Abb. 37: Western Blot mit L87/4 Zellen**

Nachweis der Notch 1 Expression mit Ak 4B2 auf der Zell-Linie L87/4

Es zeigte sich, dass Notch auf allen untersuchten Zell-Linien exprimiert wurde. Die Existenz von Notch Rezeptor allein ist also kein Hinweis auf eine bestimmte Differenzierung in eine bestimmte Richtung.

#### 4.3.2 Notch 1 Expression auf primären Zellen

Da Zell-Linien ein Stück weit auch immer ein künstliches System bedeuten, sollte die Notch-Expression mit intrazellulärem Antikörper auf verschiedenen primären Zellen analysiert werden. Aus der Literatur war nur über RT-PCR Versuche bekannt, dass Notch auf CD34<sup>+</sup> und CD34<sup>-</sup> Zellen vorkommt. Daher wurde hier auf Proteinebene das Vorkommen von Notch Rezeptor untersucht (siehe Abb. 38).

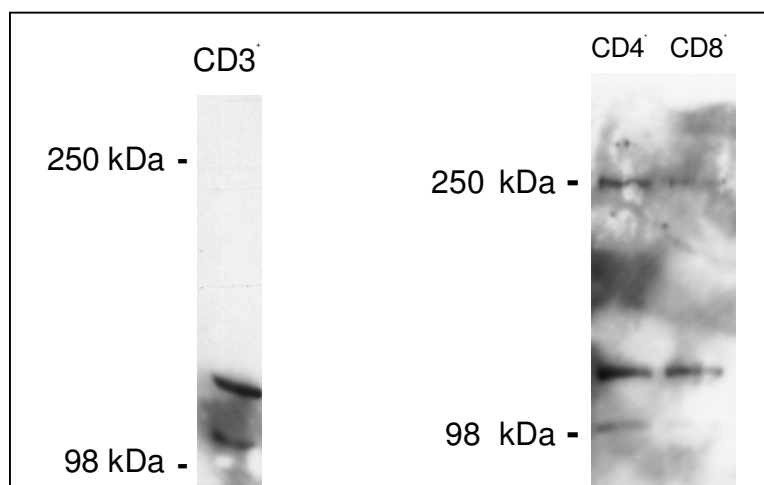


**Abb. 38: Western Blot von CD34<sup>+</sup> und CD34<sup>-</sup> Zellen**

Nachweis von Notch 1 Rezeptor mit Antikörper 4B2

Notch Protein ist sowohl auf CD 34<sup>+</sup> als auch in der restlichen Fraktion CD34<sup>-</sup> Zellen vorhanden, die Notch Expression ist somit nicht auf CD 34<sup>+</sup> hämatopoetische Stammzellen beschränkt.

Weiterhin wurde die Notch Expression auf T-Zellen untersucht (siehe Abb. 39). Notch findet sich nicht nur auf CD3<sup>+</sup> Zellen, sondern auch auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Antikörpern markiert und im Zell-Sorter angereichert, dann im Western Blot mit Antikörper 4B2 detektiert.

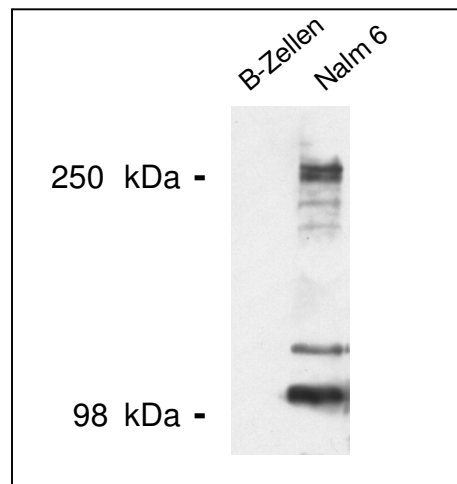


**Abb. 39: Western Blot von T-Zellen**

Notch Nachweis mit Antikörper 4B2

Das Fehlen der 300 kDa Bande auf dem CD3+ Blot kann auf die experimentelle Schwierigkeit des Proteintransfers von höher molekularen Proteinen zurückgeführt werden, zumal bei mehreren Blots die Beobachtung gemacht wurde, dass bei Zellextrakten von primären Zellen die 120 kDa Bande deutlicher war.

Bei einem Vergleich der Notch 1 Expression auf B-Zellen mit einer B-Zell-Linie konnte auf den nativen Zellen kein Notch Protein detektiert werden (siehe Abb. 40). In der Literatur wurde zwar eine Notch 1 Expression auf B-Zellen beschrieben, allerdings wurde dabei auch festgestellt, dass in B-Zellen Notch 2 am meisten exprimiert wird (Saito *et al.*, 2003).



**Abb. 40: Western Blot mit B-Zellen**

Notch Nachweis mit Antikörper 4B2 auf nativen B-Zellen und einer B-Zell-Linie

## 4.4 Notch 3

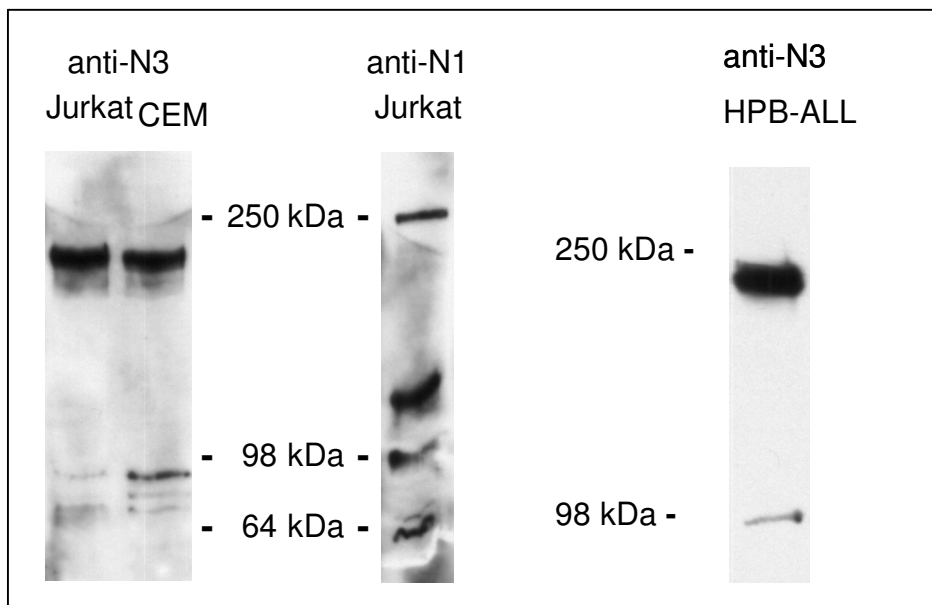
### 4.4.1 Expression von Notch 3

Da mittlerweile auch anti-Notch 3 Antikörper (gegen die intrazelluläre Domäne) zur Verfügung standen, interessierte auch die Frage der parallelen Expression von humanem Notch 1 und Notch 3.

Das Notch 3 Gen codiert für ein Protein aus 2321 Aa mit einem Molekulargewicht von 243.656 Da und ist damit etwas kleiner als Notch 1.

#### 4.4.1.1 Notch 3 Expression auf T-Zell-Linien

Bei der Verwendung von Antikörpern, die gegen die intrazelluläre Domäne von Notch 3 gerichtet sind erhält man, ähnlich wie bei Notch 1, im Western Blot zwei Banden: bei Notch 1 auf der Höhe von ca. 120 kDa und 300 kDa, bei Notch 3 auf der Höhe von ca. 280 kDa und 97 kDa. Offenbar unterliegt Notch 3 auch einer Prozessierung. Zum Vergleich sind in Abb. 41 noch einmal die Größen der Notch Banden bei Notch 1 und Notch 3 dargestellt.



**Abb. 41: Western Blot von T-Zell-Linien mit anti Notch 3 Antikörper**

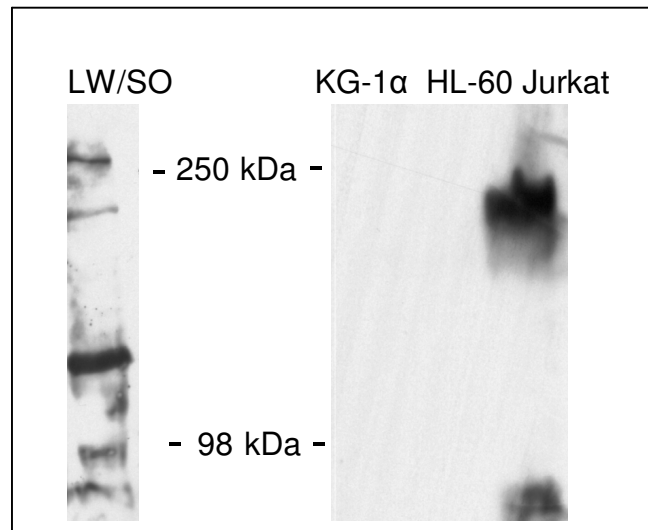
Auf Jurkat-, CEM- und HPB-ALL Zellen wird Notch 3 exprimiert

T-Zell-Linien exprimieren neben Notch 1 auch Notch 3.

#### 4.4.1.2 Notch 3 Expression auf Zellen der myeloischen Reihe

Auf den Zell-Linien KG-1 $\alpha$  und HL-60 ist kein Notch 3 nachweisbar (siehe Abb. 42). Jurkat Zellen dienten als Positivkontrolle für den Blot.

Das Ergebnis auf LW/SO ist unklar, da es sich bei den sichtbaren Banden der Größe nach nicht unbedingt um Notch 3 handelt. Durch die bei diesem Blot sehr lange erfolgte Belichtungszeit sind Artefakte bzw. Kreuzreaktionen mit anderen Notch-Proteinen nicht auszuschließen.

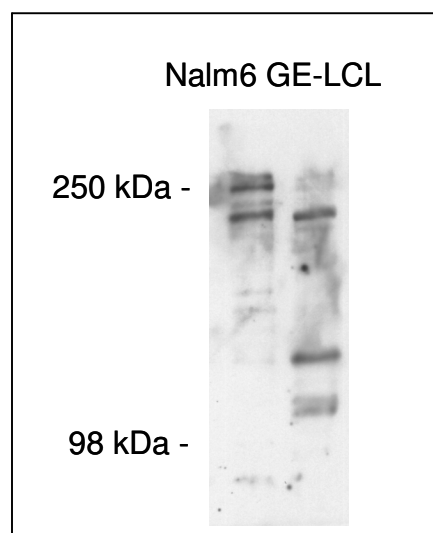


**Abb. 42: Western-Blot mit anti Notch 3 Antikörper**

Auf KG-1 $\alpha$  und HL-60 Zellen ist kein Notch 3 Protein nachweisbar. Das Bandenmuster auf LW/SO Zellen ist nicht eindeutig (siehe Text).

#### 4.4.1.3 Notch 3 Expression auf B-Zellen

Mit Notch 3 Antikörper werden auf Extrakten von B-Zell-Linien (siehe Abb. 43) erst nach langer Belichtungszeit Banden sichtbar, deren Notch 3 Spezifität daher und aufgrund ihrer Größe fraglich ist.

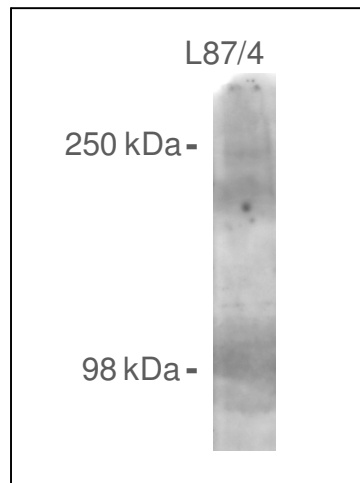


**Abb. 43: Western Blot mit B-Zell-Linien**

Notch 3 kann auf den B-Zell-Linien Nalm 6 und GE-LCL nicht eindeutig nachgewiesen werden (siehe Text).

#### 4.4.1.4 Notch 3 Expression auf Stroma-Zell-Linien

Auf der Notch 1 exprimierenden Zell-Linie L87/4 (siehe 4.3.1.4.) konnte im Western Blot keine Expression von Notch 3 nachgewiesen werden (siehe Abb. 44).



**Abb. 44: Western Blot der Zelle-Linie L 87/4**

Auf der stromalen Zell-Linie L87/4 ist keine Notch 3 Expression sichtbar.

#### 4.4.1.5 In T-Zell-Linien werden Notch 1 und Notch 3 exprimiert

Eine parallele Expression von Notch 1 und Notch 3 konnte im Western Blot nur für die T-Zell-Linien Jurkat, HBP-ALL und CEM nachgewiesen werden. Tabelle 3 zeigt eine Zusammenfassung der Western Blot Resultate.

	Jurkat	HBP-ALL	CEM	Nalm 6	GE-LCL	KG1a	HL60	LW/SO	L87/4
N1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N3	+	+	+	-	-	-	-(+)*	(+)*	(+)

\* N3 wird auf HL-60 und LW/SO nur schwach exprimiert

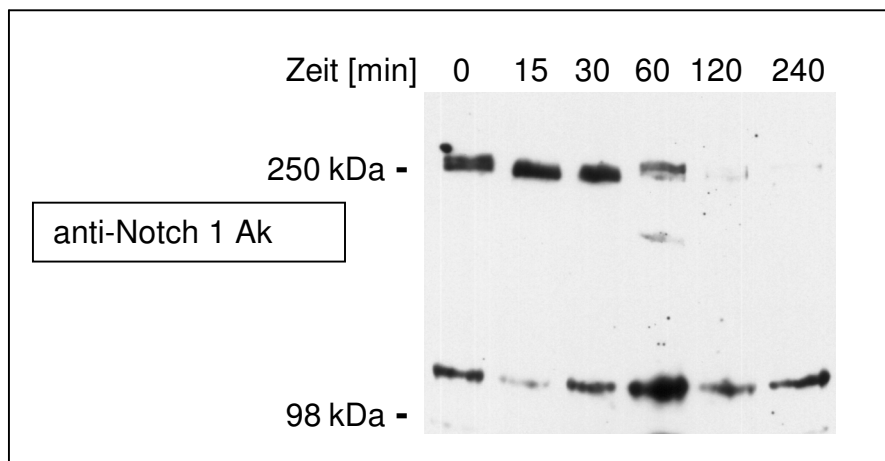
**Tab. 3: Nachweis der Expression von Notch 1 und Notch 3 im Western Blot**

Auf T-Zell-Linien werden Notch 1 und Notch 3 parallel exprimiert, auf Zell-Linien der myeloischen Reihe wird mehr Notch 1 als Notch 3 exprimiert. B-Zellen exprimieren Notch 1.

#### 4.4.2 Charakterisierung der Notch 3 Prozessierung

##### 4.4.2.1 Auch Notch 3 wird als „full-length“ Vorläuferprotein gebildet und anschließend prozessiert

Offenbar unterliegt Notch 3 ähnlichen Prozessierungsprozessen wie Notch 1. Für Notch 1 wurde gezeigt, dass ein 300 kDa Protein der Vorläufer ist, der dann in ein ca. 120 kDa und ein ca. 180 kDa großes Fragment prozessiert wird. Bei Behandlung mit Cycloheximid (CHX), einem Hemmer der Proteinsynthese, und BFA wurde gezeigt, dass die Menge an 120 kDa Fragment erhalten bleibt, während das unprozessierte 300 kDa Vorläuferprotein abnimmt (siehe Abb. 45). Das gleiche sollte dann auch für Notch 3 gelten.

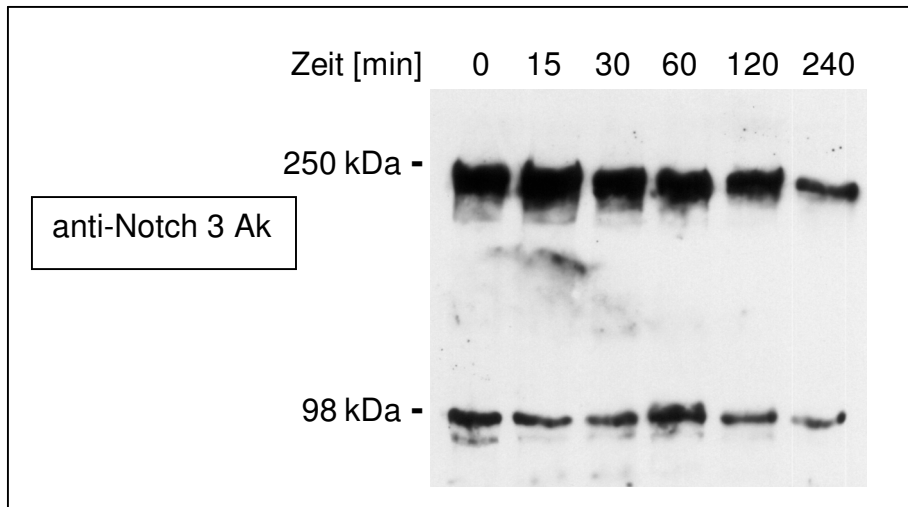


**Abb. 45: Prozessierung des Notch 1 Rezeptors**

Inkubation von Jurkat Zellen mit 25 µg/ml CHX und anschließender Western Blot mit Antikörper NIC 4B2 (jeweils 2 Mio Zellen). Die Neusynthese des 300 kDa Vorläufers wird gehemmt, während das bereits prozessierte 120 kDa Fragment erhalten bleibt.

Jurkat Zellen wurden mit CHX inkubiert und die Zellextrakte unterschiedlicher Zeitpunkte mit Notch 3 Antikörper im Western Blot analysiert (siehe Abb. 46).





**Abb. 46: Prozessierung des Notch 3 Rezeptors**

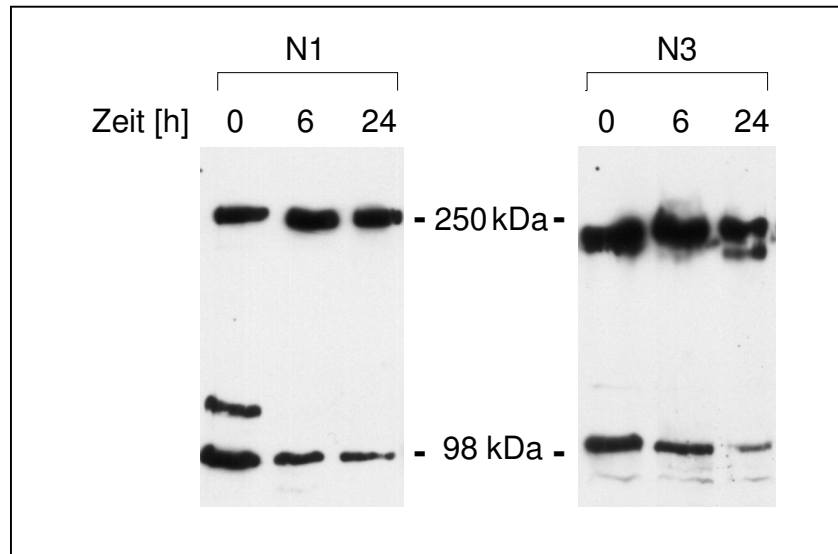
Die Menge des 97 kDa Proteins bleibt konstant, während die Menge des 280 kDa Vorläuferproteins abnimmt.

Das 280 kDa Notch 3 Vorläufer Protein nimmt unter zunehmender Einwirkdauer von CHX ab, das kürzere Fragment bleibt jedoch konstant, ähnlich wie bei Notch 1. Also wird auch Notch 3 als Vorläuferprotein gebildet und erst anschließend prozessiert.

#### 4.4.2.2 Die S1 Spaltung von Notch 3 findet wie bei Notch 1 im Golgi Apparat statt

Brefeldin A (BFA) blockiert den Transport von Proteinen aus dem ER in den Golgi Apparat. Bei Notch 1 konnte damit festgestellt werden, dass die erste Prozessierung im ER stattfindet (Logeat *et al.*, 1998), da nach Behandlung mit BFA weniger 120 kDa Protein nachgewiesen werden konnte, während die Menge an 300 kDa Protein konstant blieb bzw. leicht zunahm.

Durch Behandlung der Zellen mit Brefeldin A sollte verhindert werden, dass das "full-length" Notch Vorläuferprotein in den Golgi-Apparat transportiert wird, wo es in ein 180 kDa und ein 120 kDa Fragment prozessiert wird (siehe Abb. 47).



**Abb. 47: Western Blot nach Inkubation mit BFA**

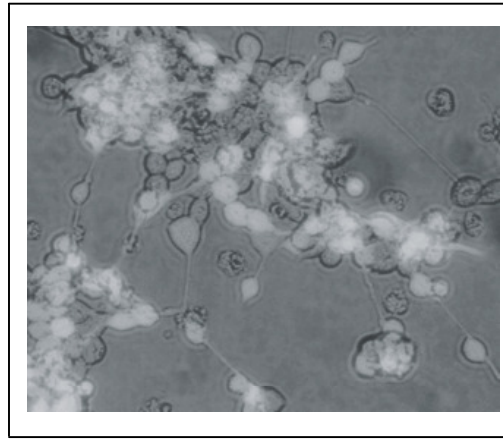
Western Blot von Jurkat Zellen mit anti-Notch 1 und anti-Notch 3 Antikörpern nach unterschiedlich langer Inkubation mit BFA [50µg/ml].

Zu erkennen ist eine Abnahme des prozessierten kürzeren intrazellulären Fragments, während das unprozessierte Fragment konstant bleibt, bzw eher leicht akkumuliert. Daraus kann geschlossen werden, dass auch die Prozessierung von Notch 3 im Golgi-Apparat stattfindet.

## 4.5 Notch 1 Immunhistologische Färbungen auf normalem und Tumorgewebe

### 4.5.1 Etablierung der Methode

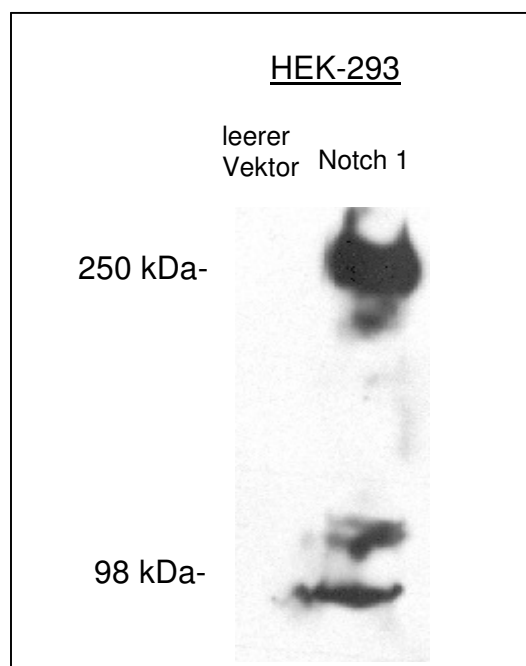
Mit dem intrazellulären Antikörper 4B2 sollten spezifische Gewebefärbungen von Paraffinschnitten angefertigt werden. Um Spezifität zu gewährleisten, wurde die Methode an HEK293 Zellen etabliert, die mit humanem Notch oder leerem Vektor transient transfiziert, mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurden. Die Zellen wurden mittels Lipofectamin mit einem GFP-Plasmid transfiziert, um die Transfektionsbedingungen für Notch zu etablieren. Es wurden ca. 50% der Zellen erreicht (siehe Abb. 48).



**Abb. 48: Mit GFP-Vektor transient transfizierte HEK-293 Zellen**

Die GFP-exprimierenden Zellen erscheinen auf der schwarz-weiß Abbildung einer mikroskopischen Aufnahme als hell leuchtend im Gegensatz zu den nichttransfizierten dunkel abgebildeten Zellen.

Nach dieser Etablierung der Transfektionsbedingungen wurden HEK-Zellen transient mit dem Notch 1 Expressionsvektor pcDNA1AMP/hN1 transfiziert. Im Western Blot wurde mit anti-Notch 1 Antikörper gezeigt, dass Notch 1 ausschließlich in den transfizierten Zellen exprimiert wird (siehe Abb. 49).

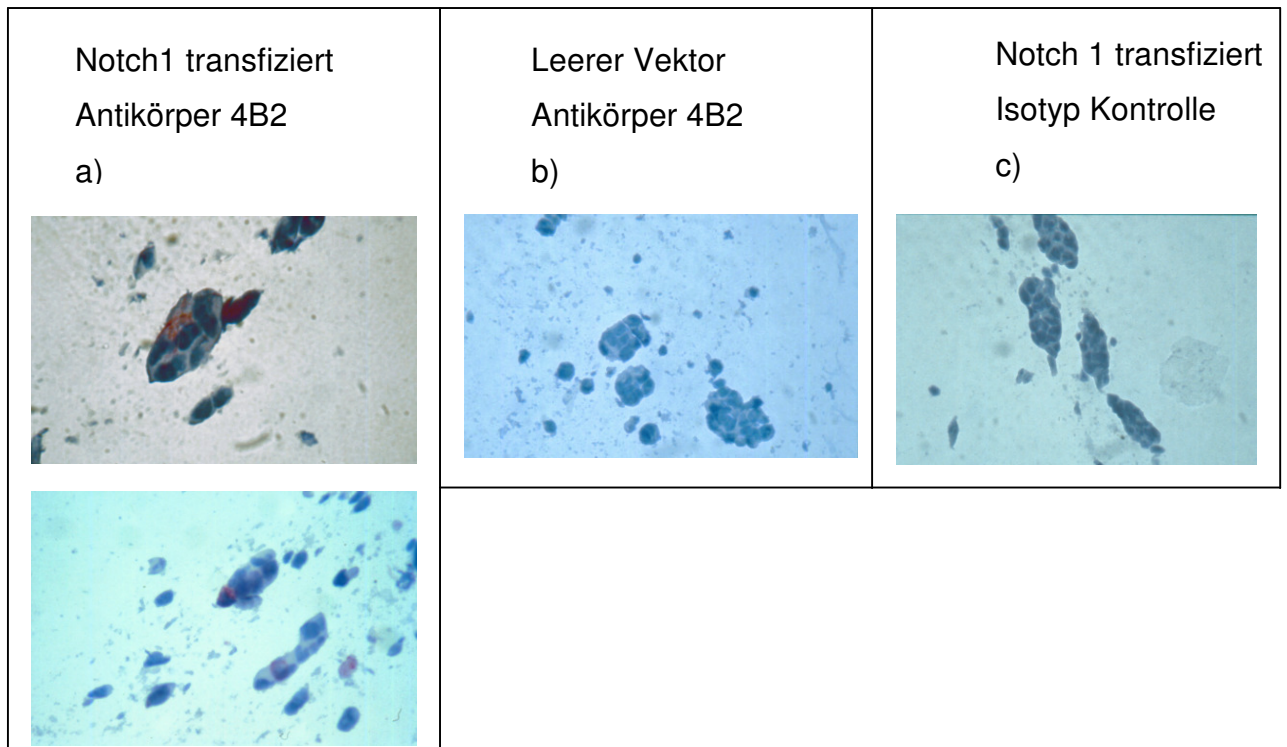


**Abb. 49: Notch 1 Expression auf transfizierten HEK-293 Zellen**

Mit Antikörper 4B2 ist Notch im Western Blot nur auf Notch 1 transfizierten Zellen nachweisbar.

Die Zellen wurden nach der Transfektion fixiert und in Paraffin eingegossen. Bei der Wahl der Färbemethode, insbesondere des „Antigen Retrieval“ (Substanzen oder Methoden, die das Antigen für den Antikörper zugänglich machen), stand im Vordergrund, dass eine intrazelluläre und eventuell auch eine Kernfärbung erreicht werden sollte, um das intrazelluläre Notch Fragment detektieren zu können. Da auch mit einer nicht allzu starken Expression zu rechnen war, wurde eine möglichst sensitive Methode gewählt, die APAAP-Färbung (alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase). Diese Enzym-Immunkomplex Methode ermöglicht es, eine größere Anzahl Enzymmoleküle pro Gewebsantigen anzufügen und so eine Signalverstärkung zu erreichen.

Nach Austestung verschiedenener Protokolle, besonders diverser Andau-Methoden und Antikörperverdünnungen (siehe Material und Methoden) zeigte sich, dass zur Andauung 15 minütiges Kochen der Schnitte in der Mikrowelle mit Lösung TRS 9 (target retrieval solution) sowie eine Verdünnung des Notch Antikörpers im Verhältnis 1: 130 in Verdünnungsmedium der Firma DAKO am Besten geeignet war: Die Spezifität der Färbung wurde durch Verwendung eines Isotyp Kontrollantikörpers bestätigt (siehe Abb. 50). Der Kontrollantikörper (gereinigtes Ratten IgG<sub>2a</sub>) wurde in verschiedenen Verdünnungen getestet, die eine Antikörperkonzentration von 60 - 600 ng/ml abdeckten. Da bei der transienten Transfektion nicht alle Zellen erreicht wurden, hatte man eine zusätzliche interne Kontrolle der Färbung, da ein Gemisch aus transfizierten und untransfizierten Zellen vorlag. Bei keiner Färbung mit Kontrollantikörper wurde eine Färbung des Präparates festgestellt.

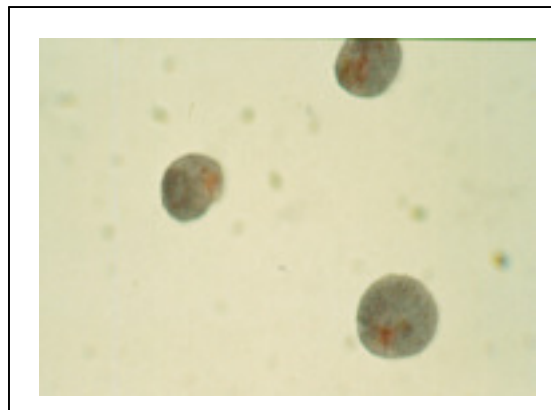


**Abb. 50: Transient transfizierte HEK-293 Zellen**

- a) transfiziert mit Notch 1, gefärbt mit Antikörper 4B2  
 b) transfiziert mit leerem Vektor, gefärbt mit Antikörper 4B2  
 c) transfiziert mit Notch 1, gefärbt mit einem Isotyp-Kontrollantikörper

Nur bei transfizierten Zellen ist eine spezifische Färbung zu erkennen. Unter den ausgetesteten Bedingungen ist die Markierung also spezifisch für Notch 1.

Zur Bestätigung wurden CEM-Zellen gefärbt, die endogen Notch exprimieren (siehe Abb.51): Alle Zellen zeigten eine rote Färbung.



**Abb. 51: Notch 1 Expression von CEM-Zellen**

Mit Antikörper 4B2 gefärbte CEM-Zellen zeigen eine zytoplasmatische Färbung.

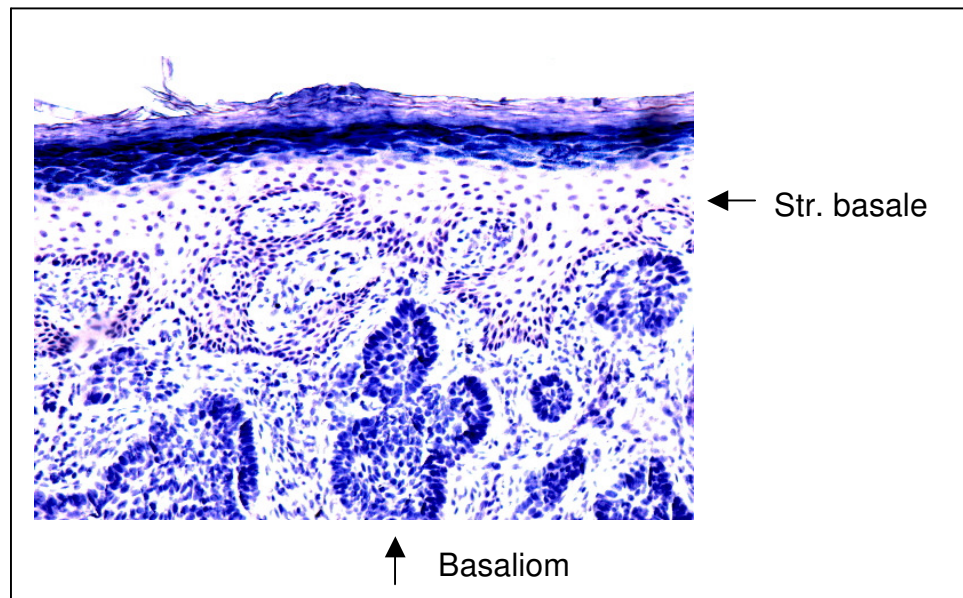
#### 4.5.2 Notch 1 Färbung auf Paraffinschnitten von normalem- und Tumorgewebe

Mit der zuvor genannten etablierten Methode wurden verschiedene Gewebe mit anti-Notch 1 Antikörper gefärbt. An Tumorgewebe standen Schnitte eines Karzinoms der Haut und eines tubulären Kolon-Adenoms zur Verfügung. Von normalem Gewebe wurden Zervix und Hoden untersucht. Auf den folgenden Geweben konnte keine spezifische Färbung gesehen werden, da sich hier die Vorbehandlung der Schnitte als ungeeignet herausstellte: Weibliches Brustgewebe (Methode ungeeignet), Leber (unspezifische Färbung durch endogene Phosphatase), Magen, Lymphknoten, Knochenmark, Lunge.

##### 4.5.2.1 Im Karzinom der Haut ist im Gegensatz zur normalen Haut keine Notch 1 Expression mehr nachweisbar

Die äußerste Schicht der Haut (Epidermis) besteht aus Keratinozyten, die, von der Basalmembran (*Stratum basale*) gebildet, nach außen wandern und auf diesem Weg kontinuierlich differenzieren.

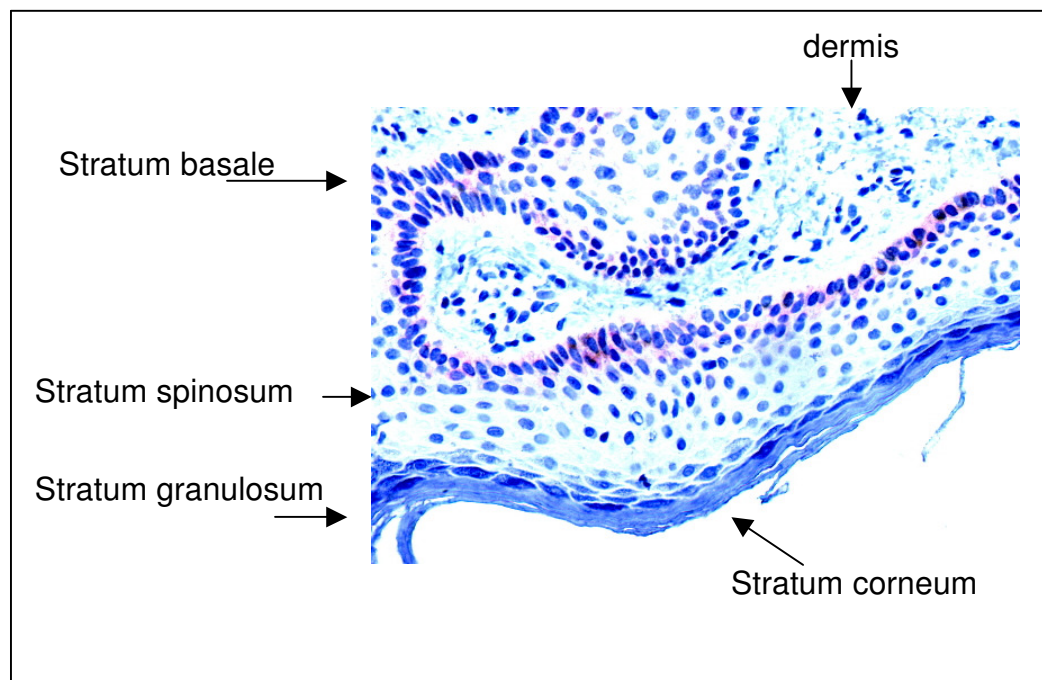
Abb. 52 zeigt eine Übersicht über einen Haut Gewebeschnitt mit Basaliom nach Notch 1 Färbung.



**Abb. 52: Basaliom**

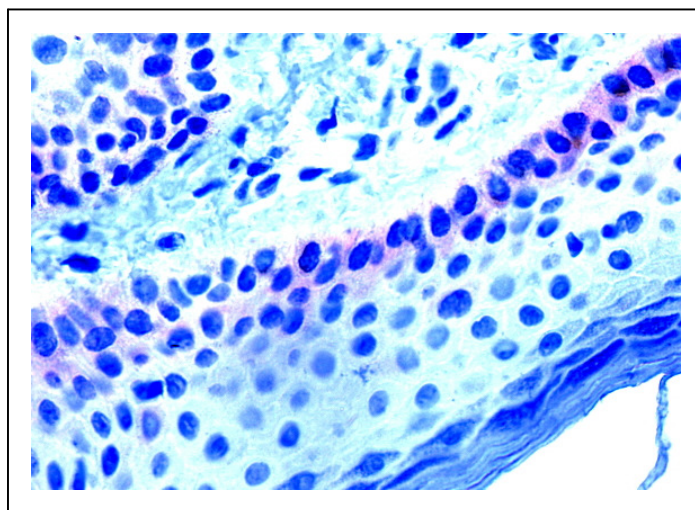
Übersichtsaufnahme (100-fache Vergrößerung): Haut mit Basaliom bei normaler Notch Expression im *Stratum basale*.

In den folgenden Abbildungen (Abb. 53 und Abb. 54) ist deutlich die Notch 1 Expression in der Basalmembran zu erkennen.



**Abb. 53: Plattenepithel in Nachbarschaft eines invasiven Karzinoms**

Ausschnitt, vergrößert (200-fach): normales Plattenepithel mit überwiegend zytoplasmatischer Notch Expression im *Stratum basale*.

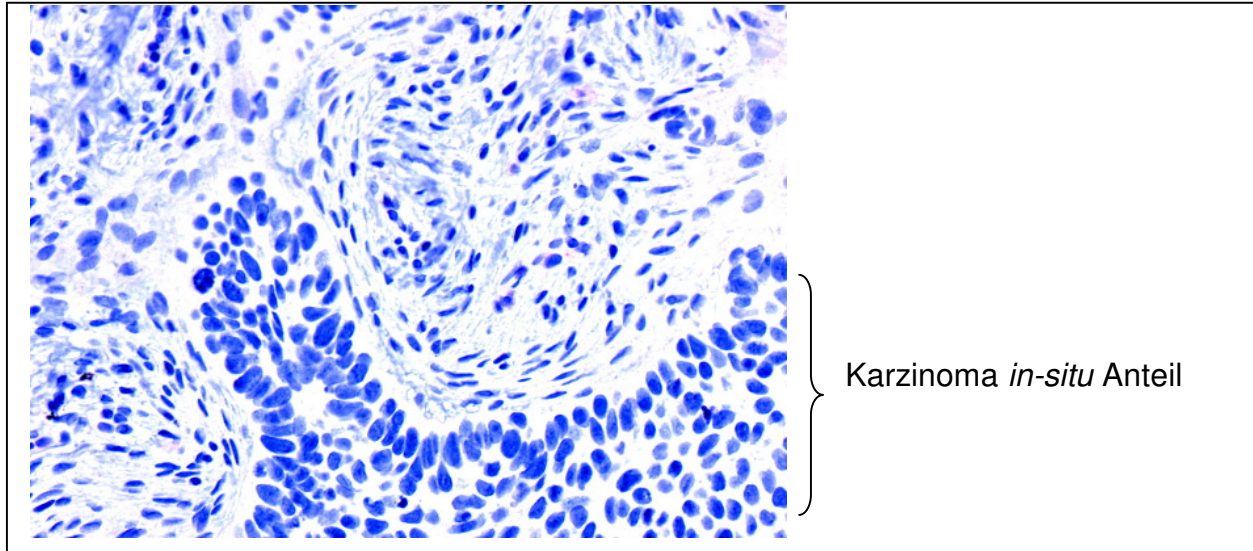


**Abb. 54: Plattenepithel in Nachbarschaft eines invasiven Karzinoms**

Ausschnitt, vergrößert (1000-fach): normaler Bereich. Zytoplasmatische Expression im *Stratum basale* wie in Abb. 53, allenfalls geringe Epitheldysplasie.



In den obigen Abbildungen ist zu sehen, dass in normalen regenerativen Bereichen der Haut (*Stratum basale*) Notch exprimiert wird (rote Färbung). Bei den vereinzelt zu sehenden dunkelbraunen Strukturen handelt es sich um Melanin. Im Tumor dagegen scheint kein Notch 1 exprimiert zu werden (siehe Abb. 55).

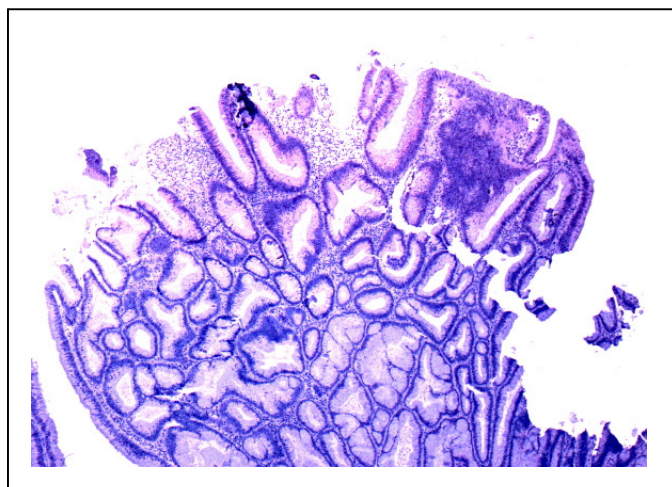


**Abb. 55: Vergrößerter (400-fach) Ausschnitt eines Karzinoma *in situ***

Haut mit Karzinoma *in situ* (schwere Dysplasie). Hier findet sich keine positive Notch Färbung.

#### 4.5.2.2 Notch 1 wird in einem tubulären Kolon-Adenom exprimiert

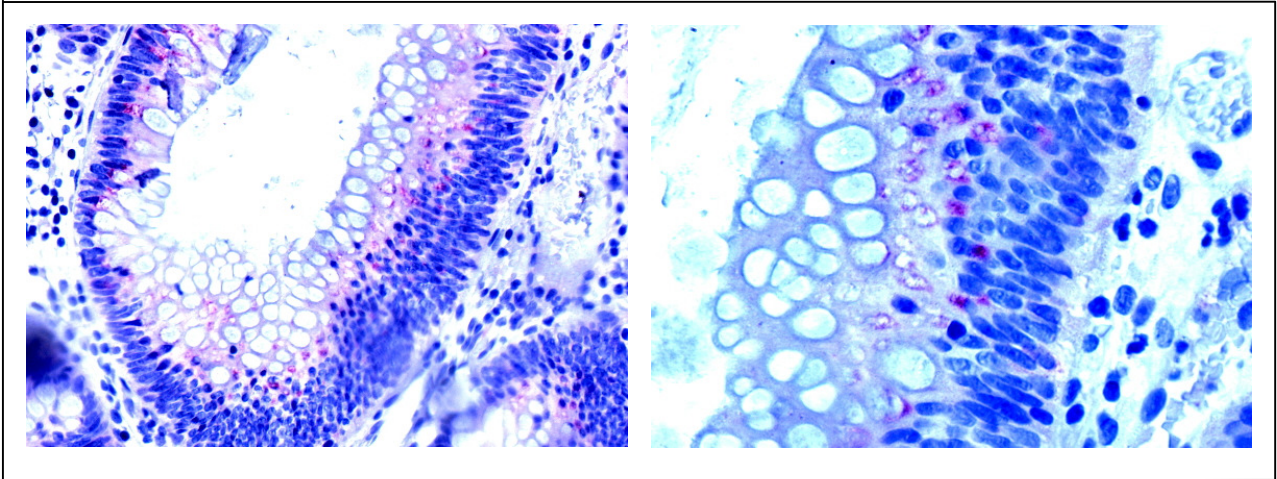
Wie aus den Abbildungen 56 und 57 hervorgeht, ist in Zellen des Adenoms und in Schleimhautzellen eine intrazelluläre und membranständige Notch 1 Färbung zu beobachten.



**Abb. 56: Übersicht über ein Kolon-Adenom**

Kolon-Adenom nach immunhistologischer Notch 1 Färbung (50-fache Vergrößerung).



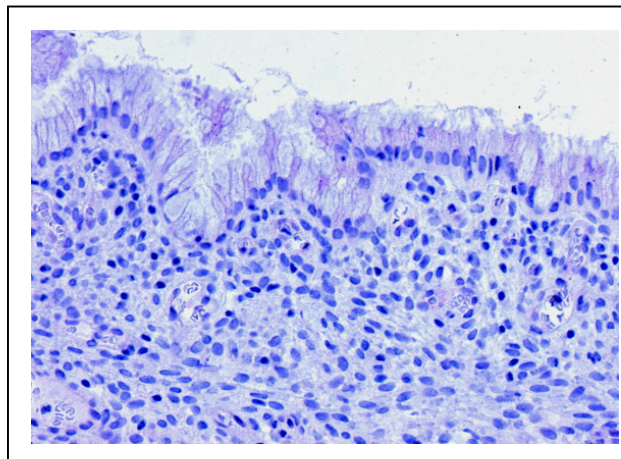


**Abb. 57: Vergrößerte Darstellung eines Kolon-Adenoms**

Ausschnitte aus Abb. 56: linkes Bild 200-fache, rechtes Bild 1000-fache Vergrößerung

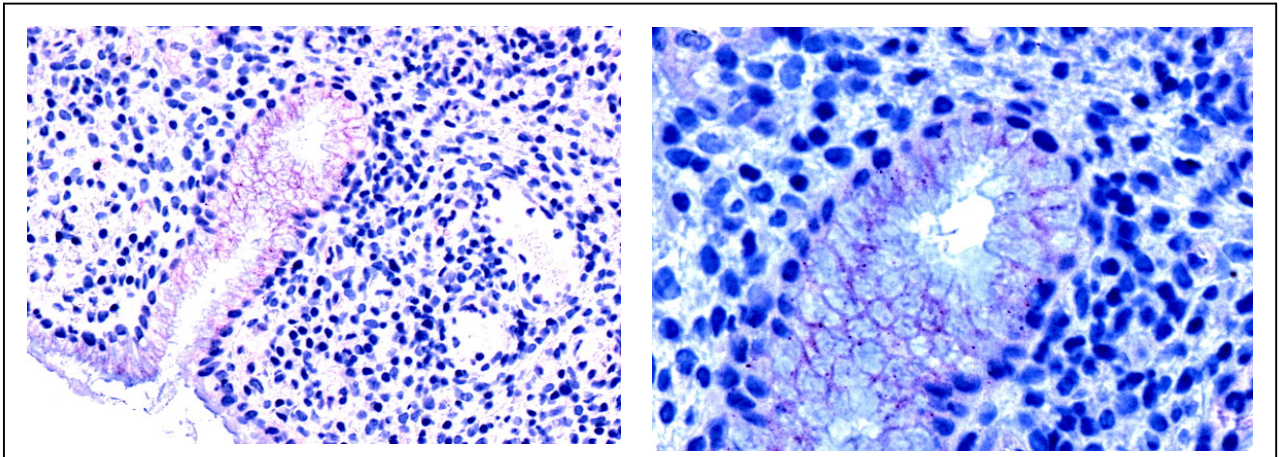
4.5.2.3 In normalem Zervixgewebe wird Notch 1 in der Membran von Schleimhautzellen exprimiert

Nach immunhistologischer Färbung von normalem Zervixgewebe mit Notch 1 Antikörper ist eine Färbung der Schleimhaut zu beobachten (siehe Abb. 58 und 59).



**Abb. 58: Normales Zervixgewebe**

Die Zervix-Schleimhaut über den basalständigen Zellkernen zeigt Notch 1 Expression (Vergrößerung 100-fach).

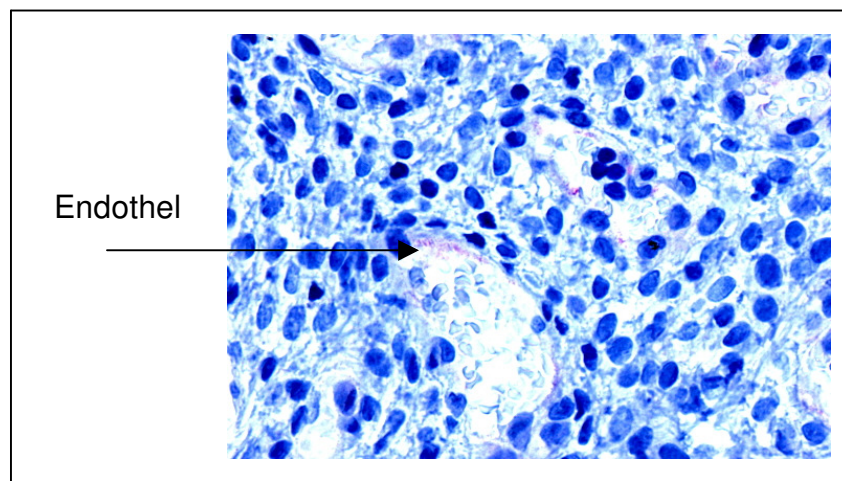


**Abb. 59: Vergrößerte Ausschnitte (links 100-fach, rechts 1000-fach)**

In normalem Zervixgewebe wird Notch 1 in der Membran von Schleimhautzellen exprimiert.

#### 4.5.2.4 Notch 1 Expression im Epithel von Blutgefäßen

Bei Betrachtung der Zervix-Präparate fiel auch eine Notch 1 Expression im Epithel von Blutgefäßen auf (siehe Abb. 60).

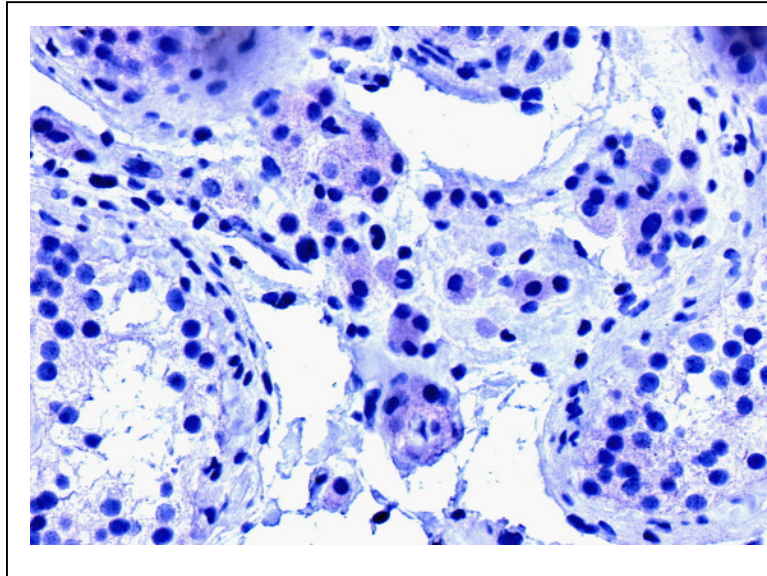


**Abb. 60: Schnitt durch ein kapilläres Blutgefäß**

Das Epithel des Gefäßes ist durch Notch 1 Antikörper angefärbt (Vergrößerung 1000-fach).

#### 4.5.2.5 In den Leydig Zwischenzellen des Hodens wird Notch 1 exprimiert

Nach immunhistologischer Färbung zeigt sich eine Notch 1 Färbung der Leydig Zwischenzellen im Hoden (siehe Abb.61).



**Abb. 61: Präparat von Leydig Zwischenzellen des Hodens**

Es ist eine überwiegend zytoplasmatische Notch 1 Färbung der Leydig Zwischenzellen zu sehen (Vergrößerung 400-fach).



## 5 Diskussion

### 5.1 Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des humanen Notch 1 Rezeptors

Antikörper gegen extrazelluläre Domänen haben gegenüber intrazellulär bindenden Antikörpern den Vorteil, dass lebende Zellen damit markiert und mittels FACS sortiert werden können, ohne vorher die Zellwand permeabilisieren zu müssen. Die Verwendung monoklonaler Antikörper statt polyklonaler Seren sollte zudem helfen, Kreuzreaktionen mit Proteinen, die Notch-ähnliche Domänen enthalten, zu vermeiden. Da die Notch Rezeptoren untereinander sehr homolog sind und die gewonnenen Antikörper spezifisch sein sollten, wurde darauf geachtet, einen Bereich zur Klonierung zu wählen, der auch weniger stark konservierte Abschnitte aufweist. Durch die Verwendung eines Notch 1 spezifischen Primers für die reverse Transkription konnte mittels RT-PCR ein Notch 1 Fragment amplifiziert werden, ohne Nebenprodukte anderer Notch Gene oder weiterer EGF-Abschnitte enthaltener Gene mit zu amplifizieren.

Erfolgreich wurde eine Strategie zur Reinigung des rekombinanten Proteins etabliert, so dass Ratten mit dem Antigen immunisiert werden konnten. Als bedeutend erwies sich bei der Proteinreinigung die Zugabe von Imidazol zu dem Waschpuffer, wodurch eine allzu große Verunreinigung des Proteins durch bakterielle Proteine unterbunden werden konnte. Imidazol konkurriert mit Histidin um die Bindung an Nickel und kann so unspezifische Bindungen von kontaminierenden *E. coli* Proteinen an das Säulenmaterial reduzieren. Als weitere Modifikation wurde dem Lysepuffer  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt, um die Bildung von Disulfidbrücken zwischen kontaminierenden Proteinen und dem 6xHis-Tag Protein zu reduzieren.

Bei der Austestung der erhaltenen monoklonalen anti-Notch 1 Antikörper stellte sich jedoch heraus, dass die Antikörper zur Detektion denaturierter Proteine im Western Blot wie auch zur Markierung nativer Proteine nicht gut geeignet waren. Ein Grund dafür mag in der großen Homologie zwischen dem humanen und dem Ratten Notch 1 Protein liegen, wie der in Abb. 62 dargestellte Vergleich auf Proteinebene zeigt. Darauf könnte auch die geringe Immunogenität des rekombinanten humanen Notch Proteins zurückzuführen sein. Tatsächlich liegt zumindest in den EGF- Bereichen der

Notch Proteine eine größere interspezifische als intraspezifische Homologie vor (Lardelli und Lendahl, 1993).

Mensch.	SYCEDLVDECSPPCQNGATCTDYLGYSCKCVAGYHGVNCSEEIDECLSHPCQNGGTCL	1200
Ratte.	SYCEDEVDECSNPNCQNGATCTDYLGGSCKCVAGYHGSNCSEEINECLSQPCQNGGTCTI	1199
	***** .*****:***** *****:****:*****:	
Mensch.	DLPNTYKCSPRGTQGVHCEINVDDCNPPVDPVSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPPGF	1260
Ratte.	DLTNTYKCSPRGTQGVHCEINVDDCHPPLDPASRSPKCFNNGTCVDQVGGYTCTCPPGF	1259
	** .*****:***:*.*****:*****	
Mensch.	VGERCEGDVNECLSNPCDARGTQNCVQRVNDFHCECRAGHTGRRCESVINGCKGKPCCKNG	1320
Ratte.	VGERCEGDVNECLSNPCDPRGTQNCVQRVNDFHCECRAGHTGRRCESVINGCRGKPCRNG	1319
	***** .*****:****:***	
Mensch.	GTCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTCISGPRSPTCLCLGPFT	1380
Ratte.	GVCASNTARGFICRCPARFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTCISGPRSPTCLCLGSFT	1379
	* .*****:*** ***** .**	
Mensch.	GPECQFPASSPLGGNPCYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFSGGAGRD	1440
Ratte.	GPECQFPASSPCVGSNPCYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFTGAAGRD	1439
	*****:*.***** .****	
Mensch.	IPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKY	1500
Ratte.	IPPPQIEEACELPECQEDAGNKVCSLQCNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKY	1499
	**** ***** .*****	
Mensch.	FSDGHCDSDQNSAGCLFDGFDQRAEQCNPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGL	1560
Ratte.	FSDGHCDSDQNSAGCLFDGFDQLTEGQCNPPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGL	1559
	***** :*****	
Mensch.	DCAEHVPERLAGTLVVVLLMPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHQQMIFPY	1620
Ratte.	DCAEHVPERLAGTLVLVLLPPDQLRNSSFHFLRDVSHVLHTNVVFKRDAQQMIFPY	1619
	*****:***:***.*****:*.*****:*****	
Mensch.	YGREEELRKHP IKRAAEGWAAPDALLGQVKASLLPGGSEGGRRRRELDPMDVRSIVYLE	1680
Ratte.	YGREEELRKHP IKRSVAVGWAT-----TSLLPG-TNGGRQRRELDPMIHGSIVYLE	1669
	*****:* ***: :***** :*:*****:*****	
Mensch.	IDNRQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLGS LNIPYKIEAVQSETVEPPPPAQLHFMVY	1740
Ratte.	IDNRQCVQSSSQCFQSATDVA AFLGALASLGS LNIPYKIEAVKSETVEPPLPSQLHLMVY	1729
	*****:*****:***** *:*:***:***	

**Abb. 62: Homologie von humanem zu Ratten Notch 1 Protein**

Jeweils die erste und letzte Aminosäure des humanen rekombinanten Proteins sind rot dargestellt (Genbank accession: Notch Ratte Q07008, Notch Mensch P46531)

Die erhaltenen extrazellulären Antikörper wurden auf Spezifität und Sensitivität getestet und die experimentellen Bedingungen im Western Blot optimiert um ein zufriedenstellendes Protokoll für die Verwendung dieser Antikörper zu erhalten.

Parallel zu den extrazellulär bindenden Antikörpern wurden im selben Labor Antikörper gegen die intrazelluläre Notch 1 Domäne hergestellt. Diese zeigten eine wesentlich bessere Sensitivität im Western Blot, als die extrazellulären Antikörper, so dass im Folgenden diese Antikörper Verwendung fanden.

Aufgrund dieser Erfahrungen bei der Problematik, monoklonale Antikörper gegen die extrazelluläre Notch Domäne zu erhalten, könnte ein erneuter Ansatz zur Gewinnung spezifischer extrazellulärer Notch 1 Antikörper darin bestehen, Peptide ausgewählter Bereiche als Immunogen zu verwenden. Man könnte auch versuchen, polyklonale Antisera aus Spezies, deren Notch Protein eine geringere Homologie zu humanem Notch Rezeptor aufweist, zu gewinnen.

## **5.2 Expression von Notch 1 und Notch 3 auf Zell-Linien und primären Zellen**

Im Western Blot wurde Notch 1 auf allen T-Zell-Linien gefunden die untersucht worden waren (siehe Tab. 4). Hierbei wurden mit dem intrazellulären Antikörper immer zwei Banden detektiert, nämlich ein ca. 300 kDa und ein ca. 120 kDa Fragment, die im denaturierenden Western Blot aufgetrennt werden. Dabei repräsentiert die 300 kDa Bande das unprozessierte Notch Vorläufer Protein, während das 120 kDa Fragment dem prozessierten intrazellulären Protein entspricht. Teilweise wurde beobachtet, dass Banden von niedrigerem Molekulargewicht unterhalb der 120 kDa Bande auftraten. Hier könnte es sich um ein Produkt nach dem dritten Prozessierungsschritt handeln, also um das Fragment, das in den Zellkern wandert. Allerdings erscheint das eher unwahrscheinlich, da Notch bislang noch nicht direkt im Zellkern nachgewiesen werden konnte und bisher davon ausgegangen wird, dass das an der zu geringen Menge von Notch Protein im Kern liegt. Wahrscheinlich handelt es sich bei den zusätzlichen Banden um proteolytische Produkte, die während der Präparation zustande kommen.

Parallel zur Expression von Notch 1 konnte mit einem gegen die intrazelluläre Domäne von Notch 3 gerichteten Antikörper auch die Expression dieses Proteins im Western Blot analysiert werden. Auch hier ergab sich ein charakteristisches Bild mit einem 280 kDa und einem 97 kDa Fragment. Es konnte gezeigt werden, dass man auch bei Notch 3 von verschiedenen Prozessierungsschritten ausgehen kann und die S1 Spaltung ebenfalls im Golgi Apparat stattfindet.

Zusammenfassung der Western Blot Resultate:

	T-Zellen			B-Zellen		Myeloische Zellen			Stromale Zellen
	Jurkat	HBP-ALL	CEM	Nalm6	GE-LCL	KG1a	HL60	LW/SO	L87/4
N1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N3	+	+	+	-	-	-	-(+)*	(+)*	-

\* N3 wird auf HL-60 und LW/SO nur schwach exprimiert

**Tab. 4: Expression von Notch 1 und Notch 3 auf Zell-Linien**

Expression von Notch 1 und Notch 3 auf Zell-Linien, nachgewiesen im Western Blot. Die Versuchsdurchführung erlaubt hier nur qualitative Aussagen, eine Quantifizierung erfolgte nicht.

Auf T-Zell-Linien werden Notch 1 und Notch 3 parallel exprimiert, auf Zell-Linien der myeloischen Reihe wird mehr Notch 1 als Notch 3 exprimiert. Auf B-Zell-Linien und einer stromalen Zell-Linie war nur Notch 1 Protein nachweisbar.

Da Notch 1 hier auf allen untersuchten Zell-Linien nachgewiesen wurde, wurden zur Ergänzung auch noch einige primäre Zellen untersucht. Notch 1 wurde hier ebenfalls bei allen untersuchten Zell-Fraktionen gefunden: auf CD 34<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen. Diese Ergebnisse finden Entsprechung in anderen Publikationen, die Notch Expression auf primären Zellen untersucht haben (Übersicht von Parreira *et al.*, 2003).

Quantitative Daten, die auf mRNA Ebene erhalten wurden, dürfen allerdings nicht automatisch mit Proteinexpression gleichgesetzt werden. So konnte anhand von Untersuchungen bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden, dass keine

zuverlässige Korrelation zwischen mRNA- und Proteinmenge hergestellt werden kann (Gygi *et al.*, 1999).

Da sich bei diesen Tests abzeichnete, dass der Notch Rezeptor ubiquitär exprimiert zu sein scheint und keine Aussagen über den Aktivierungszustand getroffen werden können, kann anhand dieser Daten keine Aussage über eine mögliche Funktion im Rahmen der Hämatopoese getroffen werden.

Da Notch 1 und Notch 3 auch parallel exprimiert werden, darf davon ausgegangen werden, dass trotz der großen strukturellen und biochemischen Ähnlichkeiten diesen beiden Proteinen verschiedene biologische Aufgaben zukommen.

Allerdings wurde im Gegensatz zu den Zell-Linien auf primären B-Zellen im Western Blot kein Notch Protein gesehen. In der Literatur wird für B-Zellen in erster Linie eine Expression von Notch 2 beschrieben (Saito *et al.*, 2003). Dennoch konnte mit FACS und RT-PCR Notch 1 auf humanen B-Zellen (pro B, frühe prä B, späte prä B, unreife und B-Zellen) nachgewiesen werden (Übersicht von Parreira *et al.*, 2003). Möglicherweise wird bei diesen Zellen Notch 1 sehr schwach exprimiert und damit könnte der Western Blot als Nachweismethode nicht sensitiv genug sein.

### **5.3 Immunhistochemischer Nachweis der Notch 1 Expression in normalem und in Tumorgewebe**

Schon bei der Klonierung des humanen Notch 1 Rezeptors war eine Assoziation mit einer Neoplasie gegeben (siehe Einleitung 1.7.1.1), da verkürzte und aktivierte Notch Proteine einen Teil der T-Zell Leukämien verursachen (Ellisen *et al.*, 1991; Pear *et al.*, 1996). Danach folgten einige weitere Berichte, die Notch im Zusammenhang mit Tumorgeschehen beschrieben (siehe 1.7.1). Daher sollten verschiedene Gewebeschnitte auf ihre Notch 1 Expression hin untersucht werden

#### **5.3.1 Etablierung der APAAP-Färbemethode**

In der vorliegenden Arbeit sollte eine immunhistochemische Färbemethode für die intrazelluläre Notch 1 Domäne etabliert werden, die mit den intrazellulären Antikörpern die Detektion von Notch in Paraffinschnitten erlaubt. Die Entscheidung



fiel für die APAAP-Methode, die durch wiederholtes Anfügen von Substrat zu einer Verstärkung des ursprünglichen Signals führt (siehe Material und Methoden 3.4.5). Da eine intrazelluläre Färbung erfolgen sollte, wurden verschiedene Andauer getestet, um die Gewebeschnitte für Antikörper zu permeabilisieren. Die Spezifität der Färbung wurde in Vorversuchen an HEK-293 Zellen untersucht, die transient mit Notch 1 transfiziert und anschließend in Paraffin eingebettet worden waren. Damit stand ein Testsystem zur Etablierung von Andauungsmethode und Färbung der Zellen zur Verfügung. Da bei transients Überexpression nur ein Teil der Zellen auch tatsächlich erreicht wird, hatte man so eine interne Negativkontrolle anhand der untransfizierten Zellen. Es wurden unterschiedliche Verfahren zur Andauung sowie verschiedene Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten untersucht. Schließlich wurde ein Färbeprotokoll erarbeitet, das spezifisch Notch 1 positive Zellen anfärbte. Nach der erfolgreichen Etablierung auf den transfizierten Zellen wurden Schnitte verschiedener Gewebe dieser Färbeprozedur unterzogen. Dabei stellte sich heraus, dass die Andauung in der Mikrowelle für Brustdrüsengewebe, Knochenmark, Magen, Lymphknoten und Lunge zu intensiv war. Die Proben verkochten und enthielten keine zur Färbung geeignete Struktur mehr.

Bei Leberzellen war eine unspezifische Färbung aller Zellen zu beobachten. Dies könnte auf endogene Phosphatase Aktivität zurückgeführt werden, die nur unzureichend durch Levamisol blockiert wurde. Zur Unterdrückung endogener Peroxidaseaktivität in Leberschnitten müsste man die Schnitte besser mit  $H_2O_2$  vorbehandeln. Für diese empfindlicheren Proben wäre also ein eigenes Färbeprotokoll zu etablieren.

Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Schnitte konnten erfolgreich angefärbt werden.

### 5.3.2 Notch 1 Expression in normalen Geweben und Tumoren

#### 5.3.2.1 Notch 1 Expression im Kolon

Bei den hier untersuchten tubulären Kolon-Adenomen war in Epithelzellen des Adenoms eine intrazelluläre und membranständige Notch 1 Färbung zu erkennen. Immunhistochemisch wurde bereits früher eine Notch 1 Expression in Adenokarzinomen des Kolons nachgewiesen (Zagouras, Stifani *et al.* 1995).

Allerdings wurde dort bei den nicht malignen normalen Drüsen keine Notch 1 Färbung beobachtet. Notch 1 war in dieser Arbeit nur in malignem Gewebe sichtbar. Die Färbung der Schleimhautzellen könnte an der sensitiven APAAP-Färbemethode liegen oder doch auf eine Artefakt zurückzuführen sein.

Mit mRNA *in situ* Hybridisierung wurden in Dünndarmzellen von Mäusen fötal und postnatal alle Notch Rezeptoren und Liganden nachgewiesen (Schroder und Gossler, 2002). Dabei traten Unterschiede sowohl in der Expressionsstärke als auch in der zeitlichen und räumlichen Verteilung auf, ein Hinweis auf den Einfluss des Notch Signalweges bei der Darmdifferenzierung. Ein Mechanismus, bei dem eine Aktivierung der Notch Signalkette über eine Störung der Homöostase zu neoplastischer Transformation führt, scheint also auch im Kolon möglich.

#### 5.3.2.2 Notch 1 Expression in normalem Zervix-Gewebe

Auch in Schnitten durch normales Zervixgewebe war eine Notch Färbung in der Membran von Schleimhautzellen zu sehen, während das darunterliegende Gewebe nicht angefärbt wurde.

Andere Arbeiten kommen zu verschiedenen Resultaten, wobei es allerdings sehr auf den zervikalen Bereich ankommt, der betrachtet wird: In normal differenzierten zervikalen Drüsen wurde immunhistochemisch keine Notch 1 Expression gesehen (Gray *et al.*, 1999). Im Plattenepithel der Ektozervix war im *Stratum spinosum* Notch Rezeptor nachweisbar. In normalem Zylinderepithel der Endozervix war Notch 1 nur auf Reservezellen exprimiert. Basale Epithelzellen an der endozervikal-ektozervikalen Verbindung zeigten eine starke Notch 1 Färbung (Zagouras *et al.*, 1995).

Anders verhält es sich bei der Betrachtung von Zervixkarzinomen. In Zervixkarzinomen wurde eine erhöhte Notch Expression gefunden (Zagouras *et al.*, 1995; Gray *et al.*, 1999). Dabei fand man in einer Subpopulation der Zellkerne eines Plattenkarzinoms, aber auch in einem Adenokarzinom eine Expression von Notch 1. Da bei über 90 % der Zervixkarzinome von einer Beteiligung humaner Papillomaviren (HPV) ausgegangen wird, scheint ein Zusammenspiel von HPV Onkogenen mit dem Notch Signalweg wahrscheinlich. Ein Zusammenwirken von Notch 1 mit dem HPV Onkogen E6 bei der Transformation einer Zell-Linie konnte bereits gezeigt werden (Rangarajan *et al.*, 2001). Daneben existieren allerdings auch Beobachtungen, dass

Notch 1 in HPV infizierten Tumoren im Spätstadium herunterreguliert ist, und dass eine aktive Notch vermittelte Signalgebung einer HPV induzierten Transformation entgegenwirken könnte (Talora *et al.*, 2002). Die Funktion von Notch bei der Progression des Zervixkarzinoms scheint daher stark vom Stadium des Tumors abhängig und sehr komplex zu sein. Immunhistologisch wurden auch Änderungen in der Expression und der zellulären Lokalisation von Notch-Proteinen bei der Transition von hochgradigen Vorstufen zu Tumoren beschrieben (Daniel *et al.*, 1997).

### 5.3.2.3 Notch 1 Expression in Blutgefäß-Endothel

Bei der histologischen Untersuchung der Zervix konnte nebenbei auch eine Anfärbung von Notch 1 im Blutgefäßendothel beobachtet werden.

In der Literatur ist einiges über die Rolle von Notch bei der Entwicklung von Arterien und Venen beschrieben (Übersichten z. B. von Iso *et al.*, 2003; Torres-Vazquez *et al.*, 2003), wobei eine Expression von Notch 1, sowie von Notch 3 und Notch 4 auf Arterien beschränkt zu sein scheint (Villa *et al.*, 2001) und eine Beteiligung des Notch Signalwegs bei der Differenzierung von Arterien und Venen bestehen könnte. Im Zebrafisch wurde gezeigt, dass eine Notch Signalgebung während der Gefäßentwicklung die arterielle Differenzierung auf Kosten venöser Differenzierung fördert (Lawson *et al.*, 2001; Lawson *et al.*, 2002).

Für eine Rolle des Notch Signalweges bei der Entstehung von Blutgefäßen spricht auch, dass genetisch bedingte Erkrankungen wie CADASIL (Cerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukoenzephalopathie) oder AGS (Alagille-Syndrom, arteriohepatische Dysplasie), die durch Mutationen von Notch 3 bzw. Jagged 1 entstehen (siehe 1.7), Fehlbildungen im kardiovaskulären System nach sich ziehen können (Joutel *et al.*, 1996). Außerdem wurden in Epithelzellen Transkripte von Notch 1, Notch 4 und dem Liganden Delta 4 nachgewiesen (Taylor *et al.*, 2002). Während die Expression von Notch 1 und Notch 4 in Blutgefäßen auf das Endothel beschränkt ist, wird Notch 3 Expression in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur adulter Gewebe beschrieben (z. B. Joutel *et al.*, 2000).

#### 5.3.2.4 Notch 1 Expression im Hoden

Bei dem hier vorliegenden Hodenpräparat ist ein positives intrazelluläres Notch 1 Signal auf den Leydig-Zwischenzellen zu erkennen. Bisher ist nur wenig über eine Rolle von Notch im Hoden publiziert. Bei *Drosophila* wurde gezeigt, dass Notch an Oogenese und Spermatogenese beteiligt ist und Einfluss auf die Fruchtbarkeit von männlichen und weiblichen Individuen hat (Xu *et al.*, 1992).

Eine besondere Rolle scheint allerdings vor allem Notch 4 im Hoden zuzukommen. So wurden Notch 4 Transkripte in post-meiotischen Keimzellen in adultem Maus Testis gefunden (Uyttendaele *et al.*, 1996). Diese Transkripte hatten eine andere Länge als aus anderen Geweben bekannt. Auch beim Menschen wurde in normalem adultem Testis Notch 4 RNS nachgewiesen (Imatani und Callahan, 2000).

#### 5.3.2.5 Notch 1 Expression im Karzinom der Haut

Eine Untersuchung der Beteiligung von Notch an Neoplasien der Haut erschien besonders vielversprechend, da aus *Drosophila* bekannt war, dass Notch an der Epidermisbildung beteiligt ist (z. B. Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Hier wird über den Notch Signalweg die Entscheidung zwischen neuronalem oder epidermalemem Differenzierungsweg gefällt. Die neurogenen Gene vermitteln über Zell-zu-Zell Kontakte Prozesse, bei denen eine Zelle einen neuronalen Typ annimmt und damit die anderen Zellen davon abhält, ebenfalls neuronal zu werden. Diese Zellen entwickeln sich dann zu Epidermis (z. B. Heitzler und Simpson, 1991). Sogenannte „loss of function“ Mutationen führen daher zu einem neurogenen Phänotyp, bei dem Zellen, die eigentlich zu Epidermis differenzieren sollten, zu neuronalen Zellen differenzieren (siehe auch 1.2.1).

Auch bei Vertebraten gab es bereits Hinweise auf einen Notch Signalweg in der Haut: Notch, Notch-Liganden und weitere Komponenten des Notch Signalwegs werden in der Epidermis von Vertebraten exprimiert und zwar in unterschiedlichen Mustern, abhängig vom Grad der Differenzierung der Keratinozyten (Liu *et al.*, 1996). Ferner wurde bei adulten Mäusen eine Notch 1 Expression in der Epidermis sowie in den äußeren Haarwurzelscheiden und Matrixzellen von Haarfollikeln beschrieben (Powell *et al.*, 1998). Außerdem konnte mittels *in situ* Hybridisierung die Expression

des humanen Liganden Jagged 2 in der Epidermis nachgewiesen werden (Luo *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden Karzinome der Haut untersucht. Dabei war eine Notch Färbung im proliferierenden, regenerativen Bereich (*Stratum basale*) zu sehen. Im Basaliom hingegen war diese Notch 1 Expression verschwunden. Da hier eine Notch 1 Expression im Bereich des Tumors nicht mehr vorhanden ist, könnte Notch eine Rolle als Tumorsuppressor spielen.

Diese hier vorliegende Beobachtung auf Proteinebene wird durch Ergebnisse ergänzt, die an Biopsien durch sogenannte *in situ* Hybridisierung mit „antisense Riboprobes“ gewonnen wurden und eine Herabregulation von Notch Rezeptoren beim Basaliom beschreiben (Thelu *et al.*, 2002). So waren unter anderem Notch1-3, Delta 1 und Jagged 1 in der Basalzellschicht normaler Haut am stärksten exprimiert. Bei der übermäßigen Proliferation von Keratinozyten, wie z. B. bei einem Basaliom war die Expression schwach oder nicht mehr vorhanden.

Bei transgenen Mäusen mit einer für Keratinozyten spezifischen konditionalen Notch 1 Deletion wurde gezeigt, dass die Entfernung von Notch 1 aus dem Hautepithel zu einem Verlust der normalen Wachstumskontrolle führt und damit zu epidermaler Hyperproliferation und reduzierter Differenzierung in der Epidermis (Rangarajan *et al.*, 2001). Auch bei primären Keratinozyten in Zellkultur führte eine Aktivierung von Notch zu einer Wachstumshemmung.

In einem weiteren Mausmodell konnte über ein gewebespezifisches induzierbares „gen-targeting“ System die Rolle von Notch 1 in Epidermis und Kornea Epithel untersucht werden (Nicolas *et al.*, 2003). Dabei führte eine fehlende Expression von Notch 1 zu epidermaler und kornealer Hyperplasie gefolgt von Hauttumoren und einer erleichterten durch Chemikalien induzierbaren Karzinogenese der Haut. Das Fehlen von Notch 1 in Haut und primären Keratinozyten führte zur Entwicklung von Basaliom ähnlichen Tumoren. All diese Ergebnisse deuten auf eine Funktion von Notch 1 in Säugerhaut als Tumor-Suppressor hin.

Auch eine Untersuchung der Rolle des Delta-Notch Signalwegs in humaner Epidermis weist darauf hin, dass sich die Notch Signalgebung in epidermalen Stammzellen von anderen Vorläuferzellen unterscheidet (Lowell *et al.*, 2000). Durch Notch scheint hier eine Differenzierung eher gefördert als unterdrückt zu werden.

Die Expression von Notch 1 Rezeptor in der Basalzellschicht, in der auch die Stammzellen liegen, spricht für eine Funktion des Notch Signalweges bei der Differenzierung der Zellen in der Basalzellschicht zu epidermalen Zellen. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass der Notch Ligand Delta in der basalen Schicht exprimiert wird (Lowell *et al.*, 2000) und zwar begrenzt auf Bereiche, in denen Stammzellen liegen. Es wurde auch ein protektiver Effekt von einer starken Delta Expression auf den Erhalt von Stammzellen beschrieben (Lowell *et al.*, 2000).

Auch Versuche mit dem Notch Liganden Jagged zeigten, dass zur Reifung humaner Epidermis der Notch Signalweg erforderlich ist: Um eine vollständige Differenzierung von Keratinozyten einschließlich Kornifizierung einzuleiten war in einem Modellsystem eine Aktivierung durch ein lösliches Jagged 1 Peptid ausreichend (Nickoloff *et al.*, 2002).

Allerdings darf die Rolle des Notch Signalweges keinesfalls isoliert betrachtet werden, zumal im Falle der Entstehung des Basalioms bekannt ist, dass eine Fehlregulation in der hedgehog Signalkaskade maßgeblich beteiligt ist (Wicking und McGlinn, 2001).

#### **5.4 Mögliche Therapie-Ansätze**

Das Ziel einer Notch Forschung ist die Klärung einer möglichen Notch Beteiligung (ursächlich oder sekundär) am Krankheitsgeschehen, um letztlich durch Identifizierung und Aufklärung des Notch Signal-Netzwerkes therapeutisch eingreifen zu können.

Unter Berücksichtigung eigener Ergebnisse und der Literatur zeichnet sich eine vielfältige Rolle für Notch bei der Entstehung von Tumoren ab. Dabei müssen die zugrundeliegenden Mechanismen noch weiter untersucht werden, zumal sich unterschiedliche Effekte der Notch Signalgebung bei verschiedenem zellulärem Kontext abzeichnen: Onkogen oder Tumor-Suppressor. Vielleicht könnten damit neue Ziele für eine Tumorthherapie gefunden werden.

Für potenzielle Therapien von Erkrankungen, die durch eine Überfunktion der Notch Signaltransduktion hervorgerufen werden, sind vielfältige Ansätze denkbar. Etwa

Blockierung durch monoklonale Antikörper, Einsatz von „antisense RNA interference“ oder von künstlichen Liganden oder Molekülen, die zur Blockierung des Rezeptors führen, Manipulation der beteiligten Enzyme und Liganden etc. Entsprechend müsste der Ansatz für eine gewollte Aktivierung von Notch zum Beispiel in der Haut als Tumor Suppressor Gen über aktivierende Strategien verlaufen. Das könnten etwa Liganden-ähnliche aktivierende Peptide sein.

Bei der mittlerweile ausführlich untersuchten T-ALL scheint Notch eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese zuzukommen. Da die meisten mutierten Notch-Formen eine  $\gamma$ -Sekretase zur Aktivierung benötigen, könnte der Einsatz von  $\gamma$ -Sekretase-Hemmern erfolgversprechend sein. Allerdings wurde bei entsprechenden Experimenten mit Zebrafischen und *Drosophila* festgestellt, dass dadurch ähnliche Wirkungen wie man sie von Notch „loss of function“ Mutationen kennt, auftreten (Geling *et al.*, 2002; Micchelli *et al.*, 2003). In welcher Weise die auch aus der Alzheimer Therapie bekannte Behandlung mit  $\gamma$ -Sekretase-Hemmern modifiziert werden kann, bleibt zu untersuchen.

Aufgrund einer möglichen Wirkung von Notch als Tumorsuppressor beim Basaliom und der vielfältigen Beteiligungen des Notch-Signalweges und seiner Komponenten besteht das Risiko weitreichender unerwünschter Nebenwirkungen.

Von großer Herausforderung bei einem Therapieansatz über den Notch Signalweg könnte dabei auch sein, die entsprechenden Substanzen zielgerichtet an ihren Wirkungsort zu bringen um besonders systemische Nebenwirkungen zu vermeiden.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten monoklonale Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des humanen Notch 1 Rezeptors als Werkzeug für weitergehende Untersuchungen hergestellt werden. Dazu konnte erfolgreich ein Reinigungsprotokoll zur Aufreinigung eines rekombinanten Proteins aus dem extrazellulären Teil von Notch 1 etabliert werden. Das Austesten der Antikörper ergab, dass diese aufgrund von geringer Sensitivität im Western Blot nicht zu verwenden waren. Auch im FACS konnten sie nicht eingesetzt werden, da keine Bindung an natives Notch erfolgte. Daher wurde auf die Verwendung von mittlerweile verfügbaren Antikörpern gegen die intrazelluläre Notch Domäne zurückgegriffen. Damit konnte gezeigt werden, dass Notch 1 Rezeptor auf allen untersuchten Proben von primären Zellen exprimiert wird, sowie auf allen untersuchten Zell-Linien. Unter Verwendung von Notch 3 Antikörpern wurde die parallele Expression von Notch 1 und Notch 3 auf Zell-Linien analysiert und festgestellt, dass auf T-Zell-Linien Notch 1 und Notch 3 gleichzeitig exprimiert werden. Biochemische Untersuchungen zeigten, dass Notch 3 wie Notch 1 einer S1 Prozessierung im Golgi-Netzwerk zu unterliegen scheint.

Mit den intrazellulär bindenden Notch 1 Antikörpern konnte eine immunhistochemische intrazelluläre Notch 1 Färbemethode etabliert werden, die eine Untersuchung von (Tumor-) Gewebe erlaubte. Das unterschiedliche Expressionsmuster von Notch lässt auf unterschiedliche Mechanismen bei der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung schließen. So konnte in Tumoren der Haut keine Notch 1 Expression gesehen werden, jedoch im Str. basale. In Zellen des Kolonadenoms dagegen war eine Notch 1 Expression zu erkennen. Zusätzlich zu der bereits in der Literatur ausführlich beschriebenen Rolle von Notch als Onkogen tritt, abhängig vom untersuchten System, Notch auch in der Rolle eines Tumorsuppressorgens auf. Allerdings kann durch eine immunhistochemische Untersuchung der Notch 1 Expression allein keine Aussage getroffen werden, ob eine Änderung der Notch Expression Ursache für einen Transformationsprozess ist, oder als Folge eines solchen Prozesses auftritt. Dennoch liefert die parallele Untersuchung von gesundem und Tumor-Gewebe einen ersten Hinweis auf eine wie auch immer geartete Beteiligung des Notch Signalweges.

Prinzipiell ist bei der Interpretation auch zu beachten, dass hier die Notch 1 Färbung keine Aussage über den Aktivierungszustand von Notch liefern kann, da nicht



gesichert ist, ob und in welcher Quantität Notch im Zellkern mit dieser Methode nachweisbar ist.

Der Notch Signalweg hat vielfältige Auswirkungen. Zur Aufklärung aller Mechanismen ist noch weitere intensive Forschung nötig. Nur dann können Möglichkeiten zur Beeinflussung und Therapie gefunden werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002).  
Molecular Biology of the Cell (4<sup>th</sup> edition), Garland Science, New York
- Allenspach, E. J., Maillard, I., Aster, J. C., and Pear, W. S. (2002). Notch signaling in cancer. *Cancer Biol Ther* **1**, 466-76.
- Allman, D., Aster, J. C., and Pear, W. S. (2002). Notch signaling in hematopoiesis and early lymphocyte development. *Immunol Rev* **187**, 75-86.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M. E. (1995). Notch signaling. *Science* **268**, 225-32.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-6.
- Aster, J. C., Simms, W. B., Zavala-Ruiz, Z., Patriub, V., North, C. L., and Blacklow, S. C. (1999). The folding and structural integrity of the first LIN-12 module of human Notch1 are calcium-dependent. *Biochemistry* **38**, 4736-42.
- Aster, J. C., Xu, L., Karnell, F. G., Patriub, V., Pui, J. C., and Pear, W. S. (2000). Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by notch1. *Mol Cell Biol* **20**, 7505-15.
- Bellavia, D., Campese, A. F., Alesse, E., Vacca, A., Felli, M. P., Balestri, A., Stoppacciaro, A., Tiveron, C., Tatangelo, L., Giovarelli, M., Gaetano, C., Ruco, L., Hoffman, E. S., Hayday, A. C., Lendahl, U., Frati, L., Gulino, A., and Screpanti, I. (2000). Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *Embo J* **19**, 3337-48.
- Berdnik, D., Torok, T., Gonzalez-Gaitan, M., and Knoblich, J. A. (2002). The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in Drosophila. *Dev Cell* **3**, 221-31.
- Berry, L. W., Westlund, B., and Schedl, T. (1997). Germ-line tumor formation caused by activation of glp-1, a Caenorhabditis elegans member of the Notch family of receptors. *Development* **124**, 925-36.
- Bettenhausen, B., Hrabe de Angelis, M., Simon, D., Guenet, J. L., and Gossler, A. (1995). Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta. *Development* **121**, 2407-18.

- Bigas, A., Martin, D. I., and Milner, L. A. (1998). Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol Cell Biol* **18**, 2324-33.
- Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* **90**, 281-91.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A., and Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* **5**, 207-16.
- Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H., and Cohen, S. (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* **406**, 411-5.
- Bulman, M. P., Kusumi, K., Frayling, T. M., McKeown, C., Garrett, C., Lander, E. S., Krumlauf, R., Hattersley, A. T., Ellard, S., and Turnpenny, P. D. (2000). Mutations in the human delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. *Nat Genet* **24**, 438-41.
- Bush, G., diSibio, G., Miyamoto, A., Denault, J. B., Leduc, R., and Weinmaster, G. (2001). Ligand-induced signaling in the absence of furin processing of Notch1. *Dev Biol* **229**, 494-502.
- Chan, Y. M., and Jan, Y. N. (1999). Presenilins, processing of beta-amyloid precursor protein, and notch signaling. *Neuron* **23**, 201-4.
- Cheng, P., Zlobin, A., Volgina, V., Gottipati, S., Osborne, B., Simel, E. J., Miele, L., and Gabilovich, D. I. (2001). Notch-1 regulates NF-kappaB activity in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* **167**, 4458-67.
- Colliton, R. P., Bason, L., Lu, F. M., Piccoli, D. A., Krantz, I. D., and Spinner, N. B. (2001). Mutation analysis of Jagged1 (JAG1) in Alagille syndrome patients. *Hum Mutat* **17**, 151-2.
- Crosnier, C., Driancourt, C., Raynaud, N., Hadchouel, M., and Meunier-Rotival, M. (2001). Fifteen novel mutations in the JAGGED1 gene of patients with Alagille syndrome. *Hum Mutat* **17**, 72-3.
- Daniel, B., Rangarajan, A., Mukherjee, G., Vallikad, E., and Krishna, S. (1997). The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. *J Gen Virol* **78**, 1095-101.

- Davis, R. L., and Turner, D. L. (2001). Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* **20**, 8342-57.
- de Celis, J. F., and Bray, S. J. (2000). The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe. *Development* **127**, 1291-302.
- de la Pompa, J. L., Wakeham, A., Correia, K. M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R. J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T. W., Rossant, J., and Conlon, R. A. (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* **124**, 1139-48.
- Deblandre, G. A., Lai, E. C., and Kintner, C. (2001). Xenopus neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling. *Dev Cell* **1**, 795-806.
- Deftos, M. L., He, Y. W., Ojala, E. W., and Bevan, M. J. (1998). Correlating notch signaling with thymocyte maturation. *Immunity* **9**, 777-86.
- Dievart, A., Beaulieu, N., and Jolicoeur, P. (1999). Involvement of Notch1 in the development of mouse mammary tumors. *Oncogene* **18**, 5973-81.
- Dunwoodie, S. L., Clements, M., Sparrow, D. B., Sa, X., Conlon, R. A., and Beddington, R. S. (2002). Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene Dll3 are associated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm. *Development* **129**, 1795-806.
- Dunwoodie, S. L., Henrique, D., Harrison, S. M., and Beddington, R. S. (1997). Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* **124**, 3065-76.
- Ebinu, J. O., and Yankner, B. A. (2002). A RIP tide in neuronal signal transduction. *Neuron* **34**, 499-502.
- Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D., and Sklar, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**, 649-61.
- Favier, B., Fliniaux, I., Thelu, J., Viallet, J. P., Demarchez, M., Jahoda, C. A., and Dhouailly, D. (2000). Localisation of members of the notch system and the

- differentiation of vibrissa hair follicles: receptors, ligands, and fringe modulators. *Dev Dyn* **218**, 426-37.
- Favre, C. J., Mancuso, M., Maas, K., McLean, J. W., Baluk, P., and McDonald, D. M. (2003). Expression of genes involved in vascular development and angiogenesis in endothelial cells of adult lung. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H1917-38. Epub 2003 Jul 3.
- Fitzgerald, K., and Greenwald, I. (1995). Interchangeability of *Caenorhabditis elegans* DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo. *Development* **121**, 4275-82.
- Fortini, M. E. (2001). Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 627-34.
- Fortini, M. E. (2002). Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 673-84.
- Fortini, M. E., and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell* **79**, 273-82.
- Fryer, C. J., Lamar, E., Turbachova, I., Kintner, C., and Jones, K. A. (2002). Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev* **16**, 1397-411.
- Gallahan, D., Jhappan, C., Robinson, G., Hennighausen, L., Sharp, R., Kordon, E., Callahan, R., Merlino, G., and Smith, G. H. (1996). Expression of a truncated Int3 gene in developing secretory mammary epithelium specifically retards lobular differentiation resulting in tumorigenesis. *Cancer Res* **56**, 1775-85.
- Gallahan, D., and Callahan, R. (1997). The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). *Oncogene* **14**, 1883-90.
- Garces, C., Ruiz-Hidalgo, M. J., de Mora, J. F., Park, C., Miele, L., Goldstein, J., Bonvini, E., Porras, A., and Laborda, J. (1997). Notch-1 controls the expression of fatty acid-activated transcription factors and is required for adipogenesis. *J Biol Chem* **272**, 29729-34.
- Geling, A., Steiner, H., Willem, M., Bally-Cuif, L., and Haass, C. (2002). A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep* **3**, 688-94.
- Girard, L., and Jolicœur, P. (1998). A full-length Notch1 allele is dispensable for transformation associated with a provirally activated truncated Notch1 allele in

- Moloney MuLV-infected MMTV(D)/myc transgenic mice. *Oncogene* **16**, 517-22.
- Gray, G. E., Mann, R. S., Mitsiadis, E., Henrique, D., Carcangiu, M. L., Banks, A., Leiman, J., Ward, D., Ish-Horowitz, D., and Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Human ligands of the Notch receptor. *Am J Pathol* **154**, 785-94.
- Greenwald, I. (1994). Structure/function studies of lin-12/Notch proteins. *Curr Opin Genet Dev* **4**, 556-62.
- Greenwald, I. (1998). LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev* **12**, 1751-62.
- Guidos, C. J. (2002). Notch signaling in lymphocyte development. *Semin Immunol* **14**, 395-404.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., and Aebersold, R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* **19**, 1720-30.
- Harper, J. A., Yuan, J. S., Tan, J. B., Visan, I., and Guidos, C. J. (2003). Notch signaling in development and disease. *Clin Genet* **64**, 461-72.
- Heitzler, P., and Simpson, P. (1991). The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* **64**, 1083-92.
- Henderson, S. T., Gao, D., Christensen, S., and Kimble, J. (1997). Functional domains of LAG-2, a putative signaling ligand for LIN-12 and GLP-1 receptors in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **8**, 1751-62.
- Hicks, C., Johnston, S. H., diSibio, G., Collazo, A., Vogt, T. F., and Weinmaster, G. (2000). Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nat Cell Biol* **2**, 515-20.
- Hirsinger, E., Malapert, P., Dubrulle, J., Delfini, M. C., Duprez, D., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Pourquie, O. (2001). Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation. *Development* **128**, 107-16.
- Hoppe, P. E., and Greenspan, R. J. (1990). The Notch locus of *Drosophila* is required in epidermal cells for epidermal development. *Development* **109**, 875-85.
- Hsieh, J. J., Henkel, T., Salmon, P., Robey, E., Peterson, M. G., and Hayward, S. D. (1996). Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol Cell Biol* **16**, 952-9.

- 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**, 23-8.
- Hukriede, N. A., Gu, Y., and Fleming, R. J. (1997). A dominant-negative form of Serrate acts as a general antagonist of Notch activation. *Development* **124**, 3427-37.
- Imatani, A., and Callahan, R. (2000). Identification of a novel NOTCH-4/INT-3 RNA species encoding an activated gene product in certain human tumor cell lines. *Oncogene* **19**, 223-31.
- Irvine, K. D. (1999). Fringe, Notch, and making developmental boundaries. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 434-41.
- Iso, T., Hamamori, Y., and Kedes, L. (2003a). Notch Signaling in Vascular Development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **13**, 13.
- Iso, T., Kedes, L., and Hamamori, Y. (2003b). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* **194**, 237-55.
- Izon, D. J., Aster, J. C., He, Y., Weng, A., Karnell, F. G., Patriub, V., Xu, L., Bakkour, S., Rodriguez, C., Allman, D., and Pear, W. S. (2002). Deltex1 redirects lymphoid progenitors to the B cell lineage by antagonizing Notch1. *Immunity* **16**, 231-43.
- Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1998). Asymmetric cell division. *Nature* **392**, 775-8.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R., and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* **377**, 355-8.
- Jeffries, S., Robbins, D. J., and Capobianco, A. J. (2002). Characterization of a high-molecular-weight Notch complex in the nucleus of Notch(ic)-transformed RKE cells and in a human T-cell leukemia cell line. *Mol Cell Biol* **22**, 3927-41.
- Jehn, B. M., Bielke, W., Pear, W. S., and Osborne, B. A. (1999). Cutting edge: protective effects of notch-1 on TCR-induced apoptosis. *J Immunol* **162**, 635-8.
- 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**, 8033-40.
- Jen, W. C., Wettstein, D., Turner, D., Chitnis, A., and Kintner, C. (1997). The Notch ligand, X-Delta-2, mediates segmentation of the paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development* **124**, 1169-78.

- Jhappan, C., Gallahan, D., Stahle, C., Chu, E., Smith, G. H., Merlino, G., and Callahan, R. (1992). Expression of an activated Notch-related int-3 transgene interferes with cell differentiation and induces neoplastic transformation in mammary and salivary glands. *Genes Dev* **6**, 345-55.
- Johnston, L. A., and Edgar, B. A. (1998). Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing. *Nature* **394**, 82-4.
- Joutel, A., Andreux, F., Gaulis, S., Domenga, V., Cecillon, M., Battail, N., Piga, N., Chapon, F., Godfrain, C., and Tournier-Lasserre, E. (2000a). The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J Clin Invest* **105**, 597-605.
- Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cecillon, M., Marechal, E., Maciasek, J., Vayssiere, C., Cruaud, C., Cabanis, E. A., Ruchoux, M. M., Weissenbach, J., Bach, J. F., Bousser, M. G., and Tournier-Lasserre, E. (1996). Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* **383**, 707-10.
- Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cecillon, M., Marechal, E., Maciasek, J., Vayssiere, C., Cruaud, C., Cabanis, E. A., Ruchoux, M. M., Weissenbach, J., Bach, J. F., Bousser, M. G., and Tournier-Lasserre, E. (1997). Notch3 mutations in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), a mendelian condition causing stroke and vascular dementia. *Ann N Y Acad Sci* **826**, 213-7.
- Joutel, A., Francois, A., Chabriat, H., Vahedi, K., Andreux, F., Domenga, V., Cecillon, M., Maciasek, J., Bousser, M. G., and Tournier-Lasserre, E. (2000b). [CADASIL: genetics and physiopathology]. *Bull Acad Natl Med* **184**, 1535-42; discussion 1542-4.
- Kageyama, R., and Ohtsuka, T. (1999). The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell Res* **9**, 179-88.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., and Tomita, K. (2000). The bHLH gene Hes1 regulates differentiation of multiple cell types. *Mol Cells* **10**, 1-7.
- 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**, 2269-77.
- 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**, 4133-41.
- Kidd, S., Kelley, M. R., and Young, M. W. (1986). Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Mol Cell Biol* **6**, 3094-108.
- Kidd, S., and Lieber, T. (2002). Furin cleavage is not a requirement for *Drosophila* Notch function. *Mech Dev* **115**, 41-51.
- Kishi, N., Tang, Z., Maeda, Y., Hirai, A., Mo, R., Ito, M., Suzuki, S., Nakao, K., Kinoshita, T., Kadesch, T., Hui, C., Artavanis-Tsakonas, S., Okano, H., and Matsuno, K. (2001). Murine homologs of deltex define a novel gene family involved in vertebrate Notch signaling and neurogenesis. *Int J Dev Neurosci* **19**, 21-35.
- Kopan, R., Nye, J. S., and Weintraub, H. (1994). The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development* **120**, 2385-96.
- Kramer, H. (2001). Neuralized: regulating notch by putting away delta. *Dev Cell* **1**, 725-6.
- Krantz, I. D., Colliton, R. P., Genin, A., Rand, E. B., Li, L., Piccoli, D. A., and Spinner, N. B. (1998). Spectrum and frequency of jagged1 (JAG1) mutations in Alagille syndrome patients and their families. *Am J Hum Genet* **62**, 1361-9.
- Kurata, S., Go, M. J., Artavanis-Tsakonas, S., and Gehring, W. J. (2000). Notch signaling and the determination of appendage identity. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2117-22.
- 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**, 7238-44.
- Kurooka, H., and Honjo, T. (2000). Functional interaction between the mouse notch1 intracellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5. *J Biol Chem* **275**, 17211-20.

- 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**, 5448-55.
- Lai, E. C. (2002). Protein degradation: four E3s for the notch pathway. *Curr Biol* **12**, R74-8.
- Lai, E. C., and Rubin, G. M. (2001). Neuralized is essential for a subset of Notch pathway-dependent cell fate decisions during Drosophila eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5637-42.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Lardelli, M., Dahlstrand, J., and Lendahl, U. (1994). The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev* **46**, 123-36.
- Lardelli, M., and Lendahl, U. (1993). Motch A and motch B--two mouse Notch homologues coexpressed in a wide variety of tissues. *Exp Cell Res* **204**, 364-72.

- Lardelli, M., Williams, R., Mitsiadis, T., and Lendahl, U. (1996). Expression of the Notch 3 intracellular domain in mouse central nervous system progenitor cells is lethal and leads to disturbed neural tube development. *Mech Dev* **59**, 177-90.
- Larsson, C., Lardelli, M., White, I., and Lendahl, U. (1994). The human NOTCH1, 2, and 3 genes are located at chromosome positions 9q34, 1p13-p11, and 19p13.2-p13.1 in regions of neoplasia-associated translocation. *Genomics* **24**, 253-8.
- Lawson, N. D., Scheer, N., Pham, V. N., Kim, C. H., Chitnis, A. B., Campos-Ortega, J. A., and Weinstein, B. M. (2001). Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* **128**, 3675-83.
- Lawson, N. D., Vogel, A. M., and Weinstein, B. M. (2002). sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell* **3**, 127-36.
- Le Caignec, C., Lefevre, M., Schott, J. J., Chaventre, A., Gayet, M., Calais, C., and Moisan, J. P. (2002). Familial deafness, congenital heart defects, and posterior embryotoxon caused by cysteine substitution in the first epidermal-growth-factor-like domain of jagged 1. *Am J Hum Genet* **71**, 180-6.
- Lecourtois, M., and Schweisguth, F. (1998). Indirect evidence for Delta-dependent intracellular processing of notch in Drosophila embryos. *Curr Biol* **8**, 771-4.
- Li, L., Krantz, I. D., Deng, Y., Genin, A., Banta, A. B., Collins, C. C., Qi, M., Trask, B. J., Kuo, W. L., Cochran, J., Costa, T., Pierpont, M. E., Rand, E. B., Piccoli, D. A., Hood, L., and Spinner, N. B. (1997). Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet* **16**, 243-51.
- Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V., and Young, M. W. (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev* **7**, 1949-65.
- Lieber, T., Kidd, S., and Young, M. W. (2002). kuzbanian-mediated cleavage of Drosophila Notch. *Genes Dev* **16**, 209-21.
- Lieber, T., Wesley, C. S., Alcamo, E., Hassel, B., Krane, J. F., Campos-Ortega, J. A., and Young, M. W. (1992). Single amino acid substitutions in EGF-like

- elements of Notch and Delta modify *Drosophila* development and affect cell adhesion in vitro. *Neuron* **9**, 847-59.
- Lin, M. H., Leimeister, C., Gessler, M., and Kopan, R. (2000). Activation of the Notch pathway in the hair cortex leads to aberrant differentiation of the adjacent hair-shaft layers. *Development* **127**, 2421-32.
- Lindsell, C. E., Shawber, C. J., Boulter, J., and Weinmaster, G. (1995). Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* **80**, 909-17.
- Liu, Y., Dehni, G., Purcell, K. J., Sokolow, J., Carcangiu, M. L., Artavanis-Tsakonas, S., and Stifani, S. (1996). Epithelial expression and chromosomal location of human TLE genes: implications for notch signaling and neoplasia. *Genomics* **31**, 58-64.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., and Israel, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8108-12.
- Lowell, S., Jones, P., Le Roux, I., Dunne, J., and Watt, F. M. (2000). Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol* **10**, 491-500.
- Liu, Y., Dehni, G., Purcell, K. J., Sokolow, J., Carcangiu, M. L., Artavanis-Tsakonas, S., and Stifani, S. (1996). Epithelial expression and chromosomal location of human TLE genes: implications for notch signaling and neoplasia. *Genomics* **31**, 58-64.
- Liu, Z. J., Shirakawa, T., Li, Y., Soma, A., Oka, M., Dotto, G. P., Fairman, R. M., Velazquez, O. C., and Herlyn, M. (2003). Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol* **23**, 14-25.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., and Israel, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8108-12.
- Lowell, S., Jones, P., Le Roux, I., Dunne, J., and Watt, F. M. (2000). Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol* **10**, 491-500.
- Lu, B., Rothenberg, M., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1998). Partner of Numb colocalizes with Numb during mitosis and directs Numb asymmetric localization in *Drosophila* neural and muscle progenitors. *Cell* **95**, 225-35.

- Luo, B., Aster, J. C., Hasserjian, R. P., Kuo, F., and Sklar, J. (1997). Isolation and functional analysis of a cDNA for human Jagged2, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor. *Mol Cell Biol* **17**, 6057-67.
- Lyman, D., and Young, M. W. (1993). Further evidence for function of the Drosophila Notch protein as a transmembrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10395-9.
- Matsuno, K., Diederich, R. J., Go, M. J., Blaumueller, C. M., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* **121**, 2633-44.
- Matsuno, K., Go, M. J., Sun, X., Eastman, D. S., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Suppressor of Hairless-independent events in Notch signaling imply novel pathway elements. *Development* **124**, 4265-73.
- Micchelli, C. A., Esler, W. P., Kimberly, W. T., Jack, C., Berezovska, O., Kornilova, A., Hyman, B. T., Perrimon, N., and Wolfe, M. S. (2003). Gamma-secretase/presenilin inhibitors for Alzheimer's disease phenocopy Notch mutations in Drosophila. *Faseb J* **17**, 79-81.
- Miele, L., and Osborne, B. (1999). Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J Cell Physiol* **181**, 393-409.
- Miller, D. T., and Cagan, R. L. (1998). Local induction of patterning and programmed cell death in the developing Drosophila retina. *Development* **125**, 2327-35.
- Milner, L. A., Kopan, R., Martin, D. I., and Bernstein, I. D. (1994). A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors. *Blood* **83**, 2057-62.
- Mohr, O. L. (1919). Character changes caused by mutation of an entire region of a chromosome in Drosophila. *Genetics* **4**, 275-82.
- Moloney, D. J., Panin, V. M., Johnston, S. H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K. D., Haltiwanger, R. S., and Vogt, T. F. (2000a). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **406**, 369-75.
- Moloney, D. J., Shair, L. H., Lu, F. M., Xia, J., Locke, R., Matta, K. L., and Haltiwanger, R. S. (2000b). Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. *J Biol Chem* **275**, 9604-11.
- Mumm, J. S., and Kopan, R. (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* **228**, 151-65.

- Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Saxena, M. T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D. J., Ray, W. J., and Kopan, R. (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* **5**, 197-206.
- Munro, S., and Freeman, M. (2000). The notch signalling regulator fringe acts in the Golgi apparatus and requires the glycosyltransferase signature motif DXD. *Curr Biol* **10**, 813-20.
- Nam, Y., Aster, J. C., and Blacklow, S. C. (2002). Notch signaling as a therapeutic target. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 501-9.
- Nickoloff, B. J., Qin, J. Z., Chaturvedi, V., Denning, M. F., Bonish, B., and Miele, L. (2002). Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma. *Cell Death Differ* **9**, 842-55.
- Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J. A., Mill, P., Van Noort, M., Hui, C. C., Clevers, H., Dotto, G. P., and Radtke, F. (2003). Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* **33**, 416-21.
- Nie, J., McGill, M. A., Dermer, M., Dho, S. E., Wolting, C. D., and McGlade, C. J. (2002). LNX functions as a RING type E3 ubiquitin ligase that targets the cell fate determinant Numb for ubiquitin-dependent degradation. *Embo J* **21**, 93-102.
- Nofziger, D., Miyamoto, A., Lyons, K. M., and Weinmaster, G. (1999). Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Development* **126**, 1689-702.
- Oda, T., Elkahlon, A. G., Pike, B. L., Okajima, K., Krantz, I. D., Genin, A., Piccoli, D. A., Meltzer, P. S., Spinner, N. B., Collins, F. S., and Chandrasekharappa, S. C. (1997). Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet* **16**, 235-42.
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *Embo J* **18**, 2196-207.
- Ordentlich, P., Lin, A., Shen, C. P., Blaumueller, C., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S., and Kadesch, T. (1998). Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Mol Cell Biol* **18**, 2230-9.

- 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**, 5417-26.
- 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**, 7761-74.
- Pan, D., and Rubin, G. M. (1997). Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* **90**, 271-80.
- Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., and Irvine, K. D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* **387**, 908-12.
- Parks, A. L., Klueg, K. M., Stout, J. R., and Muskavitch, M. A. (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* **127**, 1373-85.
- Parreira, L., Neves, H., and Simoes, S. (2003). Notch and lymphopoiesis: a view from the microenvironment. *Semin Immunol* **15**, 81-9.
- Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K. M., Muskavitch, M. A., Moschonas, N. K., and Delidakis, C. (2001). neuralized Encodes a peripheral membrane protein involved in delta signaling and endocytosis. *Dev Cell* **1**, 807-16.
- Pear, W. S., Aster, J. C., Scott, M. L., Hasserjian, R. P., Soffer, B., Sklar, J., and Baltimore, D. (1996). Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med* **183**, 2283-91.
- Poodry, C. A. (1990). shibire, a neurogenic mutant of *Drosophila*. *Dev Biol* **138**, 464-72.
- Powell, B. C., Passmore, E. A., Nesci, A., and Dunn, S. M. (1998). The Notch signalling pathway in hair growth. *Mech Dev* **78**, 189-92.
- Qiu, L., Joazeiro, C., Fang, N., Wang, H. Y., Elly, C., Altman, Y., Fang, D., Hunter, T., and Liu, Y. C. (2000). Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hec-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **275**, 35734-7.
- Rae, F. K., Stephenson, S. A., Nicol, D. L., and Clements, J. A. (2000). Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display. *Int J Cancer* **88**, 726-32.

- Ramain, P., Khechumian, K., Seugnet, L., Arbogast, N., Ackermann, C., and Heitzler, P. (2001). Novel Notch alleles reveal a Deltex-dependent pathway repressing neural fate. *Curr Biol* **11**, 1729-38.
- Rand, M. D., Grimm, L. M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S. C., Sklar, J., and Aster, J. C. (2000). Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Mol Cell Biol* **20**, 1825-35.
- Rangarajan, A., Syal, R., Selvarajah, S., Chakrabarti, O., Sarin, A., and Krishna, S. (2001a). Activated Notch1 signaling cooperates with papillomavirus oncogenes in transformation and generates resistance to apoptosis on matrix withdrawal through PKB/Akt. *Virology* **286**, 23-30.
- Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J. C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P., Miele, L., Aguet, M., Radtke, F., and Dotto, G. P. (2001b). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *Embo J* **20**, 3427-36.
- Rebay, I., Fehon, R. G., and Artavanis-Tsakonas, S. (1993a). Specific truncations of Drosophila Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* **74**, 319-29.
- Rebay, I., Fleming, R. J., Fehon, R. G., Cherbas, L., Cherbas, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* **67**, 687-99.
- Rebay, I., Fortini, M. E., and Artavanis-Tsakonas, S. (1993b). Analysis of phenotypic abnormalities and cell fate changes caused by dominant activated and dominant negative forms of the Notch receptor in Drosophila development. *C R Acad Sci III* **316**, 1097-123.
- Robbins, J., Blondel, B. J., Gallahan, D., and Callahan, R. (1992). Mouse mammary tumor gene int-3: a member of the notch gene family transforms mammary epithelial cells. *J Virol* **66**, 2594-9.
- Roehl, H., Bosenberg, M., Billelloch, R., and Kimble, J. (1996). Roles of the RAM and ANK domains in signaling by the C. elegans GLP-1 receptor. *Embo J* **15**, 7002-12.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-8.



- Rohn, J. L., Luring, A. S., Linenberger, M. L., and Overbaugh, J. (1996). Transduction of Notch2 in feline leukemia virus-induced thymic lymphoma. *J Virol* **70**, 8071-80.
- Ronchini, C., and Capobianco, A. J. (2001). Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol Cell Biol* **21**, 5925-34.
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., Nakagami-Yamaguchi, E., Hamada, Y., Aizawa, S., and Hirai, H. (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* **18**, 675-85.
- Schroder, N., and Gossler, A. (2002). Expression of Notch pathway components in fetal and adult mouse small intestine. *Gene Expr Patterns* **2**, 247-50.
- Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A., and Kopan, R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* **393**, 382-6.
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S., and Rakic, P. (1999). Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* **286**, 741-6.
- Seugnet, L., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997). Requirement for dynamin during Notch signaling in Drosophila neurogenesis. *Dev Biol* **192**, 585-98.
- Shawber, C., Boulter, J., Lindsell, C. E., and Weinmaster, G. (1996a). Jagged2: a serrate-like gene expressed during rat embryogenesis. *Dev Biol* **180**, 370-6.
- Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J. J., Lindsell, C., Bogler, O., Hayward, D., and Weinmaster, G. (1996b). Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* **122**, 3765-73.
- Shawber, C. J., Das, I., Francisco, E., and Kitajewski, J. (2003). Notch signaling in primary endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci* **995**, 162-70.
- Shen, Q., Zhong, W., Jan, Y. N., and Temple, S. (2002). Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts. *Development* **129**, 4843-53.
- Shimizu, K., Chiba, S., Kumano, K., Hosoya, N., Takahashi, T., Kanda, Y., Hamada, Y., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1999). Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods. *J Biol Chem* **274**, 32961-9.

- Shimizu, K., Chiba, S., Saito, T., Kumano, K., Takahashi, T., and Hirai, H. (2001). Manic fringe and lunatic fringe modify different sites of the Notch2 extracellular region, resulting in different signaling modulation. *J Biol Chem* **276**, 25753-8.
- Shutter, J. R., Scully, S., Fan, W., Richards, W. G., Kitajewski, J., Deblandre, G. A., Kintner, C. R., and Stark, K. L. (2000). Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev* **14**, 1313-8.
- Simpson, P. (1997a). Notch signaling in development. *Perspect Dev Neurobiol* **4**, 297-304.
- Simpson, P. (1997b). Notch signalling in development: on equivalence groups and asymmetric developmental potential. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 537-42.
- Simpson, P. (1998). Introduction: Notch signalling and choice of cell fates in development. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 581-2.
- Sisodia, S. S., Kim, S. H., and Thinakaran, G. (1999). Function and dysfunction of the presenilins. *Am J Hum Genet* **65**, 7-12.
- Sisodia, S. S., and St George-Hyslop, P. H. (2002). gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci* **3**, 281-90.
- Smith, G. H., Gallahan, D., Diella, F., Jhappan, C., Merlino, G., and Callahan, R. (1995). Constitutive expression of a truncated INT3 gene in mouse mammary epithelium impairs differentiation and functional development. *Cell Growth Differ* **6**, 563-77.
- Sotillos, S., Roch, F., and Campuzano, S. (1997). The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of Drosophila imaginal discs. *Development* **124**, 4769-79.
- Sparrow, D. B., Clements, M., Withington, S. L., Scott, A. N., Novotny, J., Sillence, D., Kusumi, K., Beddington, R. S., and Dunwoodie, S. L. (2002). Diverse requirements for Notch signalling in mammals. *Int J Dev Biol* **46**, 365-74.
- Spinner, N. B., Colliton, R. P., Crosnier, C., Krantz, I. D., Hadchouel, M., and Meunier-Rotival, M. (2001). Jagged1 mutations in alagille syndrome. *Hum Mutat* **17**, 18-33.
- Struhl, G., and Adachi, A. (1998). Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* **93**, 649-60.
- Struhl, G., Fitzgerald, K., and Greenwald, I. (1993). Intrinsic activity of the Lin-12 and Notch intracellular domains in vivo. *Cell* **74**, 331-45.

- Sun, X., and Artavanis-Tsakonas, S. (1996). The intracellular deletions of Delta and Serrate define dominant negative forms of the *Drosophila* Notch ligands. *Development* **122**, 2465-74.
- Sun, X., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Secreted forms of DELTA and SERRATE define antagonists of Notch signaling in *Drosophila*. *Development* **124**, 3439-48.
- Talora, C., Sgroi, D. C., Crum, C. P., and Dotto, G. P. (2002). Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. *Genes Dev* **16**, 2252-63.
- 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**, 1416-23.
- Tanigaki, K., Nogaki, F., Takahashi, J., Tashiro, K., Kurooka, H., and Honjo, T. (2001). Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* **29**, 45-55.
- Taylor, K. L., Henderson, A. M., and Hughes, C. C. (2002). Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression. *Microvasc Res* **64**, 372-83.
- Thalmeier, K., Meissner, P., Reisbach, G., Falk, M., Brechtel, A., and Dormer, P. (1994). Establishment of two permanent human bone marrow stromal cell lines with long-term post irradiation feeder capacity. *Blood* **83**, 1799-807.
- Thalmeier, K., Meissner, P., Reisbach, G., Hultner, L., Mortensen, B. T., Brechtel, A., Oostendorp, R. A., and Dormer, P. (1996). Constitutive and modulated cytokine expression in two permanent human bone marrow stromal cell lines. *Exp Hematol* **24**, 1-10.
- Thelu, J., Rossio, P., Favier, B., Fliniaux, I., Viallet, J. P., Demarchez, M., Jahoda, C. A., and Dhouailly, D. (2002). Notch signalling is linked to epidermal cell differentiation level in basal cell carcinoma, psoriasis and wound healing. *BMC Dermatol* **2**, 7
- Thelu, J., Viallet, J. P., and Dhouailly, D. (1998). Differential expression pattern of the three Fringe genes is associated with epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* **111**, 903-6.

- Torres-Vazquez, J., Kamei, M., Weinstein, B. M., Favre, C. J., Mancuso, M., Maas, K., McLean, J. W., Baluk, P., McDonald, D. M., Shawber, C. J., Das, I., Francisco, E., Kitajewski, J., Liu, Z. J., Shirakawa, T., Li, Y., Soma, A., Oka, M., Dotto, G. P., Fairman, R. M., Velazquez, O. C., Herlyn, M., Taylor, K. L., Henderson, A. M., Hughes, C. C., Yang, R. B., Ng, C. K., Wasserman, S. M., Colman, S. D., Shenoy, S., Mehraban, F., Komuves, L. G., Tomlinson, J. E., and Topper, J. N. (2003). Molecular distinction between arteries and veins. *Cell Tissue Res* **314**, 43-59. Epub 2003 Sep 23.
- Uyttendaele, H., Marazzi, G., Wu, G., Yan, Q., Sassoon, D., and Kitajewski, J. (1996). Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* **122**, 2251-9.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-51.
- Villa, N., Walker, L., Lindsell, C. E., Gasson, J., Iruela-Arispe, M. L., and Weinmaster, G. (2001). Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev* **108**, 161-4.

- 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**, 7812-9.
- Wei, J., and Hemmings, G. P. (2000). The NOTCH4 locus is associated with susceptibility to schizophrenia. *Nat Genet* **25**, 376-7.
- Weinmaster, G. (1997). The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci* **9**, 91-102.
- Weinmaster, G. (2000). Notch signal transduction: a real rip and more. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 363-9.
- Weinmaster, G., Roberts, V. J., and Lemke, G. (1991). A homolog of Drosophila Notch expressed during mammalian development. *Development* **113**, 199-205.
- Weinmaster, G., Roberts, V. J., and Lemke, G. (1992). Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development* **116**, 931-41.
- Wesley, C. S. (1999). Notch and wingless regulate expression of cuticle patterning genes. *Mol Cell Biol* **19**, 5743-58.
- Wharton, K. A., Johansen, K. M., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* **43**, 567-81.
- Wicking, C., and McGlinn, E. (2001). The role of hedgehog signalling in tumorigenesis. *Cancer Lett* **173**, 1-7.
- 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**, 7403-15.
- 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**, 484-9.
- Xu, T., Caron, L. A., Fehon, R. G., and Artavanis-Tsakonas, S. (1992). The involvement of the Notch locus in Drosophila oogenesis. *Development* **115**, 913-22.
- Yamamoto, N., Yamamoto, S., Inagaki, F., Kawaichi, M., Fukamizu, A., Kishi, N., Matsuno, K., Nakamura, K., Weinmaster, G., Okano, H., and Nakafuku, M.

- (2001). Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J Biol Chem* **276**, 45031-40.
- Yeh, E., Dermer, M., Commisso, C., Zhou, L., McGlade, C. J., and Boulianne, G. L. (2001). Neuralized functions as an E3 ubiquitin ligase during *Drosophila* development. *Curr Biol* **11**, 1675-9.
- Zagouras, P., Stifani, S., Blaumueller, C. M., Carcangiu, M. L., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6414-8.
- Zecchini, V., Brennan, K., and Martinez-Arias, A. (1999). An activity of Notch regulates JNK signalling and affects dorsal closure in *Drosophila*. *Curr Biol* **9**, 460-9.
- Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J. J., Chen, L., Miyamoto, A., Weinmaster, G., and Hayward, S. D. (2000). SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of Notch1C To facilitate Notch1C function. *Mol Cell Biol* **20**, 2400-10.
- Zweifel, M. E., and Barrick, D. (2001a). Studies of the ankyrin repeats of the *Drosophila melanogaster* Notch receptor. 1. Solution conformational and hydrodynamic properties. *Biochemistry* **40**, 14344-56.
- Zweifel, M. E., and Barrick, D. (2001b). Studies of the ankyrin repeats of the *Drosophila melanogaster* Notch receptor. 2. Solution stability and cooperativity of unfolding. *Biochemistry* **40**, 14357-67.

## 8 Anhang

## ACCESSION M73980: TAN1/NOTCH 1 mRNS 7332 bp

```

1 atgccgcgcg tccctggcgcc cctgctctgc ctggcgctgc tgcccgcgct cgccgcacga
61 ggccccgcgat gctcccagcc cgggtgagacc tgcctgaatg gcgggaaagtg tgaagcggcc
121 aatggcacgg aggctgcgt ctgtggcggg gccttcgtgg gcccgcgatg ccaggacccc
181 aaccctggcc tcagcacccc ctgcaagaac gccgggacat gccacgtggt ggaccgcaga
241 ggcggtggcag actatgcctg cagctgtgcc ctgggcttct ctgggcccct ctgcctgaca
301 cccctggaca acgcctgcct caccaacccc tgccgcaacg gggggacctg cgacctgctc
361 acgctgacgg agtacaagtg ccgctgcccg cccggctggt cagggaaatc gtgccagcag
421 gctgaccgct gcgcctccaa cccctgcgcc aacggtgggc agtgctgcc cttcgaggcc
481 tcctacatct gccactgccc acccagcttc catggcccca cctgccggca ggatgtcaac
541 gagtgtggcc agaagcccag gctttgcgcg cacggaggca cctgccacaa cgaggtcggc
601 tcctaccgct gcgtctgcgc cgcaccccac actggcccca actgcgagcg gccctacgtg
661 ccctgcagcc cctcgccctg ccagaacggg ggcacctgcc gcccacggg cgacgtcacc
721 cacgagtgtg cctgcctgcc aggcttcacc ggccagaact gtgaggaaaa tatcgacgat
781 tgtccaggaa acaactgcaa gaacgggggt gcctgtgtgg acggcgtgaa cacctacaac
841 tgcccgtgcc cgccagagtg gacaggtcag tactgtaccg aggatgtgga cgagtgccag
901 ctgatgccaa atgcctgcca gaacggcggg acctgccaca acaccacgg tggctacaac
961 tgcgtgtgtg tcaacggctg gactggtgag gactgcagcg agaacattga tgaactgtcc
1021 agcgcgcgct gcttccacgg cgcacactgc catgaccgtg tggcctcctt ttactgcbag
1081 tgtccccatg gccgcacagg tctgctgtgc cacctcaacg acgcatgcat cagcaacccc
1141 tgtaacgagg gctccaactg cgacaccaac cctgtcaatg gcaaggccat ctgcacctgc
1201 ccctcggggg acacggggcc ggctgcagc caggacgtgg atgagtgtct gctgggtgcc
1261 aaccctgcg agcatgcggg caagtgcac aacacgctgg gctccttoga gtgcctagt
1321 ctgcagggct acacggggcc ccgatgcgag atcgacgtca acgagtgcgt ctgcaacccg
1381 tgccagaacg acgccacctg cctggaaccag attggggagt tccagtgcac gtgcatgcc
1441 ggctacgagg gtgtgcaact cgaggtcaac acagacgagt gtgccagcag cccctgcctg
1501 cacaatggcc gctgcctgga caagatcaat gaggttccagt gcgagtgcc cacgggcttc
1561 actgggcatc tgtgccagta cgatgtggac gagtgtgcca gcaccccctg caagaatggt
1621 gccaaagtgc tggacggacc caacacttac acctgtgtgt gcacggaagg gtacacgggg
1681 acgcaactgc aggtggacat cgatgagtgc gaccccgacc cctgccacta cggctcctgc
1741 aaggacggcg tcgccacctt cacctgcctc tgccgcccag gctacacggg ccaccactgc
1801 gagaccaaca tcaacgagtg ctccagccag cctgccgcc tacggggcac ctgccaggac
1861 cgggacaacg cctacctctg cttctgcctg aaggggacca caggacccaa ctgcbagatc
1921 aacctggatg actgtgccag cagcccctgc gactcgggca cctgtctgga caagatcgat
1981 ggctacgagt gtgcctgtga gccgggctac acagggagca tgtgtaacag caacatcgat
2041 gagtgtgagg gcaacccctg ccacaacggg ggcacctgcg aggacggcat caatggcttc
2101 acctgcccgt gccccgaggg ctaccaacgac cccacctgcc tgtctgaggt caatgagtgc
2161 aacagcaacc cctgcgtcca cggggcctgc cgggacagcc tcaacgggtg caagtgcgac
2221 tgtgaccctg ggtggagtgg gaccaactgt gacatcaaca acaacgagtg tgaatccaac
2281 ccttgtgtca acggcggcac ctgcaaagac atgaccagtg gcatcgtgtc cacctgccgg
2341 gagggcttca gcggtcccaa ctgccagacc aacatcaacg agtgtgcgtc caaccatgt
2401 ctgaacaagg gcacgtgtat tgacgacggt gccgggtaca agtgcaactg cctgctgcc
2461 tacacagggt ccacgtgtga ggtggtgctg gcccctgtg cccccagccc ctgcagaaac
2521 ggcggggagt gcaggcaatc cgaggactat gagagcttct cctgtgtctg ccccacggct
2581 ggggcccagg ggcagacctg tgaggctgac atcaacgagt gcgttctgag cccgtgccgg
2641 cacggcgcac cctgccagaa caccacggc gsstaccgct gccactgcca ggccggctac
2701 agtgggcgca actgcbagac cgacatcgac gactgccggc ccaaccctg tcacaacggg
2761 ggctcctgca cagacggcat caacacggcc ttctgcgact gcctgccgg ctccggggc
2821 actttctgtg aggaggacat caacgagtgt gccagtgacc cctgccgcaa cggggccaac
2881 tgcacggact gcgtggacag ctacacgtgc acctgccccg caggcttcag cgggatccac
2941 tgtgagaaca acacgcctga ctgcacagag agctcctgct tcaacgggtg cacctgcgtg
3001 gacggcatca actcgttcac ctgcctgtgt ccaccggct tcacgggacg ctactgccag
3061 cacgtagtca atgagtgcga ctcaacgacc tgcctgctag gcggcaacct tcaggacggg
3121 cgcggtctcc acaggtgcac ctgccccag ggctacactg gcccacactg ccagaacctt
3181 gtgcaactgg gtgactcctc gcctgcaag aacggcggca aatgctggca gaccacacc
3241 cagtaccgct gcgagtgcc cagcggctgg accggcctt actgcbagct gccagcgtg

```

3301 tcctgtgagg tggctgcgca ggcacaaggt gttgacgttg cccgctgtg ccagcatgga  
3361 gggctctgtg tggacgcggg caacacgcac cactgccgct gccaggcggg ctacacaggc  
3421 agctactgtg aggacctggt ggacgagtgc taccaccagcc cctgccagaa cggggccacc  
3481 tgcacggact acctgggchg ctactcctgc aagtgcgtgg cgggctacca cggggtgaac  
3541 tgctctgagg agatcgacga gtgcctctcc caccctgcc agaacggggg cacctgcctc  
3601 gacctcccca acacctaaa gtgctcctgc ccacggggca ctcagggtgt gcactgtgag  
3661 atcaacgtgg acgactgcaa tcccccggt gaccccggt cccggagccc caagtgttt  
3721 aacaacggca cctgctgga ccaggtggg ggctacagct gcacctgcc gccgggttc  
3781 gtgggtgagc gctgtgagg ggatgtcaac gactgcctgt ccaatccct cgacgccct  
3841 ggcacccaga actgcgtgca ggcgctcaat gactccact gcgagtcg tgctggtcac  
3901 accggcgcc cctgcgagtc cgtcatcaat ggctgcaaag gcaagccct caagaatggg  
3961 ggcacctgch ccgtggcctc caacaccgch cgcgggttca tctgcaagt cctgchggg  
4021 ttcgagggcg ccacgtgtga gaatgacgct cgtacctgch gcagcctgch ctgctcaac  
4081 ggcggcacat gcatctcchg cccgchcagc cccacctgcc tgtgctggg cccctcacg  
4141 ggccccgaat gccagttccc ggccagcagc cctgctgg gchggcaacc ctgctacaac  
4201 caggggacct gtgagcccac atccgagagc ccttctacc gttgctgtg ccccgccaaa  
4261 tcaacgggc tctgtgcca catcctggac tacagcttch ggggtggggc cgggchcagc  
4321 atccccchc chgtgatcga ggaggcgtgc gagctgccc agtgccagga ggacgchggc  
4381 aacaaggtct gcagcctgca gtgcaacaac cacgchcch gctgggagc chgtgactgc  
4441 tccctcaact tcaatgaccc ctggaagaac tgcacgcagt ctctgcagt ctggaagtac  
4501 ttcagtgacg gccactgtga cagccagtgc aactcagccc gctgctctt chagcgctt  
4561 gactgccagc gtgchgaagg ccagtgcaac cccctgtacg accagtactg caaggaccac  
4621 ttcagchcag ggcactgchga ccagggctgc aacagchcch agtgchagtg ggacgggctg  
4681 gactgtgchg agcatgtacc chgagggctg gchggcggca chgtggtgt ggtggtgctg  
4741 atgchcchgg agcagctgch caacagctcc tccacttcc tgcgggagct cagcchcgtg  
4801 ctgcacacca acgtggtctt caagcgtgac gcacacggcc agcagatgat ctccccctac  
4861 tacggcchcg aggaggagct gchgaagcac cccatcaagc gtgchcchga gggctgggch  
4921 gcaacctgach cctgctggg ccaggtgaag gctcgtgch tccctggtg chagcagggg  
4981 gggcgchggg ggagggagct ggaccccatg gacgtcchc gctccatcgt ctacctgag  
5041 attgacaacc ggcagtgtgt gcaggcctcc tchcagtgct tccagagtgc caccgatgtg  
5101 gchcchattc tgggagchct cchctcctg ggcagcctca acatccccct caagatcag  
5161 gchgtgchga gtgagaccgt ggagchcchc cchcchcchc agctgchact catgtactg  
5221 gchggcggcch ccttctgtgt tctgttcttc gtgggctgch ggggtgctgct gtcccgcaag  
5281 chcchcchc agcatggcca gctctggttc cctgagggct tcaaagtgc tgaggcchc  
5341 aagaagaagc ggcgggagnc cctcggcchg gactcchgtg gctcaagcc cctgaagaac  
5401 gcttcagach gtgcccctcat ggacgacaac cagaatgagt ggggggacga ggacctggg  
5461 accaagaagt tccggttcga ggagcchcgt gttctgctg acctggacga cchagacagc  
5521 caccggcagt ggactcagca gcacctggat gchcctgacc tgcchcatgt tgcctggc  
5581 cccacaccgc cccaggggtga ggttgacchc gactgchatt acgtcaatgt cchcgggchc  
5641 gatggcttca cccchctcat gatgchctcc tgcagcgggg gchggcctgga gacgggcaac  
5701 agchagggaag aggaggacch gchcggcchc atctcchact tcatctacca gggchcchc  
5761 ctgcacaacc agacagacc chcgggchcag accgchctgc acctggcchc cchctactca  
5821 chctctgatg chgccaagch cctgctggag gccagchcag atgccaacat cchaggacaac  
5881 atgggchcga cccchctgca tgcggctgtg tctgchcagc cacaaggtgt ctccagatc  
5941 ctgatcchga accgagccac agacctggat gchcchcagc atgatgchc gacgchactg  
6001 atcctgctg cchcchcggc cgtggaggch atgctggag acctcatcaa ctacacchc  
6061 gacgtcaacg chgtagatga cctgggcaag tccchcctg actgggchc chcctggaac  
6121 aatgtggatg chcchattgt gctcctgaag aacggggcta acaaagatat gcagaacaac  
6181 agggaggaga caccctggt tctgchcchc chggagggca gctacgagac chccaaggtg  
6241 ctgctggacc actttgcca cgggacatc acggatcata tggaccchc gccchcchc  
6301 atcchcagag agchcatgca tcaagacatc gtgaggctgc tggacgagta caacctggtg  
6361 chcagcchc agctgchcgg agccccchc gggggcagc caccctgct gcccccchc  
6421 tgctchccca acggctacct gggcagcctc aagccccgch tgcagggcaa gaaggtcchc  
6481 aagcccagca gcaaaggcct ggchctgtga agcaaggag ccaaggacct caaggcagc  
6541 aggaagaagt cccaggaygg caagggctgc ctgctggaca gctcchcagat gctctgccc  
6601 gtggactccc tggagtchc ccatggctac ctgtcagach tggcctcch gccactgctg  
6661 cctccccgct tccagchctc tccgtcchgt cccctcaacc acctgchctg gatgcccgac  
6721 acccactgg gcatcgggca cctgaacgtg gchggccaag cchagatgg ggcctgggt  
6781 gggggchggc ggctggcctt tgagactgch ccacctgct tctcccact gctgtggc  
6841 tctggcacha gcacctcct gggctcchc agcggagggg cctgaattt cactgtggg  
6901 gggctcacha gtttgaatgg tcaatgchc tggctgtccc ggtgchcag chggatggtg  
6961 cchaaccaat acaaccctct gchggggag gtggcaccag gccccctgag cacacggc  
7021 cctcctgch agcatggcat ggtaggcchc ctgchcagta gchctgctg chagcchcctg



---

7081 tcccagatga tgagctacca gggcctgccc agcaccggc tggccacca gcctcacctg  
7141 gtgcagaccc agcaggtgca gccacaaaac ttacagatgc agcagcagaa cctgcagcca  
7201 gcaaacaatcc agcagcagca aagcctgcag ccgccaccac caccaccaca gccgcacctt  
7261 ggcgtgagct cagcagccag cggccaactg ggccggagct tcctgagtgg agagccgagc  
7321 caggcagacg tg



## **Danksagung**

Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Ralf Huss gebührt größter Dank für seine große Unterstützung, die er meinem Promotionsvorhaben zukommen ließ. Nach den ersten Jahren unter der Betreuung von Prof. Dr. Dörmer hat er dankenswerterweise die „Doktor-Vaterschaft“ übernommen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei seiner Mitarbeiterin Frau Moosmann bedanken, die mich sehr bei der Immunhistologie und dem Korrekturlesen der Arbeit unterstützt hat. Auch bei allen anderen (früheren) Mitarbeitern des Instituts für Pathologie, die mich so freundlich aufgenommen haben, möchte ich mich für die angenehme Atmosphäre bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dörmer danke ich für die initiale Themenstellung und Unterstützung sowie die Aufnahme in das Institut für Experimentelle Hämatologie.

Mein Dank geht auch an Frau Dr. Bettina Ehring für die kompetente wissenschaftliche Betreuung und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Vielen Dank dafür auch an Frau Anne Brechtel sowie für die praktischen Labor-Tipps und die zahlreichen Gespräche. Bei Herrn Dr. Kremer möchte ich mich für die angenehme Atmosphäre in „unserem“ Büro bedanken. Vielen Dank auch an Frau Spitzer für die wertvolle Einarbeitung in den Umgang mit Zellen und die technische Unterstützung. Herrn Dr. Ellwart und Frau Nispel danke ich für die FACS-Analysen. Auch Dr. Mailhammer, Dr. Reisbach, Dr. Hültner, Herrn Lodri und Frau Glas danke ich für den freundschaftlich kollegialen Umgang und ihre Hilfsbereitschaft. Allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Hämatologikums, die mich unterstützt haben, sei hier gedankt.

Frau Dr. Kremmer danke ich für ihren kompetenten Einsatz bei der Gewinnung der Antikörper. Für Ihr Entgegenkommen beim Schreiben dieser Arbeit möchte ich mich bei Prof. Hohlfeld und Prof. Voltz bedanken.

Meine tiefste Dankbarkeit gebührt meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Martina Margaretha Schüller  
Geburtsdatum: 05.12.1966  
Geburtsort: Starnberg  
Nationalität: deutsch

## Schulbildung:

1973 - 1977      Grundschule Gilching  
1977 - 1986      Gymnasium Gilching

## Berufsausbildung:

09/1986-02/1988      Ausbildung zur Apothekenhelferin

## Studium:

1988-1995      Studium der Biologie an der Universität München  
Hauptfach: Anthropologie und Humangenetik  
Nebenfächer: Genetik, Medizinische Physiologie,  
Zoologie

## Berufstätigkeit:

seit 10/2005      Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried  
07/2000-09/2005      wissenschaftliche Angestellte am Klinikum  
Großhadern der Universität München  
05/1996-04/1999      wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für  
Experimentelle Hämatologie der GSF, München  
09/1995-11/1995      Werkstudent am Institut für Strahlenbiologie der  
GSF, München  
02/1988-07/1988      Angestellt als Apothekenhelferin, München