

**Untersuchungen zur funktionellen Äquivalenz
zwischen Notch und EBNA2
in EBV-immortalisierten B-Zellen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Hella Kohlhof

26. September 2006

**Untersuchungen zur funktionellen Äquivalenz
zwischen Notch und EBNA2
in EBV-immortalisierten B-Zellen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Hella Kohlhof

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick
Zweitgutachter: PD Dr. Daniele Zink
Tag der mündlichen Prüfung: 29. Januar 2007

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt worden ist.

München, im September 2006

Hella Kohlhof

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, im September 2006

Hella Kohlhof

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungen	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Die T-Zellentwicklung	1
1.1.2 Die frühe B-Zellentwicklung im Knochenmark.....	1
1.1.3 Der B-Zell-Rezeptor	2
1.1.4 Die Signalweiterleitung durch den B-Zell-Rezeptor.....	2
1.1.5 Die B-Zellentwicklung in der Peripherie	4
1.1.6 Die B-Zell-Aktivierung	4
1.2 Das Epstein-Barr Virus	6
1.2.1 Der Infektionszyklus des Epstein-Barr Virus.....	7
1.2.2 Die latenten EBV-Proteine und die B-Zellimmortalisierung.....	7
1.2.3 EBV und die Induktion des Zellzyklus	8
1.2.4 EBV-assoziierte maligne Erkrankungen	10
1.2.5 Das EBV-nukleäre Antigen 2 (EBNA2)	11
1.3 Der Notch-Rezeptor	12
1.3.1 Notch und die T-Zellentwicklung	15
1.3.2 Notch und die B-Zellentwicklung.....	16
1.3.3 Notch und Neoplasien	17
1.4 Offene Fragen	18
2 ZIELSETZUNG	19
3 ERGEBNISSE	20
3.1 Herstellung NotchIC-exprimierender EREB2-5 Zellen	20
3.1.1 Klonierung des humanen Notch1IC, Notch2IC und CAT in den Tetracyclin regulierbaren pRTS-1 Vektor.....	21
3.1.2 Gewinnung stabiler Klone von Notch1IC, Notch2IC und CAT	22

3.1.3 Testung der Klone auf Expression von Notch1IC und Notch2IC sowie der Funktionalität von Notch1IC, Notch2IC und EBNA2	22
3.2 Identifizierung von Notch- und EBNA2-Zielgenen mittels Affymetrix Microarray Analyse	24
3.2.1 Erstellung einer Expressionskinetik von Notch1IC, Notch2IC, CAT und EBNA2	24
3.2.2 Durchführung der Affymetrix Microarray Analyse	26
3.2.3 Auswertung der Affymetrix Microarray Analyse	27
3.2.4 Notch1IC-regulierte Gene in der Cluster-Analyse.....	31
3.2.5 Notch2IC-regulierte Gene in der Cluster-Analyse.....	33
3.2.6 EBNA2-regulierte Gene in der Cluster-Analyse.....	34
3.3 Stark regulierte Zielgene	35
3.3.1 Notch1IC-induzierte Gene	36
3.3.2 Notch2IC-induzierte Gene	38
3.3.3 EBNA2-induzierte Gene	38
3.3.4 Notch1IC-reprimierte Gene.....	40
3.3.5 Notch2IC-reprimierte Gene.....	41
3.3.6 EBNA2-reprimierte Gene	42
3.4 Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Expressionsmuster von Notch1 und Notch2.....	43
3.5 Unterschiede im Expressionsmuster von Notch1IC, Notch2IC und EBNA2	47
3.6 Einfluss von Notch und EBNA2 auf den Zellzyklus.....	49
3.6.1. EBNA2 und NotchIC regulieren Zellzyklus-assoziierte Gene unterschiedlich.....	49
3.6.2 Weder Notch1IC noch Notch2IC kann EBNA2 bei der Aufrechterhaltung der B-Zellimmortalisierung ersetzen.....	54
3.6.3 Die Expression bzw. Modifikation proliferations-relevanter Gene	58
3.6.3.1 NotchIC führt im Gegensatz zu EBNA2 nicht zur Induktion von PCNA	58
3.6.3.2 Notch-Expression führt nicht zur Hyperphosphorylierung von Rb	60
3.6.3.3 Der Transkriptionsfaktor c-MYC und das virale Protein LMP1 werden durch Notch nur unzureichend aktiviert.....	60
3.7 Der Einfluss von Notch und EBNA2 auf die Immunmodulation.....	62
3.7.1 Der Einfluss auf den Klassenwechsel	65
3.7.1.1 <i>In vitro</i> Experimente.....	66
3.7.1.2 <i>In vivo</i> Experimente	68
4 DISKUSSION	70
4.1 Evaluierung des Expressionssystems für aktives NotchIC in humanen B-Zellen..	70

4.2 Methoden zur Identifizierung und Verifizierung von Notch- und EBNA2-Zielgenen	71
4.3 Expressionsmuster Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-exprimierender Zellen in der Clusteranalyse.....	71
4.4 Gemeinsamkeiten im Expressionsmuster Notch1IC- und Notch2IC-exprimierender Zellen.....	72
4.5 Unterschiede im Expressionsmuster Notch1IC- und Notch2IC-exprimierender Zellen	76
4.6 Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Expressionsmuster durch Notch und EBNA2.....	82
4.7 Der Einfluss von Notch und EBNA2 auf den Zellzyklus	83
4.8 Der Einfluss von Notch und EBNA2 auf die Immunmodulation.....	86
4.8.1 B-Zell-Rezeptor-Signale	87
4.8.2 Weitere Aspekte von Notch und EBNA2 hinsichtlich der Immunmodulation.....	89
4.8.3 Notch und EBNA2 haben einen negativen Einfluss auf den Klassenwechsel.....	90
4.9 Ausblick.....	93
5 ZUSAMMENFASSUNG	95
6 MATERIAL UND METHODEN	97
6.1 Material.....	97
6.1.1 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Reagenzien	97
6.1.2 Plasmide	98
6.1.3 Bakterien	98
6.1.4 Zelllinien	99
6.2 Molekularbiologische Methoden.....	99
6.2.1 Techniken der RNA-Analyse	100
6.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA.....	100
6.2.1.2 Herstellung von cDNA.....	100
6.2.1.3 Quantitative RT-PCR	100
6.2.2 Spezifischer Proteinnachweis.....	104
6.2.2.1 Isolierung und Quantifizierung von Gesamt-Protein	104
6.2.2.2 SDS PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese).....	104
6.2.2.3 Western-Blot	105
6.2.3 Affymetrix Oligonukleotid Microarrays	105
6.2.3.1 Präparation der RNA Proben und Synthese der cDNA.....	106
6.2.3.2 Synthese und Fragmentierung der Biotin-markierten cRNA.....	106
6.2.3.3 Präparation von Kontroll-cRNA	107

6.2.3.4 Hybridisierung, Färben, Waschen und Scannen der Genchips	107
6.2.3.5 Statische Algorithmen für die Auswertung der Genchips.....	108
6.2.3.6 „Single Array“-Analyse	108
6.2.3.7 Vergleichsanalyse und lineare Normalisierung.....	109
6.2.3.8 GC-RMA Normalisierung und Cluster-Analyse.....	109
6.3 Zellkultur	110
6.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken.....	110
6.3.2 Bestimmung der Zelldichte	111
6.3.3 Ablösen von adhärennten Zellen.....	111
6.3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	111
6.3.5 Kultivieren von EREB2-5 Zellen.....	111
6.3.6 Kultivieren von adhärennten LTK- und CD40L exprimierenden Zellen.....	112
Kokultivierung von EREB2-5 Zellen mit LTK- oder CD40L exprimierenden Zellen	112
6.3.7 In Vitro Proliferations-Assay und BrdU-Assay	112
6.3.8 Generierung stabiler Notch1IC-, Notch2IC- und CAT-exprimierender EREB2-5 Zellen.....	112
6.3.8.1 Transfektion von EREB2-5 Zellen.....	112
6.3.8.2 Selektion transfizierter EREB2-5 Zellen.....	113
6.3.8.3 Isolierung von Notch1IC-, Notch2IC- und CAT-exprimierenden Zellen.....	113
6.4 Durchflusszytometrie	114
 7 LITERATUR	 115
 8 ANHANG	 CD

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Der B-Zell-Rezeptor-Signalweg.....	3
Abb. 1.2 Die Aktivierung des Klassenwechsels zu IgE und die Expression von AID wird durch CD40- und IL4/13-Signale induziert	6
Abb. 1.3 Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus	10
Abb. 1.4 Regulation der Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen und des Retinoblastoma-Proteins beim Übertritt von der G ₁ - zur S-Phase	10
Abb. 1.5 Die Struktur des EBNA2-Proteins.....	12
Abb. 1.6 Die Struktur des Notch-Rezeptors.....	14
Abb. 1.7 Der Notch-Signalweg.....	15
Abb. 3.1 Etablierung Notch1IC- und Notch2IC- exprimierender EREB2-5 Zellen	20
Abb. 3.2 Nachweis der Expression des transgenen Notch1IC und Notch2IC.....	23
Abb. 3.3 Notch1IC und Notch2IC sind funktionell in EREB2-5 Zellen.....	23
Abb. 3.4 Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 können die Oberflächenexpression von CD21 und IgM modulieren.....	24
Abb. 3.5 Die Aufreinigung NGFR-exprimierender EREB2-5 Zellen.....	26
Abb. 3.6 Die GC-RMA Analyse gibt Aufschluss über die Qualität der Chips und kann zur Normalisierung herangezogen werden.....	28
Abb. 3.7 Vergleich der Anzahl Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-regulierter Proben-Sets.....	30
Abb. 3.8 Darstellung Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-differentiell exprimierter Gene im Clusterbaum	33
Abb. 3.9 ASCL1 wird durch Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 induziert	37
Abb. 3.10 Durch Notch1IC stark induzierte Gene	37
Abb. 3.11 Durch Notch2IC stark induzierte Gene	39
Abb. 3.12 Gemeinsam durch Notch1IC und Notch2IC regulierte Gene dargestellt im Clusterbaum.....	39
Abb. 3.13 Durch EBNA2 stark induzierte Gene	40
Abb. 3.14 Durch Notch1IC stark reprimierteGene	41
Abb. 3.15 Durch Notch2IC stark reprimierteGene	42
Abb. 3.16 Durch EBNA2 stark reprimierteGene	43
Abb. 3.17 Frühe gemeinsam durch Notch1IC und Notch2IC induzierte Gene.....	46
Abb. 3.18 Frühe gemeinsam durch Notch1IC und Notch2IC reprimierte Gene	46
Abb. 3.19 Einordnung identifizierter Zellzyklus-assoziiierter Zielgene	51
Abb. 3.20 Regulation Notch1IC-induzierter Zellzyklus-assoziiierter Gene nach 8h oder 24h	51
Abb. 3.21 Regulation Notch2IC-induzierter Zellzyklus-assoziiierter Gene nach 8h oder 24h	52
Abb. 3.22 Vergleich Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-induzierter Zellzyklus-Gene	52
Abb. 3.23 Vergleich der Expression von Cyclinen, CDKs und Inhibitoren.....	53
Abb. 3.24 Aufrechterhaltung der Immortalisierung.....	55
Abb. 3.25 Untersuchungen zur Proliferation mittels BrdU-Einbau	57
Abb. 3.26 Die Regulation von PCNA auf Protein- und RNA-Ebene sowie die Phosphorylierung von Rb.....	59
Abb. 3.27 Die Regulation von LMP1	61
Abb. 3.28 Die Regulation von c-Myc	62

Abb. 3.29 Die Regulation von Ig α , Ig β und IgD auf RNA-Ebene	65
Abb. 3.30 Die Regulation von IL4R α 1, IL13R α 1, AID und MYBL2 auf RNA-Ebene.....	67
Abb. 3.31 Expression reifer C γ 1-Transkripte nach IL4-und CD40L-induziertem Klassenwechsel	68
Abb. 3.32 Sterile C ϵ -Transkripte und AID-Mengen in der Maus	69
Abb. 4.1 Modell zur Regulation der Repression des sterilen C ϵ -Transkripts	92
Abb. 4.2 NotchIC und EBNA2 modulieren die Immunantwort auf mehreren Ebenen.....	93
Abb. 6.1 qRT-PCR Effizienz und Standardisierung auf das ribosomale Protein L23a.....	103

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BL	Burkit-Lymphom
bp	Basenpaar (e)
BCR	B-Zell-Rezeptor („B cell receptor“)
BSA	Rinder-Serum Albumin („bovine serum albumine“)
cDNA	copy-DNA
CLP	Common Lymphoid Progenitor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
EBNA2	Epstein-Barr virales Kern Antigen („EBV-nuclear-antigen“)
EBER	nicht-polyadenylierte kleine RNA's des EBV
EBV	Epstein-Barr-Virus
et al.	und andere („et alii“)
FACS	Fluoreszenz-assoziierte Durchfluss Zytometrie
FCS	fötale Kälberserum („fetal calf serum“)
FDC	Follikuläre dendritische Zellen
FoB	follikuläre B-Zellen
g	Gramm
xg	x-fache Erdbeschleunigung
GC	Keimzentrum („germinal center“)
HD	Hodgkin Erkrankung („Hodgkins Disease“)
HL	Hodgkin-Lymphom
HRS-Zellen	Hodgkin Reed Sternberg-Zellen
HRP	Meerrettich Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin der schweren Kette
IgL	Immunglobulin der leichten Kette
ITAM	„immunoreceptor tyrosine-based activation motif“
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LMP	latentes membran protein
MACS	„Magnetic associated cell sorting“ Zell-Sortierung nach magnetischer Markierung
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
µF	Mikrofaraday
µ-Kette	schwere Kette des Immunglobulins
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten RNA („messengerRNA“)
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
MZB Zellen	Marginalzonen B-Zellen
NF-κB	Kernfaktor-κB („nuclear factor-κB“)

ORF	offener Leserahmen („open reading frame“)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
Prä-BCR	Prä-B-Zell-Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulphate“)
s	Sekunde
STAT	Signaltransduktions-aktivierter Transkriptionsfaktor
Tab.	Tabelle
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
V	Volt
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Alle Zellen des hämatopoetischen Systems entwickeln sich in Säugern aus gemeinsamen Vorläuferzellen im Knochenmark. Zellen der myeloiden Reihe wie Granulozyten und Makrophagen dienen hauptsächlich der angeborenen Immunantwort, während lymphoide Vorläuferzellen Natürliche Killerzellen (NK), T-Lymphozyten und B-Lymphozyten hervorbringen, die das adaptive Immunsystem bilden, das sich in ein zelluläres und ein humorales System weiter unterteilt.

1.1.1 Die T-Zellentwicklung

Lymphoide Vorläuferzellen (CLP) im Knochenmark, die ein Notch1-Signal erhalten, können in den Thymus wandern und sich dort über mehrere Zwischenstufen zu reifen T-Zellen entwickeln. Die frühesten unreifen T-Zellen exprimieren weder einen CD3:T-Zell-Rezeptor (TCR) -Komplex noch die Ko-Rezeptoren CD4 oder CD8, weshalb sie als „doppelt negativ“ (DN) bezeichnet werden. Diese DN T-Lymphozyten durchlaufen mehrere Reifungsstadien (DN1-4) und werden zu DP- („doppelt positiv“) Zellen, die einen CD3:TCR-Komplex, CD4 und CD8 exprimieren. Zellen, die während der positiven Selektion Selbst-MHC-Moleküle erkennen, reifen zu T-Lymphozyten, die entweder CD8 oder CD4 exprimieren und als „einfach positiv“ (engl. „single positiv“, SP) bezeichnet werden. Diese reifen T-Zellen verlassen den Thymus und agieren in peripheren lymphoiden Organen wie der Milz als zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) in der zellulären Immunantwort oder als T-Helferzellen (CD4⁺) in der humoralen Immunantwort.

1.1.2 Die frühe B-Zellentwicklung im Knochenmark

B-Lymphozyten entwickeln sich ebenso wie T-Lymphozyten aus CLPs. Sie durchlaufen mehrere Differenzierungsschritte und können als unreife B-Zellen, die sich durch einen funktionellen B-Zell-Rezeptor (BCR) auszeichnen, das Knochenmark verlassen. In frühen Pro-B-Zellen findet die Umlagerung der D- und J-Segmente im Immunglobulin-Lokus (Ig-Lokus) der schweren μ -Kette mittels somatischer Rekombination statt. Die Rekombination der V-Segmente an die D- und J-Segmente markiert den Übergang zur späten Pro-B-Zelle. Dieser Prozess wird durch die Enzyme Rag1 und Rag2 (Rekombination activated gene 1/2) vermittelt. Die Diversifizierung der Übergänge von V-, D- und J-Segmenten, die Einfluss auf das Rezeptorrepertoire hat, wird durch das Anhängen von N-Nucleosiden durch die Terminale

Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) verursacht. Bei erfolgreicher Rearrangierung der μ -Kette wird diese zusammen mit einer Ersatz-Leichten Kette („surrogate light chain, sIgL), die aus $\lambda 5$ und ν PreB besteht und den Signalmolekülen $Ig\alpha$ (CD79A) und $Ig\beta$ (CD79B) als Prä-BCR-Komplex auf der Oberfläche von Prä-B-Zellen exprimiert (zusammengefasst in (Janeway 2005). Prä-BCR-Signale fördern die Umlagerung der V- und J-Segmente der Leichten Kette (IgL) im $Ig\kappa$ - oder im $Ig\lambda$ -Lokus und erlauben den Austausch der sIgL gegen die Leichten Ketten (IgL) und damit die Expression eines funktionellen BCR an der Oberfläche unreifer B-Zellen (Bossy et al. 1991).

1.1.3 Der B-Zell-Rezeptor

Der B-Zell-Rezeptor (BCR) -Komplex besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, sowie den Signalmolekülen $Ig\alpha$ und $Ig\beta$. Die leichte Kette kann vom Isotyp κ oder λ sein, die sich funktionell nicht unterscheiden. Die schwere Kette, mit der der Rezeptor in der Membran verankert ist, kann aus fünf verschiedenen Isotypen bestehen, μ , δ , γ , α oder ϵ , was sich in den verschiedenen Isotyp-Klassen IgM, IgD, IgG, IgA und IgE ausdrückt, die unterschiedliche Funktionen haben. Beide Ketten verfügen über eine variable Region, die die Antigen-Bindung vermittelt und deren Affinität in der Keimzentrumsreaktion reifen kann. Da die sehr kurzen intrazellulären Bereiche der schweren Kette keine Signal-Domäne besitzen, wird die Signalweiterleitung nach Stimulierung des BCR durch Antigen-Bindung über die Signalmoleküle $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ vermittelt.

1.1.4 Die Signalweiterleitung durch den B-Zell-Rezeptor

Die Kreuzvernetzung des BCR nach Antigenbindung führt zur Aktivierung der Protein-Tyrosinkinase (PTK) SYK und PTKs der Src-Familie wie LYN, FYN, BLK, FGR und HCK, die teilweise redundant wirken (Abb. 1.1). LYN führt zur Phosphorylierung der ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) im zytoplasmatischen Teil von $Ig\alpha$ und $Ig\beta$, die wiederum SYK und die Tec-Kinase BTK rekrutieren und deren Aktivierung erleichtern. Mithilfe des Adaptorproteins BLNK/SL65, das SYK und BTK mit der Phospholipase C γ_2 ($PLC\gamma_2$) verbindet, können diese die $PLC\gamma_2$ phosphorylieren und aktivieren. Die PI3-Kinase (PI3K) und $PLC\gamma_2$ sind äußerst wichtige Effektorenzyme, die „Second Messenger“ Proteine generieren. Die PI3K phosphoryliert Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) zu PIP_3 , das wiederum BCR-Signal-Moleküle wie BTK, BAM32 und $PLC\gamma_2$ zur Membran rekrutieren kann und so den Signalweg positiv verstärkt. $PLC\gamma_2$ spaltet PIP_2 in Inositol-3-Phosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG), was zur Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} bzw. der Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) führt. Die Ca^{2+} -

Freisetzung und die aktivierte PKC induzieren die Aktivierung von MAPKinasen wie ERK, JNK und p38 und Transkriptionsfaktoren wie NFκB und NFAT. ERK kann zusätzlich über die Induktion des Ras-Signalweges mittels SYK aktiviert werden (Niuro and Clark 2002).

Ko-Rezeptoren des BCR können das BCR-Signal positiv oder negativ beeinflussen. So kann der Ko-Rezeptor CD19 als Adapter für PI3K dienen (Tuveson et al. 1993) und über eine positive Rückkoppelung die Schwelle für ein BCR Signal herabsetzen. Zu den negativ regulierenden Ko-Rezeptoren gehören PIRB und FcγRIIB/CD32, die inhibitorische Motive (ITIM) in ihrem zytoplasmatischen Anteil haben, über die sie Phosphatasen wie SHP1 und SHIP rekrutieren und somit BCR-Signale inhibieren. CD22 kann in Abhängigkeit der rekrutierten Faktoren positiv oder negativ wirken. Die Rekrutierung des Adapterproteins GRB2 führt womöglich zur Aktivierung des MAPK-Signalwegs, während die Bindung von SHP1 an die ITIMs im zytoplasmatischen Teil BCR-Signale blockiert.

Gemeinsam können Ko-Rezeptoren und Adaptermoleküle die Qualität und Quantität des BCR-Signals modulieren und damit Einfluss auf den Aktivierungsstatus einer reifen B-Zelle und auf Überlebenssignale während der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung in Knochenmark und Milz nehmen.

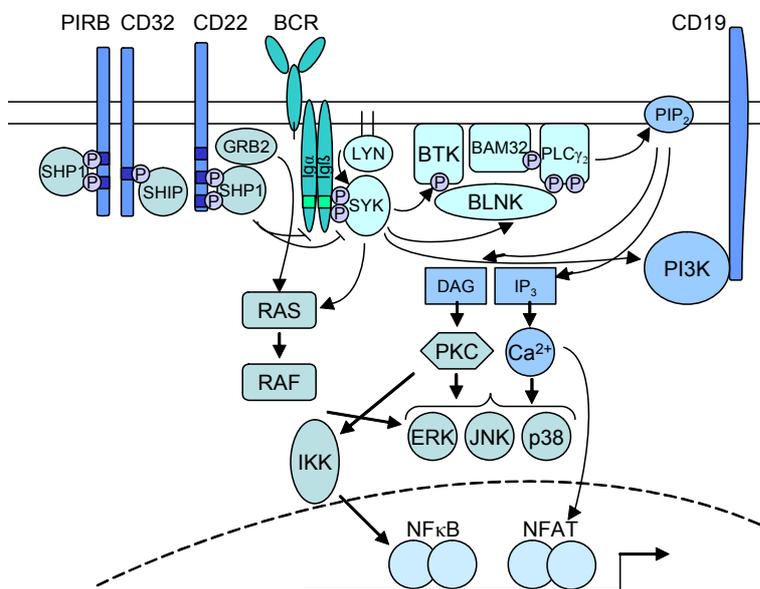


Abb. 1.1 Der B-Zell-Rezeptor-Signalweg

Nach der Antigen-Bindung an den B-Zellrezeptor (BCR) werden die drei Protein-Tyrosinkinasen (PTK) - die SRC-family Kinase LYN, SYK und die TEC-family Kinase BTK aktiviert. Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und Phospholipase Cγ2 (PLCγ2) sind wichtige Effektormoleküle des BCR-Signalwegs. B-Zell-Adaptoren wie der B-Cell-linker (BLNK) und BAM32 (B-lymphocyte adaptor molecule of 32 kD) steuern die Feinregulierung von BCR-Signalen durch die Verbindung von Kinasen und deren Effektoren. Die PLCγ2 spaltet PIP2 in IP3 und DAG, was zur Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ und zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führt. Beide sind wichtig für die Aktivierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen

(MAPK), wie ERK (extracellular signal-regulated kinase), c-JUN N-terminal kinase (JNK) und p38 MAPK, und von Transkriptionsfaktoren wie NF-κB (nuclear factor κB) und NFAT (nuclear factor of activated T-cells). DAG (Diacylglycerol); CD32 (niedrig affiner Fc-Rezeptor für IgG), IKK (Inhibitor of NF-κB (IκB) kinase), PIRB (paired immunoglobulin-like receptor B), SHIP (SH2-domain-containing inositol polyphosphate 5' phosphatase), SHP1 (SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase1).

1.1.5 Die B-Zellentwicklung in der Peripherie

Unreife B-Zellen verlassen als so genannte Transitionelle B-Zellen das Knochenmark und gelangen über den Blutstrom in die Milz, in denen sie sich zu Follikulären B-Zellen (FoB) oder Marginalzonen B-Zellen (MZB) entwickeln können. Die Gesamtheit dieser reifen B-Zellen bezeichnet man als B2-B-Zellen.

FoB, die im Erwachsenen die größte Population an zirkulierenden B-Zellen bilden, exprimieren IgM und IgD auf ihrer Oberfläche und zirkulieren kontinuierlich durch periphere lymphoide Organe, in denen sie Überlebenssignale von Follikulären Dendritischen Zellen (FDC) erhalten. Treffen sie auf ihr Antigen, so können sie aktiviert werden. FoB sind hauptsächlich in die T-Zell-abhängige Immunantwort involviert, können aber auch an der T-Zell-unabhängigen Immunantwort teilnehmen.

MZB stellen nur ca. 10 % der B2-Zellen dar. Sie sitzen in der so genannten Marginalzone, die sich zwischen der weißen und der roten Pulpa der Milz befindet. Diese Zellen zirkulieren nicht, haben ein begrenztes BCR-Repertoire und scheinen an der humoralen Antwort, die gegen Bakterien im Blut gerichtet ist, beteiligt zu sein (Martin and Kearney 2002). Ihre schnelle Aktivierung und Differenzierung in Antikörper-sekretierende Plasmazellen hilft, die Lücke zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem zu überbrücken.

Eine dritte Population an reifen B-Zellen bilden B1-Zellen, die sich aus Stammzellen in der fötalen Leber entwickeln und hauptsächlich in der Peritonealhöhle zu finden sind. Wie MZB verfügen sie nur über ein begrenztes Rezeptor-Repertoire und sind in die T-Zell-unabhängige Immunantwort involviert.

1.1.6 Die B-Zell-Aktivierung

B-Zellen, die auf ein Antigen treffen, das sie mit ihrem BCR binden können, werden aktiviert. T-Zell-abhängige Antigene werden durch Endozytose des Immunkomplexes (Antigen:BCR) und anschließender proteolytischer Spaltung des Antigens auf MHCII-Molekülen an der Oberfläche gegenüber T-Zellen präsentiert. Eine T-Zelle, die einen spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) gegen dieses Antigen exprimiert, kann das präsentierte Antigen binden und durch kostimulatorische Signale wie die CD28-B7 Interaktion und das CD40-Signal die präsentierende B-Zelle stimulieren und damit Reifungsprozesse, sowie die funktionelle Umwandlung in Antikörper-sekretierende Plasma-Zellen oder Gedächtnis-Zellen induzieren. Die aktivierten B-Zellen wandern an den Rand der T-Zell-Zone, wo sie klonal expandieren (zusammengefasst in (Janeway 2005)).

Ein Teil dieser aktivierten B-Zellen durchläuft einen Klassenwechsel. Dieser dient dazu die Funktionalität bei gleicher Affinität gegenüber einem bestimmten Antigen durch den Wechsel der konstanten I μ -Region zu I γ , I α oder I ϵ zu ändern. Der Klassenwechsel zu IgA kann durch TGF- β (Transforming Growth Factor β), der zu IgG und IgE durch die Zytokine Interleukin-4 (IL4) und Interleukin-13 (IL13), jeweils in Kombination mit einem CD40-Signal induziert werden (Abb. 1.2). Hierbei werden über die Bindung von IL4 und/oder IL13 an den IL4-Rezeptor (IL4R), der aus einem Homodimer oder einem Heterodimer (IL4R α 1/IL13R α 1 oder IL4R α 1/ γ c) bestehen kann, die Tyrosin-Kinasen JAK1 (Janus Kinase 1), JAK2 und TYK1 aktiviert und phosphoryliert. Dies führt wiederum zur Phosphorylierung und anschließender Dimerisierung von STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6), das dadurch aktiviert wird und an entsprechende Bereiche im Promotor der sterilen C-Gene binden kann und die Transkription dieser mit induziert. Eine Voraussetzung zur Induktion des Klassenwechsels zu IgG ist die Transkription steriler C γ -Transkripte (entsprechend: IgE/C ϵ -Transkripte), da diese die korrekte Umlagerung der variablen Region eines BCR mit der neuen konstanten Region C γ bzw. C ϵ fördern. Im Promotor dieser sterilen C-Gene befinden sich neben STAT6-Bindungsstellen auch solche für E-Box Proteine, AP1, c/EBP, PU.1, NF κ B (Nuclear Factor B) und PAX5. Die Aktivierung und Bindung von AP1 und NF κ B wird über den CD40-Signalweg initiiert (Geha et al. 2003). STAT6 und NF κ B induzieren zusätzlich die Expression von AID (Activation induced Cytidin Deaminase), deren Anwesenheit für den Klassenwechsel unerlässlich ist (Muramatsu et al. 2000). Die Zellen, die einen Klassenwechsel durchgeführt haben, differenzieren in extrafollikulären Foci zu Plasmazellen (MacLennan et al. 2003), die niederaffine Antikörper sezernieren und somit für eine schnelle, jedoch nicht sehr spezifische Immunantwort sorgen.

Hochaffine Antikörper dagegen können von jenen B-Zellen sezerniert werden, die die so genannte Keimzentrumsreaktion erfolgreich durchlaufen haben. Nur einige wenige B-Zellen bauen das Keimzentrum auf. Die stark proliferierenden Zellen, die als Zentroblasten bezeichnet werden, bleiben in der T-Zell-nahen Zone des Keimzentrums. Während der Proliferation findet die somatische Hypermutation statt, bei der durch zufällige Punktmutationen mit einer extrem hohen Rate von 10^{-3} bis 10^{-4} Austauschen pro Basenpaar und Generation in der V-Region der Ig-Gene die Spezifität ihres BCR und damit die Affinität gegenüber dem Antigen verändert wird. Diese Zellen proliferieren nun kaum noch und werden als Zentrozyten bezeichnet. Die Affinität des veränderten BCR wird mittels Interaktion mit Antigen-präsentierenden Follikulären Dendritischen Zellen (FDC) getestet. Nur Zellen mit einem hochaffinen BCR erhalten letztendlich ein Überlebenssignal, da sie

lange genug mit den FDC interagieren können. B-Zellen können mehrere Runden dieser Proliferations-, Mutations- und Selektionsphasen durchlaufen, was zu einer stetigen Erhöhung der Bindungsaffinität führt. Dieser Prozess wird als Affinitätsreifung bezeichnet (Liu et al. 1997). Zusätzlich zum Überlebenssignal durch den BCR benötigen Zentrozyten CD40-Signale, die sie von T-Zellen erhalten, die das auf MHCII-Molekülen präsentierte Antigen erkennen können. Ebenso wie beim Klassenwechsel ist AID für die Affinitätsreifung essentiell, in die es vermutlich durch den Austausch von Adenosin gegen Uracil mit anschließender fehlerhafter DNA-Reparatur involviert ist (Neuberger et al. 2005). Die entstandenen hochaffinen Zentrozyten verlassen das Keimzentrum und differenzieren zu Plasmazellen oder zu langlebigen Gedächtnis-B-Zellen (McHeyzer-Williams 2003).

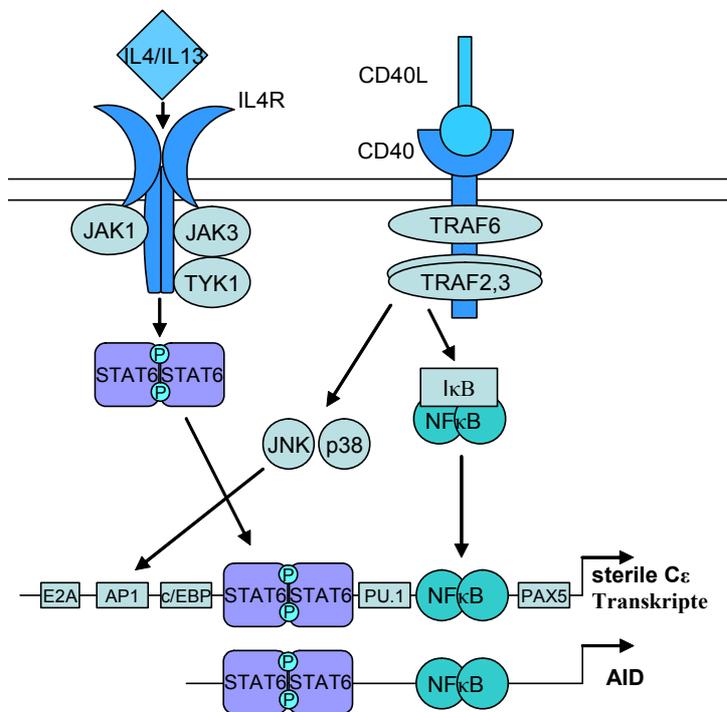


Abb. 1.2 Die Aktivierung des Klassenwechsels zu IgE und die Expression von AID wird durch CD40- und IL4/13-Signale induziert

Dem Klassenwechsel geht die RNA-Transkription im IGH-Lokus voraus, die durch bestimmte Cytokin-Signale induziert wird. Sterile C ϵ -Transkripte kodieren nicht für funktionelle Proteine. Die Bindung von Interleukin 4 (IL4) an den IL4-Rezeptor (IL4R) führt zur Rekrutierung und Aktivierung der Tyrosinkinase Januskinase 1 (JAK1), JAK3 und TYK1, die STAT6 (Signal transducer and activator of transcription 6) aktivieren. Die Interaktion von T-Zell-exprimiertem CD40-Ligand (CD40L) mit CD40 auf B-Zellen führt zur Rekrutierung von TRAFs (Tumor-necrosis factor receptor-associated factors) und dadurch zur Translokation der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (nuclear factor- κ B) und Activator Protein 1 (AP1) in den Kern. Die Stimulation des

IL4R und von CD40 fördert die Verstärkung der Transkription steriler C ϵ -Transkripte und AID (activation induced cytidine deaminase). C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein), I κ B (inhibitor of NF- κ B), JNK (c-Jun N-terminal kinase), PAX5 (paired-box protein 5).

1.2 Das Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus (EBV) gehört zur Familie der γ -Herpes Viren und wurde erstmals 1964 als mögliche Ursache von Burkitt-Lymphomen beschrieben (Epstein et al. 1964). Es infiziert hauptsächlich ruhende reife B-Zellen, die es zur Proliferation anregen kann. Nach der Erstinfektion persistiert es in langlebigen Gedächtnis-B-Zellen (Thorley-Lawson and Babcock 1999). Ca. 95 % der erwachsenen Bevölkerung sind mit EBV infiziert. Die Infektion bei Kindern verläuft meist symptomlos, mit steigendem Alter führt sie aber häufiger zu Infektiöser Mononukleose (IM), die aufgrund der enormen T-Zellantwort mit stark

geschwollenen Lymphknoten und häufig Hepatosplenomegalie einhergeht. Nach der Primärinfektion persistiert EBV lebenslang im Wirt in Gedächtnis-B-Zellen.

Bei immunsupprimierten Patienten kann es zu einem erneuten Ausbruch der EBV-Infektion kommen, was durch die verminderte T-Zellantwort zur Entstehung bösartiger Immunoblastischer Lymphome führen kann. EBV wurde mit der Entstehung weiterer Erkrankungen wie Burkitt-Lymphomen, Hodgkin-Lymphomen, T-Zell-Lymphomen, sowie Nasopharyngeal- und Magen-Karzinomen assoziiert (Kuppers 2003; Young and Rickinson 2004). Wie EBV zur Entstehung dieser malignen Erkrankungen beiträgt ist zum größten Teil noch unverstanden.

1.2.1 Der Infektionszyklus des Epstein-Barr Virus

EBV wird über den Speichel übertragen und infiziert zunächst ruhende B-Zellen in oder unterhalb des Epithels des Oropharynx. Über die Interaktion der viralen Glykoproteine gp350 und gp42 mit dem Komplement-Rezeptor CR2/CD21 bzw. einem MHCII-Molekül, wird EBV mittels Endozytose in die reife B-Zelle aufgenommen. Die Virus-DNA wird im Zellkern der B-Zelle zirkularisiert, amplifiziert und episomal an Tochterzellen weitergegeben. Die Expression elf viraler Gene führt zur Aktivierung und Proliferation der infizierten B-Zelle (Young and Rickinson 2004). Proliferierende B-Zellen werden von zytotoxischen T-Zellen, die die viralen Antigene erkennen schnell eliminiert. Nur einige infizierte B-Zellen können durch Abschaltung der viralen Gene der Immunantwort entgehen und erlauben dem Virus lebenslang zu persistieren. Diese Phase des Infektionszyklus des Virus wird als Latenz 0/I bezeichnet.

EBV kann in latent infizierten B-Zellen, die in die Mucosa des Oropharynx einwandern, reaktiviert werden. Das Virus schaltet dann vom latenten zum lytischen Zyklus um und die Viruspartikel, die dann produziert werden, werden in den Speichel abgegeben und können neue B-Zellen infizieren und so zur Aufrechterhaltung des Pools an infizierten B-Zellen beitragen (Cohen 2000).

1.2.2 Die latenten EBV-Proteine und die B-Zellimmortalisierung

In vitro kann EBV jede ruhende B-Zelle infizieren und diese zur Proliferation anregen, was zur Etablierung einer Lymphoblastoiden Zelllinie (LCL) führt. Diese Zelllinien bieten ein gutes Modell, um den Einfluss der viralen Gene auf die B-Zellimmortalisierung zu untersuchen. In diesen immortalisierten B-Zellen werden sechs EBV-nukleäre Antigene (EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP) und drei Membran-Proteine LMP1, -2A und -2B (Latent Membrane Protein) exprimiert. Zusätzlich werden nicht kodierende RNAs (EBER1 und

EBER2) exprimiert, deren Funktion aber nicht klar ist. Dieses Expressionsmuster wird als LatenzIII bezeichnet.

Einige dieser viralen Proteine scheinen konstitutive, aktive Formen von zellulären Rezeptoren zu imitieren, die in die Proliferation, Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen involviert sind. So ist LMP1 ein Liganden-unabhängiges Signal-Protein, das in der Membran verankert ist und ähnliche Signalwege induziert wie CD40 (Uchida et al. 1999). LMP1 ist essentiell für die Immortalisierung von EBV-infizierten B-Zellen (Kaye et al. 1993) und wirkt zudem als klassisches Onkogen in der Transformation von Nager-Fibroblasten (Wang et al. 1985). LMP2A scheint einen aktivierten BCR zu imitieren und kann in B-Zellen, die über keinen funktionellen BCR verfügen, BCR-ähnliche Überlebenssignale an die Zelle vermitteln. *In vitro* ist LMP2A nicht essentiell für die EBV-induzierte Transformation von B-Zellen (Longnecker 2000). EBNA2 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression aller viraler EBV-Gene der LatenzIII und einiger zellulärer Gene induziert. Da es wie ein aktivierter Notch-Rezeptor an das DNA-bindende Protein RBP-J bindet, imitiert EBNA2 wahrscheinlich den Notch-Signaltransduktionsweg (Zimmer-Strobl et al. 1994).

Die Fähigkeit von LMP1, EBNA2 und EBNA3C in B-Zellen einen LCL-ähnlichen Phänotyp zu induzieren, wenn sie einzeln exprimiert werden, weist darauf hin, dass diese viralen Proteine eine Schlüsselposition bei der Immortalisierung einnehmen (Wang et al. 1990). Diese Proteine tragen zur B-Zellimmortalisierung bei, indem sie Aktivatoren des Zellzyklus induzieren und Inhibitoren des Zellzyklus reprimieren.

1.2.3 EBV und die Induktion des Zellzyklus

Der Zellzyklus unterteilt sich in die Interphase und in die Mitose, in der die Zellteilung erfolgt. Die Interphase ist weiter in die G₁-Phase (Gap1), die S-Phase (Synthese) und die G₂-Phase (Gap2) unterteilt, in denen sich die Zelle vergrößert, die DNA repliziert wird und die Zelle sich auf die Teilung vorbereitet. Das klassische Zellzyklus-Modell ordnet jeder Phase des Zellzyklus Komplexe aus bestimmten Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und deren Aktivatoren, den Cyclinen zu, die das Fortschreiten in die nächste Phase induzieren (Abb.1.3). Die Cycline, deren Menge während des Zellzyklus oszilliert, wird durch die transkriptionelle Induktion und die Degradierung der Proteine moduliert. Der frühen G₁-Phase werden CDK4 oder CDK6 im Komplex mit D-Typ Cyclinen zugeordnet. Die späte G₁-Phase und frühe S-Phase wird von CDK2/Cyclin E-Komplexen bestimmt, die weitere S-Phase von CDK2/Cyclin A-Komplexen und die G₂-Phase von CDK1/Cyclin B-Komplexen. Der Punkt in der G₁-Phase, der den irreversiblen Eintritt in die DNA-Replikation und Zellteilung repräsentiert, wird als

Restriktionspunkt bezeichnet. Die G₁-S-Passage über den Restriktionspunkt wird durch das Retinoblastoma (Rb)-Protein kontrolliert, indem es die Expression von Proteinen inhibiert, die zur Überwindung des Restriktionspunktes notwendig sind. Diese Repression kann Rb vermitteln, indem es an E2F-Transkriptionsfaktoren bindet. Rb selbst kann durch eine sequenzielle Phosphorylierung inhibiert werden, die in der frühen G₁-Phase durch die aktivierten Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 und in der späten G₁-Phase durch CDK2 induziert wird. Die genaue Koordination der CDK4/6-Aktivierung wird zum einen durch die Bindung von Aktivatoren wie D-Typ Cyclinen (Cyclin D1, D2, D3) und Inhibitoren wie INK4a-d (p16, p15, p18, p19) und KIP1/2 (p27, p57), sowie zum anderen durch die Phosphorylierung von Cyclin D/CDK4/6-Komplexen kontrolliert (Chiles 2004) (Abb.1.4). Eine zentrale Rolle für die G₁-S-Passage scheint das Protoonkogen c-Myc zu spielen, da es die Aktivität des Cyclin D/CDK4/6-Komplex erhöht, indem es den Inhibitor INK4b (p15) reprimiert (Gartel and Shchors 2003). Ebenso kann es CDK2 und Cyclin E induzieren. Auch der Vorgang der DNA-Replikation in der S-Phase wird genau kontrolliert. Der Multiprotein-Komplex ORC (Origin recognition complex), der an den Ausgangspunkt der Replikation in der DNA bindet, dient als Andockstelle für viele weitere regulatorische Proteine. Zu diesen gehört CDC6, das transient in der frühen G₁-Phase ansteigt und durch die Bindung an ORC die weitere Bindung von MCM-Proteinen erlaubt. Dieser gesamte Protein-Komplex wird als „Pre-Replicative Complex“ (pre-RC) bezeichnet und ist die Voraussetzung für die Replikation der DNA. Ausgelöst wird die Replikation durch die Aktivierung von S-Phase CDKs in der späten G₁-Phase. Später sorgen die gleichen CDKs dafür, dass CDC6 degradiert wird und die DNA nur einmal pro Zellzyklus-Durchlauf repliziert wird. Geminin und Cyclin A, das in der späten S-Phase induziert wird, wirken als Inhibitoren des pre-RC. Der Eintritt in die Mitose wird unter anderem durch die Regulierung der CDK-Aktivität kontrolliert, indem inhibitorische Threonine dieser CDKs durch z.B. die Wee1 Kinase phosphoryliert oder CDC25 dephosphoryliert werden können. Ein weiterer Kontrollpunkt während der Mitose ist der Zusammenbau der mitotischen Spindel, die für die korrekte Verteilung der Chromosomen zu den Polen notwendig ist. Kontrolliert wird dieser Vorgang über die BUB-Proteine, die als Kinasen agieren (zusammengefasst in Molecular Cell Biology (Lodish 2000)).

Die viralen EBV-Proteine EBNA2, LMP1 und EBNA3C, die essentiell zur Immortalisierung infizierter B-Zellen sind, modulieren die Expression einiger der oben genannten Proteine, die an der Kontrolle des Zellzyklus mitwirken. So wurde beschrieben, dass LMP1 die Formierung von aktiven c-Jun/JunB Heterodimeren fördert und so die Expression von Cyclin D1 verstärkt (Song et al. 2005). LMP1 kann zusätzlich die Expression

von CDK2 induzieren und die Expression von INK4a (p16) und KIP (p27) im Kern reprimieren (Everly et al. 2004; Ohtani et al. 2003). EBNA2 aktiviert vermutlich über die Induktion des Protoonkogens c-Myc die Expression von Cyclin D2 und CDK4 (Bouchard et al. 2001; Bouchard et al. 1999; Hermeking et al. 2000; Kaiser et al. 1999). Sinclair und Kollegen konnten zeigen, dass die gemeinsame Expression von EBNA2 und EBNA-LP (Leader Protein) in Abwesenheit anderer viraler Proteine ausreicht, um Cyclin D2 zu induzieren (Sinclair et al. 1994).

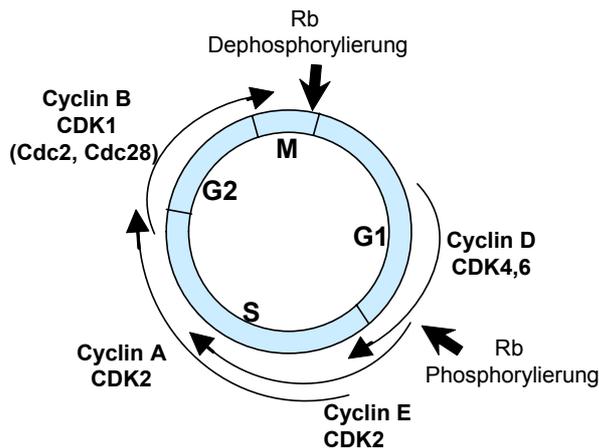


Abb. 1.3 Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus

Der Zellzyklus unterteilt sich in die Interphase und die Mitose. Die Interphase ist weiter in die G₁-Phase (Gap1), die S-Phase (Synthese) und die G₂-Phase (Gap2) unterteilt, in denen sich die Zelle vergrößert, die DNA repliziert wird und die Zelle sich auf die Teilung in der M-Phase (Mitose) vorbereitet. Das Fortschreiten innerhalb der verschiedenen Phasen und der Übergang zur nächsten Phase wird durch bestimmte Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) und deren aktivierender Cycline induziert. Der G₁-Phase und dem Übergang zur frühen S-Phase werden die CDK4 und die CDK6 sowie die D-Cycline zugeordnet. Das Substrat dieser aktivierten Kinasen ist hauptsächlich Rb (Retinoblastoma). Die

CDK2/Cyclin E Komplexe sowie die CDK2/Cyclin A Komplexe vermitteln das Fortschreiten in der S-Phase und den Übergang in die G₂-Phase. Schließlich induzieren die CDK1/Cyclin B Komplexe den Übergang in die Mitose, in der die Zelle sich teilt.

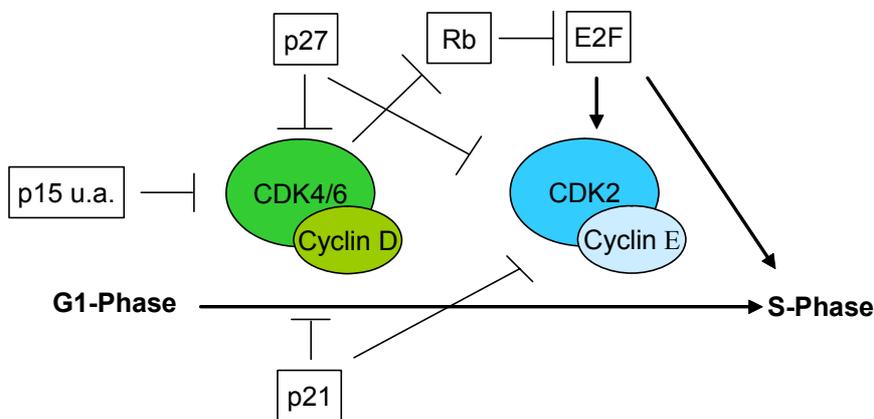


Abb. 1.4 Regulation der Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen und des Retinoblastoma-Proteins beim Übertritt von der G₁- zur S-Phase

Aktivierte CDK4/6/Cyclin D Komplexe induzieren den Übergang der G₁- in die S-Phase. Sie vermitteln die beginnende Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (Rb), das dadurch inaktiviert wird und nicht mehr an den Transkriptionsfaktor E2F binden kann und diesen somit hemmt. E2F kann nun die Expression von Cyclin E induzieren, das dann CDK2 aktiviert, was zu einer weiteren Phosphorylierung von Rb führt. In der Folge wird noch mehr E2F aktiv, das dann die Expression von weiteren S-Phase-Proteinen induziert. Der Übergang von der G₁- in die S-Phase wird von verschiedenen Inhibitoren kontrolliert. p27, p15 und p21 können die Aktivierung des CDK4/6/Cyclin D-Komplexes verhindern und p21 und p27 zusätzlich die Aktivierung des CDK2/Cyclin E-Komplexes.

den kann und diesen somit hemmt. E2F kann nun die Expression von Cyclin E induzieren, das dann CDK2 aktiviert, was zu einer weiteren Phosphorylierung von Rb führt. In der Folge wird noch mehr E2F aktiv, das dann die Expression von weiteren S-Phase-Proteinen induziert. Der Übergang von der G₁- in die S-Phase wird von verschiedenen Inhibitoren kontrolliert. p27, p15 und p21 können die Aktivierung des CDK4/6/Cyclin D-Komplexes verhindern und p21 und p27 zusätzlich die Aktivierung des CDK2/Cyclin E-Komplexes.

1.2.4 EBV-assoziierte maligne Erkrankungen

EBV kann in Kombination mit Immundefekten oder Umwelt- und genetischen Ko-Faktoren Neoplasien induzieren. Während EBV in immortalisierten B-Zellen immer in der Latenz III

vorliegt, wird in Tumorzellen normalerweise nur ein Teil der latenten viralen Gene exprimiert.

Burkitt-Lymphome, Hodgkin-Lymphome, Nasopharynxkarzinome und Magenkarzinome sind zu einem hohen Prozentsatz mit EBV-Infektionen assoziiert. So sind Burkitt-Lymphome, die hauptsächlich bei Kindern in Zentralafrika auftreten, je nach Region in 20-97% der Fälle mit einer EBV-Infektion assoziiert. Charakteristisch für das Burkitt-Lymphom ist eine Translokation, die das Protoonkogen c-MYC mit dem Ig-Lokus fusioniert und so zu einer Überexpression von c-Myc führt. *In vivo* liegt EBV in Burkitt-Lymphom-Zellen im Latenzzustand I vor, in dem EBNA1 das einzige exprimierte EBV-Protein ist. Wie die EBV-Infektion mit der Entstehung von Burkitt-Lymphomen in Zusammenhang steht, ist noch unbekannt. Auch Hodgkin-Lymphome zeigen mit ca. 50% eine sehr hohe EBV-Assoziation. Diese Tumore entwickeln sich in sekundären lymphatischen Organen und sind durch das Auftreten von Hodgkin-Reed/Sternberg- (HRS) Zellen charakterisiert, die allerdings nur 0,1 - 1 % des Tumorgewebes ausmachen. HRS-Zellen stammen von Keimzentrums-B-Zellen ab, die ihr B-Zell-spezifisches Expressionsmuster (Schwering et al. 2003), inklusive der Komponenten des BCR, häufig verloren haben (Kuppers et al. 1994). Bei EBV-positiven HRS-Zellen scheinen LMP1 und LMP2A, die die aktiven Formen von CD40 und des BCR imitieren, die fehlenden Überlebenssignale zu vermitteln (Kuppers 2003; Kuppers et al. 2002). LMP1 und LMP2A werden in HRS-Zellen unabhängig von EBNA2 exprimiert. Dieses EBV-Expressionsmuster, das als LatenzII beschrieben wird, findet man normalerweise in Keimzentrums-B-Zellen.

1.2.5 Das EBV-nukleäre Antigen 2 (EBNA2)

EBNA2 (EBV Nuclear Antigen 2) ist eines der ersten exprimierten Gene nach einer EBV-Infektion. Es ist ca. 84 kD groß und besitzt eine negativ geladene Region (DIM) am Aminoterminus, die möglicherweise eine Rolle für eine Dimerisierung spielt (Lothar Strobl, persönliche Mitteilung), einen Polyprolin-Bereich (Prolin), eine Diversitätsdomäne, eine Domäne zur Interaktion mit CSL (RBPJ), einen Arginin-Glycin-reichen Bereich (Arg-Gly), eine Transaktivierungsdomäne (TAD) und ein Kernlokalisations-Signal (NLS) am C-Terminus (Abb. 1.5). EBNA2 fungiert als Transkriptionsfaktor und ist im Kern lokalisiert. Neben viralen Genen kann es auch zahlreiche zelluläre Gene induzieren, wie z.B. CD21 (Cordier et al. 1990), CD23 (Wang et al. 1987), c-MYC (Kaiser et al. 1999), HES1 (Sakai et al. 1998), RUNX3 (Spender et al. 2002), BATF (Johansen et al. 2003), und CCR7 (Burgstahler et al. 1995).

Die Transaktivator-Aktivität von EBNA2 wird durch mehrere EB-virale Proteine beeinflusst. EBNA-LP, das gemeinsam mit EBNA2 direkt nach der Infektion exprimiert wird, interagiert mit der Transaktivierungsdomäne von EBNA2 und verstärkt dessen transkriptionelle Aktivität (Harada and Kieff 1997; Nitsche et al. 1997; Peng et al. 2004). Alle drei EBNA3-Proteine können die Transaktivierung CSL-abhängiger Promotoren modulieren (Le Roux et al. 1994). Eine negative Beeinflussung der EBNA2-aktivierten, CSL-abhängigen Promotoren wird durch RPMS1 vermittelt, einem viralen Protein, das in allen EBV-infizierten Zellen exprimiert wird (Zhang et al. 2001). Neben den viralen hat EBNA2 auch zelluläre Interaktionspartner, die die Expression von Zielgenen modulieren. So interagiert EBNA2 mit einem Ko-Aktivator-Komplex, der die Proteine PCAF, SKIP und CBP beinhaltet (Wang et al. 2000; Zhou et al. 2000) (Abb. 1.7c).

EBNA2 kann als Transkriptionsfaktor nicht direkt an die DNA binden, sondern interagiert mit CSL/RBP-J κ (Grossman et al. 1994; Henkel et al. 1994; Waltzer et al. 1994; Zimmer-Strobl et al. 1994) (Abb. 1.7c). Auch der Transkriptionsfaktor Notch kann nicht direkt an die DNA binden, sondern reguliert über die Bindung an das DNA-bindende Protein CSL/RBP-J κ die Expression von Genen, die eine CSL/RBP-J κ -Bindungsstelle in ihrem Promotor aufweisen. Deshalb vermutet man, dass EBNA2 den Notch-Signalweg verwendet, um die Expression von Zielgenen zu regulieren und bezeichnet EBNA2 auch als funktionelles Äquivalent von Notch. Ein großer Unterschied liegt jedoch darin, dass EBNA2 Liganden-unabhängig agiert, während Notch strikt Liganden-abhängig ist. Notch und EBNA2 haben keine Homologie auf Aminosäure-Ebene und interagieren nicht mit derselben Sequenz im CSL-Protein zur Bindung an dieses (Fuchs et al. 2001; Hsieh et al. 1997).

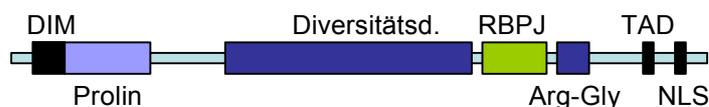


Abb. 1.5 Die Struktur des EBNA2-Proteins

Das EBNA2-Protein besitzt am N-Terminus eine negativ geladene Region (DIM), die womöglich eine Rolle in der Dimerisierung spielt,

einen Polyprolin-reichen Bereich, eine Domäne zur Interaktion mit CSL/RBPJ- κ (RBPJ), einen Arginin-Glycin reichen Bereich (Arg-Gly), eine Transaktivierungsdomäne (TAD) und ein Kernlokalisations-Signal (NLS) am C-Terminus. Die Diversitätsdomäne beschreibt den Bereich, in dem die beiden EBNA2-Proteine EBNA2A und EBNA2B keinerlei Homologie aufweisen. Insgesamt verfügen EBNA2A und EBNA2B nur über 57 % Homologie.

1.3 Der Notch-Rezeptor

Notch wurde erstmals zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Morgan und Kollegen beschrieben (Morgan 1917). Fruchtfliegen mit einer Kerbe (engl. „notch“) im Flügel zeigten eine Haploinsuffizienz des Notch-Gens, das für einen Transmembran-Rezeptor kodiert. Kloniert wurde Notch erstmals in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts (Kidd et al. 1986; Wharton

et al. 1985). Notch-Proteine und ihre Liganden regulieren in Vertebraten Prozesse in der frühen Embryogenese (Hamada et al. 1999; Swiatek et al. 1994), in der neuronalen Entwicklung (Nye et al. 1994), in der Muskeldifferenzierung (Kopan et al. 1994), der Pankreas-Zell-Differenzierung (Apelqvist et al. 1999), der Granulozyten-Differenzierung (Milner et al. 1996; Schroeder and Just 2000) und der Lymphozyten-Differenzierung (Pui et al. 1999; Radtke et al. 1999). Bei diesen Prozessen sind Notch-Proteine in die Apoptose, die Proliferation und „Border Formation“ mittels lateraler Inhibition involviert.

Während *Drosophila melanogaster* nur über einen Notch-Rezeptor und zwei Membran-gebundene Liganden Serrate und Delta verfügt, haben Säugetiere vier Rezeptoren (Notch1-4) und fünf Liganden: Jagged1 und Jagged2 (Homologe zu Serrate), Delta-like 1, 3 und 4 (Homologe zu Delta). Notch-Proteine werden als Vorläufer-Proteine synthetisiert und während des Transports zur Zelloberfläche prozessiert, wo sie als Heterodimere exprimiert werden. Die extrazelluläre Domäne hat zwischen 29 und 36 „Epidermal Growth Factor-like (EGF) Repeats“, gefolgt von drei Cystein-reichen Notch/Lin12 (LIN) Wiederholungen. Während die aminoterminalen „EGF-like-Repeats“ die DSL-Domäne (Delta, Serrate, Lag-2) der Liganden binden, verhindern die „LIN-Repeats“ eine Signalweiterleitung in Abwesenheit eines Liganden. Die zytoplasmatischen Domänen des Notch-Rezeptors, die das Signal in den Kern weiterleiten, beherbergen viele Protein-Protein-Interaktionsdomänen wie die RAM-Domäne und die „Ankyrin-Repeats“, die nachgeschaltete Effektormoleküle wie zB. CSL/RBPJ- κ binden; drei Kernlokalisations-Signale und eine PEST-Sequenz, die in die Regulierung der Proteinstabilität involviert ist und Transaktivierungspotential besitzt (Abb. 1.6). Während Notch1 und Notch2 noch über eine zusätzliche transkriptionelle Transaktivierungsdomäne verfügen, wurde diese für Notch3 und Notch4 nicht beschrieben.

Liganden-Bindung an die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors löst zwei proteolytische Spaltungen im Rezeptor aus. Die erste wird durch die ADAM-Protease TACE (Tumor-Necrosis Factor α -converting Enzyme) vermittelt, die den Rezeptor nahe der Transmembran-Domäne spaltet. Die abgespaltene extrazelluläre Domäne wird durch die Liganden-exprimierende Zelle durch Endozytose aufgenommen (Parks et al. 2000). Eine zweite Spaltung erfolgt innerhalb der Transmembran-Domäne durch die γ -Secretase-Aktivität des Multiprotein-Komplexes der Preseniline. Der nun frei gewordene zytoplasmatische Anteil des Notch-Rezeptors (NotchIC) wird in den Kern transloziert, bindet das DNA-bindende Protein CSL (CBF im Menschen, RBPJ- κ in der Maus, Suppressor of Hairless in *Drosophila*, Lag1 in *C. elegans*) und verwandelt dieses von einem transkriptionellen Repressor in einen transkriptionellen Aktivator, indem es den gebundenen Ko-Repressor-Komplex durch

Rekrutierung eines Ko-Aktivator-Komplexes ersetzt (Abb.1.7a und b). Der Ko-Repressor-Komplex besteht aus den negativen Modulatoren SHARP (Oswald et al. 2002) und SMRT und der Histon-Deacetylase HDAC-1. Der Ko-Aktivator-Komplex besteht aus Koaktivatoren wie Mastermind-like Proteinen (MAMLs) (Jeffries et al. 2002; Wu et al. 2000) und der Histon-Acetylase PCAF (Wallberg et al. 2002), die mit CBP/p300 interagieren (Fryer et al. 2002). SKIP, ein RBPJ-interagierendes Protein, scheint als Verbindungs-Protein sowohl für den HDAC-Ko-Repressor-Komplex als auch für die Aktivatoren NotchIC und EBNA2 zu dienen (Zhou et al. 2000). Bis heute sind in Lymphozyten nur wenige Notch-Zielgene bekannt. Zu diesen gehören die Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren Hes1 und Hes5 (Davis and Turner 2001), die verwandte Herp-Transkriptionsfaktor-Familie (Iso et al. 2003), der Zellzyklus-Regulator Cdkn1a (Rangarajan et al. 2001), Nrarp (Notch-regulated ankyrin repeat protein) (Krebs et al. 2001), Deltex (Deftos et al. 2000), Ptcrα (Pre-T-α) (Reizis and Leder 2002), CD21 und Igu (Strobl et al. 2000).

Zusätzlich zu den Notch-Liganden gibt es weitere zelluläre Proteine, die Notch-Signale modulieren. Fringe-Proteine gehören zur Familie der Glykosyl-Transferasen, die N-Acetylglucosamin an bestimmte „EGF-like-Repeats“ des Notch-Rezeptors anhängen können und dadurch Delta-vermittelte Signale verstärken und Jagged-vermittelte Signale inhibieren (Haines and Irvine 2003; Haltiwanger and Stanley 2002). Zu den zyttoplasmatischen Modulatoren gehören Deltex und Numb. Deltex kann Notch-Signale abhängig von Bindungspartnern positiv oder negativ beeinflussen, während Numb als negativer Regulator die Endozytose und Proteasom-vermittelte Degradierung von Notch verursacht (Miele 2006). Die nukleären Proteine Nrarp (Yun and Bevan 2003) und MINT sind beides negative Regulatoren der Notch-Signalweiterleitung. Es konnte gezeigt werden, dass MINT mit NotchIC um die Bindung an CSL kompetitiert (Kuroda et al. 2003).

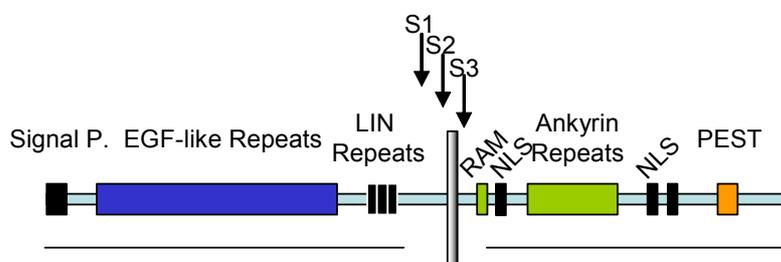


Abb. 1.6 Die Struktur des Notch-Rezeptors

Der N-terminale Bereich des Notch-Rezeptors besitzt ein Signalpeptid (Signal P.), gefolgt von vielen „Epidermal Growth Factor (EGF) like Repeats“, die als Liganden-Bindedomänen agieren und „LIN12 Repeats“, die eine Signalweiterleitung in Abwesenheit eines Liganden

verhindern. Der intrazelluläre Teil (NIC) beinhaltet die RAM-Domäne und eine Reihe von „Ankyrin-Repeats“, die beide im Kern mit CSL/RBPJ-κ interagieren können; drei Kernlokalisations-Signale (NLS) und eine c-terminale PEST-Sequenz, die in die Regulation der Proteinstabilität involviert ist und Transaktivierungspotenzial besitzt. Die Pfeile (S1-S3) weisen auf die Stellen der proteolytischen Spaltung während der Reifung des Notch-Rezeptors und nach der Aktivierung durch einen Liganden hin. NEC (extrazellulärer Teil); TM (Transmembran Domäne).

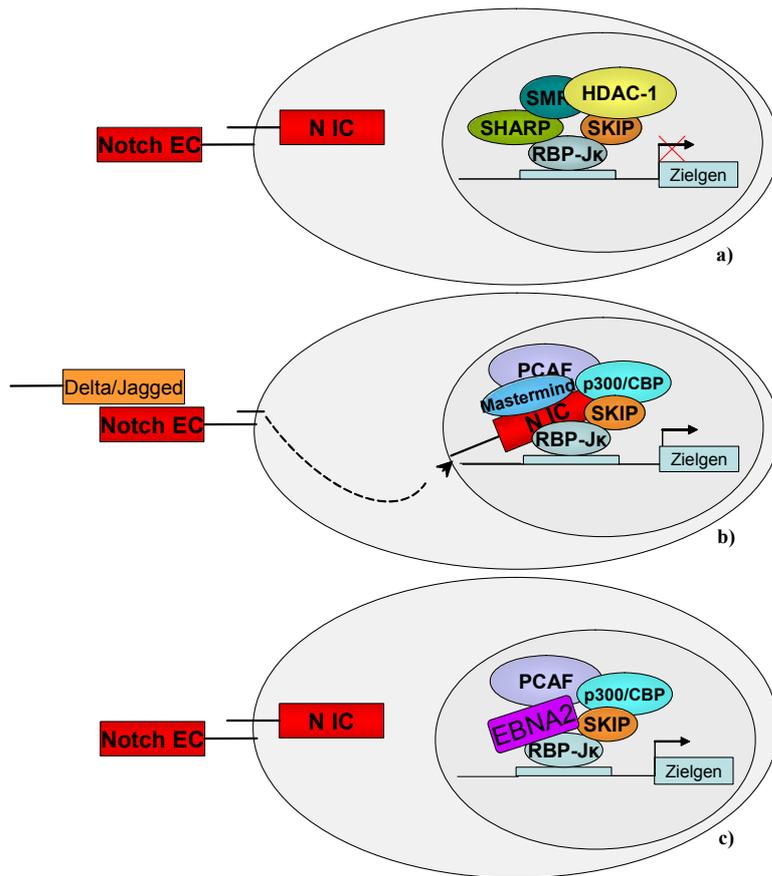


Abb. 1.7 Der Notch-Signalweg

a) Im ruhenden Zustand rekrutiert CSL/RBPJ- κ einen Ko-Repressor-Komplex, der neben SMRT, SHARP und dem Brückenprotein SKIP die Histon-Deacetylase HDAC-1 enthält. **b)** Nach der Liganden-Bindung wird der Notch-Rezeptor proteolytisch gespalten. Die erste Spaltung erfolgt in der extrazellulären Domäne (NEC), die zweite in der intrazellulären (NIC). NIC wird von der Membran freigesetzt und wandert aufgrund der Kernlokalisations-Signale in den Kern, wo es CSL/RBPJ- κ binden kann. Diese Bindung vertreibt den Ko-Repressor-Komplex und induziert die Rekrutierung eines Ko-Aktivator-Komplexes, der aus Koaktivatoren wie MAML (Mastermind-like)-Proteinen und der Histon-Acetylase PCAF besteht, die mit CBP/p300 interagieren. SKIP dient auch hier als Brückenprotein. Dieser Ko-Aktivator-Komplex induziert die Transkription von Notch-Zielgenen. **c)** Die Bindung von EBNA2 (EBV nuclear antigen 2) an CSL/RBPJ- κ erfolgt Liganden-unabhängig und verursacht die Rekrutierung des Ko-Aktivator-Komplexes, was zur Induktion von EBNA2-Zielgenen führt.

1.3.1 Notch und die T-Zellentwicklung

Die am besten untersuchte Rolle von Notch im hämatopoetischen System ist die essentielle Funktion von Notch1 in der B/T-Zellentscheidung. Die Inaktivierung von Notch1 oder des Transkriptionsfaktors CSL in Knochenmarks-Vorläuferzellen führt zu einem Block in der Thymus-abhängigen T-Zellentwicklung. Zusätzlich kommt es zur Entwicklung von unreifen B-Zellen im Thymus, was vermuten lässt, dass Notch1 frühe lymphoide Vorläufer in Richtung T-Zellen treibt und die Entwicklung zu B-Zellen unterdrückt (Han et al. 2002; Radtke et al. 1999; Wilson et al. 2001). Im Gegensatz dazu hat die Inaktivierung von Notch2 (Saito et al. 2003), Notch3 (Krebs et al. 2003) oder Notch4 (Krebs et al. 2000) keinen Einfluss auf die T-Zellentwicklung. Dies zeigt, dass die T-Zellentscheidung eine nicht redundante Funktion von Notch1 ist, dessen Signal CSL-vermittelt ist. Im Gegensatz zur Inhibierung des Notch-Signals führt eine Überexpression des zytoplasmatischen Anteils von Notch1 (Notch1IC) (Pui et al. 1999), Notch2 (Notch2IC) (Witt et al. 2003) oder Notch4 (Notch4IC) (Vercauteren and Sutherland 2004) zu einer ektopischen Entwicklung von T-Zellen im

Knochenmark und einem Block der B-Zellentwicklung. Die Spezifität von Notch1 für diesen Phänotyp scheint also nicht gegeben zu sein.

Möglicherweise beeinflussen Notch-Signale die Entscheidung zwischen B- und T-Zellen, indem sie Vorläuferzellen mit dem Potenzial sich zu B- und T-Zellen zu entwickeln, in Richtung T-Zellen treiben. In Abwesenheit von Notch entwickeln sich diese zu B-Zellen. Eine Liganden-Spezifität bei der B/T-Zell-Entscheidung wird diskutiert. *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass hämatopoetische Stammzellen (HSC) in Kokultur mit Delta1- und Delta4-exprimierenden Stromazellen zu T-Zellen differenzieren, während eine Kokultur mit Jagged-exprimierenden Stromazellen die HSC in die B-Zellentwicklung treibt (Hozumi et al. 2004; Jaleco et al. 2001; Schmitt and Zuniga-Pflucker 2002).

1.3.2 Notch und die B-Zellentwicklung

Auf reifen B-Zellen wird hauptsächlich Notch2 exprimiert, Notch1 und Notch3 indes hauptsächlich auf Thymozyten; Notch4 kann auf Lymphozyten kaum detektiert werden (Huang et al. 2003; Saito et al. 2003). Die Expressionslevel von Notch2 steigen während der B-Zellentwicklung an und sind in reifen B-Zellen am höchsten, was vermuten lässt, dass Notch2-Signale eine Rolle in der peripheren B-Zellentwicklung oder -funktion haben (Saito et al. 2003). Tatsächlich führt die Inaktivierung von Notch2 zum Verlust von Marginalzonen-B-Zellen (MZB) (Saito et al. 2003) (Ursula Strobl, persönliche Mitteilung). Der Verlust der MZB findet sich auch in CSL-defizienten Mäusen, was zeigt, dass Notch2 seinen Einfluss auf die MZB-Entwicklung über CSL-vermittelt (Tanigaki et al. 2002). Die Entwicklung von unreifen B-Zellen im Knochenmark von Notch2-defizienten, wie auch CSL-defizienten Mäusen scheint normal zu sein, womit Notch2-Signale für die frühe B-Zellentwicklung nicht essentiell zu sein scheinen. Der Verlust der MZB in CSL-defizienten Mäusen wird begleitet von einer leichten Zunahme an folliculären B-Zellen (FoB), die zur adaptiven Immunantwort beitragen. Ein gegensätzlicher Phänotyp in der Milz konnte für MINT-defiziente Mäuse beschrieben werden (Kuroda et al. 2003). MINT ist ein negativer Regulator von Notch, der in FoB stärker als in MZB exprimiert wird. MINT-defiziente Mäuse zeigen eine Zunahme an MZB und eine leichte Abnahme an FoB. Diese gegensätzlichen Phänotypen führen zu der Vermutung, dass Notch2-Signale die Zelllinienentscheidung einer bipotenten B-Zelle der Milz in Richtung MZB gegenüber FoB beeinflussen. Delta-like1-defiziente Mäuse haben keine MZB mehr, weisen aber eine ganz normale T-Zellentwicklung auf. Dies deutet darauf hin, dass Delta-like1-vermittelte Notch2-Signale essentiell für die Entstehung von MZB, aber ersetzbar für Notch1-Signale bei der T/B-Zellentscheidung sind (Hozumi et al. 2004).

1.3.3 Notch und Neoplasien

Die erste Verbindung zwischen Notch und Neoplasien wurde durch die Klonierung und Sequenzierung einer chromosomalen Translokation t(7;9) in einer kleinen Gruppe von Patienten hergestellt, die unter einer akuten T-Zell lymphoblastischen Leukämie (T-ALL) litten (Ellisen et al. 1991; Reynolds et al. 1987). Diese Translokation brachte die c-terminale Region des humanen Notch1-Gens unter die Kontrolle des TCR β -Enhancers, was zu einer abberanten Expression der verkürzten, dominant aktiven und Liganden-unabhängigen Form von Notch1 (Notch1IC) führte. Notch1IC wurde damals TAN1 für Translokations-assoziiertes Notch-Homolog genannt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von TAN1 (Deftos et al. 2000; Robey et al. 1996), Notch1IC (Pear et al. 1996) als auch Notch3IC (Bellavia et al. 2000) in Knochenmarkzellen zu einer T-Zellleukämie führt. Die molekularen Details der Notch-induzierten Tumorentstehung sind bis heute nicht gut verstanden. Experimentell konnte aber eine Zusammenarbeit von Notch1 mit c-Myc (Girard et al. 1996), E2A-PBX1 (Feldman et al. 2000) und Ikaros (Dumortier et al. 2006) gezeigt werden. Notch3 kann in Kombination mit einem pre-TCR-induzierten ERK1/2 Signal die Aktivität von E2A durch Induktion des Inhibitors Id1 reprimieren (Talora et al. 2003). In Notch3IC-transgenen Mäusen kann Notch3 die Protein-Kinase C θ aktivieren, was zur Aktivierung des NF κ B-Signalwegs führt und somit leukämogenen T-Zellen Überlebenssignale vermittelt (Felli et al. 2005).

Zahlreiche Untersuchungen lassen vermuten, dass Notch-Signale bei der Pathogenese von B-Zell-Tumoren eine Rolle spielen. So wird Notch2 in B-Zellen von Patienten mit chronischer B-Zellleukämie (B-CLL) stark exprimiert und vermittelt möglicherweise die hohe Expression des Transmembran-Glycoproteins CD23, das als Marker für die B-CLL gilt (Hubmann et al. 2002; Schwarzmeier et al. 2005). Notch1 und Notch2 werden in den malignen B-Zellen des Hodgkin Lymphoms hoch exprimiert. Eine Liganden-induzierte Aktivierung des Notch-Signals *in vitro* fördert das Wachstum und inhibiert die Arsenit-induzierte Apoptose dieser transformierten B-Zellen, was vermuten lässt, dass Notch Tumorwachstum und/oder -überleben fördert (Jundt et al. 2002). Im Gegensatz dazu gibt es auch Studien, die besagen, dass Notch in zahlreichen humanen und murinen B-Zelltumoren Wachstum inhibiert und Apoptose induziert. So haben Morimura und Kollegen in der Hühner-Lymphom-Zelllinie DT40 gezeigt, dass Notch1 das Wachstum inhibiert, die Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus akkumulieren und die Apoptoserate erhöht war (Morimura et al. 2000). Dies beruht möglicherweise auf der Notch-vermittelten Induktion von Hes1, da eine retrovirale Expression von Hes1 ebenfalls Wachstum inhibiert und Apoptose induziert

(Zweidler-McKay et al. 2005). In einer zweiten Studie in murinen B-Zell-Lymphom-Zellen konnte gezeigt werden, dass Notch-Signale bei gleichzeitiger BCR-Kreuzvernetzung die Apoptose verstärken (Romer et al. 2003). Wie und ob Notch tatsächlich onkogenes Potential in B-Zellen vermittelt, bleibt weiterhin unklar.

Neben EBV scheinen auch andere Viren den Notch-Signalweg zu benutzen, um Zellen zu transformieren. So konnte auch für das Adeno-virale Protein 13SE1A gezeigt werden, dass es an CSL bindet und CSL-abhängige Promotoren aktivieren kann (Ansieau et al. 2001). SV40 (Simian Virus 40) vermittelt den Anstieg der Notch1-Expression, der notwendig für das Zellwachstum infizierter Zellen ist (Bocchetta et al. 2003). RTA, ein Protein des Kaposi-Sarcoma assoziierten Herpesvirus, interagiert ebenfalls mit CSL und kann so möglicherweise zelluläre Gene in endothelialen Zellen regulieren (Wang et al. 2004; West and Wood 2003). All diese Viren sind mit humanen Tumoren assoziiert und verfügen über Mechanismen, die Zellzykluskontrolle zu manipulieren.

1.4 Offene Fragen

Notch und EBNA2 können beide über die Interaktion mit CSL/RBPJ- κ Zielgene regulieren und so physiologische Prozesse beeinflussen. In welchen biologischen Prozessen sich Notch und EBNA2 tatsächlich gegenseitig ersetzen können, ist bis jetzt nicht geklärt.

Bei der Immortalisierung von B-Zellen können physiologische Notch-Signale EBNA2 wahrscheinlich nicht ersetzen (Hofelmayer et al. 2001). Da alle viralen Gene, die in EBV-immortalisierten B-Zellen exprimiert werden, CSL-Bindungsstellen im Promotor aufweisen, kann man jedoch vermuten, dass diese sowohl durch EBNA2 als auch durch Notch reguliert werden können. In Keimzentrums-B-Zellen und davon abgeleiteten Neoplasien, wie z.B. Hodgkin-Lymphomen werden nur EBNA1, LMP1 und LMP2A, nicht aber EBNA2 exprimiert. Da Notch1 und Notch2 in diesen Zellen exprimiert werden, ist es möglich, dass Notch hier die Aufgabe von EBNA2 übernimmt, um LMP1 und LMP2A zu induzieren.

2 Zielsetzung

Notch-Signale spielen in der Entwicklung von Lymphozyten eine wichtige Rolle. So induzieren Notch1-Signale die T-Zellentwicklung in lymphoiden Vorläuferzellen, während Notch2-Signale für die Differenzierung reifer B-Zellen zu Marginalzonen-B-Zellen essentiell sind.

Das Epstein-Barr Virus (EBV) infiziert reife B-Zellen und hat die Fähigkeit diese zur permanenten Proliferation anzuregen. Essentiell für diesen Prozess ist unter anderem das virale Protein EBNA2, das den gleichen Signalweg zur Induktion von Zielgenen verwendet wie Notch. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass Notch1IC die EBNA2-vermittelte Proliferation von EBV-infizierten B-Zellen weder induzieren noch langfristig aufrechterhalten kann.

Um die Unterschiede und Gemeinsamkeiten von NotchIC und EBNA2 näher zu untersuchen, sollte ermittelt werden, welche Zielgene von NotchIC und EBNA2 reguliert werden. Da hauptsächlich Notch1 und Notch2 in B-Zellen exprimiert wird, sollten Notch1IC und Notch2IC in konditional immortalisierte B-Zellen eingebracht werden. Ziel war es Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-regulierte Zielgene mithilfe der DNA-Microarray-Technik zu ermitteln und diese miteinander zu vergleichen. Im Vordergrund standen dabei die Unterschiede zwischen Notch1IC- und Notch2IC-regulierten Genen, sowie der Vergleich von Notch1IC- und Notch2IC-regulierten Genen mit EBNA2-regulierten Genen.

Die Auswertung zeigte, dass sowohl von NotchIC als auch von EBNA2 Gene reguliert wurden, die mit der Kontrolle des Zellzyklus und der Immunmodulation assoziieren. Deshalb sollten diese Signalwege näher analysiert werden. Es sollte anhand der identifizierten Zielgene untersucht werden, weshalb Notch EBNA2 bezüglich der Immortalisierung von B-Zellen nicht ersetzen kann, obwohl es Zellzyklus-assoziierte Gene regulieren kann. Ein weiteres Ziel war es, identifizierte immunmodulatorische Gene, wie die Komponenten des BCR, mittels qRT-PCR zu verifizieren und den Einfluss von Notch und EBNA2 auf die Immunmodulation, speziell auf den Klassenwechsel, *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

3 Ergebnisse

Um besser zu verstehen, wie Notch1, Notch2 und EBNA2 ihren Einfluss auf die normale B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung vermitteln und wo ihre funktionellen Unterschiede sowie Gemeinsamkeiten liegen, wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Zielgene von Notch und EBNA2 reguliert werden.

3.1 Herstellung NotchIC-exprimierender EREB2-5 Zellen

Als Zellsystem für diese Untersuchungen wurden EREB2-5 Zellen, eine EBV-immortalisierte humane B-Zelllinie gewählt, in der die Aktivität von EBNA2 und somit die des gesamten Latenz III-Programms von EBV Östrogen-abhängig ist (Kempkes et al. 1995). Eine ausführliche Beschreibung der EREB2-5 Zelllinie befindet sich in Abschnitt 6.1.4. In Abwesenheit von Östrogen ähneln EREB2-5 Zellen phänotypisch reifen ruhenden B-Zellen, in Anwesenheit von Östrogen reifen aktivierten B-Zellen. Humanes Notch1IC bzw. Notch2IC wurden in ein episomal replizierendes Tet-On-Expressionsplasmid (Bornkamm et al. 2005) kloniert und stabil in EREB2-5-Zellen eingebracht (Abb. 3.1). Dies ermöglichte es, die Expression von NotchIC in den stabil transfizierten Zellen durch die Zugabe von Doxycyclin zu regulieren.

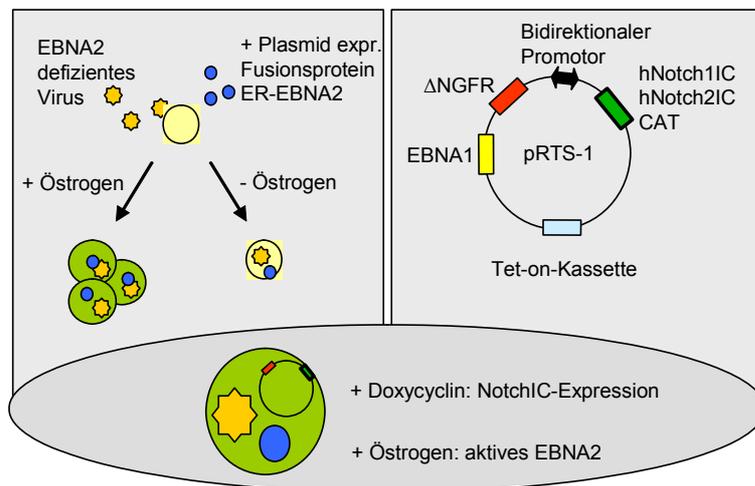


Abb. 3.1 Etablierung Notch1IC- und Notch2IC-exprimierender EREB2-5 Zellen

EREB2-5 ist eine konditional immortalisierte humane Lymphoblastoide B-Zelllinie, die durch die Infektion primärer B-Zellen mit einem EBNA2-defizienten EBV (P3HR1) infiziert wurde. Der EBNA2-Defekt wurde durch ein Expressionsplasmid komplementiert, das für das Östrogen-regulierbare Fusionsprotein ER-EBNA2 kodiert. In Anwesenheit von Östrogen wird EBNA2 aktiviert. Ohne Östrogen zeigen EREB2-5 Zellen einen ruhenden Phänotyp, in Anwesenheit von Östrogen einen

aktivierten. EREB2-5 Zellen wurden mit einem Tetrazyklin-regulierbaren Expressionsplasmid (pRTS-1), das für humanes Notch1IC, Notch2IC oder CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase) kodiert, stabil transfiziert. Der bidirektionale Tet-O7 Promotor kontrollierte die Expression der Transgene und dem Marker, Δ NGFR (verkürzter „Nerve Growth Factor Receptor“), mit dessen Hilfe NotchIC- und CAT-exprimierende Zellen aufgereinigt werden konnten. EBNA1 dient der episomalen Erhaltung des Plasmids im Genom. Die Tet-on-Kassette erlaubt die Expression des reversen Tet-Transaktivators.

3.1.1 Klonierung des humanen Notch1IC, Notch2IC und CAT in den Tetrazyclin regulierbaren pRTS-1 Vektor

Die Expressionsplasmide pRTS-1 N1 und pRTS-1 N2 kodieren für den kompletten translatierten intrazellulären Teil des humanen Notch1-Rezeptors (Notch1IC) bzw. des humanen Notch2-Rezeptors (Notch2IC). Dies ist besonders hervorzuheben, da in früheren Experimenten oftmals auf die PEST (Prolin-Glutamin-Serin-Threonin-reiche) Sequenz verzichtet wurde, weil sie zu einer Destabilisierung der aktivierten Notch-Proteine führt. Da diesem Bereich aber Transaktivierungs-Aktivität zugeschrieben wird, wurden Notch1IC und Notch2IC inklusive der PEST Sequenz kloniert. Um die Proteinmengen des transgenen Notch1IC und Notch2IC miteinander vergleichen zu können, wurde N-terminal eine FLAG-Sequenz kloniert. Das FLAG-Epitop konnte jedoch in späteren Western-Blot-Analysen nicht nachgewiesen werden. Die Notch-Proteine konnten deshalb nur über gegen Notch1- und Notch2-gerichtete Antikörper nachgewiesen werden.

Um nach Zugabe von Doxycyclin den Einfluss des aktivierten Expressionsplasmids auf die Zelle und deren Expressionsmuster zu untersuchen, wurde als Kontrolle die in Eukaryonten funktionslose Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) in den pRTS-1 Vektor kloniert (pRTS-1 CAT). Der pRTS-1 Vektor beinhaltet den reversen Tet-Transaktivator (rTtA), der Doxycyclin benötigt, um die Tet-Operon Sequenz im Tet-Plasmid zu erkennen und so die Transkription zu aktivieren. Zusätzlich wird von diesem Vektor der KRAB-Repressor exprimiert, der in Abwesenheit von Doxycyclin an den Tet-Operator bindet und dadurch zur Unterdrückung der Transkription führt. Die episomale Erhaltung des pRTS-1 Vektors wird durch EBNA1 und den entsprechenden viralen „Origin of replication“ gewährleistet. Zusätzlich kodiert der Vektor für einen verkürzten „Nerve Growth Factor Receptor“ (Δ NGFR), der gemeinsam mit den Transgenen vom bidirektionalen Tet-O7 Promotor kontrolliert wird. Dies ermöglicht es induzierte Zellen, welche Notch oder CAT exprimieren, über die Expression des Δ NGFR mittels MACS (Magnetic Associated Cell Sorting) aufzureinigen. Die Verkürzung des NGFR am intrazellulären Teil verhindert eine Signalweiterleitung im Falle einer Liganden-Interaktion.

Da in EREB2-5 Zellen die EBNA2-Funktion durch den Entzug von Östrogen abgeschaltet werden kann, bietet dieses System die Möglichkeit, aktives Notch und EBNA2 unabhängig voneinander anzuschalten und somit die Effekte von Notch1IC bzw. Notch2IC in Abwesenheit von EBNA2, sowie die Effekte von EBNA2 im selben Zellsystem zu untersuchen.

3.1.2 Gewinnung stabiler Klone von Notch1IC, Notch2IC und CAT

Zur Gewinnung stabiler Klone von Notch1IC, Notch2IC und CAT wurden EREB2-5 Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden (pRTS-1 N1, pRTS-1 N2 bzw. pRTS-1 CAT) transfiziert und in Abwesenheit von Doxycyclin durch die Zugabe von Hygromycin selektioniert. Vier Wochen nach Start der Selektion wurde die Transgen-Expression durch die Zugabe von Doxycyclin induziert und die Zellen auf die Expression und Funktionalität ihrer Transgene getestet.

3.1.3 Testung der Klone auf Expression von Notch1IC und Notch2IC sowie der Funktionalität von Notch1IC, Notch2IC und EBNA2

Die Expression der Notch-Proteine wurde mittels Western-Blot-Analyse geprüft. NGFR-positive Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion gereinigt und für die Gewinnung von Proteinextrakten verwendet. Notch1IC und Notch2IC wurden mit spezifischen Antikörpern, die gegen Notch1 und Notch2 gerichtet sind, detektiert (Abb. 3.2). Als Negativkontrolle wurden EREB/CAT-Zellen verwendet. Notch1IC konnte 8h nach der Induktion von Doxycyclin nachgewiesen werden und zeigte innerhalb der Kinetik eine stetige Zunahme der Expression auf Proteinebene. In der Kontrollzelllinie wurde Notch1IC nicht exprimiert. Notch2IC konnte erst nach 24h nachgewiesen werden und zeigte sich nach 3d deutlich akkumuliert. Da Notch2 endogen in EREB2-5 Zellen vorhanden ist, konnte es auch in der Negativkontrolle nachgewiesen werden. Detektiert wurde hier aber nicht Notch2IC, sondern der endogene Rezeptor, der als Heterodimer vorliegt. Der detektierte Teil des Heterodimers hat ungefähr die gleiche Größe (110 kD) wie Notch2IC (ca. 90 kD) und lief deshalb unter den hier verwendeten Bedingungen auf gleicher Höhe im Western-Blot. Nach 8h konnten transgenes Notch2IC und endogenes Notch2 nur schwach nachgewiesen werden.

Zur Überprüfung der Funktionalität der Klone wurde in NGFR-aufgereinigten Zellen die Regulation der bekannten Zielgene CD21 und I μ auf RNA- und Proteinebene untersucht. Mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) konnte gezeigt werden, dass Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 fähig sind, die Expression von CD21 zu induzieren und die von I μ zu reprimieren (Abb. 3.3). Nach 4h bzw. 8h konnte noch 80 % und nach 24h noch 20 %-60 % (abhängig vom Transgen) der ursprünglichen I μ RNA-Menge detektiert werden. Während CD21 durch Notch1IC und EBNA2 bereits nach 4h bzw. 8h vier- bis sechsfach induziert wurde, konnte in Notch2IC-exprimierenden Zellen erst nach 24h eine signifikante Steigerung der CD21-Expression nachgewiesen werden. In CAT-exprimierenden Linien wurde weder die

CD21- noch die Ig μ -Expression deutlich beeinflusst. Zusätzlich wurde durch FACS-Analysen die Oberflächenexpression von CD21 und IgM untersucht (Abb. 3.4). Auch hier zeigte sich drei Tage nach Doxycyclin Zugabe eine Hochregulierung von CD21 und eine Herabregulierung von IgM in Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-exprimierenden Linien, während die Expression der Oberflächenmarker in der Negativkontrolle EREB/CAT nahezu unbeeinflusst war.

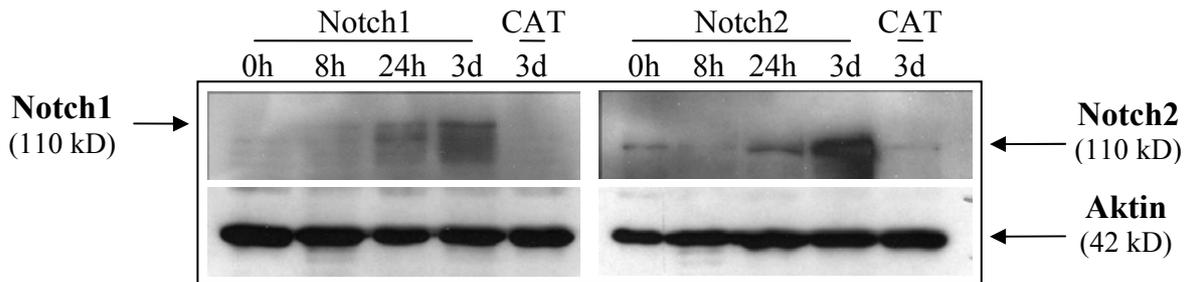


Abb. 3.2 Nachweis der Expression des transgenen Notch1IC und Notch2IC

Mithilfe der Western-Blot-Technik wurde die Expression der Transgene Notch1IC und Notch2IC in stabil transfizierten Zellen nachgewiesen. Den Zellen wurde für 3d Östrogen entzogen und anschließend wurde für 8h oder 24h die Expression von Notch1IC bzw. Notch2IC durch Doxycyclin induziert. Für den 3d-Wert wurde den Zellen Östrogen entzogen und am gleichen Tag für 3d Doxycyclin zugegeben. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und Proteinextrakte wurden isoliert. N1 (Notch1IC), N2 (Notch2IC), CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase).

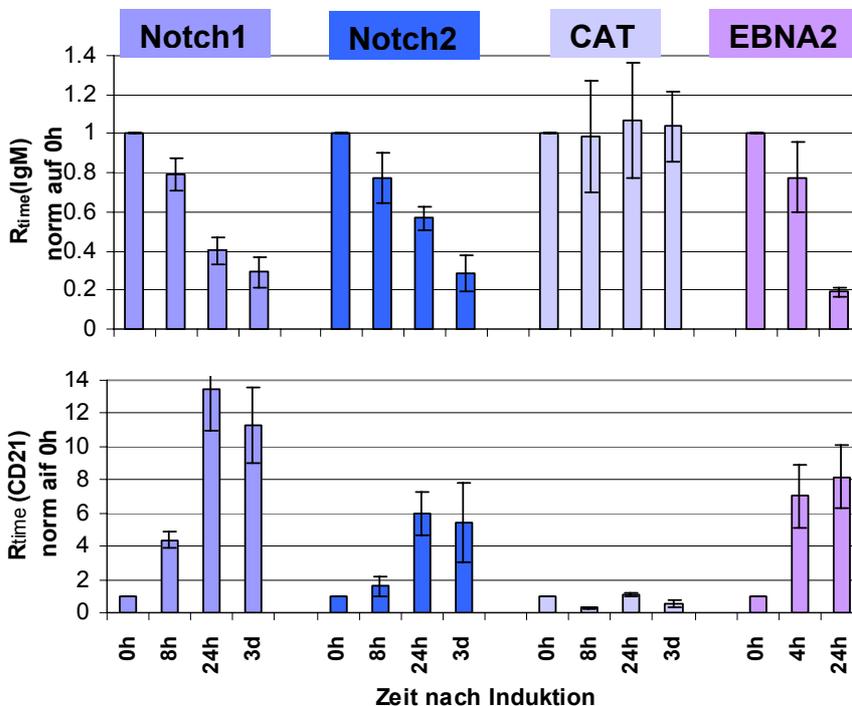


Abb. 3.3 NotchIC und EBNA2 sind funktionell in EREB2-5 Zellen

Der Effekt von aktiviertem Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 in EREB2-5 Zellen auf die transkriptionelle Regulation von Ig μ und CD21 wurde mithilfe der qRT-PCR untersucht. Den Zellen wurde für 3d Östrogen entzogen. Anschließend wurde die Expression von NotchIC und CAT durch Doxycyclin und die Aktivierung von EBNA2 durch Östrogen induziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und RNA isoliert. Die mRNA-Level von Ig μ und CD21 wurden auf die mRNA-Level des ribosomalen Proteins L23a standardisiert und anschließend auf den Induktionszeitpunkt (0h) normalisiert, um die relative Expressions-Ratio (R_{time}) zu ermitteln. CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase).

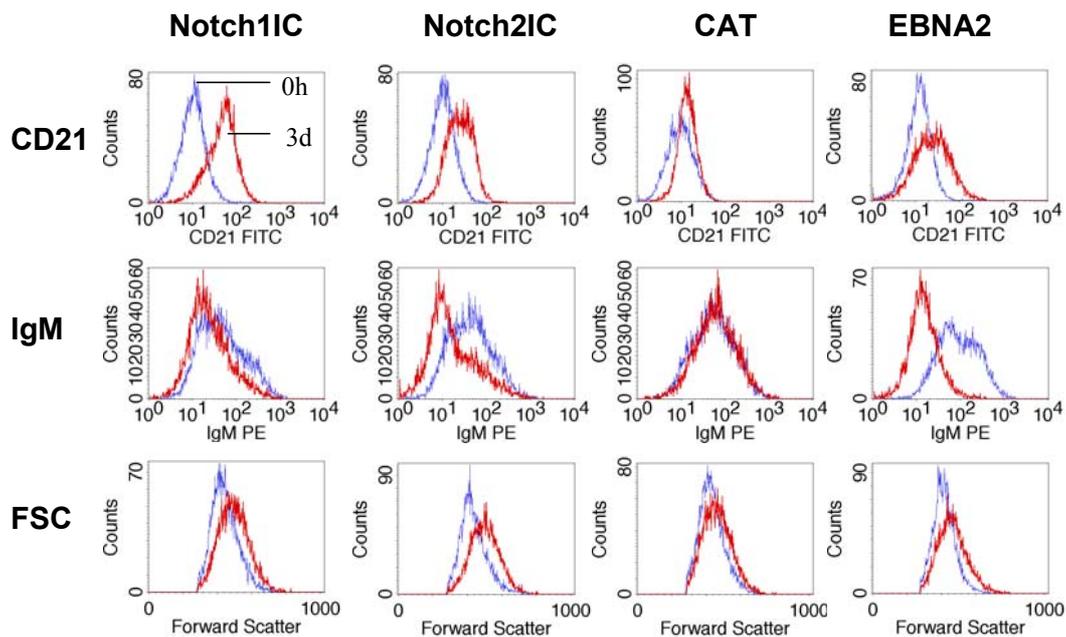


Abb. 3.4 Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 können die Oberflächenexpression von CD21 und IgM modulieren

Der Effekt von aktiviertem Notch1IC und Notch2IC und EBNA2 in EREB2-5 Zellen auf die Oberflächenexpression von IgM und CD21 wurde mithilfe der FACS-Analyse analysiert. Den Zellen wurde Östrogen entzogen und am gleichen Tag wurde die Expression von Notch1IC und CAT durch Zugabe von Doxycyclin und die Aktivierung von EBNA2 durch Zugabe von Östrogen für 3d induziert. Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 konnten die Oberflächen-Expression von CD21 induzieren und die von IgM reprimieren. Die Zellen wurden durch die Expression der Transgene etwas größer. (FSC, forward scatter), CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase).

3.2 Identifizierung von Notch- und EBNA2-Zielgenen mittels Affymetrix Microarray Analyse

Um den Einfluss von Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 auf die Regulierung einer großen Anzahl von Genen zu untersuchen, wurde in Kooperation mit Ulrich Weidle (Roche Diagnostics, Penzberg) eine Affymetrix Microarray Analyse durchgeführt. Die verwendeten Chips (HGU133 Plus 2.0) boten die Möglichkeit, die Expression von 39.500 verschiedenen Gen-Proben gleichzeitig zu untersuchen.

3.2.1 Erstellung einer Expressionskinetik von Notch1IC, Notch2IC, CAT und EBNA2

In EREB2-5 Zellen wurde durch Entzug von Östrogen die EBNA2-Funktion und somit das gesamte EBV-Programm abgeschaltet. Um frühe und späte Zielgene von Notch1IC und Notch2IC zu identifizieren, wurde deren Expression drei Tage nach einem Östrogen-Entzug

durch die Zugabe von Doxycyclin induziert. Die Zellen wurden 0h, 8h und 24h nach Induktion geerntet. Um Langzeiteffekte von Notch-Signalen auf das Genexpressionsmuster einer B-Zelle zu untersuchen, wurden die Zellen drei Tage nach Zugabe von Doxycyclin geerntet. Da die Viabilität von EREB2-5 Zellen in Abwesenheit von Östrogen nach drei Tagen stark abnimmt, wurde bei diesem Langzeitversuch bereits am Tag des Östrogen-Entzugs die Expression von Notch1IC und Notch2IC durch Doxycyclin-Zugabe induziert. Die Kontroll-Zelllinie EREB/CAT wurde für alle Zeitpunkte entsprechend der Notch1IC- und Notch2IC-Zelllinien behandelt. Die induzierten Zellen wurden über die Expression des NGFR gereinigt. In allen drei Kinetiken konnte eine Reinheit von mindestens 89 % bis 99,6 % erzielt werden (Abb. 3.5). Aus den aufgereinigten Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert, und diese in cDNA umgeschrieben.

Zur Untersuchung EBNA2-induzierter Gene, wurde in der Kontroll-Zelllinie CAT die EBNA2-Funktion drei Tage nach Entzug von Östrogen durch Wiedergabe von Östrogen, rekonstituiert. Die Zellen wurden 0h, 4h und 24h nach Zugabe von Östrogen geerntet. Da das EBNA2-Protein im Gegensatz zu den Doxycyclin-regulierten Proteinen nicht neu synthetisiert werden muß, sondern nur aufgrund der fusionierten Östrogen-Bindedomäne in Abwesenheit von Östrogen inaktiv ist, erfolgt die Aktivierung der EBNA2-Funktion schneller als die von NotchIC. Deshalb wurden frühe Effekte 4h nach Aktivierung von EBNA2 und 8h nach Induktion der NotchIC-Expression analysiert. Die Zellen der EBNA2-Kinetik wurden ohne weitere Aufreinigung geerntet, Gesamt-RNA isoliert und die enthaltene mRNA in cDNA umgeschrieben.

Das komplette Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Bevor die isolierte RNA zur Durchführung der Affymetrix Microarray Analyse verwendet wurde, wurde mittels qRT-PCR und FACS-Analyse die Regulierung der bekannten Zielgene CD21 und I μ kontrolliert. In allen drei Kinetiken waren die Zielgene wie erwartet reguliert (Abb. 3.3) und die Proben wurden für die Microarray Analyse verwendet.

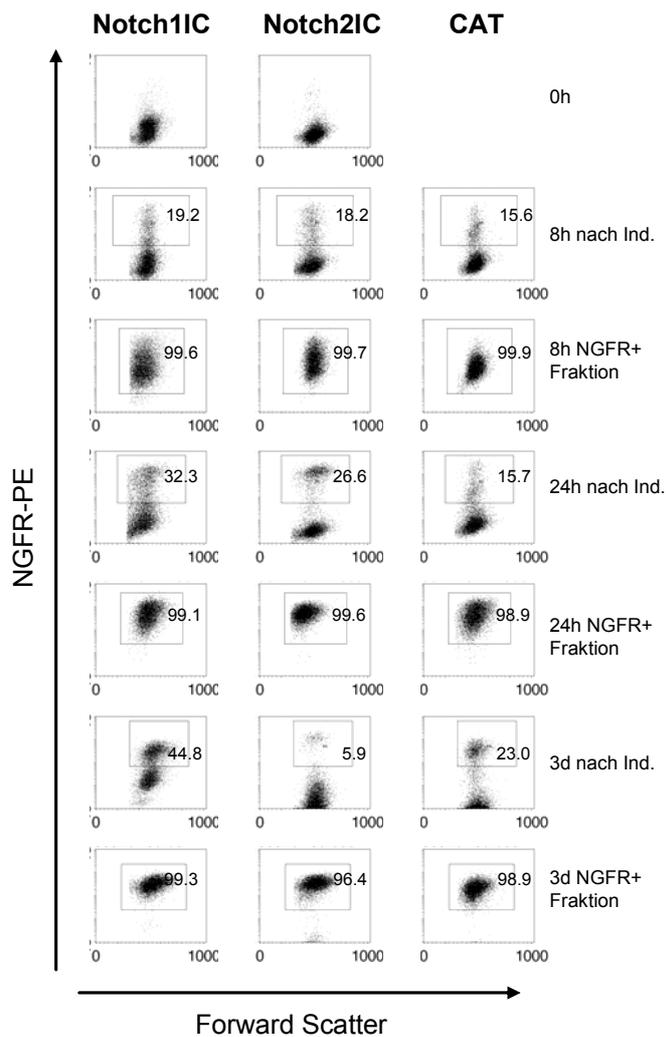


Abb. 3.5 Die Aufreinigung NGFR-exprimierender EREB2-5 Zellen

Die Expression von Notch1IC und CAT in EREB2-5 Zellen wurde nach einem dreitägigen Entzug von Östrogen durch Zugabe von Doxycyclin induziert. Abweichend davon wurde den Zellen für den 3d-Wert am Tag des Östrogen-Entzugs Doxycyclin für 3d zugegeben. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mithilfe der MACS-Technik (Magnetic Associated Cell Sorting) über die Expression des Δ NGFR aufgereinigt. Die Abbildung zeigt den Anteil NGFR-exprimierender Zellen in % vor und zu bestimmten Zeitpunkten nach der Induktion (Ind.) durch Doxycyclin und nach der Anreicherung durch MACS. Für CAT 0h lagen in dieser Kinetik keine FACS-Daten vor.

3.2.2 Durchführung der Affymetrix Microarray Analyse

Alle cDNAs, die in den drei unabhängig voneinander durchgeführten Kinetiken gewonnen wurden, wurden *in vitro* in biotinylierte cRNA umgeschrieben, fragmentiert und auf einen Chip hybridisiert. Spezifisch gebundene cRNA konnte mittels Streptavidin-Phycoerythrin-Bindung im Scanner detektiert werden.

Zur Analyse von Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-Zielgenen in humanen B-Zellen wurde der Oligonukleotid Chip HGU133 Plus 2.0 der Firma Affymetrix verwendet. Dieser Chip repräsentiert nach Herstellerangaben ca. 39.500 Gene, obwohl die Anzahl der Gene im gesamten menschlichen Genom zurzeit auf ca. 30.000 Gene geschätzt wird. Die Gene auf dem Chip werden durch 55.000 Proben-Sets dargestellt. Ein Proben-Set besteht aus 11 bis 16 Proben bzw. Probenzellen, die je 10^7 Kopien eines 25mer Oligonukleotids tragen, das homolog zum 3'-Bereich der mRNA-Referenzsequenz des betreffenden Gens ist. Passend zu diesen „Perfect Match“-Probenzellen (PM) gibt es „Mismatch“-Probenzellen (MM), die

gleich aufgebaut sind, aber in deren Oligonukleotid-Sequenz sich in der Mitte des 25mer eine nicht passende („Mismatch“) Base befindet. Dies dient der Bestimmung unspezifischer Hybridisierungen innerhalb eines Proben-Sets. Aufgrund der Signalintensitäten der PM- und MM-Probenzellen jedes Probenpaares wird bestimmt, ob ein Transkript als „present“ gewertet wird, d.h. ob das Signal spezifisch ist, und somit das Gen als exprimiert gewertet werden kann. Die Differenz zwischen PM und MM wird als Basis für die Höhe des Expressionslevels verwendet. Der sogenannte „Signal“-Wert ist dann das gewichtete Mittel dieser Differenzen. Ein Gen gilt dann als reguliert oder differentiell exprimiert, wenn sich die „Signal“-Werte für dieses Gen zwischen Kontroll-Chip (z.B. Notch1IC 0h) und Experiment-Chip (z.B. Notch1IC 24h) unterscheiden.

3.2.3 Auswertung der Affymetrix Microarray Analyse

Für die Auswertung der Microarray Daten wurde die Affymetrix Software „Microarray Suite 5.0“ (MAS5.0) verwendet. Für diese paarweise Vergleichsanalyse wurden folgende Kriterien angewandt: Ein induziertes Gen musste auf jedem Experiment-Chip als „present“ gewertet werden, wobei es auf dem Kontroll-Chip „present“ oder „absent“ sein konnte. Zusätzlich musste es in allen Vergleichsanalysen einen „Increase Call“ haben. Ein reprimiertes Gen musste auf allen Kontroll-Chips „present“ gewertet werden und konnte auf den Experiment-Chips „present“ oder „absent“ sein. Zusätzlich musste es in allen Vergleichsanalysen einen „Decrease Call“ haben.

Zur Bestimmung der differentiell exprimierten Gene, wurden jeweils die „Signal“-Werte der Experiment-Chips mit den dazugehörigen Kontroll-Chips verglichen. Es wurden also z.B. die „Signal“-Werte der Notch1IC-Chips für 8h, 24h und 3d jeweils mit den „Signal“-Werten der 0h Notch1IC-Chips innerhalb einer Kinetik verglichen. Anschließend wurde unter Verwendung aller drei Kinetiken ein Mittelwert der „Signal“-Wert-Unterschiede (Ratio) berechnet. Gene, deren „Signal“-Werte vom 0h-Wert abwichen, wurden als differentiell exprimiert gewertet. Zusätzlich wurde mithilfe der MAS5.0-generierten Daten, ohne Einschränkung auf die Stärke der Regulation, eine Excel-Tabelle erstellt, die die Mittelwerte der Expression und die Regulation aller Proben-Sets des gesamten Experiments anzeigt. Diese Tabelle wurde in der weiteren unten beschriebenen Auswertung dazu verwendet, gezielt die Regulation einzelner Gene zu betrachten.

Für die weitere strukturierte Analyse bzgl. Zielgen-Zahlen, „Clustering“ und der Zuordnung zu funktionellen Gruppen, sowie dem Vergleich von Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-

Zielgenen wurden die Rohdaten mittels der Programme dChip und SAM (Significance Analysis of Microarrays) erneut ausgewertet. Alle in dieser Arbeit gezeigten Microarray-Daten wurden mit diesen Programmen generiert, wenn nicht auf andere Programme hingewiesen wird.

Um Unterschiede in der Signalstärke, die aus Probenmarkierung, Hybridisierungseffekten und anderen Faktoren resultieren zu korrigieren, wurde vor der Auswertung der Chips eine Normalisierung durchgeführt. Diese Normalisierung erfolgte nach der GC-RMA Methode (siehe 6.2.3.8) aufgrund verschiedener GC-Gehalte der 25mere, wobei insgesamt ca. 10.000 Probenzellen verwendet wurden. Diese Normalisierung bot auch eine Qualitätskontrolle der Chips, da die Verteilung der Helligkeit, d.h. der Genexpressionsstärke um eine bestimmte Mittellinie betrachtet werden konnte (Abb. 3.6). Der Hauptteil der Signale sollte dabei innerhalb des 95. Perzentils liegen. Dies war für alle, bis auf einen Chip (Notch1IC 3d a) der Fall. Dieser Chip wurde dennoch für die weitere Berechnung verwendet, um nicht einen kompletten Datensatz des 3d-Triplikats zu verlieren und somit die Aussagekraft des Experiments bezüglich der Notch1IC-Zielgene nach 3d zu mindern. Durch die Einbeziehung dieses Chips ergaben sich so aber möglicherweise weniger Gene als differentiell exprimiert, da durch die Streuung einige Gene als nicht glaubhaft signifikant differentiell exprimiert identifiziert wurden.

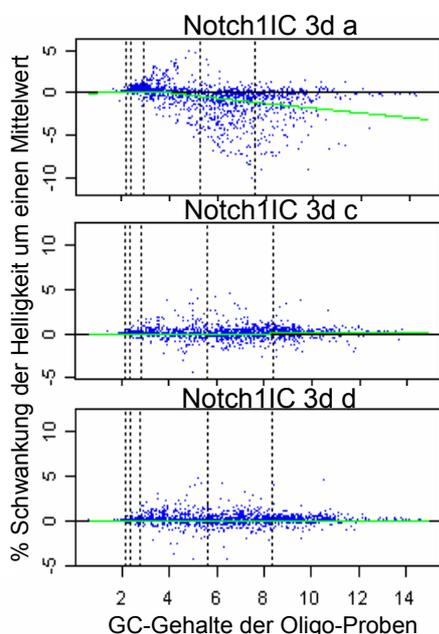


Abb. 3.6 Die GC-RMA Analyse gibt Aufschluss über die Qualität der Chips und kann zur Normalisierung herangezogen werden

Mithilfe der GC-RMA Analyse werden 10.000 Proben mit verschiedenen GC-Gehalten, auf ihre Expressionsstärke hin untersucht. Die Helligkeit dieses Signals sollte um eine Mittellinie schwanken und innerhalb des 95. Perzentils liegen. Weichen die Werte davon ab, wie in Chip Notch1IC 3d a, so kann dies als Hinweis für eine schlechte Hybridisierung gewertet werden. Anhand der Expressionswerte der 10.000 GC-RMA Proben kann auch eine Normalisierung durchgeführt werden, da diese bei erfolgreicher Hybridisierung meist sehr wenig streuen. Auf der X-Achse sind die verschiedenen GC-Gehalte der Proben aufgetragen. Die Y-Achse repräsentiert die prozentualen Schwankungen der Helligkeiten der Signale um einen Mittelachse.

Für die Detektion differentiell exprimierter Gene auf den verschiedenen Chips wurde die permutations-basierte Methode „SAM“ (Significance Analysis of Microarray) nach Tusher (Tusher et al. 2001) angewandt. Hierbei wird die relative Differenz der Expression

von Genen zu verschiedenen Zeitpunkten unter Berücksichtigung der Variabilität in den durchgeführten Replikaten berechnet. Der Datensatz wird dann mehrfach permutiert und die relativen Differenzen auf Basis der permutierten Daten neu kalkuliert. Die Werte aus originalen und permutierten Daten stimmen für die meisten Gene überein. Gene, bei denen sich die Werte um mehr als einen bestimmten Grenzwert unterscheiden, werden als differentiell exprimiert definiert. Basierend auf der Anzahl der Gene, die bei einem bestimmten Grenzwert definiert wurde, wird eine Fehlerquote (False Discovery Rate, FDR) errechnet. Des Weiteren werden nur Gene betrachtet, deren FDR kleiner als 0,01 ist, d.h. nur Gene, die mit einer Wahrscheinlichkeit > 99 % tatsächlich reguliert sind.

In die Bestimmung der Anzahl der Zielgene wurden nur solche einbezogen, die mindestens 1,5-fach reguliert waren (Abb. 3.7). Die Grenze wurde deshalb bei 1,5 gesetzt, da biologische Prozesse oftmals schon durch geringe Expressionsunterschiede beeinflusst werden. Es wurde unterschieden in früh regulierte Gene (nach 8h), in spät regulierte Gene (nach 24h) und in Gene, die unter ständiger Notch-Expression reguliert wurden (3d). Für EBNA2 wurde nur zwischen frühen (4h) und späten (24h) Zielgenen unterschieden. Da ein Gen durch ein oder mehrere Proben-Sets repräsentiert werden kann, wird im Folgenden jeweils die Anzahl der regulierten Proben-Sets beziffert.

Durch Notch1IC wurden insgesamt 630 Proben-Sets mindestens 1,5-fach reguliert. Von diesen wurden 270 induziert und 374 reprimiert. 14 dieser Proben-Sets wurden über diese gesamte Kinetik sowohl hoch- als auch herabreguliert. Unter den 270 induzierten Proben-Sets befanden sich 78 frühe, 157 späte Proben-Sets sowie 35 Proben-Sets, die nur unter ständigem Einfluss von Notch1IC induziert wurden. Die 374 herabregulierten Proben-Sets teilten sich auf in 228 frühe, 97 späte und 49 Proben-Sets, die nur unter ständiger Notch1IC-Expression herunterreguliert wurden. Die Expression von Notch2IC führte zur Regulation von insgesamt 1768 Proben-Sets, von denen 757 positiv und 959 negativ reguliert wurden, darin eingeschlossen 45 Gene, die innerhalb der Kinetik induziert und reprimiert wurden. Die 757 positiv regulierten Proben-Sets teilten sich in 227 frühe, 165 späte und 365 unter ständiger Notch2-Expression regulierte Proben-Sets auf. Es wurden 566 frühe, 139 späte und 254 Proben-Sets unter ständiger Notch2 Expression negativ reguliert. Die EBNA2 Expression führte zur Regulation von insgesamt 12.199 Proben-Sets, von denen 6.250 positiv und 6.811 negativ reguliert waren. Eingeschlossen sind hier auch 862 Gene, die erst reprimiert und dann induziert, bzw. erst induziert und anschließend reprimiert wurden. Diese tragen in der Auswertung der Zielgenzahlen sowohl zur Anzahl der reprimierten als auch induzierten Proben-Sets bei. 3.400 Proben-Sets wurden bereits nach 4h durch EBNA2

hochreguliert, 2.850 nach 24h. Die Aktivierung von EBNA2 führte nach 4h zur Herabregulierung von 5.449 weiteren und nach 24h zur Herabregulierung von 1.362 Proben-Sets. Insgesamt werden mehr Gene durch Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 reprimiert als induziert. Für die Kontrolle CAT ergaben sich nur 17 differentiell exprimierte Proben-Sets, von denen wiederum nur acht mindestens 1,5-fach reguliert waren. Bei einer Gesamtzahl von ca. 55.000 untersuchten Proben-Sets wurden diese Gene als vernachlässigbar für die weitere Auswertung betrachtet.

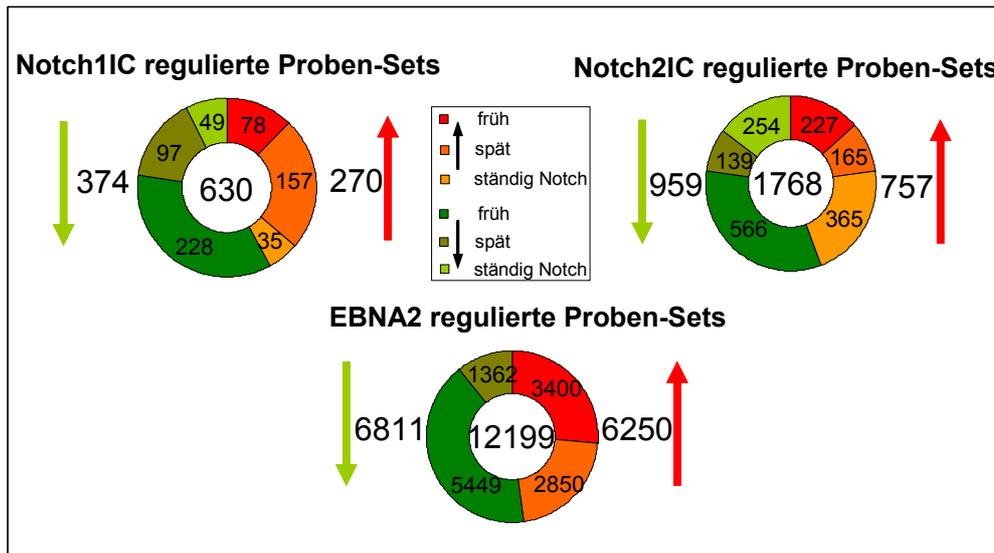


Abb. 3.7 Vergleich der Anzahl Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-regulierter Proben-Sets

Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 regulieren eine unterschiedliche Anzahl an Proben-Sets. Die Zahlen berechnen sich anhand von Proben-Sets, die mindestens 1,5-fach reguliert werden. Die Zielzahlen beziehen sich auf die Gesamtheit der regulierten Proben-Sets, dargestellt in der Mitte des jeweiligen Diagramms, sowie die Aufteilung in reprimierte und induzierte Proben-Sets, dargestellt rechts und links des jeweiligen Diagramms und schließlich aufgeschlüsselt die Anzahl der regulierten Proben Sets zu allen Zeitpunkten der Kinetik.

Um zu untersuchen, welche Gengruppen in den verschiedenen Expressionsmustern vertreten sind, wurde eine Cluster-Analyse nach Eisen (Eisen et al. 1998) mit den Programmen „Cluster“, „TreeView“ und „dCHIP“ durchgeführt. Die Programme „Cluster“ und „TreeView“ dienen der Erstellung von Clustern und der graphischen Darstellung und „dChip“ der Zuordnung zu funktionellen Gengruppen. In einer Cluster-Analyse werden die Expressionsprofile von Genen bei bestimmten Bedingungen, hier verschiedenen Zeitpunkten und Zellen ermittelt. Es wurden also z.B. für Notch1 die Gen-Expressionsprofile für 0h, 8h, 24h und 3d miteinander verglichen und graphisch dargestellt. Ebenso konnten auch zwei verschiedene Zelllinien mit allen Zeitpunkten der Kinetik miteinander verglichen werden. Die Darstellung der Gen-Expressionsprofile von Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 in einer Graphik dagegen gelang nicht, da die Datenmenge zu groß war. Gene mit ähnlichen Expressionsmustern werden zusammen in „Cluster“ gruppiert und in einem „Clusterbaum“

graphisch dargestellt. Die Expressionswerte der einzelnen Gene werden standardisiert, um Gene aufgrund ihrer Veränderung in der Expression, unabhängig von der absoluten Höhe der Expression, vergleichen zu können. Bei der Standardisierung wird zunächst für jedes Proben-Set der Mittelwert der Expressionswerte aller Bedingungen berechnet, hier 0h, 8h, 24h und 3d nach Induktion. Anschließend wird der Mittelwert von dem Expressionswert jeder Bedingung subtrahiert und das Ergebnis durch die Standardabweichung dividiert. Diese Berechnung wird als Zentralisierung bezeichnet. Die standardisierten Werte liegen dann in einem Bereich von -2 bis +2, der durch eine Farbskala repräsentiert wird. Die Skala reicht von hellgrün (-2) über schwarz (0) bis rot (+2). Diese Werte machen jedoch keine Aussage über die tatsächliche Stärke der Regulation und sind nicht mit den Ratios der regulierten Gene, wie oben beschrieben, zu verwechseln.

Eisen et al. (1998) beschreiben eine Korrelation zwischen der Gruppierung von Genen in einem Cluster und einer ähnlichen Funktion. Für die Cluster-Analyse wurde nicht nur in frühe und späte Zielgene unterschieden, sondern es wurden auch Expressionsmuster betrachtet, in denen Gene z.B. nach 8h hochreguliert, nach 24h wieder herab- und nach 3d wieder hochreguliert wurden („U-shape“). Einbezogen in diese Cluster-Analyse wurden alle Gene, die als differentiell exprimiert bezeichnet wurden. An dieser Stelle wurde absichtlich keine Selektion auf eine mindestens 1,5-fache Regulierung eingebracht, da das gesamte Expressionsmuster beschrieben werden sollte. Durch eine nachfolgende „Gene Ontology“-Analyse konnte ermittelt werden, welche funktionellen Gengruppen in den einzelnen Clustern vertreten waren. Das Programm „Gene Ontology“ ordnet jedem annotierten Proben-Set eine Funktion zu. Zusätzlich können die annotierten Proben-Sets Prozessen (z.B. Signaltransduktionswegen) und Komponenten (z.B. Lokalisierung in der Zelle) zugeordnet werden. Da die „Gene Ontology-Terms“ nicht hierarchisch aufgebaut sind, können einem Proben-Set auch mehrere Funktionen, Prozesse und Komponenten zugeordnet werden.

3.2.4 Notch1IC-regulierte Gene in der Cluster-Analyse

Die identifizierten Notch1IC-regulierten Gene ließen sich in acht Clustern verschiedener Größe darstellen, deren unterschiedliches Expressionsprofil sie charakterisiert (Abb. 3.8). Cluster 1 ist durch 320 Gene gekennzeichnet, die nach 8h oder 24h reprimiert werden und nach 3d weiterhin reprimiert sind. In Cluster 2 finden sich 45 Gene, die erst nach 3d herabreguliert werden. Das kleine Cluster 3 beinhaltet sieben Gene, die nach 8h induziert werden, auch nach 24h hoch sind und nach 3d wieder reprimiert sind. Cluster 4 ist durch 102 Gene gekennzeichnet, die nach 24h induziert werden und auch nach 3d hoch sind. Cluster 5

enthält 44 Gene und ist Cluster 4 recht ähnlich, jedoch findet sich die stärkste Expression erst nach 3d. Cluster 6 beherbergt elf Gene, die ihre maximale Expression nach 24h haben, deren Expressionswerte aber nach 8h und 3d auch schon über dem Niveau von 0h liegen. In Cluster 7 dagegen sind die 44 Zielgene nur nach 24h induziert und in Cluster 8 mit 62 Genen nur nach 3d. Eine Zusammenstellung der verschiedenen Expressionsprofile und aller dazugehörigen Funktionen und Komponenten ist in Tab. A1 im Anhang dargestellt. Einbezogen wurden nur Funktionen, denen mindestens zwei Gene zugeordnet wurden. Die Zahlen geben die Signifikanz an, mit der eine Funktion dem Expressionsprofil zugeordnet wurde. Die Signifikanz wird über einem statistisch ermittelten p-Wert beschrieben, der die Wahrscheinlichkeit angibt, dass die gewonnenen Daten rein zufällig entstanden sein könnten. Je kleiner also der p-Wert, desto größer die Wahrscheinlichkeit, dass diese Daten nicht zufällig entstanden sind. Es wurden nur Genfunktionen zugelassen, denen ein p-Wert $< 0,01$ zugeordnet werden konnte, d.h. Genfunktionen, bei denen die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Zuordnung $< 1\%$ ist. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden den p-Werten ganze Zahlen zugeordnet. Einem p-Wert von $< 0,01$ wurde die Zahl 3, einem p-Wert von $< 0,001$ die Zahl 4, usw. zugeordnet. Je höher also die zugeordnete Zahl ist, desto größer die Signifikanz.

In Cluster 1 und 2, die reprimierte Gene repräsentieren, finden sich hauptsächlich Gene, denen Funktionen wie Antigen-Präsentation und -Prozessierung, Immunantwort und -abwehr, Antwort auf biotische oder externe Stimuli, Phosphorylierung und Phosphatmetabolismus, sowie Proteinkinaseaktivität und Protein-Aminosäure-Phosphorylierung zugeordnet werden. Dies gibt den starken Hinweis, dass Notch1IC fähig ist, Gene zu reprimieren, die die Immunantwort positiv beeinflussen und Notch1IC so die Immunantwort negativ reguliert.

Cluster 3-8 beinhalten Gene, deren Expression durch Notch1IC positiv beeinflusst wird. Genen in Cluster 3, die nur nach 8h und 24h hochreguliert waren, wurden aufgrund der „Gene Ontology“-Klassifizierung Funktionen bezüglich Protein-Tyrosin-Kinase Aktivität, Rezeptor-Signal Aktivität und Signal-Transduktions Aktivität zugeordnet. Cluster 4 und 5 beinhalten Gene, die nach 24h und 3d hochreguliert sind und mit Zellzyklus-Kontrolle, Zellteilung, Zytoplasma-Organisation und Biogenese, DNA-Replikation und -Metabolismus, Helikase-Aktivität, Makromolekül-, RNA- und Nukleotid-Metabolismus und Ribosomenbiogenese assoziiert sind. Den in Cluster 6 und 7 repräsentierten Genen, die nach 24h am stärksten reguliert werden, werden Funktionen wie Chemokin-Aktivität und -Rezeptorbindung, Immunantwort, Sterol-Biosynthese und Schwefel-Metabolismus

zugeordnet. In Cluster 8 sind Gene zusammengefasst, die erst unter ständiger Expression von Notch1IC induziert werden. Diesen Genen werden Funktionen wie die Regulation des Zellzyklus und der Zellteilung, der Chromosomen-Segregation, des Glyoxylat- und Dicarboxylat-Metabolismus, der M-Phase, des Microtubulin-Zytoskeletts und der Spindel zugeordnet. Insgesamt betrachtet zeigen Notch1IC-induzierte Gene hauptsächlich eine Assoziation mit der Regulation des Zellzyklus.

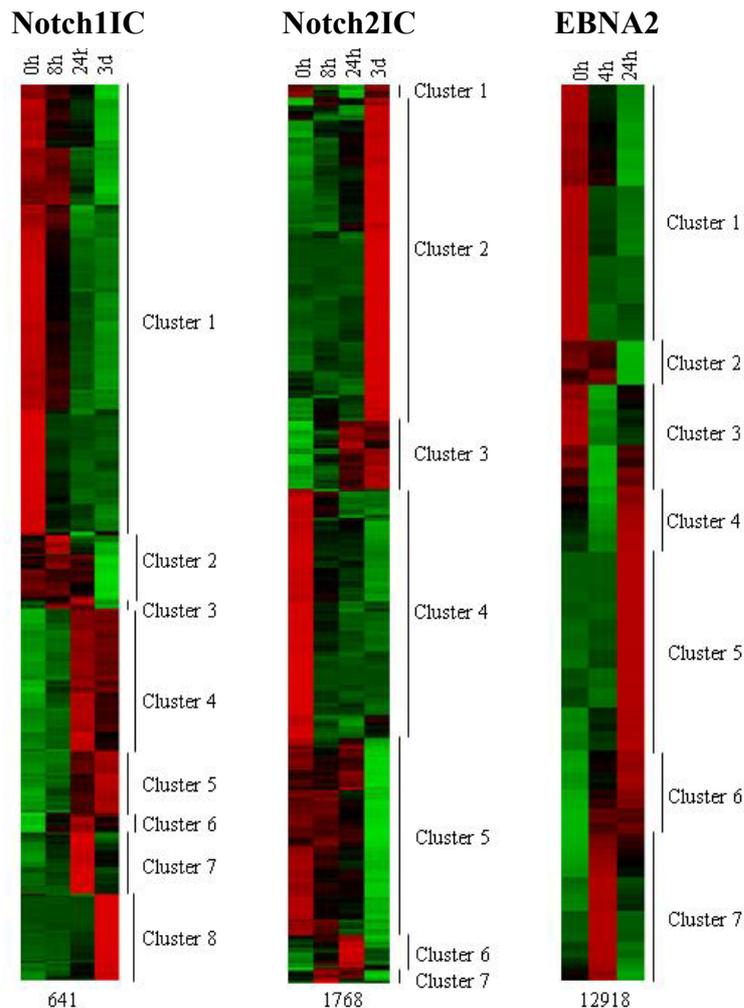


Abb. 3.8 Darstellung Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-differenziell exprimierter Gene im Clusterbaum

Mithilfe der Programme „Cluster“ und „TreeView“ wurden differenziell exprimierte Gene Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-exprimierender EREB2-5 Zellen graphisch dargestellt. Die Abbildung zeigt die Cluster, die den differenziell exprimierten Genen zugeteilt werden konnten. Welche funktionellen Gruppen in diesen Clustern hauptsächlich vertreten sind, ist im Text erläutert. Zu beachten ist, dass die Anzahl der Proben-Sets, die unter den Clusterdiagrammen verzeichnet ist, sich auf differenziell exprimierte Gene bezieht und nicht wie in Abb. 3.7 auf mindestens 1,5-fach regulierte Gene. Grün (schwache Expression), Rot (starke Expression).

3.2.5 Notch2IC-regulierte Gene in der Cluster-Analyse

Analog zur Cluster-Analyse für Notch1IC wurde ein Clusterbaum für Notch2IC erstellt (Abb. 3.8). Die 1768 differenziell exprimierten Proben-Sets konnten in sieben Clustern dargestellt werden. Eine Zusammenstellung der Cluster und aller dazugehörigen Funktionen und Komponenten ist in Tab. A2 im Anhang dargestellt.

Cluster 1 repräsentiert 26 Gene, die nach 8h und 24h herabreguliert werden, unter ständiger Notch-Expression aber hochreguliert sind. Diesem Cluster wurden Funktionen bzgl. Biopolymer-Metabolismus, Gluthation- und Lipid-Metabolismus und Proteinmodifikation

zugeordnet. In Cluster 2 sind 636 Gene zusammengefasst, die fast ausschließlich unter ständiger Notch2IC-Expression positiv reguliert werden. Diese Gene sind mit Zellzyklus, Helicase-Aktivität, M-Phase, Kerntransport, Nukleotid-Bindung und Protein-Aminosäure-Dephosphorylierung assoziiert. Im dritten Cluster werden 133 Gene zusammengefasst, die nach 24h hochreguliert werden und dies auch nach 3d bleiben. Diesen Genen werden Funktionen wie Biopolymer-Metabolismus, Zellzyklus-Kontrolle, Zytoplasma-Organisation und Biogenese, sowie DNA-Metabolismus, -Replikation und -Reparatur zugeordnet. Cluster 4 fasst 485 Gene zusammen, die nach 8h bis 24h herabreguliert werden und bis auf eine kleine Untergruppe auch unter ständiger Notch-Expression unten sind. Diesen Genen werden folgende Funktionen zugeordnet: Calcium-Ionen-Bindung, Zell-Zell-Kommunikation, Zytokin-Bindung, Immunantwort, Kinase-Aktivität und Signal-Transduktion. 388 Gene, die nur reprimiert werden, wenn Notch2 ständig exprimiert wird, sind in Cluster 5 zusammengefasst. Ihnen werden Funktionen wie Antigen-Präsentation, Immun-Antwort, Rezeptor-Aktivität und Antwort gegen andere Organismen zugeordnet. Gene in Cluster 6 sind fast ausschließlich nur nach 24h hochreguliert. Dieses Cluster umfasst 69 Gene, denen Funktionen wie Acetyl-CoA- und Alkohol-Metabolismus, Cholesteroll-Metabolismus, Elektronen-Transport, Oxidoreduktase-Aktivität und Steroid-Biosynthese zugeordnet werden. Cluster 7 umfasst 25 Gene, die nur nach 8h und oder 24h hochreguliert sind, nicht aber unter ständiger Notch-Expression. Die zugeordneten Funktionen umfassen Zellzyklus-Arrest, DNA-Rekombination und Steroid-Hormon-Rezeptor-Signalweg.

Insgesamt zeigen, ähnlich wie bei Notch1IC, auch Notch2IC-regulierte Gene eine Assoziation mit der negativen Immunmodulation und mit einer positiven Beeinflussung des Zellzyklus. Funktionelle Gruppen, die mit den höchsten Signifikanzen von 8-9 den Genen zugeordnet werden konnten, waren „Immunantwort“, „DNA-Reparatur“, „-Replikation“ und „-Metabolismus“.

3.2.6 EBNA2-regulierte Gene in der Cluster-Analyse

Die Identifizierung von EBNA2-regulierten Genen sollte vorrangig dazu dienen, identifizierte NotchIC-regulierte Gene mit diesen zu vergleichen. Aus diesem Grund wurden EBNA2-regulierte Gene nicht so detailliert ausgewertet wie die NotchIC-regulierten Gene. Zudem ist die Identifizierung von EBNA2-regulierten Genen in diesem Zellsystem schwierig, da schon früh c-MYC induziert wird und später die Zellen in die Proliferationsphase übergehen.

Die Cluster-Analyse für EBNA2-regulierte Gene bezieht 12.918 differentiell exprimierte Proben-Sets ein (Abb. 3.8). Diese konnten in sieben Clustern unterschiedlicher

Größe dargestellt werden. Cluster 1 fasst 3.687 Proben-Sets zusammen, die innerhalb von 4h und 24h herabreguliert werden. Diesen Genen wurden mittels „Gene Ontology“ unter anderem Funktionen wie Hydrolase-Aktivität, Immunantwort, GTPase regulatorische Aktivität, Regulation der NFκB- und der MAPK-Kaskade, sowie Biopolymer-Modifikation zugeordnet. Das zweite Cluster umfasst 634 Proben-Sets, die erst nach 24h herabreguliert werden. Diesen Genen konnten Funktionen wie Immunantwort, Antigen-Prozessierung und -Präsentation zugeordnet werden. In Cluster 3 wurden 1.467 Proben-Sets zusammengefasst, von denen die meisten nach 4h stark herabreguliert und nach 24h wieder leicht hochreguliert werden. Diese Gene sind mit Nukleinsäure-Bindung und -Metabolismus, katalytischer Aktivität und Biopolymer-Modifikation assoziiert. Cluster 4 ist Cluster 3 recht ähnlich, allerdings werden hier die 943 differentiell exprimierten Proben-Sets von 0h auf 4h weniger stark herabreguliert, dafür aber von 4h auf 24h stärker hochreguliert. Diese Gene assoziieren mit katalytischer Aktivität, NADH Dehydrogenase-Aktivität, DNA-Metabolismus, -Replikation und -Reparatur, sowie Makromolekül-Metabolismus. Cluster 5 umfasst 2.862 Proben-Sets, die erst nach 24h hochreguliert werden und die mit Zellzyklus, Nukleotid-Metabolismus, Glykolyse und Glukoneogenese, Transport und (m)RNA-Metabolismus assoziieren. Cluster 6 beschreibt dagegen Gene, die bereits nach 4h induziert werden und dies auch nach 24h bleiben. Den 1.210 Proben-Sets konnten hier Funktionen wie mRNA-Prozessierung, Nukleotid-Bindung, Translations-Initiations-Faktor-Aktivität, Nukleinsäure-Metabolismus, Proteinbiosynthese, sowie Ribosomen-Genese und -Zusammenbau zugeordnet werden. Die 2.114 in Cluster 7 zusammengefassten Proben-Sets waren nur nach 4h hochreguliert und waren ähnlich wie in Cluster 6 assoziiert mit Translations-Initiations-Faktor-Aktivität, Nukleinsäure-Metabolismus, Proteinbiosynthese, Ribosomen-Genese und -Zusammenbau, sowie der Regulation der Proben-Sets. Auf eine Zusammenstellung aller Gengruppen und der entsprechenden Signifikanzen wurde an dieser Stelle verzichtet, da alleine in Cluster 1 ca. 300 funktionelle Gruppen vertreten waren und insgesamt ca. 900 funktionelle Gruppen zu erwarten waren. Aber auch für EBNA2 lassen sich die Zielgene in zwei große Gruppen unterteilen. Die induzierten Zielgene sind hauptsächlich mit Zellzyklus und den zugehörigen Metabolismen assoziiert, die reprimierten Gene mit der Immunmodulation.

3.3 Stark regulierte Zielgene

Zusätzlich zum Expressionsmuster der drei transgenen Linien wurden die am stärksten regulierten Gene bestimmt. Hierzu wurden nur frühe Zielgene untersucht, die induziert oder

reprimiert wurden. Es wurden jeweils 50 Proben-Sets betrachtet, die von Notch1IC, Notch2IC bzw. EBNA2 am stärksten reguliert wurden. Bei der Stärke der Induktion oder Repression ist allerdings zu beachten, dass die Bezugswerte teilweise sehr niedrig liegen und dadurch die angegebene Regulation erhöht dargestellt sein kann. Der Bezugswert für induzierte Proben-Sets ist der 0h-Wert, für reprimierte der 4h- bzw. der 8h-Wert.

3.3.1 Notch1IC-induzierte Gene

Die 50 stärksten durch Notch1IC induzierten Proben-Sets wurden zwischen 111-fach und 1,7-fach reguliert. Es fanden sich sechs Gene, die der funktionellen Gruppe „Nervensystementwicklung“ zugeordnet wurden. Dazu gehörten HES1, CDK5R1, ASCL1, Deltex-Homolog1, MYLIP und HEY1. HES1, ein bereits bekanntes Zielgen von Notch1 wurde am stärksten reguliert. Ein in B-Zellen bisher unbekanntes Notch1 Zielgen, ASCL1/HASH1 wurde mit einer 22-fachen Induktion ebenfalls sehr stark induziert. Die Expression von ASCL1 wurde durch qRT-PCR bestätigt (Abb. 3.9). Unter den 50 am stärksten durch Notch1IC-regulierten Genen befanden sich zwölf Gene, die mit einer hohen Signifikanz (p-Wert < 0.0000001) Zellzyklus-assoziert waren. Zu diesen gehörten unter anderem die Cycline B2 und E2, CDC2 und CDC20, sowie die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK6 und die regulatorische Untereinheit von CDK5 (CDK5R1). CDK5R1 wird als Neuronen-spezifischer Aktivator beschrieben, der CDK5 (Cyclin Dependent Kinase 5) durch Bindung aktivieren kann. Weitere durch Notch1IC stark regulierte Zellzyklus-assozierte Gene sind CDKN3 (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 3), CHK1 (Checkpoint Homolog 1), zwei Proteine, die einen inhibitorischen Einfluss auf den Zellzyklus ausüben. Die Topoisomerase TOP2A, die Ribonucleotid Reductase RRM2 und Geminin wurden der funktionellen Gruppe „DNA Replication“ zugeordnet. Insgesamt 14 Gene konnten dem „Biopolymer-Metabolismus“ zugeteilt werden. Unter ihnen befanden sich neben bereits in anderen Gruppen genannten Genen die Proteinphosphatase 1F, eine Desoxyribonuklease, die Protein-Tyrosin-Phosphatase PTP4A2 und die Chitinase 3. Unter den 50 am stärksten regulierten Proben-Sets befanden sich außerdem bereits bekannte Notch1-Zielgene, wie z.B. CD21/CR2, ein Komplement-Rezeptor, der ebenfalls als EBV-Rezeptor dient und DTX1 (Deltex-homolog 1), das abhängig vom Entwicklungs- und Zell-Status als negativer oder positiver Regulator von Notch fungieren kann. RUNX3 war bereits als Zielgen von EBNA2 in EBV-immortalisierten B-Zellen bekannt, nicht jedoch als Notch1-Zielgen. Die Regulation aller Gene, die von den 50 am stärksten regulierten Proben-Sets repräsentiert werden, ist in Abb. 3.10 und in Tabelle A3 im Anhang dargestellt.

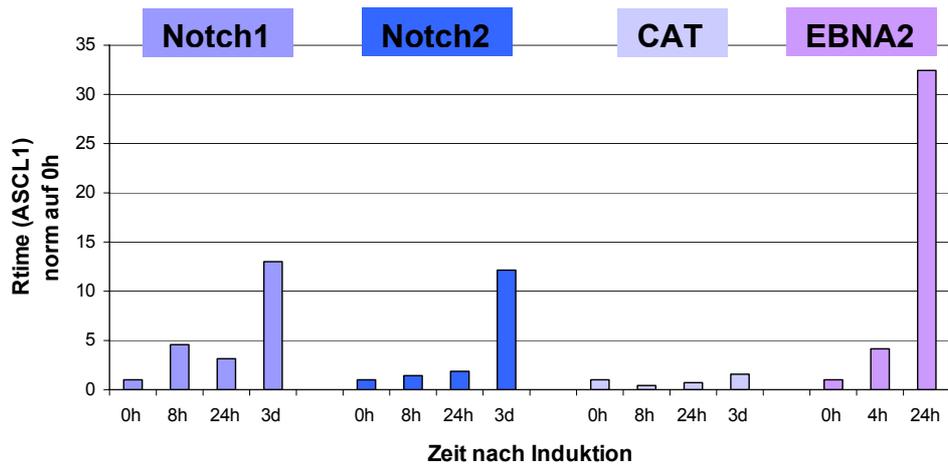


Abb. 3.9 ASCL1 wird durch Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 induziert

Mithilfe der qRT-PCR wurde die transkriptionelle Regulation von ASCL1 durch Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 untersucht. Den Zellen wurde für 3d Östrogen entzogen und die Expression von Notch1IC und CAT durch Doxycylin und die Aktivierung von EBNA2 durch Östrogen induziert. Zur Generierung der 3d-Werte wurde am Tag des Östrogen-Entzugs Doxycylin zugegeben. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion geerntet und RNA wurde isoliert. Die mRNA-Level wurden auf das ribosomale Protein L23a standardisiert und jeweils auf den 0h-Wert der entsprechenden Zelllinie normalisiert.

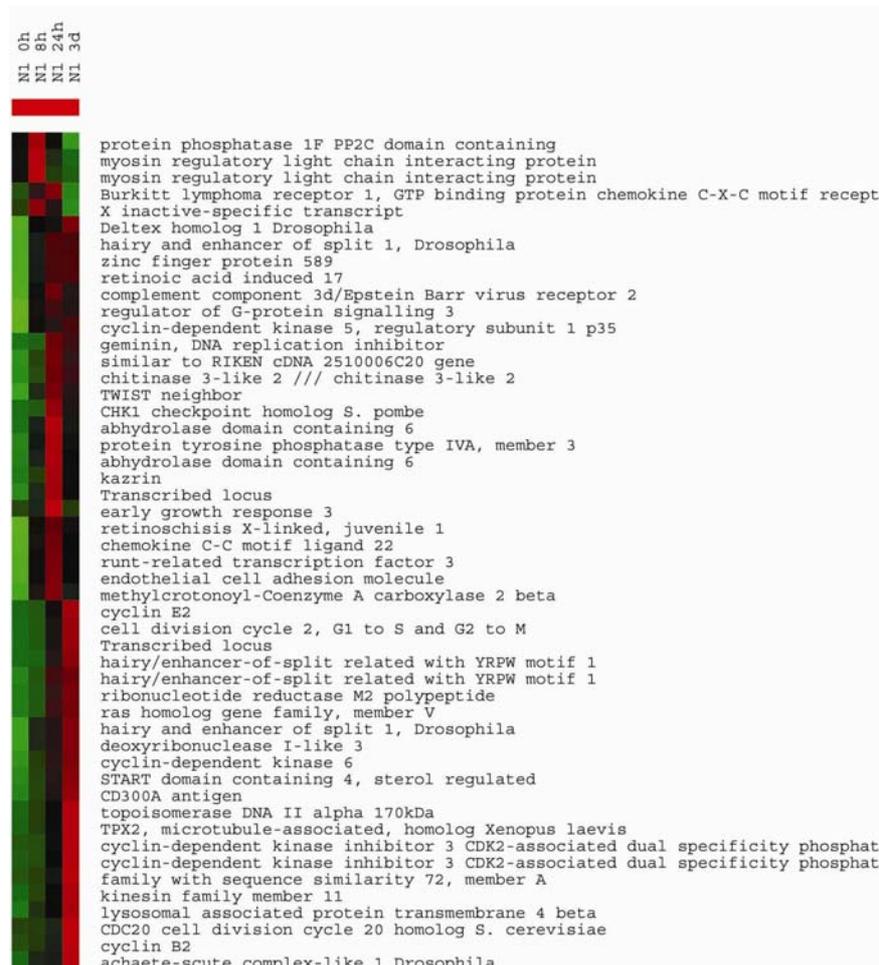


Abb. 3.10 Durch Notch1IC stark induzierte Gene

Dargestellt sind die 50 Proben-Sets, die durch Notch1IC nach 8h am stärksten induziert werden. Die meisten Gene zeigen nach 24h und 3d eine weitere Zunahme der Expressionsstärke. Die Doppelt-Nennung von Genen in dieser Art Abbildung beruht darauf, dass die Gene durch mehrere Proben-Sets vertreten sein können. Die genaue Regulation der dargestellten Gene ist in Tab. A3 im Anhang dargestellt. Grün (schwache Expression), Rot (starke Expression), N1 (Notch1IC).

3.3.2 Notch2IC-induzierte Gene

Generell gesehen induzierte Notch2IC die Zielgene etwas schwächer als Notch1IC. So wurden nur zwei Gene mehr als achtfach induziert, während Notch1IC zehn Gene mehr als achtfach induziert. Das bereits bekannte Zielgen CD21 wurde mit einer 20-fachen Induktion am stärksten reguliert. Unter den neu identifizierten, am stärksten induzierten Zielgenen befanden sich einige Zellzyklus-assoziierte Gene, von denen allerdings einige nur relativ schwach exprimiert werden. Hierzu gehören Ki-67, Septin 8, Cyclin E2, CDC6, CDC2 und CDCA2, die den Zellzyklus positiv beeinflussen. Diese Gene wurden zwischen 5- und 3,5-fach induziert. MYBL2, ein Transkriptionsfaktor, wurde 5-fach induziert, CDK5R1 ca. 4-fach. Der funktionellen Gruppe „DNA Bindung“ konnten elf Gene zugeordnet werden. Zu diesen gehörten neben bereits genannten Genen die Topoisomerase TOP2A, das ets-Transkriptionsfaktor verwandte Gen ETV5, HES1, HMGN4, ASCL1, das Zink-Finger Gen ZBED2, der E2F-Transkriptionsfaktor 8 (E2F8), der DNA Replikationsfaktor C und MCM4. Ebenfalls durch Notch1IC und Notch2IC stark induziert wird DTX1, das als Zielgen bereits bekannt ist. Die Regulation aller Gene, die durch Notch2IC induziert werden und durch 50 am stärksten induzierten Proben-Sets repräsentiert werden, ist in Abb. 3.11 dargestellt, die genaue Regulation in Tabelle A4 im Anhang.

Es findet sich eine große Übereinstimmung bezüglich der funktionellen Gengruppen, denen Notch1IC- und Notch2IC-induzierte Gene zugeordnet werden. Vergleicht man die Induktion von Notch1IC- und Notch2IC-induzierten Genen nach 8h, so zeigt sich, dass Notch1IC viele Gene stärker induzieren kann als Notch2IC (Abb. 3.12).

3.3.3 EBNA2-induzierte Gene

Die Gene, die am stärksten durch EBNA2 induziert wurden, assoziieren mit einer sehr hohen Signifikanz (p-Wert $<0,00001$) mit „Chemotaxis“ (Abb. 3.13 und Tab. A5 im Anhang). Hierzu gehören die Chemokin-Liganden 1,2,3 und 4, die ohne EBNA2 kaum detektiert werden und nach 4h extrem stark exprimiert werden. In die negative Regulation der Signaltransduktion sind die EBNA2-Zielgene RGS1 und RGS16 involviert, die durch eine Verstärkung der GTPase-Aktivität der G-Protein alpha-Untereinheiten diese in die inaktive GDP-gebundene Form treiben. Diese Proteine sind möglicherweise in die Regulation von B-Zell-Aktivierung und -Proliferation eingebunden. MAFB wird durch EBNA2 nach 4h extrem stark induziert und könnte in die zelluläre Stress-Antwort involviert sein. Unter diesen 50 Proben-Sets zeigt die DUSP2 (Dual Specificity Phosphatase 2) die stärkste Expression gekoppelt mit einer 140-fachen Induktion. Sie reguliert die mitogene Signaltransduktion

durch die Dephosphorylierung von ERK1 und ERK2. Das bekannte Zielgen HES1 wird ebenso wie durch Notch1IC und Notch2IC auch durch EBNA2 induziert. Insgesamt zwölf Gene konnten der funktionellen Gruppe „Signal Transducer Activity“ zugeordnet werden. Zu diesen gehörten neben bereits genannten Genen das Nurr77-Homolog NR4A2, ICAM1, IL1R Antagonist und NR4A3.

Zwischen den Genen, die am stärksten durch Notch1IC oder durch EBNA2 induziert werden, finden sich nur wenige Überlappungen. Auch bei den funktionellen Gruppen, die in Tabelle A6 im Anhang zusammengestellt sind, wird dies deutlich.



Abb. 3.11 Durch Notch2IC stark induzierte Gene

Dargestellt sind die 50 Proben-Sets, die durch Notch2IC nach 8h am stärksten induziert werden. Fast alle Gene zeigen nach 24h und 3d eine weitere Zunahme der Expressionsstärke. Die genaue Regulation dieser Gene ist in Tab. A4 im Anhang dargestellt. Grün (schwache Expression), Rot (starke Expression), N2 (Notch2IC).

Notch1IC Notch2IC

0h 8h 24h 3d 0h 8h 24h 3d

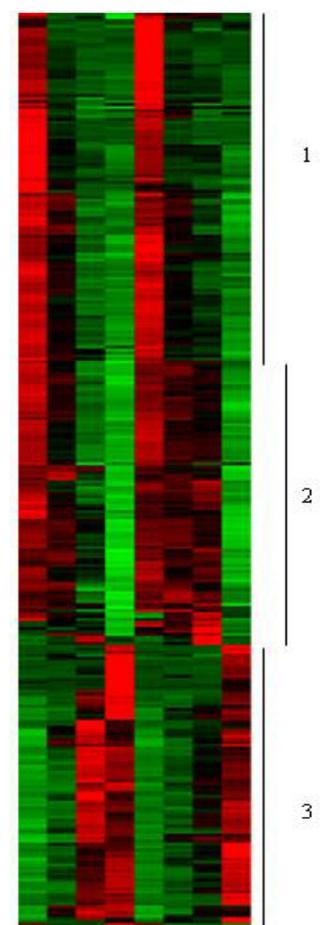


Abb. 3.12 Gemeinsam durch Notch1IC und Notch2IC regulierte Gene dargestellt im Clusterbaum

Dargestellt sind Proben-Sets, die gemeinsam durch Notch1IC und Notch2IC reguliert werden. Es setzen sich drei Bereiche ab, in denen (1) die Gene durch Notch1IC und Notch2IC gleich schnell und gleich stark reprimiert werden, in denen (2) Notch1IC eine schnellere Repression vermittelt und (3) die meisten Gene durch Notch1IC schneller induziert werden. Grün (schwache Expression), Rot (starke Expression).



Abb. 3.13 Durch EBNA2 stark induzierte Gene

Dargestellt sind die 50 Proben-Sets, die durch EBNA2 nach 4h am stärksten induziert werden. Viele dieser Gene zeigen nach 4h die maximale Expressionsstärke. Die genaue Regulation dieser Gene ist in Tab. A5 im Anhang dargestellt. Grün (schwache Expression), Rot (starke Expression).

3.3.4 Notch1IC-reprimierte Gene

Unter den 50 am stärksten durch Notch1IC reprimierten Proben-Sets befanden sich elf Gene, die mit der Plasma-Membran assoziieren (Abb. 3.14). Hierzu gehören unter anderem IL13R α 1, CD180, TNF(Ligand)10 (TRAIL), NTRK2 (neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2), das Membran-Transport Protein ABCA1, MAC1 (CD11b), das „Solute Carrier Family“ 1 Gen SLC1A1 und RHOQ (ras homolog gene family, member Q). Diese Gene werden 6- bis 2,5-fach reprimiert. ADD3 (Adducin 3) und die katalytischen Untereinheiten α und γ der Protein-Phosphatase 3 werden der funktionellen Gruppe „Calmodulin Bindung“ zugeordnet und 3,5- bis 2,5-fach reprimiert. Erstaunlicherweise fanden sich unter den am stärksten regulierten Genen kaum welche, die mit der Modulation der Immunantwort assoziieren, obwohl diese Funktion unter der Gesamtheit der reprimierten Gene stark vertreten ist. Insgesamt gesehen konnten die 50 ausgewählten Proben-Sets durch Notch1IC 8- bis 2,5-fach reprimiert werden. Da bisher nur die schwere μ -Kette des Immunglobulin-Lokus als Notch1-reprimiertes Gen bekannt war, handelt es sich bei allen Genen um neu

identifizierte Zielgene von Notch. Die genaue Regulation dieser Gene findet sich in Tabelle A7 im Anhang.



Abb. 3.14 Durch Notch1IC stark reprimierte Gene

Dargestellt sind die 50 Proben-Sets, die durch Notch1IC nach 8h am stärksten reprimiert werden. Die genaue Regulation dieser Gene ist in Tab. A7 im Anhang dargestellt. Grün (schwache Expression), Rot (starke Expression), N1 (Notch1IC).

3.3.5 Notch2IC-reprimierte Gene

Notch2IC kann im allgemeinen Gene wesentlich stärker als Notch1IC reprimieren. Während die maximale Repression bei Notch1IC achtfach war, war sie bei Notch2IC 80-fach (Abb. 3.15 und Tab. A8 im Anhang). Das am stärksten durch Notch2IC reprimierte Gen ist Protocadherin 9, dessen Transkripte bereits 8h nach Notch2IC-Induktion nahezu nicht mehr nachweisbar waren. Bei Protocadherin handelt es sich um ein Calcium-abhängiges Zelladhäsions-Protein. Im Gegensatz zu Notch1IC-reprimierten Proben-Sets, befinden sich unter den Notch2IC-reprimierten Proben-Sets Gene, die mit einer Signifikanz $< 0,0063$ der entzündlichen Immunantwort zugeordnet werden können. Dies sind CD180, CXCL10 (Chemokine-Ligand 10) und ALOX5 (Arachidonate 5-Lipoxygenase). Notch2IC-reprimierten Genen konnten lediglich zwei funktionelle Gruppen zugeordnet werden. Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um die Gruppe „Eisen Ionen Bindung“, die neben ALOX5 die Gene Hämoglobin ϵ und Peroxidasin enthält.

Unter den Genen, die durch Notch1IC oder Notch2IC am stärksten reprimiert wurden, finden sich neun gemeinsam reprimierte Gene. Vergleicht man die Repression dieser Gene miteinander, so zeigt sich, dass Notch2IC meist einen stärkeren reprimierenden Effekt als Notch1IC hat. Für induzierte Gene dagegen schien Notch1IC bzgl. der Induktionsstärke potenter als Notch2IC.



Abb. 3.15 Durch Notch2IC stark reprimierte Gene

Dargestellt sind die 50 Proben-Sets, die durch Notch2IC nach 8h am stärksten reprimiert werden. Fast alle Gene zeigen bereits nach 8h eine extrem starke Repression, die auch nach 24h und 3d bestehen bleibt. Die genaue Regulation dieser Gene ist in Tab. A8 im Anhang dargestellt. Grün (schwache Expression), Rot (starke Expression), N2 (Notch2IC).

3.3.6 EBNA2-reprimierte Gene

Den drei am stärksten EBNA2-reprimierten Proben-Sets, die ca. 30-fach reguliert werden wurde bis jetzt weder ein Name noch eine Funktion zugeordnet (Abb. 3.16 und Tab. A9 im Anhang). Die Gene FGD4, DOCK8 (Dedicator of cytokinesis 8) und PTPRC (protein tyrosine phosphatase, receptor type, C) assoziieren mit einer mittleren Signifikanz (p-Wert 0,002) mit der „Gene Ontology“-Funktionsgruppe „Enzym Bindung“, FDG4 und DOCK8 zusätzlich auch mit „GTPase Bindung“. Die restlichen regulierten Gene lassen sich nicht signifikant einzelnen Gengruppen zuordnen. Interessanterweise reprimiert EBNA2 ZC3HAV1 (zinc finger CCCH-type, antiviral 1), von dem vermutet wird, dass es eine Infektion durch

Retroviren verhindert, indem es die virale Genexpression inhibiert und die angeborene Immunantwort gegen virale Infektionen induziert. Zwar gehört EBV nicht zu den Retroviren, dennoch könnte EBNA2 durch die frühe und starke Repression dieses Gens eine Immunantwort gegen EBV verhindern.

Unter den am stärksten regulierten Genen fanden sich elf, die gemeinsam durch EBNA2 sowie durch Notch1IC und /oder Notch2IC reprimiert wurden. Allerdings konnte nur wenigen dieser Gene eine Funktion in Lymphozyten zugeordnet werden, wie etwa RhoQ, das zur Familie der GTPasen gehört und Solute Carrier Family 1, das in den Glutamat-Transport involviert ist.

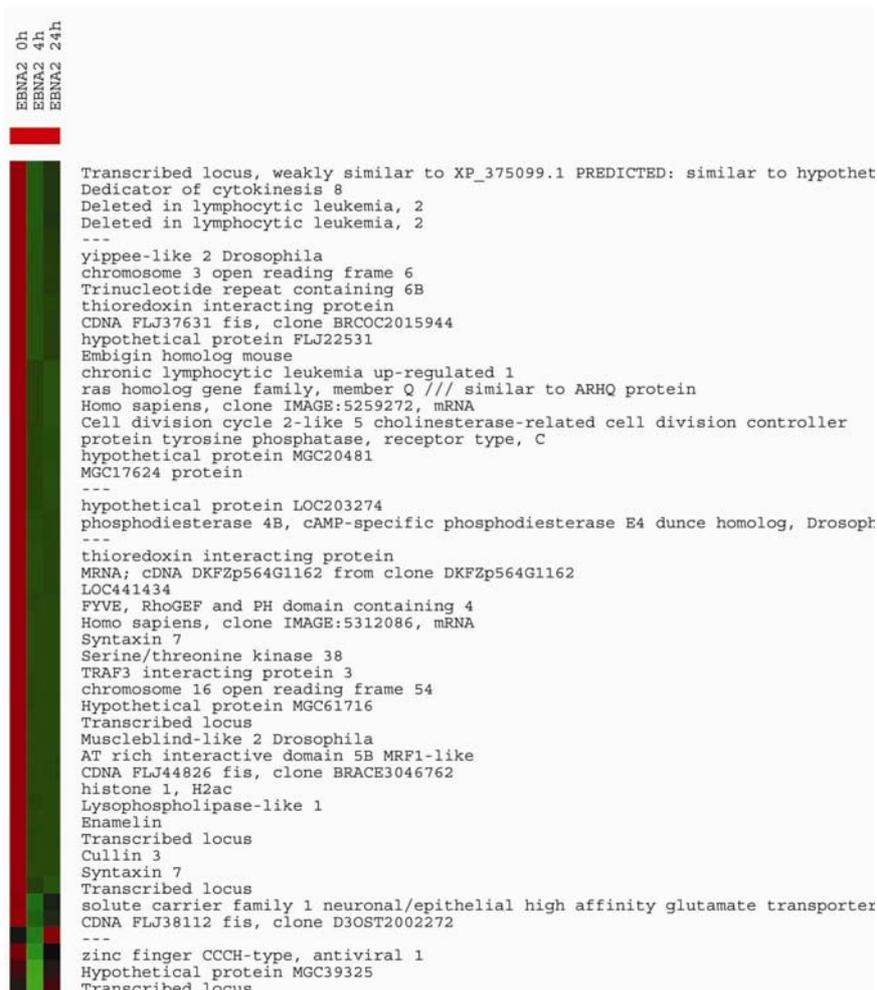


Abb. 3.16 Durch EBNA2 stark reprimierte Gene

Dargestellt sind die 50 Proben-Sets, die durch EBNA2 nach 4h am stärksten reprimiert werden. Fast alle Gene zeigen bereits nach 4h eine extrem starke Repression, die auch nach 24h und 3d bestehen bleibt. Einige wenige Gene werden dagegen nach 24h erneut induziert. Die genaue Regulation dieser Gene ist in Tab. A9 im Anhang dargestellt. Grün (schwache Expression), Rot (starke Expression).

3.4 Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Expressionsmuster von Notch1 und Notch2

Da die Familie der Notch-Rezeptoren mehrere Mitglieder hat, liegt es nahe, dass die einzelnen Mitglieder unterschiedliche Funktionen haben. Andererseits ist es auch möglich, dass sie teilweise redundante Funktionen haben und sich somit gegenseitig ersetzen können. Die Chip-

Analyse bietet eine gute Möglichkeit, Notch1- bzw. Notch2-vermittelte Gemeinsamkeiten und Unterschiede bezüglich der Regulation von Zielgenen zu untersuchen.

Insgesamt wurden 308 Proben-Sets gemeinsam durch Notch1IC und Notch2IC differentiell exprimiert. 212 davon wurden reprimiert und 96 induziert (Abb. 3.12). Im Cluster-Diagramm zeigt sich hierbei deutlich, dass bei den induzierten Genen, Notch1IC gemeinsam regulierte Gene früher induzieren kann als Notch2IC. Höchstwahrscheinlich beruht dieser Effekt auf der früheren Expression von NotchIC.

Es wurde untersucht, welche frühen Zielgene sowohl von Notch1IC als auch von Notch2IC mindestens 1,5-fach induziert werden. Es konnten 28 Gene identifiziert werden. Darunter befanden sich sieben Gene, die Zellzyklus-assoziiert waren. Dies sind die Cycline A2 und E2, CDC2, KIF11 (kinesin family member 11), CDK5R1, Geminin und ein transkribierter Lokus. Dabei wurden CDC2, Cyclin A2 und E2 und KIF11 durch Notch2IC stärker induziert als durch Notch1IC. Fünf Gene wurden mit DNA-Metabolismus in Zusammenhang gebracht. Die Gene CDK5R1, Deltex1, Hes1 und ASCL1 werden der Entwicklung des Nervensystems zugeordnet. Insgesamt wurden elf Gene durch Notch2IC stärker reguliert als durch Notch1IC und 16 durch Notch1IC stärker als Notch2IC (Abb. 3.17).

Insgesamt 55 Gene, die durch 87 Proben-Sets repräsentiert wurden, wurden gemeinsam durch Notch1IC und Notch2IC nach 8h reprimiert. 16 dieser Gene werden mit einer hohen Signifikanz (p-Wert 0,000007) der funktionellen Gengruppe „Plasma-Membran“ zugeordnet. Dazu gehörten unter anderem IL13R α 1, TNF(Ligand)10, CD180, Syntaxin 7 und Dystonin. Weitere funktionelle Gruppen, denen nach 8h reprimierte Gene mit einer geringeren Signifikanz (p-Wert < 0,01) zugeordnet werden konnten, waren Zytoskelett-Proteinbindung, Anionen-Transporter-Aktivität und Membran-gebundene Vesikel. Insgesamt 23 Proben-Sets wurden durch Notch2IC etwas stärker reprimiert als durch Notch1IC (Abb. 3.18).

Um frühe Zielgene zu ermitteln, die durch Notch1IC nicht aber durch Notch2IC, bzw. Notch2IC nicht aber durch Notch1IC reguliert wurden, wurde die Regulation von Zielgenen von Notch1IC und Notch2IC nach 8h miteinander verglichen. Da möglicherweise einige Gene nur zeitlich verzögert durch eins der Transgene reguliert werden, wurden die 8h-Werte des einen Transgens jeweils mit allen Zeitpunkten des anderen Transgens verglichen. Der verwendete Algorithmus zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen ist nicht zwangsläufig dazu geeignet, nicht-differentiell exprimierte Gene zu bestimmen. Deshalb wurden die so identifizierten Gene mit den MAS5.0-generierten Expressionsdaten verglichen

und nur solche weiter betrachtet, die nach 8h durch das eine, aber zu keinem anderen Zeitpunkt durch das jeweils andere Transgen in gleicher Weise reguliert wurden.

Es konnten sechs Gene identifiziert werden, die durch Notch1IC nach 8h induziert wurden, durch Notch2IC aber zu keinem Zeitpunkt (Tab. A10 im Anhang). Dies waren MYLIP, ein Myosin interagierendes Protein, die Protein Phosphatase PPM1F, eine Carboxylase, SEH-like 1, ein Arsenate Resistenz Protein und das B-Zell Scaffold Protein BANK1. Lediglich BANK1 konnte eine Funktion in B-Zellen zugeordnet werden.

Ausschließlich durch Notch2IC aber nicht durch Notch1IC wurden 14 Gene nach 8h induziert (Tab. A10 im Anhang). Von diesen 14 Genen konnte nur TCL1A (T cell leukemia/lymphoma 1) und der Phosphatase PPAP2A eine Funktion in B-Zellen zugeteilt werden.

Notch1IC konnte nach 8h nur drei Proben-Sets reprimieren, die durch Notch2IC zu keinem Zeitpunkt reprimiert wurden (Tab. A10 im Anhang). Dies waren ein hypothetisches Protein, ein offener Leserahmen und die Histon-Acetyl-Transferase PCAF, die Bestandteil des Ko-Aktivator-Komplexes im Notch-Signalweg ist.

Ausschließlich durch Notch2IC nach 8h wurden 62 Gene reprimiert (Tab. A10 im Anhang). In der funktionellen Gengruppe „Komplement Aktivierung“ waren CD55 und der Komplement-Rezeptor 1 (CR1) vertreten. Der Gruppe „Response to biotic stimulus“ konnten unter anderem der Chemokin-Rezeptor CCR7, Ig δ , eine Tyrosyl Sulfotransferase und das Epstein-Barr Virus induzierte Gen 2 (EBI2) zugeordnet werden. Weitere Gene, die keiner Gruppe zugeteilt wurden, waren unter anderem Transgelin, der negative Regulator der BTK SH3BP5, Protocadherin 9, das Scaffold Protein Pellino Homolog 1 und zwei Mitglieder der Krüppel-like Faktor Familie BCL11A und KLF3/BKLF.

Diese Auswertung zeigt, dass es zwischen Notch1IC und Notch2IC in diesem Zellsystem funktionelle Gemeinsamkeiten und Unterschiede gibt. So können einige Gene gemeinsam durch beide Transgene reguliert werden, teils gleich stark, teils unterschiedlich stark. Andererseits können einige Gene auch nur durch eins der Transgene reguliert werden. Insgesamt scheint Notch2IC in reifen B-Zellen mehr Gene zu regulieren als Notch1IC, was die hauptsächliche Expression von Notch2 in reifen B-Zellen widerspiegeln könnte.

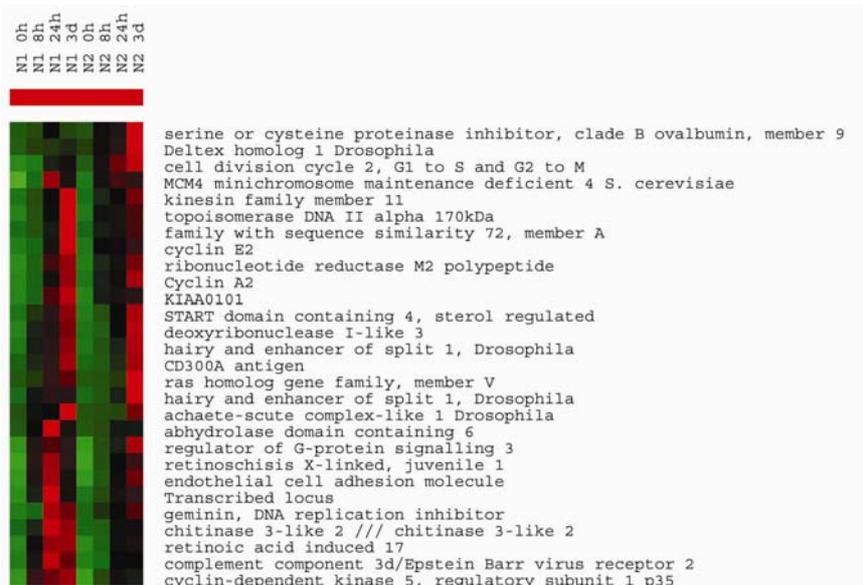


Abb. 3.17 Frühe gemeinsam durch Notch1IC und Notch2IC induzierte Gene

Gemeinsam durch Notch1IC und Notch2IC wurden nach 8h 27 Gene mindestens 1,5-fach induziert. Bei vielen Genen zeigte sich eine frühere und stärkere Induktion durch Notch1IC als durch Notch2IC. Grün (schwache Expression), Rot (starke Expression), N1 (Notch1IC), N2 (Notch2IC).



Abb. 3.18 Frühe gemeinsam durch Notch1IC und Notch2IC reprimierte Gene

Gemeinsam durch Notch1IC und Notch2IC wurden nach 8h 87 Proben-Sets mindestens 1,5-fach reprimiert. Einige Gene wurden stärker durch Notch1IC, andere stärker durch Notch2IC reprimiert. Grün (schwache Expression), Rot (starke Expression), N1 (Notch1IC), N2 (Notch2IC).

3.5 Unterschiede im Expressionsmuster von Notch1IC, Notch2IC und EBNA2

Anhand der vorigen Auswertung konnte gezeigt werden, dass zwischen Notch1IC und Notch2IC funktionelle Gemeinsamkeiten und Unterschiede vorliegen. Im Folgenden wurde untersucht, welche Position EBNA2 als virales „funktionelles“ Homolog von NotchIC einnimmt. Hierzu wurden Gengruppen betrachtet, die nur durch alle drei Transgene gemeinsam reguliert wurden, solche, die durch Notch1IC und Notch2IC, nicht aber durch EBNA2, oder nur durch Notch1IC und EBNA2, nicht aber Notch2IC oder schließlich nur durch Notch2IC und EBNA2, nicht aber Notch1IC reguliert wurden. Bei diesen Vergleichen wurden nur früh regulierte Gene nach 4h bzw. 8h betrachtet.

Gemeinsam durch Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 wurden lediglich 20 Gene induziert. Diese konnten den funktionellen Gengruppen „Zellzyklus“, „Regulation der Kinase-Aktivität“ und „Nervensystem-Entwicklung“ zugeordnet werden. Zellzyklus-assoziierte Gene waren CDK5R1, Cyclin A2, Geminin und ein transkribierter Lokus. Cyclin A2 wurde hierbei am stärksten durch Notch2IC und CDK5R1 am stärksten durch Notch1IC induziert. Der Nervensystem-Entwicklung wurden die Gene HES1, CDK5R1, DTX1 und ASCL1 zugeordnet. HES1, ASCL1 und DTX1 wurden dabei am stärksten von Notch1 induziert und am schwächsten von EBNA2. CDK5R1 wurde dagegen von EBNA2 am stärksten induziert, was die Frage aufwirft, ob und welche Rolle CDK5R1 außerhalb des Nervensystems spielt.

Es konnten nur acht Gene identifiziert werden, die durch Notch1IC und Notch2IC, nicht aber durch EBNA2 induziert werden. Dies sind CDC2, CD300A, Cyclin E2, KIAA0101, RRM2 (ribonucleotide reductase M2 polypeptide), TOP2A (topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa), family with sequence similarity 72, member A und KIF11 (kinesin family member 11). Diese Gene konnten mit relativ geringer Signifikanz (p-Wert 0,01) den funktionellen Gengruppen „Zellzyklus“, „DNA-Replikation“ und „ATP-Bindung“ zugeordnet werden.

27 Gene wurden gemeinsam durch Notch1IC und EBNA2 induziert, nicht aber durch Notch2IC. Vier dieser Gene ließen sich den funktionellen Gruppen „Antwort auf abiotischen Stimulus“ bzw. „Antwort auf chemischen Stimulus“ zuordnen. Weitere funktionelle Gruppen konnten für diese Gene nicht gefunden werden, was bedeutet, dass es sich um eine heterogene Gruppe von Genen handelt.

Notch2IC und EBNA2 konnten 63 Gene induzieren, die nicht durch Notch1IC induziert wurden. Mit einer recht hohen Signifikanz (p-Wert =0,000004) wurde die

funktionelle Gruppe „Sterol Biosynthese“ identifiziert, der die vier Gene DHCR7 (7-dehydrocholesterol reductase), CYP51A1 (cytochrome P450, family 51, subfamily A), polypeptide 1, HMGCR (3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase) und HMGCS1 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1) zugeordnet werden konnten. Weitere Funktionsgruppen dieser 63 Gene waren „Katalytische Aktivität“ und „Protein Polymerisation“. Erstaunlicherweise wurde diesen Genen nicht die Funktionsgruppe „Zellzyklus“ zugeordnet, obwohl viele Notch2IC- und auch EBNA2-induzierte Gene Zellzyklus-assoziiert sind. Offensichtlich handelt es sich dabei um ein anderes Set an Genen.

Von Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 gemeinsam konnten 99 Gene nach 8h bzw. 4h reprimiert werden. Diesen Genen konnten unter anderem die funktionellen Gengruppen „Plasma Membran“ und „humorale Immunantwort“ zugewiesen werden. Letztere beinhaltete die Lymphozyten-Antigene 9 und 96, TNFR17 und CD24.

Genau wie bei den induzierten Genen konnten nur extrem wenig Gene identifiziert werden, die gemeinsam durch Notch1IC und Notch2IC, nicht aber durch EBNA2 reprimiert werden. Bei diesen fünf Genen handelt es sich um Adenosine Kinase, CD44, CystatinA, Jumonji und Neuron Navigator 2. Diesen Genen konnte keine gemeinsame Gengruppe zugeordnet werden.

Gemeinsam durch Notch1IC und EBNA2 nicht aber Notch2IC wurden 68 Gene nach 8h bzw. 4h reprimiert. Diese Gene assoziierten mit einer relativ geringen Signifikanz (p -Wert = 0,01) unter anderem mit „Protein Bindung“ und „Induktion von Apoptose“. Apoptose-assoziiert waren hierbei die Gene Caspase 10, Kollagen Typ IV und NACHT, die durch EBNA2 jeweils stärker reprimiert wurden als durch Notch1. Mit „Protein Bindung“ assoziierten 23 Gene, wie z.B. Annexin A2, Villin2, und Ribosomal protein S6 kinase. Insgesamt wurden die meisten der 68 Gene durch EBNA2 stärker reprimiert als durch Notch1IC.

Es konnten 247 Gene identifiziert werden, die gemeinsam durch Notch2IC und EBNA2 reprimiert wurden, nicht aber durch Notch1IC. Diesen Genen konnten Funktionen wie „Kinase Aktivität“, „Immunantwort“, „Protein-Modifikation“ und „Signaltransduktion“ zugeordnet werden. 20 Gene, wie z.B. IL4R, Igb, IL24 und AID waren mit der Immunantwort assoziiert.

Diese Auswertung zeigt, dass Notch2IC und EBNA2 mehr Gemeinsamkeiten haben also Notch1IC und EBNA2. Dies mag zum einen daran liegen, dass mehr Zielgene von Notch2IC und EBNA2 identifiziert werden konnten als von Notch1IC. Damit wäre eine größere Überlappung rein statistisch gesehen wahrscheinlicher. Andererseits werden

möglicherweise tatsächlich in reifen B-Zellen mehr Gene gemeinsam durch Notch2 und EBNA2 reguliert, da beide in diesem Zellsystem physiologisch vorkommen.

3.6 Einfluss von Notch und EBNA2 auf den Zellzyklus

Die Auswertung der einzelnen Chip-Daten in der Cluster-Analyse hat gezeigt, dass positiv regulierte Gene aller drei Transgene häufig mit Zellzyklus-Regulation in Zusammenhang stehen.

In der Literatur wird kontrovers diskutiert, welchen Einfluss Notch1 in reifen B-Zellen auf die Induktion des Zellzyklus und die Proliferation hat (Gordadze et al. 2001; Hofelmayr et al. 2001) und ob Notch1IC EBNA2 bei der Aufrechterhaltung der B-Zellimmortalisierung ersetzen kann. Der Einfluss von Notch2IC auf die Proliferation reifer B-Zellen und die Aufrechterhaltung der Immortalisierung nach Abschaltung von EBNA2 wurde bis jetzt noch nicht untersucht. Da Notch2IC insgesamt mehr Gene gemeinsam mit EBNA2 induziert, ist es möglich, dass Notch2IC auch die Immortalisierung positiv beeinflussen kann. Deshalb sollte ausgewertet werden, welche Zellzyklus-assoziierten Gene von Notch1IC und Notch2IC reguliert werden und wie stark diese Regulation ist. Außerdem sollte nochmals näher die Frage aufgegriffen werden, inwieweit Notch1IC und Notch2IC EBNA2 bei der B-Zell-Immortalisierung ersetzen können.

3.6.1. EBNA2 und NotchIC regulieren Zellzyklus-assoziierte Gene unterschiedlich

Mit Hilfe der Chip-Daten sollte detaillierter ausgewertet werden, welche Zellzyklus-assoziierten Gene von Notch1IC und Notch2IC reguliert werden und wie stark diese Regulation ist. Die NotchIC-regulierten Gene sollten mit den EBNA2-regulierten Zellzyklus-assoziierten Genen verglichen werden. Insbesondere sollte untersucht werden, ob NotchIC und EBNA2 das gleiche Set an Proliferations-assoziierten Genen induzieren. Abbildung 3.19 zeigt die Zuordnung einiger der im weiteren Text erwähnten Zielgene zu den verschiedenen Phasen des Zellzyklus.

Notch1IC induzierte nach 8h bis 24h 31 Zellzyklus-assoziierte Gene (Abb.3.20). Drei dieser Gene konnten der funktionellen Gruppe „G1/S transition of mitotic cell cycle“ zugeteilt werden. Dazu gehörten ein Regulator der Chromosomen Kondensation 1, Cyclin D1 und der CDK Inhibitor 3. Letzterer wurde sehr stark induziert, während CyclinD1 nur schwach exprimiert und induziert wurde. Zur „M Phase des mitotischen Zellzyklus“ wurden elf Gene zugeordnet, die nach 8h schwach, nach 24h aber drei- bis 39-fach induziert wurden. In dieser

Gruppe vertreten waren unter anderem die Cycline A2 und B2, CDC2 (CDK1), CDC5, 6 und 20, „kinesin family member 11“ und das Mikrotubuli-assoziierte Gene TPX2. Die Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA wurden durch Notch1IC erst nach 24h relativ schwach (dreifach) induziert. Viele der 32 Gene wurden nach 8h schwach und erst nach 24h stärker induziert.

Notch2IC konnte nach 8h bis 24h 45 Zellzyklus-assoziierte Gene induzieren (Abb. 3.21). Die Gene CDC6, CDC28, CDK5R1, sowie die Cycline A2 und E2 sind in die Regulation der CDK-Aktivität involviert und werden teils nach 8h zwei- bis fünffach und nach 24h bis zu zehnfach induziert. Sehr schwach reguliert (maximal 1,6-fach nach 24h) wurden dagegen die Gene „S-phase kinase-associated protein 2 (p45)“ und der Regulator der Chromosomen Kondensation 1, die beide der Gruppe „G1/S transition of mitotic cell cycle“ zugeordnet wurden. Der „M Phase“ konnten 18 Gene zugeordnet werden, die nach 24h maximal 10,5-fach induziert waren. Zu diesen gehörten unter anderem die Cycline A2 und F, die CDK1 und 2, CDC6 und CDC5, sowie die Kinesin-Familien-Mitglieder 11 und 15.

EBNA2 konnte nach 4h bereits 109 und nach 24h insgesamt 269 Zellzyklus-assoziierte Gene induzieren. Um Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Expression Zellzyklus-assoziiierter Gene durch Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 zu verdeutlichen, wurden in Abbildung 3.22 die Expression einiger zentraler Zellzyklusgene, die anhand EBNA2-induzierter Gene ausgewählt wurden, mit der Expression in NotchIC-exprimierenden Zellen verglichen. Hierzu wurden die MAS5.0-generierten Daten verwendet. Die Abbildung zeigt deutlich, dass die meisten Gene in EBNA2-exprimierenden Zellen wesentlich stärker induziert werden, als in NotchIC-exprimierenden Zellen. Ebenso wird klar, dass nur wenige der Gene durch EBNA2 bereits nach 4h stark induziert werden. Zu diesen gehören c-MYC, die Cycline D1, D2 und J, „G1 to S Phase transition 1“ und der E2F-Transkriptionsfaktor 6. Notch1IC und Notch2IC können diese Gene kaum oder nur schwach induzieren. Die Regulation zentraler Zellzyklusfaktoren wie Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen und Inhibitoren wurde zusätzlich verglichen (Abb. 3.23). Die reprimierten Gene in Gruppe 1, zu denen auch der CDK4/6 Inhibitor Kip1 (p27) gehört, werden alle durch EBNA2 wesentlich schneller und stärker reprimiert. Fast alle Cycline die in Gruppe 2 vertreten sind, werden stärker durch EBNA2 als durch NotchIC induziert. In dieser Gruppe befinden sich auch die CDK4 und CDK6, die ebenfalls durch EBNA2 stärker induziert werden. Die Gene der dritten Gruppe wie Cyclin D1 werden auch durch Notch1IC induziert, allerdings zu einem späteren Zeitpunkt, als durch EBNA2. Das G₁-Phase Cycline Cyclin D2 wird ausschließlich und sehr stark bereits nach 4h durch EBNA2 induziert. Dies zeigt, dass EBNA2 besonders G₁-Phase

Cycline stärker induzieren kann und Inhibitoren dieser Phase stärker reprimieren kann als Notch1C.

Diese Auswertung zeigt auch, dass Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 einige gemeinsame Zellzyklus-assoziierte Gene regulieren können, die aber meist durch EBNA2 bzw. das gesamte EBV-Programm wesentlich stärker reguliert werden. EBNA2 scheint nicht grundsätzlich Zellzyklus-assoziierte Gene stärker induzieren zu können, wie die frühe Regulation z.B. von CyclinA2 und CDK5R1 zeigt, die durch Notch1C und EBNA2 gleich stark induziert werden. 24h nach EBNA2-Aktivierung können aber auch andere EBV-Gene und c-Myc die Expression von Zellzyklus-Genen beeinflussen. Diese starke Expression kann von Notch1C alleine nach 24h nicht induziert werden.

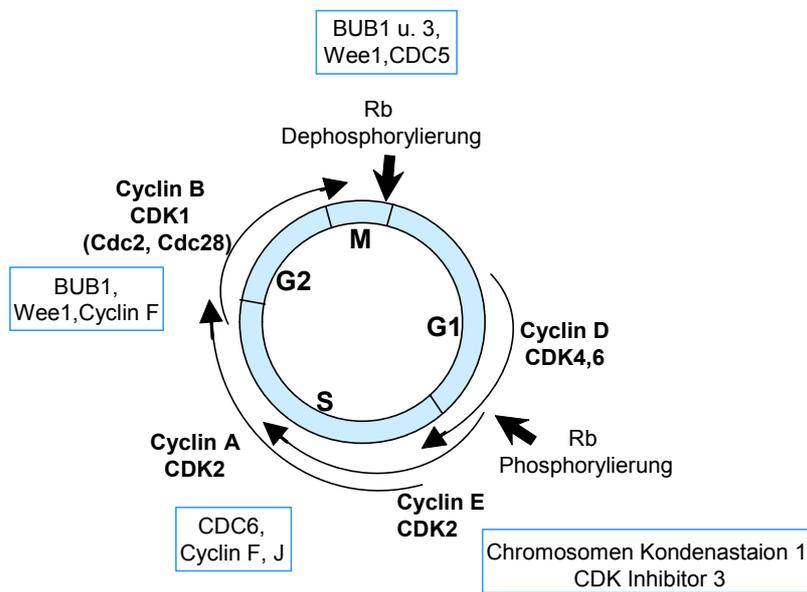


Abb. 3.19 Einordnung identifizierter Zellzyklus-assoziiierter Zielgene

Die Abbildung zeigt die verschiedenen Phasen des Zellzyklus und die zugehörigen Cycline und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) der verschiedenen Phasen, ergänzt durch die Zuordnung einiger identifizierter Zellzyklus-assoziiierter Zielgene. (Vergleiche Abb. 1.3).



Abb. 3.20 Regulation Notch1IC-induzierter Zellzyklus-assoziiierter Gene nach 8h oder 24h

Dargestellt ist die Gruppe Notch1IC-induzierter Gene, die nach 8h oder 24h mindestens 1,5-fach induziert werden und Zellzyklus-assoziiert sind. Grün (schwache Expression), Rot (starke Expression), NI (Notch1IC).



Abb. 3.21 Regulation Notch2IC-induzierter Zellzyklus-assoziierter Gene nach 8h oder 24h

Dargestellt ist die Gruppe Notch2IC-induzierter Gene, die nach 8h oder 24h mindestens 1,5-fach induziert werden und Zellzyklus-assoziert sind. Grün (schwache Expression), Rot (starke Expression), N2 (Notch2IC).



Abb. 3.22 Vergleich Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-induzierter Zellzyklus-Gene

Gezeigt ist die Regulation von Zellzyklus-assozierten Genen in Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-exprimierenden EREB2-5 Zellen. Ausgewählt wurden diese Gene danach, dass sie in EBNA2-exprimierenden Zellen nach 4h oder 24h induziert waren. Es wird deutlich, dass selbst durch EBNA2 nur wenige Gene bereits nach 4h stark induziert werden. Fast alle Gene werden durch EBNA2 wesentlich stärker induziert als durch Notch1IC oder Notch2IC. Die Expressionswerte wurden mit der MAS5.0 Software ermittelt. Grün (schwache Expression), Rot (starke Expression), N1 (Notch1IC), N2 (Notch2IC).



Abb. 3.23 Vergleich der Expression von Cyclinen, CDKs und Inhibitoren

Verglichen wurde die Regulation von Cyclinen, Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und deren Inhibitoren in Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-exprimierenden EREB2-5 Zellen. In Gruppe 1 werden die Gene am stärksten durch EBNA2 reprimiert, in Gruppe 2 am stärksten durch EBNA2 induziert. Die dritte Gruppe zeigt Gene, die neben EBNA2 auch durch Notch1IC deutlich induziert werden aber nicht durch Notch2IC. Grün (schwache Expression), Rot (starke Expression), N1 (Notch1IC), N2 (Notch2IC).

Um den Einfluss von Notch1 und Notch2 auf die Aufrechterhaltung der Proliferation zu untersuchen, wurde die Expression Zellzyklus-assoziierter Gene untersucht, die unter ständiger Expression von Notch1IC reguliert wurden. Unter ständiger Notch1IC-Expression wurden 52 Zellzyklus-assozierte Gene reguliert, von denen 36 induziert und 26 reprimiert wurden (Tab. A11 im Anhang). Induzierte Gene wie CDC6, CDKN3, CDK5R1, Ki-67 und „discs, large homolog 7“ (HURP) wurden der Gruppe Proliferation zugeordnet. In dieser Gruppe fanden sich auch reprimierte Gene wie GEF2, p300 und CDC2like3. Durch Notch2IC werden nach 3d 79 Zellzyklus-assozierte Gene reguliert, 64 induziert und 15 reprimiert (Tab. A12 im Anhang). 20 induzierte Gene konnten der funktionellen Gruppe „Zellteilung“ zugeordnet werden. Unter diesen befanden sich stark (5,5- bis 23-fach) regulierte Gene wie CDC6, BUB1, „protein regulator of cytokinesis 1“, Cyclin A2 und E2, CDC2 und „kinesin family member 11“.

Unter ständiger Expression von Notch1IC und Notch2IC können somit einige Zellzyklus-assozierte Gene relativ stark induziert werden. Da aber unklar ist, welche Gene für die Aufrechterhaltung der EBNA2-induzierten Proliferation in EBV-immortalisierten B-Zellen essentiell sind und bereits nach 24h EBNA2-Expression wesentlich mehr Zellzyklus-assozierte Gene induziert werden, als nach 3d durch Notch1IC, kann man vermuten, dass die durch Notch1IC-induzierten Gene nicht ausreichen, um die Proliferation EBV-immortalisierter Zellen aufrecht zu erhalten. Um die Effekte von Notch1IC und EBNA2 auf die

Aufrechterhaltung und die Induktion der Proliferation weiter zu untersuchen, wurden funktionelle Tests durchgeführt.

3.6.2 Weder Notch1IC noch Notch2IC kann EBNA2 bei der Aufrechterhaltung der B-Zellimmortalisierung ersetzen

Es stellte sich die Frage, ob die Anzahl, die Qualität und die Stärke der exprimierten Notch1IC- und Notch2IC- Zellzyklus-assoziierten Zielgene ausreicht, um EBNA2 bei der B-Zellimmortalisierung zu ersetzen. Um nochmals detaillierter zu untersuchen, ob Notch1IC oder Notch2IC EBNA2 teilweise bei der B-Zellimmortalisierung ersetzen kann, wurde den transfizierten EREB2-5-Zellen Östrogen entzogen und am gleichen Tag Notch1IC und Notch2IC durch die Zugabe von Doxycyclin und EBNA2 durch die Zugabe von Östrogen induziert. Als Kontrolle wurde den CAT-exprimierenden Linien in An- und Abwesenheit von Östrogen Doxycyclin zugegeben. Alle Zellen wurden in einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ml ausgesät und die Anzahl der lebenden Zellen über acht Tage täglich bestimmt. Parallel wurde der Anteil der NGFR-positiven Zellen an der Gesamtzahl lebender Zellen bestimmt.

Wie erwartet stieg die Zellzahl EBNA2-exprimierender Zellen stark an. Die Zugabe von Doxycyclin zeigte in EBNA2-exprimierenden Zellen nur einen geringen Einfluss auf diesen Anstieg. In Abwesenheit von EBNA2 und der Anwesenheit von Notch1IC bzw. Notch2IC nahm die Zellzahl stetig ab (Abb. 3.24a). Bei Notch2IC-exprimierenden Zellen waren nach sechs und bei Notch1IC-exprimierenden Zellen nach sieben Tagen keine lebenden Zellen mehr nachweisbar (Abb. 3.24b). Lebende NotchIC-exprimierende Zellen verschwanden somit mit einer ähnlichen Kinetik wie die ohne Östrogen gehaltenen CAT-transfizierten Zellen in An- und Abwesenheit von Doxycyclin. Der Anteil der NGFR-positiven Zellen an den lebenden Zellen nahm im Ansatz für Notch1IC um ca. 20 % und für Notch2IC um ca. 30 % ab (Abb. 3.24c). In dem Ansatz, in dem CAT und EBNA2 exprimiert wurden, zeigte sich keine Veränderung, während in der Kontrolle, in der nur CAT exprimiert wurde eine Zunahme um 60 % zu verzeichnen war. Die Werte lagen für Notch2IC und CAT im Mittel bei ca. 20 %, bei CAT/EBNA2 bei ca. 25 % und bei Notch1IC bei ca. 40 %. Da in Abwesenheit von EBNA2 in NotchIC-exprimierenden Linien die Anzahl lebender Zellen und der prozentuale Anteil NGFR-positiver Zellen kontinuierlich abnahm, ist anzunehmen, dass weder Notch1IC noch Notch2IC in EREB2-5 Zellen einen Proliferations- oder Überlebensvorteil bieten und dass sie EBNA2 bezüglich der Immortalisierung in B-Lymphozyten nicht ersetzen können.

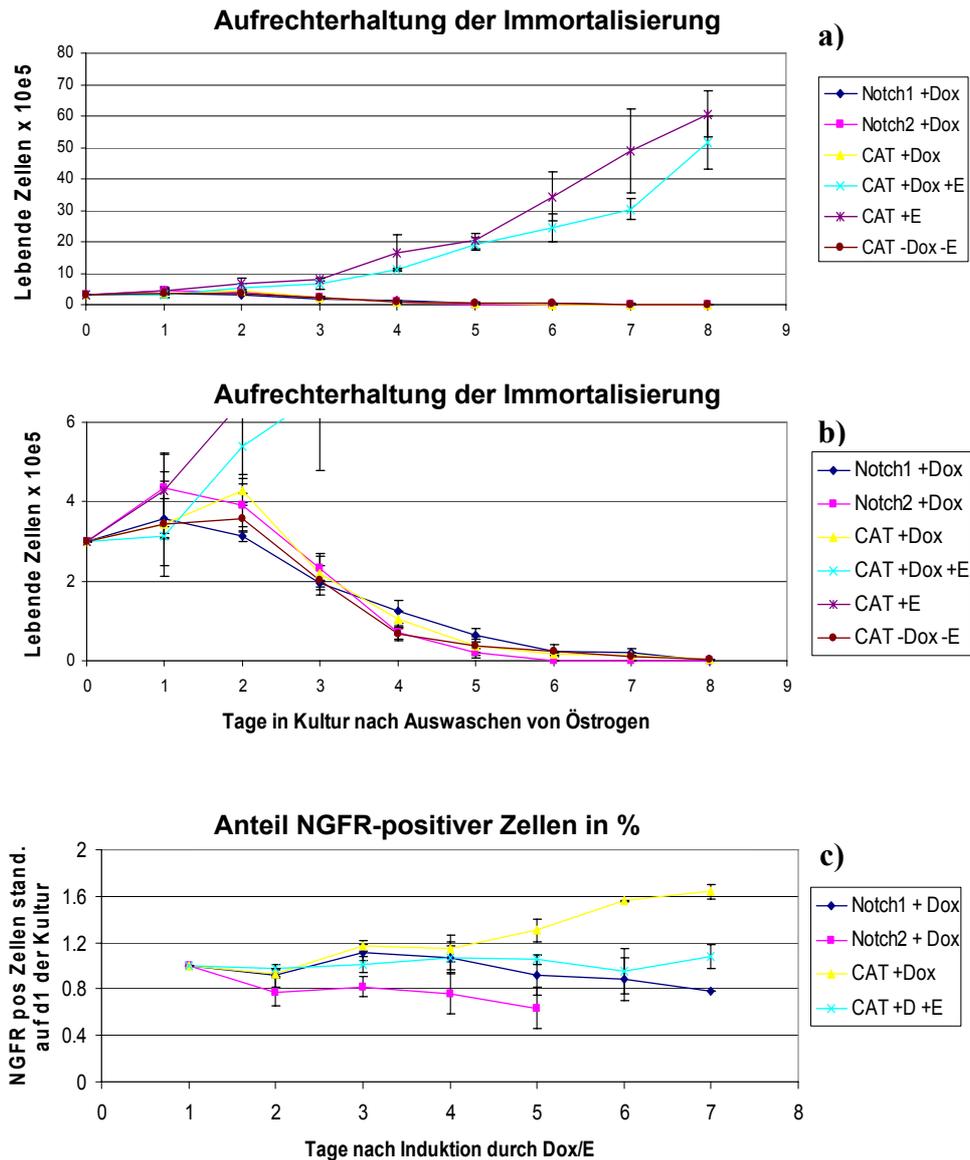


Abb. 3.24 Aufrechterhaltung der Immortalisierung

Die Aufrechterhaltung der Immortalisierung in Notch1IC-, Notch2IC-, CAT- und EBNA2-exprimierenden EREB2-5 Zellen wurde bestimmt, indem täglich über acht Tage nach Auswaschen von Östrogen die Anzahl lebender Zellen bestimmt wurde. **a)** Die Graphik zeigt, dass nur Zellen, die EBNA2 (CAT+E) oder EBNA2 und CAT (CAT+Dox+E) exprimieren, deutlich proliferieren. Notch1IC (Notch1+Dox)-, Notch2IC (Notch2+Dox)- und CAT (CAT+Dox)-exprimierende Zellen sowie Zellen, die weder CAT noch EBNA2 (CAT-Dox-E) exprimierten, zeigen keine Zunahme der Zellzahl. **b)** Die veränderte Skalierung der Y-Achse verdeutlicht die Abnahme an lebenden Zellen in Notch1IC-, Notch2IC- und CAT-exprimierenden Zellen sowie in Zellen, die weder CAT noch EBNA2 exprimieren. **c)** Der Anteil NGFR-positiver Zellen an der Gesamtzahl der lebenden Zellen, der dem Anteil Notch1IC-, Notch2IC- und CAT-exprimierender Zellen entspricht, wurde mittels FACS-Analyse täglich bestimmt und auf Tag 1 standardisiert, da die Population schon zu Beginn unterschiedliche Anteile an NGFR-positiven Zellen aufwies. Es wurden nur Werte ermittelt, wenn mindestens 2 % der Zellen der Kultur vital waren. Dox (Doxycyclin), E (engl. Estrogen, Östrogen).

Um zu untersuchen, ob die Abnahme der lebenden Zellen in Notch1IC-exprimierenden Zellen auf verstärkte Apoptose oder fehlende Proliferation zurückzuführen ist, wurde das Proliferationsverhalten Notch1IC-exprimierender B-Zellen und EBNA2-exprimierender B-Zellen durch BrdU (Bromdesoxy-Uridin)-Experimente näher untersucht und miteinander verglichen. Hierbei wurde zusätzlich unterschieden, ob Notch die Proliferation erhalten kann oder induzieren kann.

Um zu analysieren, ob Notch1IC bzw. Notch2IC in Abwesenheit von EBNA2 die Proliferation aufrecht erhalten kann, wurden Notch1IC- und Notch2IC- transgenen EREB2-5 Zellen Östrogen entzogen und am gleichen Tag die Expression der Transgene durch Zugabe von Doxycyclin bzw. Östrogen induziert. Als Kontrollen wurden CAT-exprimierende Zellen, CAT/EBNA2-exprimierende Zellen und solche, in denen weder CAT noch EBNA2 exprimiert wurde, mitgeführt. Nach drei Tagen wurden die Zellen vier Stunden mit BrdU inkubiert und der BrdU Einbau in Notch1IC bzw. CAT-exprimierenden Zellen in der An- bzw. Abwesenheit von EBNA2 durch Ko-Färbung mit gegen BrdU und NGFR gerichteten Antikörpern mittels der FACS Analyse bestimmt.

Die Zugabe von Östrogen und damit die Aktivierung von EBNA2 und des gesamten EBV-Programms führte zum Einbau von BrdU in ca. 11 bis 13 % der Zellen (Abb. 3.25a). Im Gegensatz dazu konnten in Abwesenheit von EBNA2 nur 2,1 % der Notch1IC- und 0,8 % der Notch2IC-exprimierenden Zellen als BrdU-positiv detektiert werden. Der Anteil der BrdU-positiven Zellen in der Negativ-Kontrolle CAT lag in Anwesenheit von Doxycyclin bei 0,3 % und in Abwesenheit von Doxycyclin bei 0,7 %. Dies bedeutet, dass weder Notch1IC noch Notch2IC fähig sind die EBNA2-vermittelte Proliferation aufrecht zu erhalten, wobei sich unter Notch1IC-exprimierenden Zellen minimal mehr Zellen in der S-Phase befanden als in Notch2IC-exprimierenden Zellen und in der Negativkontrolle CAT.

Um zu untersuchen, ob Notch1IC fähig ist, die Proliferation in Abwesenheit von Östrogen zu induzieren, wurde den Zellen zwei Tage Östrogen entzogen. Am Tag 2 wurde die Expression der Transgene durch Zugabe von Doxycyclin bzw. Östrogen induziert. 24h nach Induktion wurden die Zellen für vier Stunden mit BrdU inkubiert und anschließend durch FACS wie oben beschrieben analysiert.

Während die Zugabe von Östrogen und somit die Aktivierung von EBNA2 in 25 % der Zellen in Abwesenheit von Doxycyclin und in 26 % der Zellen in Anwesenheit von Doxycyclin zum Einbau von BrdU führten, konnten in Abwesenheit von EBNA2 in Notch1IC-exprimierenden Zellen nur 2,2 % und in Notch2IC-exprimierenden Zellen nur 0,8 % BrdU-positive Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.25b). Die Notch2IC-exprimierenden

Zellen unterschieden sich somit nur wenig vom Anteil der BrdU-positiven Zellen in der Negativ-Kontrolle CAT in der in Anwesenheit von Doxycyclin 0,3 % und in Abwesenheit von Doxycyclin 0,7 % BrdU-positive Zellen nachgewiesen werden konnten.

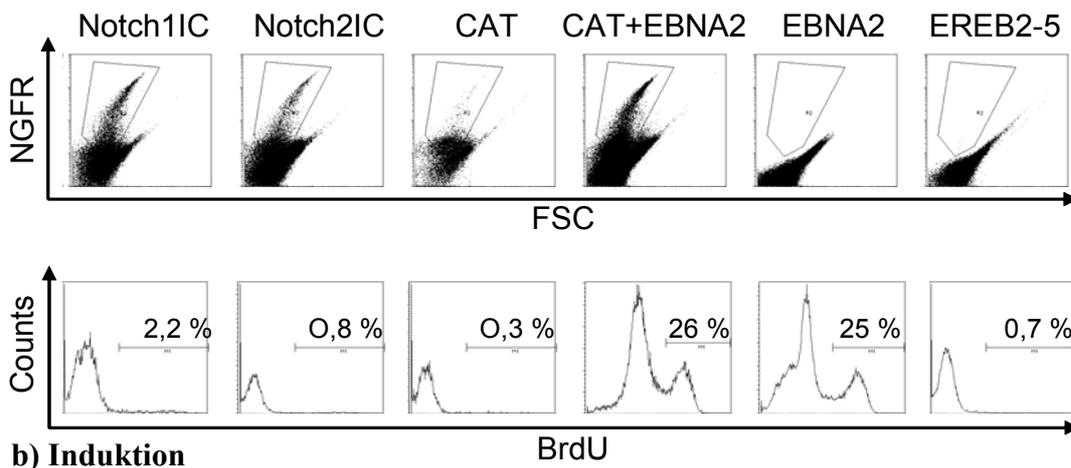
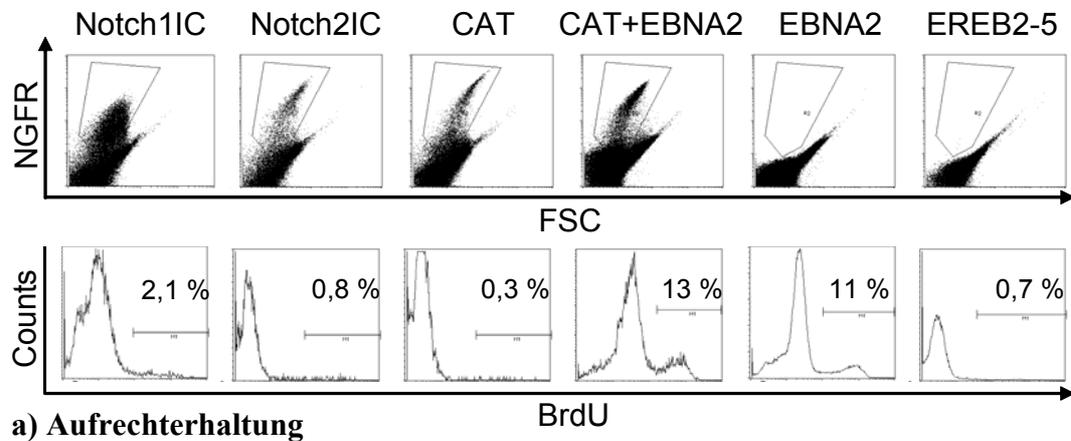


Abb. 3.25 Untersuchungen zur Proliferation mittels BrdU-Einbau

Der Einbau von BrdU (Bromdesoxy-Uridin) in neu synthetisierte DNA bei der Replikation von Zellen gibt den Anteil proliferierender Zellen einer Population an, die während der Zugabe von BrdU (Dauer 4h) die S-Phase durchlaufen haben. Die jeweils obere Färbung (NGFR/FSC) zeigt die ausgewählte Population, die für die Auswertung BrdU-positiver Zellen in der unteren Reihe herangezogen wurde. Populationen, die nur EBNA2 oder kein Transgen exprimieren wurden ohne Einschränkung für die Auswertung BrdU-positiver Zellen verwendet, da sie keinen NGFR exprimieren. **a)** Zur Untersuchung der Aufrechterhaltung der Proliferation in EREB2-5 Zellen, wurde diesen Östrogen und somit aktives EBNA2 entzogen und am gleichen Tag Notch1IC, Notch2IC, CAT, CAT+EBNA2, EBNA2 oder kein Transgen (EREB2-5) induziert. Nur in Populationen, die über aktives EBNA2 verfügen, wird in 11 % bis 13 % BrdU eingebaut. Die Einbaurate von BrdU in Notch1IC-exprimierende Zellen liegt mit 2,1 % etwas höher als in den restlichen Kulturen. **b)** Zur Untersuchung der Induktion der Proliferation wurde den Zellen für zwei Tage aktives EBNA2 entzogen, anschließend die jeweiligen Transgene für 24h induziert und dann mit BrdU für 4h inkubiert. Nur in Kulturen, die über aktives EBNA2 verfügen, wird in 25 % bis 26 % der Zellen BrdU eingebaut, in Notch1IC-exprimierenden Kulturen 2,2 % und in allen anderen maximal 0,8 %. FSC (Forward Scatter).

Diese Ergebnisse zeigen, dass im Vergleich zu EBNA2 weder Notch1IC noch Notch2IC einen proliferativen Effekt in EBV-immortalisierten B-Zellen hat. Allerdings bestand zwischen Notch1IC und Notch2IC ein geringer qualitativer Unterschied bezüglich der Fähigkeit, die Proliferation EBV-immortalisierter Zellen zu induzieren bzw. zu erhalten. So

wurden in der Notch1IC-transfizierten Linie nach Östrogenentzug etwas länger lebendige Zellen nachgewiesen als in Notch2IC-exprimierenden Zellen. Zudem konnte in Notch1IC-exprimierenden Zellen ein etwas höherer BrdU-Einbau detektiert werden. Ob sich dieses Ergebnis auch in der Expression bzw. Modifikation proliferations-relevanter Gene wie PCNA, c-MYC und LMP1 und der Phosphorylierung von RB widerspiegelt, wurde im Folgenden bestimmt.

3.6.3 Die Expression bzw. Modifikation proliferations-relevanter Gene

Für den Nachweis proliferations-assoziiierter Proteine im Western-Blot wurde den Zellen für drei Tage Östrogen entzogen und anschließend die Expression der Transgene durch Zugabe von Doxycyclin bzw. Östrogen für verschiedene Zeiträume induziert. Da für die Expression von Notch1IC, Notch2IC und CAT sowohl die RNA als auch die Proteine synthetisiert werden müssen und dieses ca. vier Stunden dauert, wurden die Zeitpunkte 0h, 8h, 10h und 24h gewählt. EBNA2 liegt bereits als inaktives Protein in der Zelle vor und kann durch Zugabe von Östrogen sofort aktiviert werden. Deshalb wurden hier die entsprechenden Zeitpunkte 0h, 4h, 6h und 24h und zusätzlich 8h gewählt. Um Auswirkungen von Doxycyclin auf die EBNA2-induzierte Expression Proliferations-assoziiierter Gene untersuchen zu können, wurde auch eine Kinetik für EBNA2/CAT-exprimierende Zellen erstellt. Damit der durch Doxycyclin aktivierte Transaktivator genau wie in NotchIC-exprimierenden Zellen die Transkription beeinflussen konnte, bevor das Transgen exprimiert wurde, wurde Doxycyclin jeweils vier Stunden vor Zugabe von Östrogen zugegeben. Als Positiv-Kontrollen wurden Proteinextrakte aus proliferierenden CAT-transgenen EBNA2-exprimierenden Zellen in der An- und Abwesenheit von Doxycyclin hergestellt. Nach Zugabe von Doxycyclin wurden die NGFR-positiven Zellen über MACS gereinigt. Die Reinheit der verwendeten Zellen für die Herstellung der Proteinextrakte betrug 87 % bis 98 % (Daten nicht gezeigt).

3.6.3.1 NotchIC führt im Gegensatz zu EBNA2 nicht zur Induktion von PCNA

Die Bestimmung der Expression von PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) eignet sich, um eine beginnende Proliferation zu detektieren. Während PCNA in komplett arretierten Zellen nur schwach exprimiert wird, wird es mit Einsetzen der Proliferation hochreguliert. PCNA ist in die Kontrolle der DNA-Replikation involviert, indem es die Prozessierbarkeit der DNA-Polymerase δ während der Elongation des Leitstrangs verbessert. Zusätzlich ist es in die DNA-Reparatur involviert (Knippers 2006).

PCNA konnte unter allen Versuchsbedingungen detektiert werden, aber nur in Zellen, in denen EBNA2 exprimiert wurde, konnte eine deutliche Zunahme der PCNA-Expression

nachgewiesen werden (Abb. 3.26a). Die Expression von NotchIC konnte dagegen keine deutliche Verstärkung der PCNA-Expression induzieren. Anhand der Chip-Daten konnte auf RNA-Ebene eine leichte Induktion der PCNA-Menge durch Notch1IC und Notch2IC festgestellt werden (Abb. 3.26b). Diese war mit dem Faktor 3 nach 24h für Notch1IC leicht höher als für Notch2IC mit einer 1,6-fachen Induktion. EBNA2 dagegen führte nach 24h zu einer achtfachen Induktion von PCNA. NotchIC kann also auf transkriptioneller Ebene die Expression von PCNA leicht beeinflussen, was aber nicht zwingend zu einer erhöhten Proteinexpression führt.

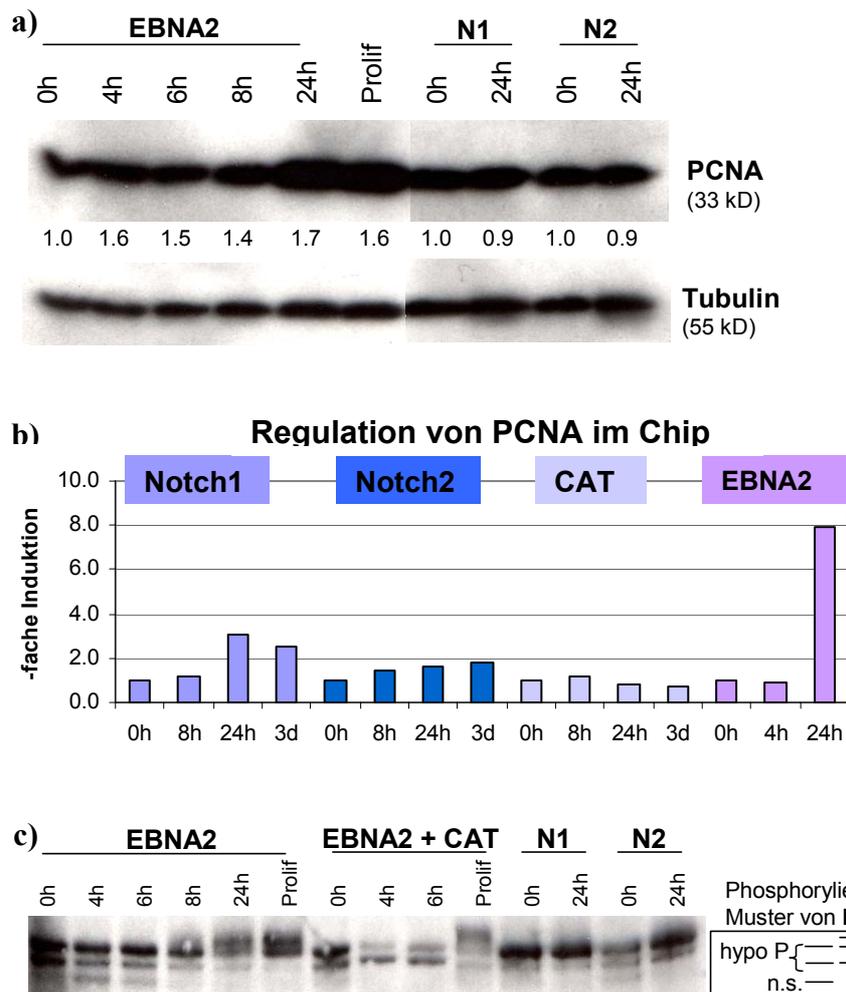


Abb. 3.26 Die Regulation von PCNA auf Protein- und RNA-Ebene sowie die Phosphorylierung von Rb
 PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) wird in arretierten Zellen schwach exprimiert und mit Beginn der Proliferation induziert. Proliferierende Zellen werden hyperphosphoryliert. Den Zellen wurde für 3d Östrogen entzogen und anschließend wurde die Expression bzw. die Aktivität von NotchIC, CAT und EBNA2 durch Zugabe von Doxycyclin bzw. Östrogen induziert. Als Positivkontrolle wurden proliferierende EREB2-5 Zellen verwendet. **a)** Der Western-Blot zeigt, dass PCNA in Zellen, die aktives EBNA2 exprimieren, induziert wird, während in allen anderen Zellen keine oder nur eine sehr schwache Induktion zu verzeichnen ist. Die Expression von PCNA wurde auf die Expression von Tubulin standardisiert. Die Zahlen geben die x-fache Induktion bezogen auf den 0h-Wert der jeweiligen Kinetik an. **b)** Die Regulation von PCNA auf RNA-Ebene wurde anhand der MAS5.0 generierten Chip-Daten ermittelt. In Notch1IC- und Notch2IC-exprimierenden Zellen zeigt sich eine schwache Induktion nach 24h, während in CAT-exprimierenden Zellen keine Induktion zu verzeichnen ist. EBNA2 dagegen induziert nach 24h einen ca. achtfachen Anstieg der PCNA-mRNA Mengen nach 24h. **c)** Hyperphosphoryliertes Rb-Protein kann in EBNA2-exprimierenden und in proliferierenden Zellen nachgewiesen werden, nicht jedoch in Notch1IC- oder Notch2IC-exprimierenden Zellen. N1 (Notch1IC), N2 (Notch2IC), CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase).

3.6.3.2 Notch-Expression führt nicht zur Hyperphosphorylierung von Rb

Das Rb (Retinoblastoma-Tumorsuppressor)-Protein liegt in verschiedenen Zuständen der Zelle in unterschiedlichen Phosphorylierungsstufen vor. In arretierten Zellen ist es hypo- und in proliferierenden Zellen hyperphosphoryliert. Mit Hilfe der Western-Blot-Technik konnte gezeigt werden, dass nur EBNA2-exprimierende Zellen nach 24h und proliferierende Zellen hyperphosphoryliertes Rb aufweisen (Abb. 3.26c). Weder Notch1IC noch Notch2IC waren in der Lage eine Hyperphosphorylierung herbeizuführen und zeigten nur hypophosphoryliertes Rb. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass weder Notch1IC noch Notch2IC in EREB2-5 Zellen Proliferation induzieren können und somit EBNA2 ersetzen können.

3.6.3.3 Der Transkriptionsfaktor c-MYC und das virale Protein LMP1 werden durch Notch nur unzureichend aktiviert

Die Expression des viralen Proteins LMP1 und des Transkriptionsfaktors c-MYC sind essentiell für die Proliferation EBV-transformierter B-Zellen. Deshalb wurde untersucht, ob Notch1IC und Notch2IC genau wie EBNA2 fähig sind, c-MYC und LMP1 zu induzieren.

Die Expression von LMP1 wurde mittels quantitativer RT-PCR ermittelt, da LMP1 als virales Gen nicht auf dem HGU133 Plus2.0 Chip repräsentiert war (Abb. 3.27b). Notch1IC induzierte LMP1 nach 8h dreifach und nach 24h 25-fach. Notch2IC induzierte die Expression von LMP1 nach 8h vierfach, nach 24h siebenfach. Die stärkste durch Notch2IC induzierte Hochregulierung (26-fach) erfolgte unter ständiger Notch2IC-Expression. EBNA2 dagegen bewirkte bereits nach 4h eine 850-fache Induktion, die nach 24h (140-fach) bereits geringer wurde und in proliferierenden EREB2-5 Zellen noch zehnfach über dem Ausgangsniveau lag. NotchIC kann also auf RNA-Ebene die starke Expression von LMP1, die nach der Re-Induktion von EBNA2 entsteht, nicht verursachen, jedoch induziert NotchIC LMP1 auf dasselbe Niveau wie es in proliferierenden B-Zellen vorliegt. Die Protein-Expression von LMP1 wurde mittels Western-Blot nachgewiesen (Abb. 3.27a). In EBNA2-exprimierenden Zellen konnte für LMP1 nach 6h ein extrem starkes Signal detektiert werden, das in proliferierenden Zellen deutlich schwächer war. In Notch1IC- und Notch2IC-exprimierenden Zellen konnte entsprechend der RNA-Analysen nach 24h nur ein extrem schwaches LMP1-Signal detektiert werden. Auch auf Protein-Ebene ist also weder Notch1IC noch Notch2IC fähig, LMP1 so stark wie EBNA2 zu induzieren.

Da c-MYC durch Notch1IC zwar differentiell exprimiert wurde, aber maximal 1,1-fach reguliert war und in der Chip-Analyse Notch2IC-regulierter Gene gar nicht detektiert wurde, wurde die Expression auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR analysiert (Abb. 3.28b).

Notch1IC konnte c-MYC dabei maximal fünffach nach 24h induzieren, Notch2IC lediglich zweifach. EBNA2 dagegen induzierte bereits nach 4h eine fast 90-fache Hochregulierung der c-MYC RNA. Im Western-Blot konnte eine EBNA2-induzierte Induktion von c-MYC ebenfalls bereits nach 4h deutlich detektiert werden (Abb. 3.28a). Ähnlich wie bei LMP1 nimmt auch hier die Expression wieder ab und erreicht nach 24h bzw. in proliferierenden Zellen einen relativ niedrigen Level, der aber noch über dem 0h-Wert liegt. Notch1IC und Notch2IC dagegen sind weder nach 8h noch nach 10h fähig die Expression von c-MYC zu induzieren. Erst nach 24h ist ein schwaches Signal detektierbar, das nach der Induktion von Notch1IC etwas stärker als von Notch2IC ist und dem c-Myc-Signal in proliferierenden Zellen recht ähnlich ist.

Sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene zeigte sich deutlich, dass NotchIC zwar eine leichte Induktion von c-MYC und LMP1 bewirken kann, diese aber um ein vielfaches schwächer ist, als die Induktion durch EBNA2. Notch1IC konnte dabei c-MYC und LMP1 etwas stärker induzieren als Notch2IC. Die durch NotchIC induzierte Menge von c-MYC und LMP1 ist zudem etwas niedriger als die in proliferierenden Zellen und scheint nicht ausreichend zu sein, um die Proliferation zu induzieren.

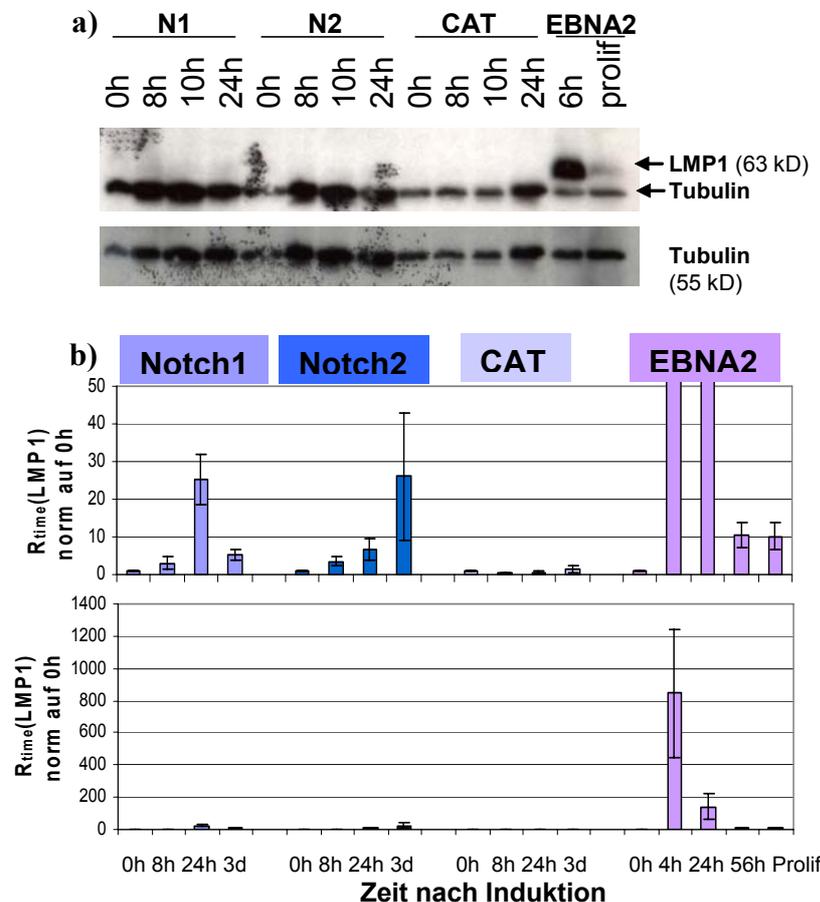


Abb. 3.27 Die Regulation von LMP1

Die Expression von LMP1 wurde auf Protein-Ebene und auf RNA-Ebene (qRT-PCR) bestimmt. Den Zellen wurde für 3d Östrogen entzogen und anschließend wurde die Expression von Notch1IC, Notch2IC, CAT und EBNA2 durch Zugabe von Doxycyclin bzw. Östrogen für die angegebenen Zeiträume induziert. **a)** LMP1 wird nur in Zellen exprimiert, die über aktives EBNA2 verfügen. Der 0h-Wert der EBNA2-Kinetik entspricht dem 0h-Wert der CAT-Kinetik, da in ein und derselben Zelle CAT und EBNA2 unabhängig voneinander aktiviert werden können. **b)** Die mRNA Mengen von LMP1 wurden auf die mRNA des ribosomalen Protein L23a standardisiert und auf den 0h-Wert normalisiert. LMP1 wird durch alle drei Transgene induziert. Eine andere Skalierung der Y-Achse zeigt, dass diese Induktion wesentlich schwächer ist als die Induktion durch EBNA2. Die Expressionsstärke in proliferierenden (prolif) Zellen ähnelt der in Notch1IC- und Notch2IC-exprimierenden Zellen.

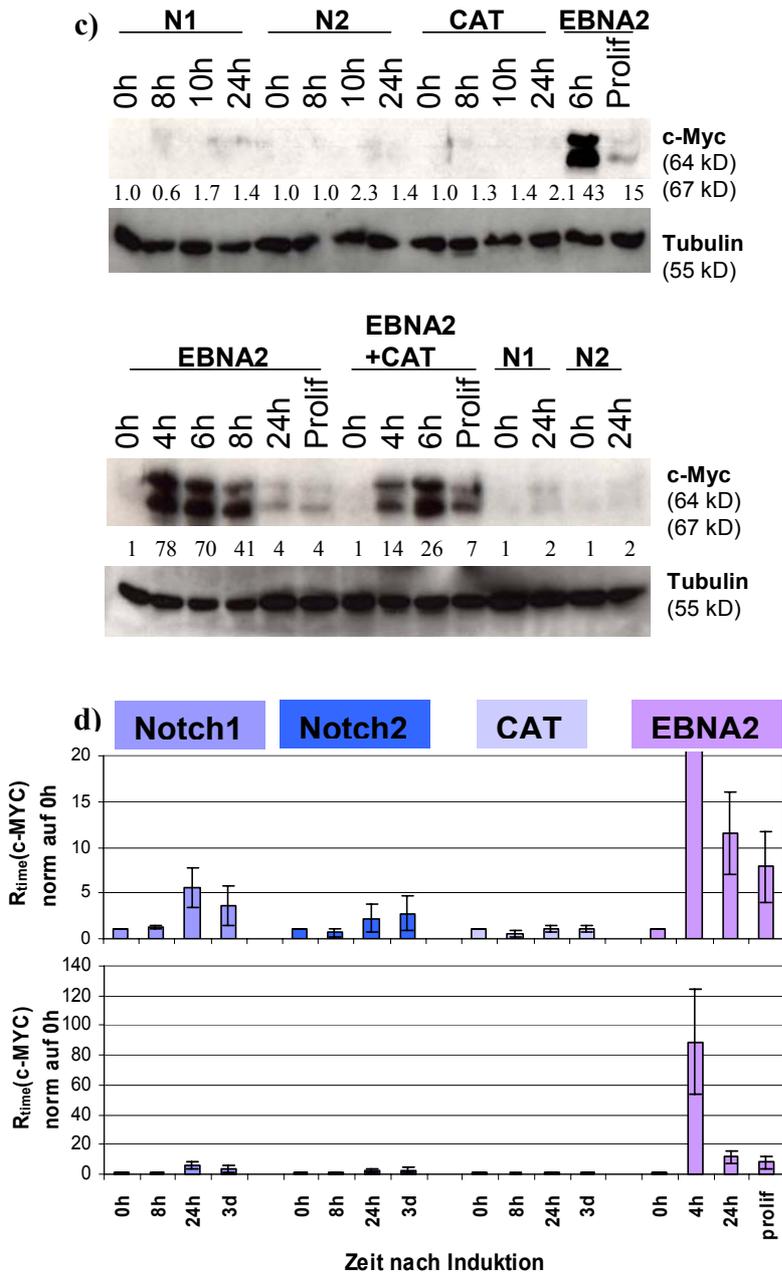


Abb. 3.28 Die Regulation von c-Myc

Die Expression von c-MYC wurde auf Protein-Ebene (im Western-Blot) und auf RNA-Ebene (mittels qRT-PCR) bestimmt. Die Zellen wurden wie in Abb. 3.28 beschrieben behandelt. **a)** c-Myc wird zu keinem Zeitpunkt durch Notch1IC, Notch2IC oder CAT so stark exprimiert wie durch EBNA2, jedoch ist die Expression nach 24h durch Notch1IC und Notch2IC ähnlich wie in proliferierenden EREB2-5 Zellen. Die Zahlen geben die x-fache Induktion der Expression standardisiert auf Tubulin and anschließend normalisiert auf den jeweiligen 0h Wert der Kinetik an. **b)** Auf RNA-Ebene wird c-MYC durch Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 induziert. Die Induktion durch EBNA2 erfolgt jedoch bereits sehr stark nach 4h, gefolgt von einer starken Abnahme der Expression nach 24h und in proliferierenden Zellen. CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase).

3.7 Der Einfluss von Notch und EBNA2 auf die Immunmodulation

Die Auswertung der Cluster-Analyse hat gezeigt, dass durch Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 Komponenten der Immunantwort differentiell reprimiert werden. Zusammengefasst unter dem Begriff der Immunmodulation ist die Signalweiterleitung durch den B-Zell-Rezeptor-Komplex, die wichtig für die B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung ist, die Regulation der Expression von Zytokinen und Chemokinen, sowie deren Rezeptoren, die die Aktivierung und das Wanderungsverhalten von B-Zellen beeinflussen und die Regulation der Expression der MHC-Komplexe, die die Antigen-Präsentation und -Prozessierung gegenüber Effektorzellen bewerkstelligen.

Es sollte näher ausgewertet werden, welche Bestandteile der komplexen Immunantwort reguliert werden, und ob alle drei Transgene diese gleichermaßen beeinflussen. Betrachtet wurden hierbei nur Gene, die nach 4h bzw. 8h, 24h oder 3d mindestens 1,5-fach reprimiert wurden. Es war bereits bekannt, dass Notch1 und EBNA2 die Expression der schweren μ -Kette des B-Zell-Rezeptors reprimieren.

Notch1IC-reprimierte Gene konnten mit relativ hohen Signifikanzen (5-4) den Funktionsgruppen „Antwort gegen andere Organismen“, „Immunantwort“, „Abwehrantwort“, „Antigen-Präsentation“ und „Antigen-Prozessierung“ zugeordnet werden. Insgesamt wurden 31 Gene diesen Funktionen zugeordnet. Aufgrund der nicht-hierarchischen Gengruppen im Programm „Gene Ontology“ konnten diese Gene auch mehreren Gruppen zugeteilt werden. In den Gruppen „Antigen-Präsentation“ und „Antigen-Prozessierung“ fanden sich ausschließlich MHCII Gene, die bereits nach 8h leicht und nach 24h und unter ständiger Notch1-Expression stärker (2- bis 10-fach) reprimiert wurden. Am stärksten wurden bereits nach 8h die Gene CD180, TLR7, TNFL10 und CXCR3 reprimiert. CD180 und TLR7 gehören zur TLR-Familie und vermitteln die angeborene Immunantwort gegen bakterielle Antigene, indem sie zur NF κ B-Aktivierung, Zytokin-Sekretion und inflammatorischer Antwort führen. Ebenso werden BCMA (TNFRSF17) und T3JAM, die den Immunglobulin-Klassenwechsel modulieren, Syntaxin7 und die Lymphozyten-Antigene Ly96 und Ly9 reprimiert, sowie CD100/SEMA4D, das in die Signalweiterleitung von BCR-Signalen eingreift (Tab. A13 im Anhang).

Unter den Notch2IC-reprimierten Genen konnten insgesamt 107 Gene den Funktionsgruppen „Antigen-Prozessierung“ und „Antigen-Präsentation“, sowie „Immunantwort“, „Abwehrantwort“ und „Antwort gegen biotischen Stimulus“ mit sehr hohen Signifikanzen (9) zugeordnet werden. In den Gruppen „Antigen-Präsentation“ und „-Prozessierung“ fanden sich wie auch bei Notch1IC MHCII Gene, die meist erst nach 24h leicht und unter ständiger Notch2IC-Expression 10- bis 1,5-fach reprimiert waren. Alleine 70 dieser 107 Gene konnten der Funktion „Antwort gegen biotischen Stimulus“ zugeteilt werden. Bereits nach 8h wurden 59 Gene mehr als 1,5-fach reprimiert. Zu diesen gehörten unter anderem die Gene CD180, CXCL10, die schwere δ -Kette des B-Zell-Rezeptors und der IL4R α 1, die 18- bis 2,3-fach reprimiert wurden. Weitere Gene, die Chemokinen und ihren Rezeptoren zugeordnet werden können und reprimiert werden, sind EDG6, CXCL10, CXCR5, CCR6 und CCR7. Aus der Gruppe der Toll-like-Rezeptoren wurden die Gene CD180, Ly96, Ly9 und TLR7 reprimiert. Zusätzlich fanden sich mit CD100/SEMA4D, CLEC4A und BCR Downstream Signalling1 Gene, die reprimiert wurden und mit der

Modulation der BCR-Signalweiterleitung in Zusammenhang stehen. Neben CD21, das durch Notch1IC und Notch2IC induziert wird, wurden die Komplement-Komponenten CD35(CR1) und CD55 durch Notch2IC reprimiert. In den Klassenwechsel involviert und durch Notch2IC reprimiert wurden der IL4R α 1 und BCMA (TNFRSF17). Syntaxin7 und das TRAF3 interagierende Protein T3JAM wurde zwar nicht der funktionellen Gruppe der Immunantwort zugeordnet, modulieren diese aber dennoch über den Transport von Lysosomen und Endosomen bzw. über die Regulation des CD40-Signals beim Klassenwechsel (Tab. A14 im Anhang).

Bei der Cluster-Analyse von Genen, die durch EBNA2 differentiell reprimiert wurden, konnten diesen Genen Funktionen wie „Antigen-Präsentation“ und „Antigen-Prozessierung“ mit einer sehr hohen Signifikanz zugeordnet werden. Vertreten waren in diesen Gruppen im Gegensatz zu Notch1IC und Notch2IC neben MHCII Genen, die nur auf Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden auch MHCI Gene, die auf allen Zellen exprimiert werden. Der funktionellen Gruppe „Immunantwort“ konnten 181 Gene zugeteilt werden, von denen 100 bereits nach 4h mindestens 1,5-fach reprimiert wurden. Zu den am stärksten regulierten Genen gehören der Chemokin-Rezeptor 1, CD24, CD180, Ig β , TLR7, die Tyrosinkinase SYK und BLNK, welches mit SYK, Ig β und BTK interagieren kann. Weitere Gene, die durch EBNA2 reprimiert wurden, waren die Komplement-Rezeptoren CD35 (CR1) und CD55, die Lymphozyten-Antigene Ly96, Ly86 und Ly9, der Toll-like-Rezeptor TLR1, die Interleukin-Rezeptoren IL4R α 1, IL13Ra1, IL3R, IL12R, IL7R und IL17R. Die reprimierten Gene CD72, CD100 (SEMA4D), CLEC4A, BCR downstream signaling 1, SLP76, SLP65 (BLNK), LCK, Ig α 1, Ig δ , Ig κ , Ig λ , sowie die Signalmoleküle Ig α (CD79A) und Ig β (CD79B) assoziieren alle mit dem BCR-Signalweg. Zusätzlich zu diesen Genen konnten einige Gene in der gesamten Liste der EBNA2-regulierten Gene identifiziert werden, die die Immunantwort beeinflussen, aber nicht anhand der „Gene Ontology“-Klassifizierung der Immunantwort zugeordnet wurden. Dazu gehören die Januskinase 1 (JAK1) und ein TRAF3 interagierendes Protein (T3JAM), die den Klassenwechsel beeinflussen können und die Fc-Rezeptoren FREB und FCRL5. EBNA2 reprimiert somit viele Gene, die in die Regulation der angeborenen Immunantwort, der Signalweiterleitung von B-Zell-Rezeptor-Signalen und dem Klassenwechsel involviert sind. NotchIC und EBNA2 regulieren viele gemeinsame Gene, allerdings wird deutlich, dass EBNA2 wesentlich mehr Gene, welche die Immunantwort modulieren, regulieren kann (Tab. A15 im Anhang).

Um die Regulation der B-Zell-Rezeptor-Komplex Komponenten (BCR) durch Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 zu verifizieren, wurden die schwere δ -Kette und die

Signalmoleküle $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ des BCR mittels quantitativer RT-PCR analysiert (Abb. 3.29). $Ig\alpha$ scheint dabei nur durch EBNA2 signifikant nach 24h auf 20 % des Ausgangsniveaus reprimiert zu sein. $Ig\beta$ wird deutlich durch alle drei Transgene früh reprimiert, wobei EBNA2 die stärkste Repression nach 4h als auch nach 24h induziert. Die Transkription von $Ig\delta$ wird deutlich durch Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 bereits nach 4h bzw. 8h reprimiert, wobei Notch2IC den stärksten frühen Effekt zeigt und $Ig\delta$ auf 40 % reprimiert. EBNA2 kann $Ig\delta$ nach 4h auf 55 % und nach 24h auf ca. 10 % reprimieren.

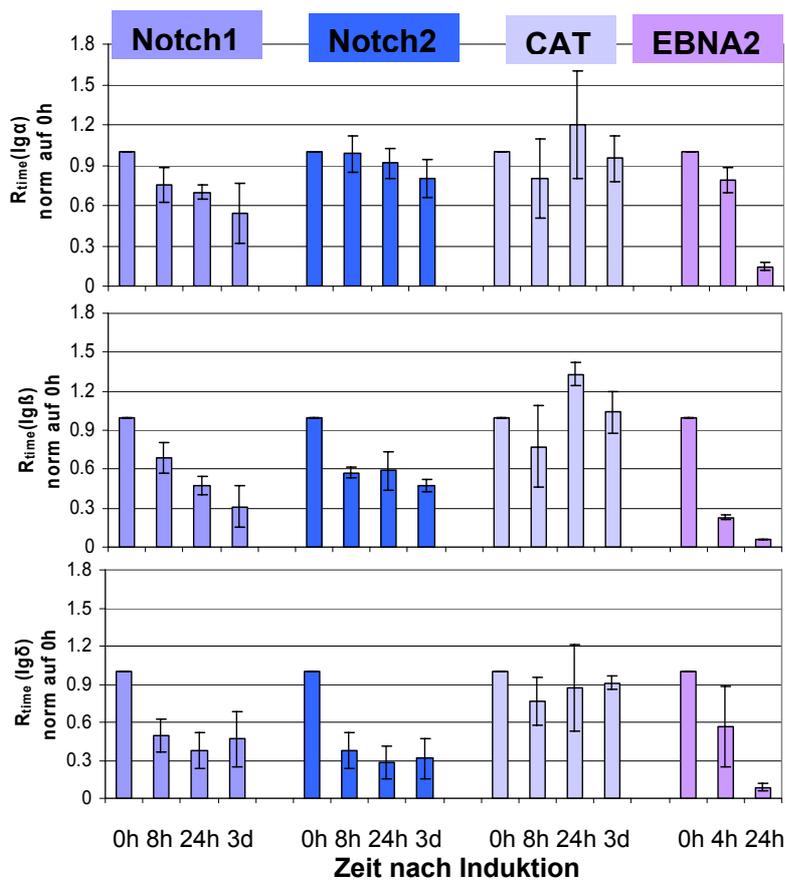


Abb. 3.29 Die Regulation von $Ig\alpha$, $Ig\beta$ und $Ig\delta$ auf RNA-Ebene

Die Regulation der Komponenten des BCR-Komplexes wurden mittels qRT-PCR verifiziert. Hierzu wurde RNA aus Zellen isoliert, denen 3d Östrogen entzogen wurde und anschließend für die angegebenen Zeiträume Doxycyclin oder Östrogen zur Induktion des Transgens zugesetzt wurde. $Ig\alpha$ wird durch Notch1IC und durch EBNA2 deutlich und durch Notch2IC schwach reprimiert. $Ig\beta$ wird deutlich durch alle drei Transgene früh reprimiert, wobei EBNA2 die stärkste Repression vermittelt. Ebenso können alle drei Transgene die Expression von $Ig\delta$ reprimieren. CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase), Ig (Immunglobulin).

3.7.1 Der Einfluss auf den Klassenwechsel

Die Chip-Analyse hat gezeigt, dass auch Interleukine und deren Rezeptoren reprimiert werden. Interessant hierbei waren besonders die Interleukin-Rezeptoren $IL4R\alpha1$ und $IL13R\alpha1$, da über diese beiden der Klassenwechsel zu IgG und IgE induziert wird. Eine Signalweiterleitung über den $IL4R$, der aus den Heterodimeren $IL4R\alpha1/IL13R\alpha1$ oder $IL4R\alpha1/\gamma c$ bestehen kann, führt zur Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT6, das an die DNA binden kann und im Zusammenspiel mit dem CD40-Signalweg die Expression

steriler C ϵ - und C γ -Transkripte induziert. Die Expression dieser wiederum ist die Voraussetzung für einen Klassenwechsel zu IgE oder IgG (Geha et al. 2003). Notch1IC und Notch2IC konnten die Expression des IL4R α 1 bereits nach 8h auf 35 % bzw. 50 % reduzieren (Abb. 3.30). IL4R α 1 könnte also ein direktes Zielgen von Notch sein. Unter ständiger Notch1IC-Expression erfährt IL4R α 1 eine Repression auf 14 %, durch Notch2 auf 22 %. Die Expression von EBNA2 führt nach 4h zu einer Repression auf 70 %, nach 24h auf 20 %. NotchIC hat somit auf die Expression des IL4R α 1 einen stärkeren Einfluss als EBNA2. Beim IL13R α 1 verhält es sich genau umgekehrt (Abb. 3.30). Zwar führen sowohl Notch1IC, Notch2IC als auch EBNA2 zu einer starken Repression, EBNA2 ist hierbei aber am potentesten und kann den IL13R α 1 auf 3 % des Ausgangsniveaus reprimieren. AID (Activation induced Cytidine Deaminase), das den Klassenwechsel positiv beeinflusst wird ebenfalls auf RNA-Ebene durch NotchIC und EBNA2 reprimiert wird (Abb. 3.30). Zusammengefasst könnte die Regulation all dieser Gene bewirken, dass Notch und EBNA2 den Klassenwechsel zu IgG und IgE verhindern oder zumindest vermindern. Eine starke Induktion von MYBL2 (auch B-MYB) könnte diesen Effekt noch unterstützen, da in Mäusen gezeigt wurde, dass Mitglieder der MYB-Familie STAT6 von der Bindungsstelle im Promotor des sterilen C ϵ -Transkripts verdrängen können und so die positive Regulation gehemmt wird. MYBL2 ist das Mitglied der MYB-Familie, das durch Notch und EBNA2 in diesem Zellsystem am deutlichsten induziert wird. Die qTR-PCR zeigte, dass Notch1IC und Notch2IC MYBL2 bereits nach 8h 3,6- bzw. 2,8-fach induzieren, während EBNA2 nur eine 1,8-fache Induktion verursacht (Abb. 3.30). Nach 24h jedoch wird MYBL2 23-fach durch EBNA2 bzw. durch das gesamte EBV-Programm induziert, durch Notch1IC 13-fach und durch Notch2IC siebenfach.

3.7.1.1 *In vitro* Experimente

Um zu testen, ob die Expression von NotchIC und EBNA2 tatsächlich den Klassenwechsel negativ beeinflussen kann, wurden die transgenen Linien unter Zugabe von 100U IL-4/mL Medium mit CD40L-exprimierenden adhären Zellen kokultiviert. Um den Einfluss von aktivem EBNA2 in Notch1IC- und Notch2IC-exprimierenden Zellen auszuschalten, wurde diesen ein Tag vor der Kokultivierung durch dreimaliges Auswaschen Östrogen entzogen. Anschließend wurde durch Zugabe von Doxycyclin die Expression von Notch1IC, Notch2IC und CAT induziert. EBNA2 wurde durch Zugabe von Östrogen in CAT/EREB-Zellen aktiviert, in denen aber kein CAT induziert wurde. Die Zellen wurden 30h nach Beginn der Kokultivierung geerntet und es wurde Gesamt-RNA isoliert und die Expression reifer IgG₁-Transkripte mittels qRT-PCR untersucht. Als zusätzliche Negativ-Kontrolle wurde die CAT-

transgene Linie in Abwesenheit von Doxycyclin verwendet. Zusätzlich wurden alle Ansätze ohne IL-4 mit der LTK-Zelllinie kokultiviert, die keinen CD40L exprimiert. Die Analyse zeigte, dass in Zellen, in denen nur CAT oder kein Transgen exprimiert wurde, reife IgG₁-Transkripte detektiert werden konnten, während Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-exprimierende Zellen keine reifen IgG₁-Transkripte aufweisen (Abb. 3.31).

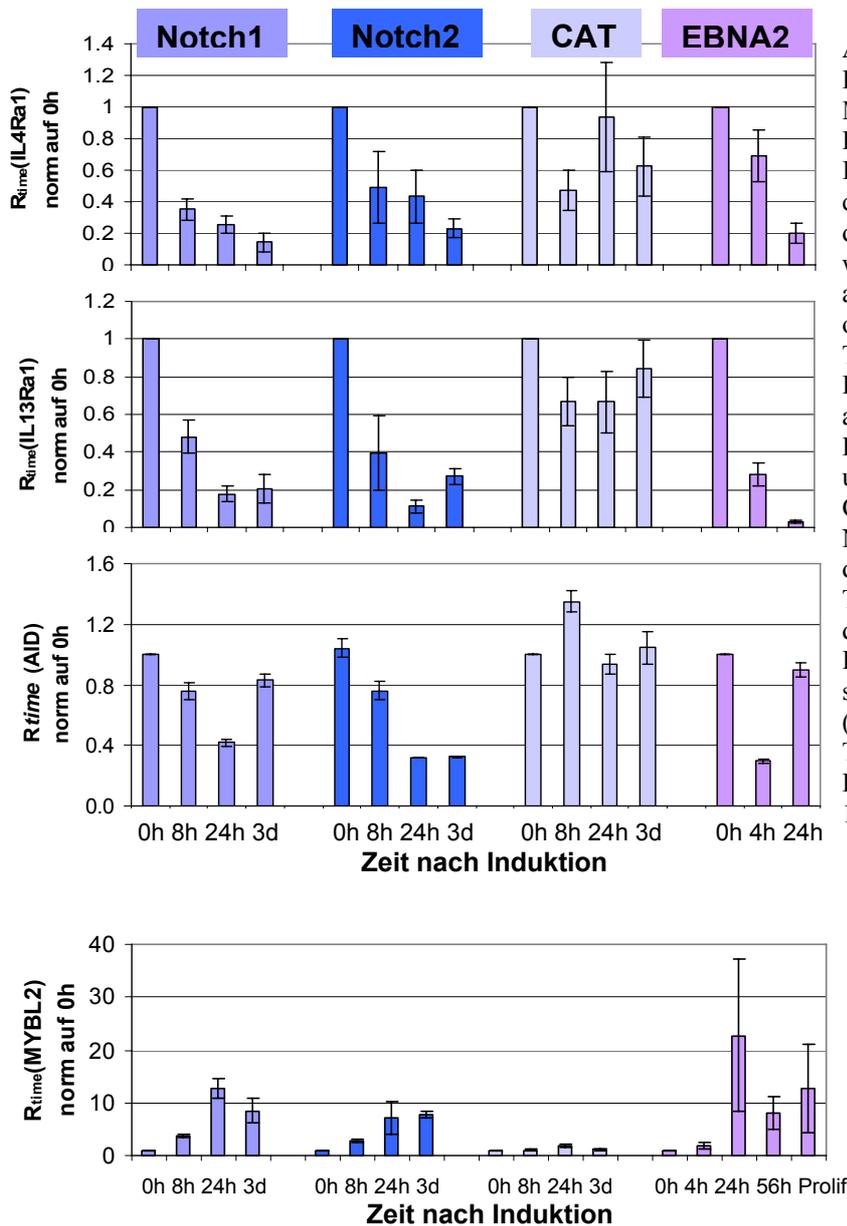


Abb. 3.30 Die Regulation von IL4Rα1, IL13Rα1, AID und MYBL2 auf RNA-Ebene

Die Expression von IL4Rα1, IL13Rα1 und MYBL2 wurde mittels qRT-PCR in Zellen verifiziert, denen für 3d Östrogen entzogen wurde und anschließend für die angegebenen Zeiträume Doxycyclin oder Östrogen zur Induktion des Transgens zugesetzt wurde. Die Expressionswerte von AID beruhen auf MAS5.0 generierten Chip-Daten. Der IL4Rα1, der IL13Rα1 und AID (Activation induced Cytidine Deaminase) werden durch Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 deutlich reprimiert. Der Transkriptionsfaktor MYBL2 wird durch Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 bereits nach 4h bzw. 8h und stärker nach 24h induziert. CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase), IL4Rα1 (Interleukin-4 Rezeptor-α1), IL13Rα (Interleukin-13 Rezeptor-α1).

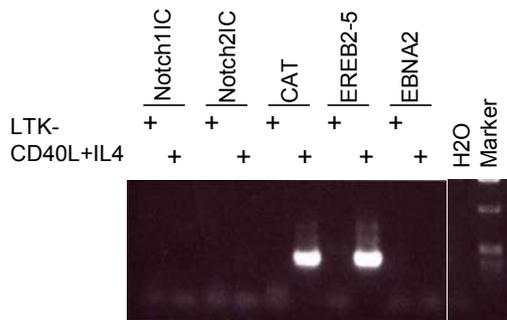


Abb.3.31 Expression reifer $C\gamma_1$ -Transkripte nach IL4- und CD40L-induziertem Klassenwechsel

Die Expression reifer $C\gamma_1$ -Transkripte in EREB2-5 Zellen in denen der Klassenwechsel durch Gabe von IL4 in Kokultur mit CD40L- (CD40 Ligand) exprimierenden Zellen, wurde mittels qRT-PCR untersucht. Als Kontrolle wurden alle Zelllinien auf LTK-Zellen ohne Zugabe von IL4 kultiviert. In Zellen, die CAT oder kein Transgen (EREB2-5) exprimieren und mit CD40L und IL4 stimuliert wurden, können reife $C\gamma_1$ -Transkripte detektiert werden, in Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-exprimierenden Zellen nicht. IL4 (Interleukin4), CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase).

3.7.1.2 *In vivo* Experimente

Der Einfluss von Notch2 auf den Klassenwechsel wurde *in vivo* in Mäusen untersucht, deren B-Zellen kein Notch2 exprimierten ($N2^{-/-}$). Diese Mäuse wurden mit NP (Nitrophenylacetyl)-gekoppeltem Antigen immunisiert und so eine T-Zell-abhängige Immunantwort induziert. Die Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung analysiert. Von diesen Mäusen wurden B-Zellen der Milz zur Analyse von Klassenwechsel-assoziierten Genen verwendet. Als Kontrolle wurden Wildtyp-Mäuse (WT) verwendet, in denen das Notch2-Gen in B-Zellen nicht deletiert war. Die Analyse von sterilen $C\epsilon$ -Transkripten mittels qRT-PCR 6d, 7d und 8d nach Immunisierung und in nicht immunisierten Mäusen zeigte, dass der Klassenwechsel zu IgE in Notch2-defizienten Mäusen deutlich verstärkt war. Während in nicht immunisierten Mäusen keine sterilen $C\epsilon$ -Transkripte nachgewiesen werden konnten, konnten diese in Notch2-defizienten Mäusen gut detektiert werden und wurden wesentlich stärker induziert als in Wildtyp-Mäusen (Abb. 3.32a). Die stärkste Expression von sterilen $C\epsilon$ -Transkripten zeigte sich nach 7d, weshalb in Abbildung 3.32b die Expression dieser in verschiedenen Mäusen dargestellt ist. Im Mittel war die Expression steriler $C\epsilon$ -Transkripte in Notch2-defizienten Mäusen ca. sechsfach höher als in Wildtyp-Mäusen. Die Untersuchung der AID-Level in diesen Mäusen zeigte, dass auch diese in Notch2-defizienten Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen leicht erhöht waren (ca. 1,5-fach) (Abb. 3.32c). Eine höhere Expression von AID und sterilen $C\epsilon$ -Transkripten in Notch2-defizienten Mäusen und die erhöhten IgE-Titer im Serum dieser Mäuse (persönliche Mitteilung Ursula Strobl) bestätigen den Einfluss von Notch auf den Klassenwechsel zu IgG bzw. IgE, der bei der Überexpression von NotchIC reprimiert und bei einer Notch2-Defizienz verstärkt wird.

Zusammenfassend betrachtet, können Notch1C und EBNA2 transkriptionell einen negativen Einfluss auf die Immunmodulation nehmen, indem sie die BCR-Expression vermindern, die Signalweiterleitung über den BCR hemmen, die Antigen-Präsentation mittels MHC-Repression vermindern, den Klassenwechsel, sowie Komponenten, die zur Induktion des Klassenwechsels notwendig sind, reprimieren und die Expression von Komponenten der angeborenen Immunantwort wie Komplement-Rezeptoren und Toll-like-Rezeptoren abschwächen.

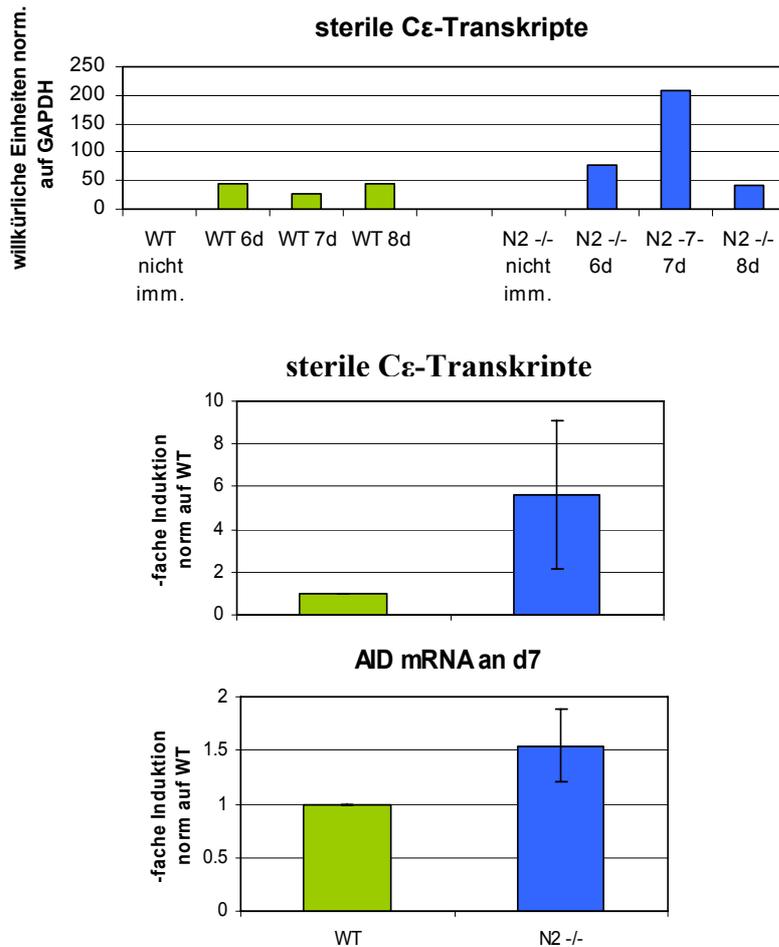


Abb. 3.32 Sterile Cε-Transkripte und AID Mengen-in der Maus

Die Expression steriler Cε-Transkripte und von AID wurde in B-Zellen Notch2-defizienter (N2^{-/-}) Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung mit einem Antigen untersucht, das eine T-Zell-abhängige Immunantwort auslöst. In N2^{-/-} Mäusen kann nach 6d und 7d mehr mRNA steriler Cε-Transkripte nachgewiesen werden, als in Wildtyp- (WT) Mäusen. In nicht immunisierten Mäusen können keine sterilen Cε-Transkripte detektiert werden. Gezeigt sind die Expressionswerte eines Versuches mit insgesamt acht Mäusen. Der Vergleich der Expression steriler Cε-Transkripte in insgesamt drei Mauspaaren zeigt, dass in N2^{-/-} Mäusen ca. sechsmal mehr mRNA steriler Cε-Transkripte vorliegt als in WT Mäusen. Die AID-Expression in N2^{-/-} Mäusen ist gegenüber WT Mäusen leicht erhöht. AID (Activation induced Cytidine Deaminase), imm. (immunisiert).

4 Diskussion

4.1 Evaluierung des Expressionssystems für aktives NotchIC in humanen B-Zellen

Um zu verstehen, welchen Einfluss Notch1 und Notch2 auf B-Zellen haben und welche Zielgene in diese Prozesse involviert sind, wurden Zielgene von Notch1IC und Notch2IC, in reifen, ruhenden B-Zellen identifiziert. Um des Weiteren die funktionelle Homologie zwischen NotchIC und EBNA2 näher zu untersuchen, wurden die Notch-Zielgene mit den EBNA2-Zielgenen verglichen. Als Zellsystem wurde das EREB2-5 System (Kempkes et al. 1995) verwendet, da es den Vorteil bietet, Zielgene in reifen humanen B-Zellen zu identifizieren, die sich in einem ruhenden Zustand befinden und die durch Aktivierung von EBNA2 mittels Östrogen wieder aktiviert werden können. Dieses reversible System von Aktivierung und Deaktivierung wurde durch Einbringen von aktivierbarem Notch1IC und Notch2IC mittels des Tetrazyklin-regulierbaren Expressionsvektors pRTS-1 erweitert, so dass Notch- und EBNA2- Zielgene im gleichen Zellsystem verglichen werden konnten.

Der pRTS-1 Vektor beinhaltet den reversen Tet-Transaktivator, der durch Zugabe von Doxycyclin aktiviert wird. Um den Einfluss von Doxycyclin und das dadurch aktivierte Tet-Transaktivator-System auf die Regulation von Genen zu überprüfen, wurde die Kontroll-Zelllinie CAT hergestellt, in der anstelle von NotchIC das Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) Gen kloniert wurde. Es ist anzunehmen, dass CAT keinen Einfluß auf den Phänotyp von B-Zellen hat. Tatsächlich führte die Zugabe von Doxycyclin nach 8h zu einer kurzfristigen Repression der Expression einiger Gene, wie z.B. CD21, IgD, Iga, Igβ, IL4Ra1, IL13Ra1 und MYBL2. Wahrscheinlich wird diese unspezifische Repression dadurch verursacht, dass der starke reverse Tet-Transaktivator über seine VP16-Transaktivierungsdomäne sehr effektiv zelluläre Ko-Aktivatoren rekrutiert, die dann zellulären Transkriptionsfaktoren, die oftmals ebenfalls wie VP16- eine saure Transaktivierungsdomäne besitzen, nicht mehr zur Expression bestimmter Gene zur Verfügung stehen. Dieser Effekt wurde aber durch zelluläre Mechanismen nach einiger Zeit ausgeglichen, so dass nach 24h keine unspezifische Repression mehr sichtbar war.

Die Funktionalität von Notch und EBNA2 in EREB-Zellen wurde durch Analyse der Regulation der bekannten Zielgene CD21 und Igu auf RNA- und Proteinebene getestet. Beide Gene wurden wie erwartet sowohl von EBNA2 als auch von Notch-IC reguliert. CD21 konnte auf RNA- und auf Proteinebene durch Notch stärker induziert werden als durch EBNA2. Bei

der Repression von I μ dagegen vermittelte EBNA2 einen stärkeren Effekt. Maier und Kollegen beschreiben, dass die Induktion von CD21 strikt CSL/RBPJ-abhängig ist, während die Repression von I μ nur teilweise CSL/RBPJ-abhängig ist (Maier et al. 2005).

4.2 Methoden zur Identifizierung und Verifizierung von Notch- und EBNA2-Zielgenen

Die Verwendung von Microarray-Chips bietet momentan die beste Möglichkeit, die Expression einer Vielzahl von Genen gleichzeitig zu untersuchen. Die verwendeten Oligo-DNA-Chips von Affymetrix, HGU 133 Plus 2.0, repräsentieren ca. 39.000 Gene, die durch ca. 55.000 Proben-Sets vertreten werden. Einige dieser so identifizierten Zielgene wurden mittels quantitativer Real Time-PCR (qRT-PCR) verifiziert. Gegenüber der klassischen Analyse der mRNA-Expression mittels Northern Blot-Analyse, bietet die qRT-PCR die Vorteile, dass sie sensitiver, reproduzierbarer und besser quantifizierbar ist und wesentlich geringere Mengen an Ausgangsmaterial eingesetzt werden können. Zur Standardisierung der ermittelten relativen Expressionswerte durch qRT-PCR wurde mit Hilfe der Chip-Daten das Gen „Humanes Ribosomales Protein L23a“ ausgewählt, da dieses Gen in EREB-Zellen sehr stark exprimiert wird und innerhalb der durchgeführten Induktions-Kinetiken die maximale Abweichung von 7 % zum Mittelwert der Expressionswerte sehr gering war. Klassische „House-keeping“ Gene, wie etwa GAPDH, Aktin oder Tubulin zeigten für diese Kinetik stärkere Schwankungen, was zeigt, dass die Standardisierung der Ergebnisse immer auf die Versuchsbedingungen optimiert werden sollte.

4.3 Expressionsmuster Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-exprimierender Zellen in der Clusteranalyse

Die ermittelten Zielgene von Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 wurden anhand eines Clusterdiagramms dargestellt. Die Clusteranalyse ermöglicht eine graphische Darstellung von Genen, die unter ähnlichen Bedingungen ähnlich reguliert werden. So können Clustern funktionelle Gengruppen zugeordnet werden. Die auffälligsten funktionellen Gruppen betrafen sowohl bei Notch1IC-, Notch2IC-, als auch EBNA2-exprimierenden Zellen die Immunmodulation und die Regulation des Zellzyklus. Bei der Bestimmung der Anzahl differentiell exprimierter Gene wurden alle Zeitpunkte einbezogen. Große Unterschiede bezüglich der funktionellen Gruppen waren zwischen den drei Transgenen nicht direkt zu erkennen. Deutlich zu erkennen war allerdings die extrem unterschiedliche Anzahl der

differentiell exprimierten Gene. So konnte Notch1IC 641, Notch2IC 1.768 Proben-Sets regulieren und EBNA2 führte zur differentiellen Expression von insgesamt 12.199 Proben-Sets. Die höhere Anzahl Notch2IC-regulierter Gene im Vergleich zu den Notch1IC-regulierten Genen könnte darauf zurück zu führen sein, dass im physiologischen Zusammenhang in reifen B-Zellen hauptsächlich Notch2 exprimiert wird. Dies könnte darauf hinweisen, dass in B-Zellen einige Gene nur über Notch2IC jedoch nicht über Notch1IC signifikant reguliert werden können.

Die ungleich höhere Zahl EBNA2-regulierter Transkripte hat sicherlich zum einen die Ursache darin, dass nach 24h auch Effekte des kompletten EBV-Programms detektiert werden und die Zellen in einen aktivierten Zustand übergegangen sind, was die Expression einer Vielzahl von Genen zur Folge hat. Zum anderen zeigen sich aber auch bereits nach 4h deutlich mehr Gene als differentiell exprimiert, als durch Notch1IC oder Notch2IC. Dies könnte daran liegen, dass EBNA2 sehr potent bereits nach 1h die Transkription des Protoonkogen c-Myc induzieren kann (Kaiser et al. 1999), welches wiederum selbst eine sehr große Anzahl an Zielgenen reguliert.

4.4 Gemeinsamkeiten im Expressionsmuster Notch1IC- und Notch2IC-exprimierender Zellen

Bei der Clusteranalyse der Gene, die durch Notch1IC und Notch2IC gemeinsam reguliert wurden, zeigte sich deutlich, dass Notch1IC-regulierte Gene oftmals früher induziert wurden als Notch2IC-regulierte Gene (Abb.3.12). Dies könnte darauf beruhen, dass Notch1IC über eine stärkere Transaktivierungsdomäne als Notch2IC verfügt (Allman et al. 2002) oder Notch1IC nach 8h höher exprimiert wird als Notch2IC.

Der Proteinnachweis von Notch1IC und Notch2IC durch Notch-spezifische Antikörper im Western-Blot zeigte, dass beide Proteine im Laufe der Kinetik (0h, 8h, 24h, 3d) verstärkt hergestellt werden. Auffällig war jedoch, dass nach 8h nahezu kein Notch2-Protein nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Gegenregulation. Transgenes Notch2IC kann zu diesem Zeitpunkt augenscheinlich noch nicht gut detektiert werden, obwohl aufgrund bereits regulierter Zielgene eine Expression auf Proteinebene vorliegen muss. Leider konnte die Expressionsstärke von Notch1IC und Notch2IC im Western-Blot nicht direkt verglichen werden, da die beiden Proteine mit zwei verschiedenen Antikörpern nachgewiesen wurden. Es wurde zwar sowohl an Notch1IC als auch an Notch2IC ein FLAG Epitop kloniert um die Proteinexpression der beiden Transgene zu vergleichen, leider konnte dies aber im Western-Blot nicht detektiert werden.

Wahrscheinlich wurde das Epitop im Kontext von Notch1IC so maskiert, dass es auch unter denaturierenden Bedingungen im Western-Blot nicht erkannt wurde. Erschwerend kam außerdem hinzu, dass in EREB2-5 Zellen Notch2 bereits exprimiert wird. Da das Heterodimer des endogenen Notch2-Rezeptors im Western-Blot auf gleicher Höhe wie das Transgen läuft, kann nach Doxycyclin-Zugabe die Induktion von Notch2IC nicht bestimmt werden. Auch mittels qRT-PCR konnte das FLAG-Epitop nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es kann also nur angenommen werden, dass Gene, die unter der Kontrolle des gleichen Promotors exprimiert werden und eine ähnliche Größe und Struktur aufweisen, auch in ähnlichen Mengen in der Zelle als funktionelle Proteine vorliegen.

Die Auswertung der Zielgene, die nach 8h mindestens 1,5-fach gemeinsam von Notch1IC und Notch2IC induziert wurden, ergaben 27 Gene. Acht dieser Gene wurden durch Notch2IC stärker als durch Notch1IC induziert, 15 stärker durch Notch1IC und vier ca. gleich stark. Die früh durch Notch1IC und Notch2IC gemeinsam induzierten Gene waren hauptsächlich mit den Gengruppen Zellzyklus und DNA-Metabolismus assoziiert. Auf die Zellzyklus-assoziierten Gene wird im Abschnitt zum Einfluss von Notch und EBNA2 auf den Zellzyklus genauer eingegangen. Unter den DNA-Metabolismus-assoziierten Genen fanden sich die Topoisomerase-II- α , Ribonucleotid-Reductase-M2-Polypeptid, eine Desoxyribonuklease, Geminin und MCM4. Auch diese Gene spielen bei der Induktion des Zellzyklus eine Rolle, da eine Zelle, die sich auf die Teilung vorbereitet die Replikations-Maschinerie aktivieren muss.

Eine weitere interessante Gengruppe, die bei dieser Auswertung auftrat, beinhaltete Gene, die bei der Entwicklung des Nervensystems eine Rolle spielen. So werden Hes1, CDK5R1, Deltex1 und ASCL1 von Notch1IC und Notch2IC gemeinsam nach 8h induziert. Deltex1 und Hes1 wurden bereits als Zielgene von Notch in B-Zellen beschrieben. Deftos und Kollegen beschrieben Deltex1 als transkriptionelles Ziel von Notch1 (Deftos et al. 2000), da es aber in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert wird, ist es möglicherweise nicht strikt Notch-abhängig (Matsuno et al. 1998). Als Zielgen von Notch kann Deltex1 Notch1-Effekte vermitteln oder verstärken aber diesen auch entgegenwirken. So kann Deltex genau wie Notch1IC den bHLH-Transkriptionsfaktor E2A in transienten Expressionsstudien inhibieren (Kishi et al. 2001; Matsuno et al. 1998; Ordentlich et al. 1998), während die Überexpression von Deltex1 in Vorläuferzellen des Knochenmarks *in vivo* und *in vitro* die B-Zellentwicklung auf Kosten der T-Zellentwicklung fördert (Deftos et al. 2000). Hierbei scheint Deltex1 Notch1-Signale zu inhibieren, indem es die Rekrutierung von p300 in den Ko-Aktivator-Komplex verhindert (Deftos et al. 2000).

Hes1 ist ein Helix-Loop-Helix-Protein, das über drei verschiedene Mechanismen als transkriptioneller Repressor agieren kann. Als Dimer kann es durch die Rekrutierung eines Ko-Repressors direkt Genexpression aktiv reprimieren, durch die Orange-Domäne seine eigene Expression inhibieren oder durch Interaktion mit dem Helix-Loop-Helix-Protein E47 ein Heterodimer bilden, in dem E47 dann nicht mehr aktiv als Transkriptionsfaktor wirken kann (Iso et al. 2003). Die retrovirale Überexpression von Hes1 in hämatopoetischen CD34+ Stammzellen führt zu einem partiellen Block in der Entwicklung zu B-Zellen (Hoebeke et al. 2006).

Während Hes1 und Deltex1 bei der T/B-Zellentscheidung gegensätzlich agieren, werden sie in sich entwickelnden Thymozyten im Thymus beide stark exprimiert und scheinen einen positiven Einfluss auf die Entwicklung von DN-Zellen über DP-Zellen zu SN-Zellen zu haben (Choi et al. 2002). Für die MZB-Differenzierung konnten Saito und Kollegen zeigen, dass Notch2-defiziente Mäuse eine stark verminderte Anzahl an Marginalzonen B-Zellen (MZB) haben und, dass Deltex1 in Abhängigkeit von Notch2 sehr hoch in MZB exprimiert wird, während Hes1 in reifen B-Zellen, in FoB und in MZB unabhängig von Notch2 gleich stark exprimiert waren. Die Autoren postulieren, dass Deltex1 möglicherweise bei der Entwicklung von MZB eine Rolle spielt (Saito et al. 2003). Auch in Zentroblasten humaner Tonsillen wird Deltex1 stark exprimiert und ist so möglicherweise in die B-Zell-Differenzierung von Keimzentren involviert (Gupta-Rossi et al. 2003). Zudem gibt es Hinweise, dass Notch1 und Notch2 über die Induktion von Hes1 und Deltex1 zumindest teilweise die Repression des B-Zell-Rezeptor-Komplexes vermitteln. So wurde postuliert, dass Notch-Signale die Aktivität des IgH-Enhancers inhibieren, indem Hes1 und Deltex1 mit dem bHLH Faktor E2A/E47 interagieren, was zu einer verminderten Expression von IgH führt (Morimura et al. 2001). Da die Regulation des IgH-Lokus jedoch über sehr viele Transkriptionsfaktoren vermittelt wird, lässt sie sich sicher nicht einzig über Deltex1 und Hes1-Aktivierung erklären.

ASCL1 (Achaete-scute Homolog 1, auch MASH1 oder HASH1 genannt), ein weiteres Helix-Loop-Helix-Protein, das in diese Gruppe fällt, spielt bei der frühen neuronalen Entwicklung und bei der Entstehung von Neuroblastomen eine Rolle. Bei beginnender Differenzierung von Neuroblasten wird ASCL1 durch Notch-induziertes Hes1 negativ reguliert und Notch1 kann so die Differenzierung inhibieren (Axelson 2004). Notch und ASCL1 werden zwar oftmals gemeinsam bei der Beschreibung der normalen und malignen neuronalen Entwicklung und der Entstehung von Lungenkrebs genannt, eine frühe, möglicherweise direkte transkriptionelle Induktion, wie in den von uns untersuchten reifen B-

Zellen ist jedoch nicht beschrieben. Ebenso ist eine Funktion von ASCL1 in B-Zellen nicht beschrieben. ASCL1 besitzt eine DNA-Bindedomäne, muss aber für eine effiziente DNA-Bindung mit anderen bHLH-Faktoren, wie z.B. E47 interagieren. Mit welchen Faktoren es in B-Zellen interagiert, ist noch unklar. Zudem ist nicht bekannt, ob es nicht auch durch seine Interaktion mit anderen bHLH-Faktoren die Expression von Genen negativ beeinflussen kann, die über eine E-Box im regulatorischen Bereich verfügen. Da ASCL1 in EREB-Zellen stark durch Notch induziert wird, stellt sich die Frage, ob ASCL1 eine physiologische Rolle in reifen B-Zellen zugeordnet werden kann, oder ob nur durch die unphysiologische Überexpression von NotchIC ASCL1 in B-Zellen induziert wird. Aus diesem Grund haben wir versucht, ASCL1 in murinen B-Zellen der Milz mittels qRT-PCR nachzuweisen. ASCL1 wurde allerdings extrem schwach exprimiert und es konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Notch2-defizienten Zellen festgestellt werden. Dies bedeutet allerdings nicht, dass ASCL1 generell nicht in B-Zellen nach Notch-Aktivierung exprimiert wird. So konnte für das bekannte Notch-Zielgen CD21 (Strobl et al. 2000) ebenfalls nicht gezeigt werden, dass es in Wildtyp- Mäusen stärker exprimiert wird als in Notch2-defizienten Mäusen. Für Hes1 gelang dies allerdings. Der Nachweis von Genen, die durch Notch2 induziert werden ist mit momentanen Techniken relativ schwierig, da B-Zellen, die gerade ein Notch-Signal erhalten haben, aus dem Gesamtpool der Milz-B-Zellen nicht isoliert werden können. Eine transgene Maus, bei der Zellen detektiert werden können, die gerade ein Notch-Signal erhalten haben, wäre an dieser Stelle notwendig.

Ein weiteres Zielgen, das sowohl durch Notch1IC als auch Notch2IC früh induziert wurde und in die Gengruppe „neuronale Entwicklung“ fiel, war CDK5R1, die regulatorische Untereinheit von CDK5. Die Expression von CDK5R1 wurde bis jetzt nur im Hirngewebe in Neuronen und in Monozyten beschrieben. Die Expression in Lymphozyten konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Der Name Cyclin Dependent Kinase 5 beschreibt das Protein nicht ganz treffend, da es nicht durch ein Cyclin aktiviert wird, sondern durch die Aktivatoren CDK5R1 (auch p35 genannt) und p39 ((Maccioni et al. 2001)). Interessanterweise akkumuliert gespaltenes p35 (p25) in den Neuronen des Gehirns von Alzheimer-Patienten und korreliert mit einer erhöhten Aktivität der CDK5. Dies führt möglicherweise zur Degeneration der Neuronen (Patrick et al. 1999). Lee und Kollegen konnten zeigen, dass die neuronale „Cdc2-like-Kinase“ Nck, die sich aus CDK5 und dem Aktivator p25 zusammensetzt, *in vivo* und *in vitro* fähig ist, Rb zu phosphorylieren (Lee et al. 1997). Es wäre interessant zu untersuchen, ob CDK5R1 in aktivierten Lymphozyten exprimiert wird und hier zusammen mit

CDK5 zur RB-Phosphorylierung und dadurch zur Proliferation von aktivierten B-Zellen beiträgt.

Gemeinsam durch Notch1IC und Notch2IC reprimiert wurden mit 55 Genen etwas mehr als induziert wurden, was zu erwarten war, da beide Transgene auch einzeln eine größere Anzahl an Genen reprimieren können. Dazu gehörten unter anderem Gene wie IL13R α 1, TNF(Ligand)10, CD180, Syntaxin und Dystonin, die mit der Plasmamembran assoziieren. Die ersten vier genannten Gene stehen ebenfalls mit der Immunmodulation in Zusammenhang und werden im Abschnitt zur Immunmodulation gesondert beschrieben. Dystonin ist ein Zytoskelett-Linker-Protein, das am stärksten im Skelettmuskel und in kultivierten Keratinozyten exprimiert wird. Es kann die Plasmamembran mit dem Zytoskelett und ebenso verschiedene Komponenten des Zytoskeletts miteinander verbinden und Membrandomänen organisieren (Roper et al. 2002). Welche Rolle dieses Gen allerdings in B-Zellen spielt, ist völlig unbekannt. Denkbar wäre, dass Dystonin über die Organisation von Membrandomänen Einfluss auf die Immunmodulation nimmt, indem es bei der Rekrutierung von Tyrosinkinase zum BCR in der Plasmamembran positiv regulierend eingreift. Da auch die anderen Gene, die gemeinsam durch Notch1IC und Notch2IC reprimiert werden und mit der Plasmamembran assoziieren, in die Immunmodulation involviert sind und oftmals Gene mit gleicher Funktion ähnlich reguliert werden, ist es durchaus möglich, dass Dystonin in B-Zellen mit der Immunmodulation in Zusammenhang steht.

Insgesamt war es auffallend, dass viele gemeinsam durch Notch1IC und Notch2IC positiv-regulierte Gene Zellzyklus-assoziiert und negativ regulierte Gene häufig in die Modulation der Immunantwort involviert sind.

4.5 Unterschiede im Expressionsmuster Notch1IC- und Notch2IC-exprimierender Zellen

Um funktionelle Unterschiede zwischen Notch1 und Notch2 in reifen B-Zellen zu untersuchen, bietet die Chip-Analyse die Möglichkeit, Gene zu identifizieren, die ausschließlich durch eins der Transgene reguliert werden. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass der verwendete Algorithmus darauf hin optimiert wurde, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren und nicht nicht-differentiell exprimierte Gene. Zudem sind die Kriterien zur Detektion signifikant regulierter Gene mit einer gewählten False Detection Rate (FDR) von $< 1\%$ sehr stringent. Die Verwendung der so generierten Daten birgt also beim Gebrauch zur Detektion von Genen, die nur durch eins der Transgene reguliert werden, die Gefahr, dass falsch positive Gene identifiziert werden. Deshalb wurden identifizierte Gene

mit den MAS5-generierten Expressionsdaten verglichen und nur solche weiter betrachtet, die nach 8h durch das eine, aber zu keinem Zeitpunkt durch das jeweils andere Transgen in gleicher Weise reguliert wurden. Somit bietet die Analyse von Genen mit der von uns gewählten Methode eine gute Möglichkeit, funktionelle Unterschiede zwischen Notch1IC und Notch2IC zu detektieren.

Für Notch1IC-induzierte Gene, die zu keinem Zeitpunkt durch Notch2IC induziert werden, konnten lediglich sechs Gene identifiziert werden. Nur ein durch Notch1IC „singulär“-induziertes Gen, BANK1, wurde bis jetzt im Zusammenhang mit B-Zellen beschrieben. BANK1 ist ein Substrat der Tyrosinkinase Lyn, die bei der Signalweiterleitung von BCR-Signalen involviert ist. BANK1 wird ausschließlich in B-Zellen, die einen funktionellen BCR haben, exprimiert (Yokoyama et al. 2002). Eine Überexpression von BANK1 führt zu einer erhöhten Calcium-Mobilisation nach einem BCR-Signal. Über diesen Weg könnte Notch1IC in die Modulation von B-Zell-Rezeptor-Signalen eingreifen. Interessanterweise wurde dieses Gen durch Notch2IC gegensätzlich reguliert, und trat in der Liste differenziell durch Notch2IC aber nicht durch Notch1IC repräsentierter Gene auf.

Ausschließlich durch Notch2IC aber nicht durch Notch1IC wurden nach 8h 15 Gene induziert. Die interessantesten Gene dieser Gruppe waren BHLHB5 und TCL1A. BHLHB5 ist ein Neuronen-spezifischer basic Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor, der zur Klasse II der bHLH-Proteine gehört (Xu et al. 2002). Seine Funktion und seine Interaktionspartner in B-Zellen sind unbekannt. Da bHLH Faktoren aber meist Hetero-Dimere mit anderen bHLH Faktoren bilden, wäre es äußerst interessant zu wissen, mit welchen Faktoren er interagiert. Möglicherweise würde dies einen Hinweis darauf geben, wie Notch die Repression von Zielgenen vermitteln könnte.

Transgene Mäuse, die TCL1A überexprimieren, stellen gute Modelle für reife humane lymphoide Erkrankungen dar, wie z.B. T-Zell Pro-Lymphozyten-Leukämie, Burkitt-like Lymphom (BLL), Diffuse-Large-B-Cell-Lymphoma (DLBCL), seltenes Follikuläres Lymphom und B-CLL (Teitell 2005). So zeigen Hoyer und Kollegen (Hoyer et al. 2002), dass transgene Mäuse, die TCL1A in B- und T-Zellen überexprimieren, bereits nach vier Monaten beginnen DLBCL und BLL zu entwickeln. Die Aktivierung prä-maligner B-Zellen dieser Mäuse durch Kreuzvernetzung des BCR führt zu einer verstärkten Proliferation und erhöht AKT-Signale, die wiederum BCR-Signale verstärken können (Hoyer et al. 2002). Bis auf den Einfluss auf AKT-Signale ist völlig unklar, wie TCL1A sein onkogenes Potential vermittelt. Ebenso unklar ist es, wie TCL1A selbst reguliert und dysreguliert wird. Man vermutet, dass in B-Zellen die Expression von TCL1A EBV-vermittelt ist (Teitell 2005). Interessanterweise

kann Notch2IC TCL1A bereits nach 8h induzieren, während die EBNA2-Expression erst nach 24h zu einem Anstieg von TCL1A führt, was eher für eine indirekte durch andere EBV-Gene vermittelte Induktion spricht. Es wurde gezeigt, dass Notch2IC, nicht aber Notch1IC in B-Zellen von Patienten mit B-CLL überexprimiert wird. Möglicherweise trägt das Notch-Signal über die Induktion von TCL1A zur Entstehung oder Aufrechterhaltung von B-CLL bei. Bislang wurden die Überexpression von TCL1A und Notch-Signale in T- und B-Zell-Lymphomen in der Literatur nicht in Zusammenhang gebracht.

Der Vergleich von Genen, die ausschließlich durch Notch1IC nach 8h reprimiert werden, jedoch durch Notch2IC zu keinem Zeitpunkt, führt zur Identifizierung von drei Proben-Sets, von denen nur PCAF eine Funktion zugeordnet werden konnte. PCAF ist eine Histon-Acetyl-Transferase, die an p300 bindet und die Transaktivierung von Genen positiv beeinflusst. Sie befindet sich auch im Ko-Aktivator-Komplex, den Notch zur Induktion von Genen rekrutiert (Kurooka and Honjo 2000). Bisher wurde nicht beschrieben, dass Notch1 fähig ist, PCAF negativ zu regulieren. Diese negative Regulation von PCAF könnte auf ein Autoregulationsmechanismus von Notch-Signalen hinweisen. Betrachtet man die Induktionskinetik von Notch1IC-regulierten Genen, so fällt tatsächlich auf, dass nach 8h und 24h ein Anstieg zu verzeichnen ist, während unter ständiger Notch-Expression die Expression oftmals nachlässt.

Ausschließlich durch Notch2IC reprimierte Gene konnten durch 62 Proben-Sets beschrieben werden. Ein Gen, das mit B-Zellen assoziiert werden konnte und ausschließlich durch Notch2IC reprimiert wurde, ist SH3BP5, ein negativer Regulator der Bruton's Tyrosinkinase (BTK), die bei der Weiterleitung von BCR-Signalen eine wichtige Rolle spielt. Eine Überexpression von SH3BP5 in B-Zellen führt zur Reduktion des BCR-Signals (Yamadori et al. 1999). Da weder Notch1IC noch Notch2IC auf transkriptioneller Ebene Einfluss auf die Transkription von BTK nehmen, wäre die Modulation eines Regulators auf transkriptioneller Ebene eine Möglichkeit, dennoch die Funktion der BTK zu beeinflussen und somit in die Regulation der Signalweiterleitung über den BCR einzugreifen.

Ausschließlich durch Notch2IC reprimiert wird auch EBI2. Hierbei handelt es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der sehr stark in EBV-infizierten Zellen exprimiert wird. Auch in EREB2-5 Zellen zeigt sich eine Induktion des Gens bereits 4h nach EBNA2-Expression. Möglicherweise arbeitet EBI2 mit einem anderen G-Protein gekoppelten Rezeptor, BILF1, der konstitutiv aktiv ist, in der Reprogrammierung der Zelle während der

EBV-Infektion zusammen (Rosenkilde et al. 2006). Zusätzlich ist EBI2 ebenso wie CCR7 (EBI1) in die Migration EBV-infizierter B-Zellen involviert (Cahir-McFarland et al. 2004). Beide Gene werden interessanterweise durch Notch2IC und EBNA2 gegensätzlich reguliert. CCR7 ist ein Chemokin-Rezeptor, der die Wanderung von Lymphozyten und Dendritischen Zellen in sekundäre lymphoide Organe und deren Rückkehr (engl. „Homing“) in die entsprechenden B- und T-Zellzonen der Follikel vermittelt (Muller and Lipp 2003). Die EBNA2-vermittelte Induktion von EBI2 und CCR7 könnte EBV-infizierten B-Zellen dazu dienen in die Follikel einzuwandern, in denen sie sich dann vermehren können. Reife B-Zellen, die ein Notch2-Signal erhalten, sollen dagegen in die Marginalzone einwandern, weshalb CCR7 und möglicherweise auch EBI2 reprimiert werden müssen. Dies würde auch erklären, weshalb Notch2-defiziente Mäuse keine MZB aber eine erhöhte Anzahl an FoB haben (persönliche Mitteilung Ursula Strobl). Ein weiteres Protein, das bei der Migration von B-Zellen in die Marginalzone unerlässlich ist, ist das Sphingosin-1-Phosphat (S1P). Mäuse, die S1P1-defizient sind, verfügen vermehrt über B-Zellen in den Follikeln aber über keine MZB mehr (Cinamon et al. 2004). Die Synthese von S1P wird durch Sphingosin-Kinasen katalysiert und die Degradation durch Sphingosin-Lyasen und spezifische Sphingosin-Phosphatasen (SGPP1 u. 2) (Le Stunff et al. 2004). Die SGPP1 wird durch Notch2IC und schwächer durch Notch1IC reprimiert, die Lyasen und Kinasen werden nicht reguliert. Notch-Signale in B-Zellen könnten also durch die Repression von Phosphatasen verhindern, dass S1P degradiert wird und so die Migration in die Marginalzone fördern. EBNA2 konnte SGPP1 zwei- bis vierfach reprimieren und induzierte SGPP2 33-fach. Somit könnte EBNA2 durch die extrem starke Induktion der SGPP2 selbst bei gleichzeitiger Repression der SGPP1 die Degradation von S1P induzieren und so dafür sorgen, dass reife B-Zellen nicht die Marginalzone einwandern, sondern in den Follikel. Notch2IC und EBNA2 könnten also die Migration von reifen B-Zellen in die Follikel und die Marginalzone gegensätzlich lenken, indem sie CCR7, EBI2 und Sphingosin-Phosphatasen unterschiedlich regulieren.

Protocadherin 9 wird durch Notch2IC extrem stark bereits nach 8h 30- bis 100-fach reprimiert, durch Notch1IC findet jedoch keine Regulation statt. Protocadherin 9 kodiert für einen Cadherin-verwandten neuronalen Rezeptor, der möglicherweise in die synaptische Transmission und in die Generation von spezifischen synaptischen Verbindungen involviert ist (Frank and Kemler 2002). Welche Funktion Protocadherin 9 allerdings in B-Zellen hat und warum dieses Gen differentiell durch Notch1IC und Notch2IC reguliert wird ist nicht bekannt. Vergleicht man die Expression von Protocadherin 9 in verschiedenen B-Zell-Lymphomen (Alizadeh et al. 2000), so zeigt sich deutlich, dass Protocadherin in B-CLL

extrem schwach exprimiert wird. Möglicherweise vermittelt das in B-CLL stark überexprimierte Notch2 diese Repression.

Die Gene PELI und CR1 werden nur durch Notch2IC nicht aber durch Notch1IC reprimiert und haben womöglich einen negativen Einfluss auf die B-Zellaktivierung. Pellino Homolog 1 (PELI) ist ein Scaffold Protein, das in die Signalweiterleitung von Interleukin-1-Signalen über den IL1R involviert ist. Es vermittelt vermutlich die Loslösung des aktivierten IRAK-TRAF6-Komplexes vom IL1R an der Membran und ermöglicht so eine Aktivierung des NFκB-Signalwegs im Zytoplasma (Jiang et al. 2003). Eine Repression von PELI1 durch Notch2IC könnte eine schwächere NFκB-Aktivierung bedeuten, was wiederum die Aktivierung von B-Zellen oder die Proliferation vermindern könnte. Ebenso könnte die Repression der Komplement-Komponente CR1/CD35 zu einer verminderten Aktivierung des Komplementsystems führen.

Notch2IC scheint mit der Repression von BCL11A, KLF3 und AID negativen Einfluss auf die Keimzentrumsreaktion nehmen zu können. BCL11A, ein Mitglied der Krüppel-like-Faktor Familie, das zusammen mit PU.1, IL7R, EBF, E2A und Pax5 eine wichtige Rolle in der frühen B-Zellentwicklung spielt (Singh et al. 2005), wird in EREB2-5 Zellen durch Notch2IC reprimiert, nicht aber durch Notch1IC. BCL11A wird in Keimzentrums-B-Zellen hoch exprimiert, welche genaue Rolle ihm dort zukommt, ist aber unbekannt. KLF3/BKLF kodiert für einen transkriptionellen Repressor, der in ruhenden naiven B-Zellen hoch exprimiert wird (Glynne et al. 2000). Eine Überexpression von BKLF in Abelson-murine Leukemia Virus transformierten 18-81 B-Zellen führt zur Induktion von somatischer Hypermutation (Kirberg et al. 2005). Über die Repression von BKLF könnte Notch2IC somatische Hypermutation im Keimzentrum negativ beeinflussen. Verstärkt wird diese Annahme dadurch, dass Notch ebenfalls fähig ist AID zu reprimieren, das für Hypermutation essentiell ist.

Insgesamt zeigt sich, dass Notch2IC zusätzlich zu den gemeinsam durch Notch1IC- und Notch2IC-regulierten Genen auf verschiedenen Wegen die Immunantwort negativ regulieren kann. So reprimiert es Genprodukte, die Bestandteil des BCR-Komplexes sind, die das Komplementsystem aktivieren, die an der Signalweiterleitung von Membranrezeptoren mitwirken, die Hypermutation induzieren und die das Migrationsverhalten von B-Zellen beeinflussen.

Zusammenfassend betrachtet lassen sich anhand der ermittelten Gene in diesem Zellsystem keine sehr großen funktionellen Unterschiede zwischen Notch1IC- und Notch2IC-regulierten Genen feststellen, es scheint jedoch, dass Notch2 in B-Zellen mehr Gene

regulieren kann als Notch1. Notch2IC kann zusätzlich zu den gemeinsam regulierten Genen weitere Gene regulieren, die aber den gleichen funktionellen Gruppen zugeordnet werden können. Es bleibt zu beachten, dass durch die Überexpression von NotchIC die Ligand-Rezeptor-Spezifität umgangen wird. Eventuell werden wesentlich mehr Gene in B-Zellen nur über Notch2 reguliert. Kraman und McCright konnten zeigen, dass es eine funktionelle Konservierung zwischen den intrazellulären Teilen von Notch1 und Notch2 gibt, obwohl sich diese in ihrer Sequenz unterscheiden. Sie tauschten den divergenten intrazellulären Teil von Notch2 gegen den entsprechenden Teil von Notch1 aus. Es handelte sich hierbei um die letzten 426 Aminosäuren des Notch2-Rezeptors, die nur zu 37 % mit denen des Notch1-Rezeptors übereinstimmten. Diese transgenen Mäuse zeigten jedoch keinen Phänotyp (Kraman and McCright 2005). Einen Hinweis auf funktionelle Unterschiede in der frühen B-Zellentwicklung bieten die Arbeiten von Radtke und Kollegen, sowie Witt und Kollegen. Demnach führt überexprimiertes Notch1IC zu einem sehr frühen Block der B-Zelldifferenzierung noch vor dem Pro-B-Zellstadium (Radtke et al. 1999), während Notch2IC die B-Zellentwicklung erst in großen Pre-B-Zellen blockiert (Witt et al. 2003). Ob diese Unterschiede zwischen Notch1IC und Notch2IC funktionellen Ursprungs sind, oder aufgrund unterschiedlicher Expressionsstärke zustande kommen, ist unklar. Einen Hinweis darauf, dass Liganden von Notch eine sehr wichtige Rolle bei der Qualität des Notch-Signals und damit der Regulation von Zielgenen spielen, liefern Untersuchungen von Besseyrias und Kollegen (Besseyrias et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Ein weiterer Hinweis für Rezeptor-Liganden Spezifität ist der Delta1 k.o., der nur zum Verlust von MZB nicht jedoch zu einem Block in der T-Zellentwicklung führt (Hozumi et al. 2004). Dies weist darauf hin, dass Notch-Rezeptoren bevorzugte Liganden haben und dass Notch1- und Notch2-Signale nach der Induktion durch gleiche Liganden eine unterschiedliche Qualität haben, was auf funktionelle Unterschiede hindeutet, die hauptsächlich durch die Interaktion mit Liganden verursacht werden.

Auch wenn die von uns durchgeführte Analyse von Notch1IC- und Notch2IC-regulierten Genen in reifen B-Zellen keine endgültige Aussage über funktionelle Unterschiede zwischen Notch1 und Notch2 zulassen, so hat sich doch deutlich gezeigt, dass Notch2IC in reifen B-Zellen eine wesentlich größere Anzahl von Genen regulieren kann. Zusätzlich zeigte sich, dass bei gemeinsam regulierten Genen Notch1IC die Induktion von Genen stärker beeinflussen kann, während Notch2IC einen stärkeren reprimierenden Effekt hat.

4.6 Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Expressionsmuster durch Notch und EBNA2

Gemeinsam durch Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 nach 8h bzw. 4h wurden mit 20 Proben-Sets nur sehr wenige Gene induziert. Dies könnte an der relativ geringen Anzahl Notch-induzierter Gene zu diesem Zeitpunkt liegen und daran, dass EBNA2 wesentlich potenter ist. Zusätzlich könnte es bedeuten, dass EBNA2 trotz des wesentlich größeren Repertoires an Zielgenen nicht in der Lage ist, alle Funktionen von Notch zu übernehmen. Die Nervensystem-assoziierten Gene HES1, CDK5R1, DTX1 und ASCL1, die schon bei Notch1IC und Notch2IC gemeinsam regulierten Genen beschrieben wurden, werden auch durch EBNA2 induziert. HES1, ASCL1 und DTX1 wurden dabei am stärksten von Notch1IC induziert und am schwächsten von EBNA2. CDK5R1 wurde dagegen von EBNA2 am stärksten induziert. Falls CDK5R1 in Kombination mit CDK5 fähig ist, in B-Zellen Rb zu phosphorylieren, so könnte die stärkere Induktion durch EBNA2 dessen positiven Einfluss auf den Zellzyklus widerspiegeln. Die gemeinsam regulierten Zellzyklus-assoziierten Gene Cyclin A2 und Geminin werden im Abschnitt „Einfluss auf den Zellzyklus“ genauer beschrieben.

Eine gemeinsame Repression durch Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 erfuhren 99 Gene. Erwartungsgemäß assoziierten die meisten dieser Gene mit der Immunantwort. Es konnten nur sehr wenige Gene identifiziert werden, die durch Notch nicht aber durch EBNA2 reguliert wurden. Unter den induzierten Genen befanden sich Zellzyklus-assoziierte Gene, den fünf reprimierten Genen konnte keine gemeinsame Funktion zugeordnet werden.

Die Anzahl der Gene, die durch Notch1IC und EBNA2 oder Notch2IC und EBNA2 reguliert werden können ist im Gegensatz dazu wesentlich höher. Dies zeigt, dass EBNA2 die Regulation von Genen übernehmen kann, die nur durch Notch1IC oder nur durch Notch2IC reguliert werden können. EBNA2 scheint somit der „universellere“ Transkriptionsfaktor zu sein. Dass Notch2IC und EBNA2 eine größere Anzahl gemeinsam regulierter Gene haben, mag daran liegen, dass beide in EREB2-5 Zellen physiologisch vorliegen und damit möglicherweise aufgrund von noch unbekanntem Hilfsfaktoren eine bessere Zugänglichkeit zur Transkription haben.

Weitere Unterschiede zwischen Notch und EBNA2 werden anhand ihrer Einflüsse auf den Zellzyklus und die Immunmodulation in den folgenden zwei Kapiteln genauer diskutiert.

4.7 Der Einfluss von Notch und EBNA2 auf den Zellzyklus

Wie im Ergebnisteil beschrieben, können Notch und EBNA2 viele Zielgene induzieren, die mit der Regulation des Zellzyklus assoziieren. Dazu gehören Gene wie Cycline und CDKs, sowie deren Modulatoren, die direkt mit der Induktion des Zellzyklus in Zusammenhang gebracht werden. Ebenso werden Gene reguliert, die mit Prozessen wie Protein-, DNA- und RNA-Metabolismus, Ribosomengenes, Replikation und DNA-Reparatur, Aufbau des Spindelapparats und weiteren assoziieren, die für eine erfolgreiche Teilung der Zelle ablaufen müssen. Der Vergleich von Notch-Zielgenen nach 8h oder 24h mit EBNA2-Zielgenen nach 4h oder 24h hat gezeigt, dass gemeinsam regulierte Gene von NotchIC und EBNA2, die mit dem Zellzyklus assoziieren, durch EBNA2 wesentlich stärker reguliert werden. Welche Gene allerdings mindestens exprimiert werden müssen und in welcher Stärke, um den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus zu induzieren, ist unklar. Klassischerweise wird das Überschreiten des Restriktionspunkt als die Voraussetzung beschrieben, die einer Zelle erlaubt, die Passage der G₁/S Transition zu vollziehen und sich zu teilen. Studien mit kultivierten Zellen haben gezeigt, dass die Passage der G₁/S Transition durch den Cyclin D/CDK4/6-Komplex reguliert wird. Als Substrat für die aktivierte CDK4 oder CDK6 dient Rb, von dem man annimmt, dass seine Phosphorylierung eine Voraussetzung für die G₁/S Transition ist (Sanchez and Dynlacht 2005).

Knockout-Studien haben aber gezeigt, dass es nicht ausschließlich lineare Beziehungen zwischen den Phasen des Zellzyklus und der Aktivität der CDKs gibt. So zeigte sich, dass die Abwesenheit von CDK4 oder CDK6 nicht die Proliferation von Fibroblasten aus Maus-Embryonen (MEF) verhindert (Malumbres et al. 2004; Tsutsui et al. 1999). Fehlen CDK4 und CDK6, so werden die Mäuse zwar geboren, sterben aber kurz nach der Geburt und haben erhebliche Defekte im hämatopoetischen System. Untersuchungen mit CDK4/CDK6^{-/-} MEFs zeigen aber, dass auch in diesen Zellen Rb phosphoryliert werden kann. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass D-Cycline in diesen Zellen CDK2 aktivieren können, die dann Rb phosphoryliert (Malumbres et al. 2004). Die Anwesenheit von CDK4 und CDK6 ist also nicht absolute Voraussetzung für die G₁/S Transition.

EBNA2 ist fähig die mit der frühen G₁-Phase assoziierten D-Cycline D1 und D2 zu induzieren, während Notch1IC erst nach 24h Cyclin D1 leicht induziert und Notch2IC dies gar nicht kann. Letztere können nach 8h lediglich die späten G₁- und S-Phase assoziierten Cycline E2 und A2 induzieren. Die Analyse von Mäusen, die defizient für D-Cycline sind, zeigt, dass selbst diese Cycline nicht essentiell für die Phosphorylierung von Rb und somit für die G₁/S Transition sind. Fibroblasten von Mäusen, die defizient für alle drei D-Cycline sind,

können normal proliferieren, brauchen aber zur Induktion einen stärkeren mitogenen Stimulus als Wildtyp-Zellen. Rekonstitutions-Experimente mit fötalen Leberzellen dieser Mäuse zeigen jedoch, dass die D-Cycline für die Entwicklung des Lymphozyten-Kompartments essentiell sind (Kozar et al. 2004). Auch wenn die Proliferation in Fibroblasten unabhängig von D-Cyclinen induziert werden kann, bleibt es fraglich, ob dies auch für die Proliferation in reifen B-Zellen wie EREB2-5 Zellen gilt. EBNA2 erfüllt mit der Induktion der D-Cycline, der Expression der CDK4 und 6, sowie der Repression des Inhibitors p27, der die Aktivität der CDK4 negativ kontrolliert, die Voraussetzung, um die G₁/S-Transition zu induzieren. Notch1IC konnte im Gegensatz zu EBNA2 diese Cycline und CDKs nur schwach oder gar nicht induzieren. Dies ist wahrscheinlich einer der Gründe, dass weder Notch1IC noch Notch2IC fähig sind, die Proliferation von EREB2-5 Zellen in gleichem Maße wie EBNA2 zu induzieren oder aufrecht zu erhalten.

Durch den Einbau von BrdU konnte gezeigt werden, dass Notch1IC in einigen wenigen Zellen die Proliferation induzieren kann. Möglicherweise reflektiert dies die Tatsache, dass Notch1IC im Gegensatz zu Notch2IC fähig ist, nach 8h die CDK6 und nach 24h leicht Cyclin D1 zu induzieren. Ob CDK6 zusätzlich erfolgreich mit den früh induzierten A- oder E-Cyclinen interagieren kann, ist aber unklar. Die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von Rb zeigt allerdings, dass weder Notch1IC noch Notch2IC im Gegensatz zu EBNA2 die Hyperphosphorylierung in einer ausreichenden Anzahl von Zellen induzieren kann.

Da bekannt ist, dass das EB-virale Protein LMP1 in EBV-infizierten B-Zellen notwendig zur G₁/S Transition (Dirmeier et al. 2005) und zur Immortalisierung ist (Kilger et al. 1998), die alleinige Expression aber nicht zur Induktion der Proliferation ausreicht (Zimmer-Strobl et al. 1996), wurde untersucht, in welchem Maße Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 die Expression von LMP1 induzieren können. Sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene konnte gezeigt werden, dass weder Notch1IC noch Notch2IC fähig sind, LMP1 auch nur annähernd so stark zu induzieren wie EBNA2. Zusätzlich wurde die Expression des Protoonkogens c-Myc untersucht, da es einen zentralen Regulator für die Koordination der Zellzyklus-Kontrolle darstellt. Die Expression von c-Myc in der humanen B-Zelllinie P493-6, die durch Einbringen von Tetracyclin-regulierbarem c-Myc in EREB2-5 Zellen generiert wurde, führt zur Hyperphosphorylierung von Rb, der Aktivierung der CDK2 und dem Eintritt in den Zellzyklus (Schuhmacher et al. 2001). Notch1IC und Notch2IC konnten im Gegensatz zu EBNA2 die Expression von c-Myc auf RNA- und auf Protein-Ebene kaum induzieren. Allerdings lagen die durch NotchIC-induzierten Proteinmengen von LMP1 und c-Myc nur

leicht unter denen in proliferierenden EREB2-5 Zellen. Möglicherweise können Notch1IC und Notch2IC also nur die extrem starke Induktion von LMP1 und c-Myc, wie sie nach der Aktivierung von EBNA2 in ruhenden EREB2-5 Zellen erreicht wird, nicht vermitteln. Dies ist besonders interessant, da Schuhmacher und Kollegen gezeigt haben, dass das Proliferationsverhalten in starkem Maße abhängig von der Menge an exprimiertem c-Myc ist. So korrelieren Proliferations-assoziierte Phänotypen wie Proliferationsrate, Zellgröße und die Expression von Zielgenen mit steigender Menge an c-Myc. Ebenso werden viele Transkriptionsfaktoren erst durch sehr hohe Mengen an c-Myc induziert, die möglicherweise den positiven Einfluss auf die Proliferation verstärken (Schuhmacher et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Die fehlende starke Induktion von c-Myc, und damit auch von dessen Zielgenen CDK4 und Cyclin D2 (Bouchard et al. 2001; Bouchard et al. 1999; Hermeking et al. 2000), Cullin1 (Coller et al. 2000; O'Hagan et al. 2000) und die Repression von p15^{INK4b} (Cyclin/CDK Inhibitor) (Gartel et al. 2001), sowie von LMP1 durch Notch1IC und Notch2IC könnten also ein Grund dafür sein, dass Notch die Proliferation weder induzieren noch aufrechterhalten kann. NotchIC kann zwar einige Zellzyklus-Gene induzieren, die vorhandene Induktion dieser Gene durch NotchIC spricht aber dafür, dass diese ohne eine hohe Expression von c-Myc und LMP1 und deren Zielgenen in EREB2-5 Zellen, nicht ausreichen, damit die Zelle die G₁/S Transition durchschreiten kann. Dass NotchIC überhaupt Zellzyklus-assoziierte Gene induzieren kann, obwohl es in diesem Zellsystem keine Proliferation induzieren kann, könnte daran liegen, dass Notch-Signale nur in der Kombination mit anderen Stimuli zur Proliferation beitragen. So könnten Notch-Signale zusammen mit CD40- und BCR-Signalen zu einer kurzfristigen Proliferation von B-Zellen bei der B-Zellaktivierung beitragen. Dies wird in Zukunft in unserem Labor untersucht werden, indem NotchIC-exprimierende Zellen mit CD40L-exprimierenden Zellen bei gleichzeitiger Kreuzvernetzung des BCR kultiviert werden.

Die von uns durchgeführte Analyse des Einflusses von Notch auf die Proliferation bestätigt die Aussage der Publikation von Höfelmayr und Kollegen, dass Notch1IC nicht fähig ist EBNA2 bezüglich der Proliferation zu ersetzen (Höfelmayr et al. 2001). Diese Ergebnisse standen im Widerspruch zu einer Studie von Gordadze und Kollegen, die zeigte, dass eine Überexpression von Notch1IC in B-Zellen die Expression der Gene LMP1 und c-Myc und die Proliferation induzieren kann (Gordadze et al. 2001). Die widersprüchlichen Ergebnisse wurden darauf zurückgeführt, dass in der Arbeit von Höfelmayr und Kollegen murines Notch1IC verwendet wurde, das nur eine Sequenzhomologie von 87 % zu humanen Notch1IC aufweist und zudem im Carboxyterminus trunkiert war. Diese Trunkierung führte

zur Deletion der PEST-Domäne, innerhalb derer später eine Transaktivierungsdomäne nachgewiesen wurde (Dumont et al. 2000). Deshalb wurde die Frage, ob Notch1IC EBNA2 bei der B-Zellimmortalisierung ersetzen kann, in dieser Arbeit nochmals neu gestellt. Die Proliferationsversuche wurden mit den neu stabil transfizierten EREB2-5 Zellen, die jetzt den kompletten intrazellulären Anteil des humanen Notch1IC bzw. Notch2IC exprimierten, wiederholt. Die Versuche zeigten, dass weder Notch1IC noch Notch2IC fähig sind, EBNA2 hinsichtlich der Proliferation in lymphoblastoiden Zelllinien zu ersetzen. Da in den stabil transfizierten Zelllinien viele Zielgene von Notch1IC und EBNA2 in gleicher Weise reguliert wurden, ist anzunehmen, dass die vergleichsweise schwache Regulation von c-Myc, LMP1 oder entsprechender Zellzyklus-assoziiierter Gene in Notch1IC-exprimierenden Zellen nicht dadurch zu erklären sind, dass die Notch1IC-Gene zu schwach exprimiert werden. Außerdem konnte sowohl Notch1IC als auch Notch2IC im Western-Blot nachgewiesen werden, was nahe legt, dass die Notch1IC-Menge bereits in unserem System über dem physiologischen Bereich liegt. Deshalb ist anzunehmen, dass Notch-Signale physiologischerweise EBNA2 in EBV-immortalisierten Zellen hinsichtlich der Proliferation nicht ersetzen können, sondern dass nur Notch1IC-Mengen, die weit über dem physiologischen Bereich liegen, EBV-infizierte Zellen in Abwesenheit von EBNA2 zur Proliferation anregen können. Unphysiologisch hohe Mengen von Notch1IC können in Tumorzellen erreicht werden und hier einen direkten Einfluss auf die Proliferation der Zellen haben. In einigen T-ALL wurde eine Translokation des Notch-Gens an den T-Zell-Rezeptor beschrieben, die zu einer konstitutiv hohen Expression von Notch1IC unter Kontrolle des T-Zellrezeptors führte (Ellisen et al. 1991; Reynolds et al. 1987). In Hodgkin-Lymphomen wurde eine Überexpression von Notch1 und Notch2 nachgewiesen. Die dadurch verstärkte Expression von Notch1IC könnte in EBV-positiven Hodgkin-Lymphomen in Kombination mit LMP1 und LMP2A zur Proliferation der Tumorzellen beitragen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob EREB-Zellen, die LMP1 und LMP2A unabhängig von EBNA2 exprimieren, durch Stimulierung des endogenen Notch2-Rezeptors zur Proliferation angeregt werden können.

4.8 Der Einfluss von Notch und EBNA2 auf die Immunmodulation

Die Auswertung Notch- und EBNA2-regulierter Gene anhand der Chip-Analyse hat gezeigt, dass Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 auf vielfältige Weise in die Regulation des Immunsystems eingreifen können. So können sie BCR-Signale modulieren, den Isotypen-Klassenwechsel reprimieren, sowie die humorale und angeborene Immunantwort auf Ebene

der Antigen-Prozessierung und -Präsentation, des Komplementsystems, der Migration von Lymphozyten und der Regulierung von Signalwegen beeinflussen.

4.8.1 B-Zell-Rezeptor-Signale

Die Stärke von BCR-Signalen spielt bei der Reifung von B-Zellen im Knochenmark und in der Peripherie eine große Rolle. Die Feinabstimmung der Signalstärke erfolgt dabei über die Modulation von Komponenten des Signalwegs, wie Kinasen und Adaptor-Proteinen. Während der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark und in der Peripherie sorgen BCR-Signale für die Passage der Kontrollpunkte. Dabei führen Mutationen oder Deletionen in Komponenten des BCR oder in signalweiterleitenden Molekülen zum spezifischen Block in verschiedenen Stadien der B-Zellentwicklung (Kurosaki 2002). Neben der B-Zellentwicklung ist auch die humorale Immunantwort stark abhängig von BCR-Signalen, da diese die B-Zellen aktivieren und diese als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) agieren können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zur bekannten Repression von $Ig\mu$ durch Notch1IC (Strobl et al. 2000) und EBNA2 (Jochner et al. 1996) auch die Komponenten des BCR, $Ig\delta$, $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ durch Notch1IC und EBNA2 reprimiert werden. Die Expression von $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ ist bereits in Pro- und Prä-B-Zellen essentiell, damit ein funktionaler BCR an der Oberfläche exprimiert werden kann und die Zelle BCR-Signale erhalten kann, die die Passage des Kontrollpunkt und somit die Reifung erlauben. Transgene Mäuse, die defizient für den zytoplasmatischen Teil des Signalmoleküls $Ig\alpha$ sind ($Ig\alpha^{\Delta c/\Delta c}$), zeigen eine dramatische Reduktion von Prä-B-Zellen (Torres et al. 1996), während $Ig\beta^{\Delta c/\Delta c}$ Mäuse erst eine Reduktion von unreifen B-Zellen zeigen (Reichlin et al. 2001). Vergleicht man diese Phänotypen mit denen Notch1IC-überexprimierender Mäuse, so könnte ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Repression von $Ig\alpha$ und $Ig\beta$, verursacht durch Notch1IC, und einem Block in frühen B-Zell-Populationen vermutet werden. Notch1IC-überexprimierende Mäuse zeigen einen frühen Block in der B-Zellentwicklung noch vor dem Pro-B-Zellstadium (Radtke et al. 1999) und Notch2IC-überexprimierende Mäuse einen Block in großen Prä-B-Zellen (Witt et al. 2003). Die Überexpression von Notch1IC und Notch2IC könnte also aufgrund der Repression von $Ig\alpha$, $Ig\beta$ und $Ig\mu$ verhindern, dass die entsprechenden BCR-Komponenten während der B-Zell-Entwicklung in ausreichender Menge an der Oberfläche exprimiert werden. Dadurch könnte verhindert werden, dass B-Zellen den Kontrollpunkt zur nächsten Reifungsstufe passieren können.

Auf reifen B-Zellen wird hauptsächlich Notch2 exprimiert (Saito et al. 2003). Notch2-Signale scheinen für die Differenzierung von transitionellen B-Zellen zu MZB wichtig zu

sein, da in Notch2-defizienten Mäusen ihre Anzahl stark vermindert ist (Saito et al. 2003) (Ursula Strobl, persönliche Mitteilung). Cariappa und Kollegen postulieren, dass die BCR-Signalstärke die Entscheidung Follikuläre B-Zellen (FoB) gegenüber MZB bestimmt (Cariappa et al. 2001). So erlaubt ein schwaches BCR-Signal die Entwicklung von MZB, während ein mittelstarkes Signal die Entwicklung zu FoB fördert. Notch2IC könnte also über eine moderate Repression von $Ig\alpha$, $Ig\beta$ und $Ig\mu$ das BCR-Signal in dem Maße abschwächen, dass die Entwicklung zu MZB erlaubt wird. Erhält eine transitionelle B-Zelle kein Notch2-Signal, so bleibt die BCR-Signalstärke so hoch, dass sich FoB entwickeln können.

Anhand der Chip-Analyse konnten außerdem Signalmoleküle identifiziert werden, über deren Regulation Notch-Signale in die Entscheidung MZB versus Follikuläre B-Zellen eingreifen könnten. So wird CD100/SEMA4D durch alle drei Transgene reprimiert. Die Bindung von CD100 an CD72, das aufgrund der Rekrutierung der Phosphatase SHP-1 an sein ITIM Motiv negativ auf die Signalweiterleitung wirkt, führt zu einer Inaktivierung von CD72 und damit zu einer positiven Regulierung des BCR-Signals. Kumanogoh und Kollegen postulieren, dass die BCR-Signalstärke maßgeblich durch das Verhältnis von CD100 und CD72 bestimmt wird. Zudem konnten sie zeigen, dass in CD100-defizienten Mäusen MZB-Zellen akkumulieren (Kumanogoh et al. 2005). Außerdem führte sowohl Notch2IC als auch EBNA2 zur Induktion von CLEC4A, das über ITIM-Motive die BCR-Signalstärke negativ reguliert, und zur Repression des Gens BCR-downstream-Signaling1, das zur positiven Verstärkung von BCR-Signalen führt. Die Modulation dieser Signalmoleküle durch Notch2IC und teilweise auch durch Notch1IC zeigen, dass Notch neben der Regulation der Membran-Komponenten des BCR auch Signalmoleküle im Zytoplasma regulieren kann und somit auf zwei Ebenen negativ BCR-Signale regulieren und so letztendlich zur MZB-Bildung beitragen könnte.

EBNA2 bzw. das gesamte EBV-Programm kann zu den genannten noch weitere Signalmoleküle wie BTK, SYK, SLP76, SLP65 und LCK, sowie die Komponenten des BCR $Ig\alpha_1$, $Ig\alpha_2$, $Ig\kappa$, $Ig\lambda$ und $Ig\gamma_1$ reprimieren. Da EBNA2 die Expression des viralen Proteins LMP2A induziert, das einen konstitutiv aktiven BCR imitiert und die gleichen intrazellulären Signalmoleküle verwendet, könnte die Repression der BCR-Komponenten und der Tyrosinkinasen durch EBNA2 dazu dienen, die Signalweiterleitung für LMP2A-Signale zu optimieren.

4.8.2 Weitere Aspekte von Notch und EBNA2 hinsichtlich der Immunmodulation

BCR-Signale spielen nicht nur bei der B-Zellentwicklung sondern auch bei der Aktivierung einer B-Zelle während der Immunantwort eine Rolle. Neben BCR-Komponenten und Signalmolekülen reprimiert NotchIC auch viele weitere Gene, die in die Immunantwort involviert sind, so dass anzunehmen ist, dass Notch-Signale einen negativen Einfluss auf die Immunantwort ausüben. So scheint nicht nur das BCR-Signal an sich, sondern auch die Antigenpräsentation über Notch-Signale negativ reguliert zu werden. Wahrscheinlich führt bereits die Repression des BCR-Signals zu einer verminderten Präsentation von Antigenen. Die Repression des Gens Syntaxin kann zusätzlich zu einem gestörten Transport von Membranmolekülen wie dem beladenen BCR in Endosomen und Lysosomen führen und somit ebenfalls die Antigenpräsentation auf MHC-Molekülen vermindern. Des Weiteren werden MHCII-Moleküle durch Notch-Signale transkriptionell reprimiert.

Ob eine B-Zelle bei der Immunantwort erfolgreich aktiviert wird, hängt nicht alleine von der Antigen-Erkennung über den BCR-Rezeptor ab. Vielmehr sind auch Signale über die Fc-Rezeptoren, Komplement-Rezeptoren und Ko-Rezeptoren wie CD21 und CD19 für den Aktivierungsgrad einer B-Zelle wichtig (Nielsen and Leslie 2002; Peaker 1994). Die EBNA2-Expression führt kurzfristig zu einer Induktion des Fc-Rezeptors CD23, der eine schwache Affinität für IgE besitzt. Nach 24h werden aber neben CD23 weitere FcRezeptoren für IgG wie CD32 und FREB, sowie FCRL5 reprimiert. Die Signalweiterleitung über diese Moleküle ist somit behindert, was das Gesamtpotential zur Aktivierung einer B-Zelle vermindert.

Außerdem können Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 TLR7, CD180 und Ly96 negativ regulieren, die die Immunantwort gegen LPS vermitteln, und die Komplement-Komponenten CD35 (CR1) und CD55. Zusätzlich führt die Repression von Ly9 zu einer verminderten Zytokinproduktion und damit Aktivierung von Effektorzellen der angeborenen Immunantwort (de la Fuente et al. 2001).

Die adaptive Immunantwort beruht auf einer präzisen räumlichen und zeitlichen Positionierung von Lymphozyten in lymphoiden und nicht-lymphoiden Geweben. Chemokine, die entweder konstitutiv oder während einer Entzündung exprimiert werden, bieten ein flexibles Navigationssystem, um Lymphozyten in spezifische Mikrokompartimente zu dirigieren. Die Präzision und Spezifität in diesem Prozess wird erreicht, indem verschiedene Chemokinrezeptoren in Abhängigkeit des Differenzierungsstatus und äußeren Signalen exprimiert werden. Notch und EBNA2 können in diesen Prozess eingreifen, wie die Regulation der Chemokinrezeptoren CCR6, CXCR5, CCR7, CXCR3, EDG6 und des

Chemokins CXCL10 zeigt. CCR7 und CXCR5 sind die Rezeptoren, die hauptsächlich die Migration von T-, B-, und Dendritischen Zellen in die sekundären lymphoiden Organe in die B- und T-Zellzonen vermitteln.

Die Identifizierung von Notch1IC- und EBNA2-Zielgenen hat gezeigt, dass sie die Immunantwort in negativer Weise und auf vielen Ebenen beeinflussen. Außerdem wird klar, dass Notch2IC über die Repression einer höheren Anzahl an Genen womöglich einen größeren Einfluss auf die Immunmodulation hat als Notch1IC. Die gezielte und moderate Repression einiger Komponenten der Immunantwort vermittelt den Eindruck, dass Notch2IC in dem Maße eingreift, dass eine Überreaktion des Immunsystems vermieden wird. EBNA2 bzw. das gesamte EBV-Programm dagegen scheinen durch die mitunter sehr starke Regulation einer extrem hohen Anzahl von Genen, die mit der Immunantwort assoziieren, eher flächendeckend als gezielt die Immunantwort zu reprimieren. Zum Beispiel reprimiert EBNA2 neben den auch von Notch1IC regulierten MHCII-Molekülen auch MHCI-Moleküle, die u.a. in die Präsentation viraler Proteine involviert sind. Außerdem wurde von EBNA2 zusätzlich die Expression mehrerer ko-stimulatorischer Moleküle wie z.B. Fc-Rezeptoren und Komplement-Rezeptoren reguliert. Möglicherweise versucht EBV, das Immunsystem auf verschiedenen Ebenen soweit zu reprimieren und kontrollieren, dass die infizierte Zelle nicht so schnell vom Immunsystem erkannt wird und sich vermehren kann, bevor EBV in den Latenzzustand übergeht.

4.8.3 Notch und EBNA2 haben einen negativen Einfluss auf den Klassenwechsel

Der Klassenwechsel in B-Zellen benötigt zwei Signale. Das erste wird normalerweise von Zytokinen geliefert und vermittelt die Transkription von spezifischen C_H-Genen (Heavy chain). Das zweite Signal wird bei einer T-Zell-abhängigen Immunisierung durch die Interaktion von CD40 mit dem CD40L auf aktivierten T-Zellen in die B-Zelle weitergeleitet (Geha et al. 2003). Notch1IC und EBNA2 können die Interleukin-Rezeptoren IL4R α 1 und IL13R α 1, die in den Klassenwechsel zu IgG und IgE involviert sind, transkriptionell reprimieren. Ein funktioneller Test hat gezeigt, dass Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 den Klassenwechsel zu IgG₁ unterdrücken können. In diesen Zellen konnten keine reifen Transkripte für IgG₁ auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Ein Nachweis für reife IgE-Transkripte konnte aufgrund von technischen Problemen nicht durchgeführt werden. Möglicherweise erlaubten die Versuchsbedingungen aber auch keinen Klassenwechsel zu IgE, da dieser extrem stark kontrolliert wird. Ob Notch1IC und EBNA2 tatsächlich den

Vorgang des Klassenwechsels zu IgG₁ unterdrücken oder lediglich die Transkription der reifen Transkripte verhindern, konnte aufgrund der RNA-Daten nicht abschließend geklärt werden. Ein Nachweis der „switched circles“, der entfernten Sequenzen zwischen der VDJ-Region und der neuen konstanten Region, könnte hier Klarheit schaffen.

Die Chip-Analyse und *in vivo* Daten von Notch2-defizienten Mäusen liefern jedoch weitere Hinweise, dass Notch und EBNA2 tatsächlich den Klassenwechsel negativ beeinflussen. Notch2-defiziente Mäuse zeigen nach T-Zell-abhängiger Immunisierung erhöhte IgE-Titer und erniedrigte IgG-Titer im Serum (persönliche Mitteilung Ursula Strobl). Ein verstärkter Klassenwechsel zu IgE könnte dadurch erklärt werden, dass in diesen Mäusen Notch2-Signale fehlen, die diesen Prozess auf transkriptioneller Ebene kontrollieren und reprimieren. Die erniedrigten IgG-Titer sind möglicherweise Folge des verstärkten Klassenwechsels zu IgE. Auch eine erhöhte Transkription von sterilen C ϵ -Transkripten in immunisierten Notch2-defizienten Mäusen deutet auf einen verstärkten Klassenwechsel zu IgE hin.

Neben den Interleukin-Rezeptoren IL4R α 1 und IL13R α 1 befanden sich in den Chip-Daten weitere Zielgene, die in die Regulation des Klassenwechsels eingreifen könnten. So kann EBNA2 die Januskinase JAK1 reprimieren, die nach IL4- oder IL13-Bindung an den Rezeptor aktiviert wird und STAT6 phosphorylieren kann. Diese Repression könnte die STAT6-Phosphorylierung und damit -Aktivierung verhindern, was zur Folge hätte, dass STAT6 nicht mehr als aktives Dimer die DNA im Promotor-Bereich des sterilen C ϵ -Gens binden kann und dessen Transkription mit induzieren kann. Auch MYBL2, das durch Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 induziert wird, könnte den Klassenwechsel negativ regulieren, indem es STAT6 von der DNA-Bindungsstelle im Promotor verdrängt. Monticelli und Kollegen konnten mithilfe eines Reporterassays zeigen, dass die Überexpression von A-Myb und c-Myb die Transkription der sterilen C ϵ -Transkripte um 70-77 % reduziert. Auch in ihrem normalen genomischen Kontext ist die Überexpression von Myb ausreichend, um eine IL4-abhängige Aktivierung des C ϵ -GL-Promotors zu reprimieren (Monticelli et al. 2002). In den Versuchen von Monticelli und Kollegen wurde der Einfluss von MYBL2 (B-Myb) nicht betrachtet; da aber alle drei Myb-Proteine redundante DNA-Erkennungssequenzen haben, ist die Spekulation zulässig, dass MYBL2 ebenso STAT6 von der überlappenden Bindungsstelle im IL4-responsiven Element des C ϵ -GL-Promotors verdrängen kann. Ein Modell, wie MYBL2 den Klassenwechsel negativ beeinflussen kann, ist in Abb. 4.1 dargestellt. Einbezogen ist hier auch die schwache Repression von PU.1, die anhand der Chip-Daten ermittelt wurde.

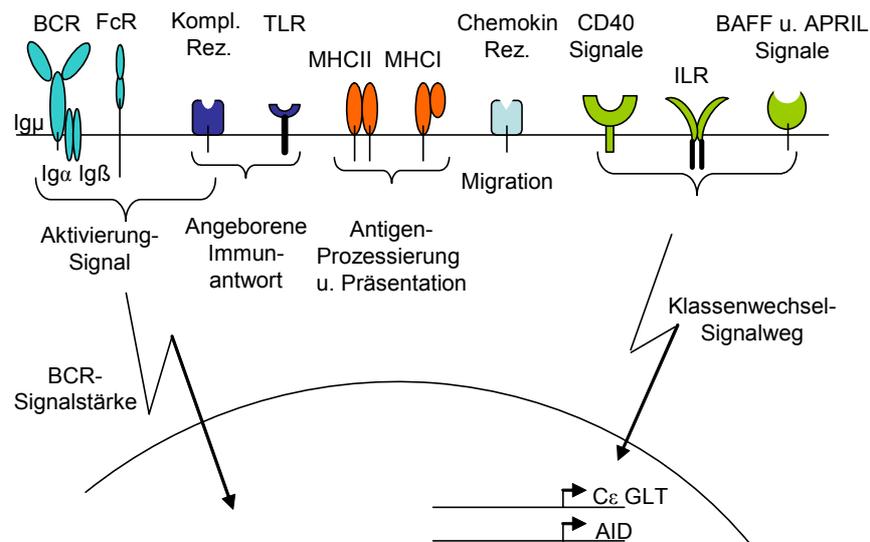


Abb. 4.2 Notch1C und EBNA2 modulieren die Immunantwort auf mehreren Ebenen

Durch die transkriptionelle Regulation von Komponenten der Immunantwort kann diese auf mehreren Ebenen moduliert werden. Die Repression von B-Zellrezeptor (BCR) Komponenten, Signalmolekülen, Fc-Rezeptoren (FcR) und Komplement-Rezeptoren (Kompl. Rez.) führt zu einer verminderten B-Zellaktivierung. Die Antigen-Prozessierung und -Präsentation wird über die Repression von MHC-Molekülen abgeschwächt und die Migration von B-Zellen über die Regulation von Chemokin-Rezeptoren moduliert. Durch die Regulation von Interleukin-Rezeptoren (ILR), CD40-, BAFF- und APRIL-Signalen wird der Klassenwechsel reprimiert.

4.9 Ausblick

Die Chip-Analyse hat viele Möglichkeiten offen gelegt, wie Notch1C, Notch2C und EBNA2 ihren Einfluss auf reife B-Zellen vermitteln und damit ein weites Feld von Signalwegen eröffnet, die genauer untersucht werden können. Folgende Aspekte haben sich aus dieser Arbeit ergeben, die in Zukunft näher untersucht werden können:

1. Durch die Chip-Daten konnte eine Vielzahl neuer Gene identifiziert werden, die durch Notch1C und EBNA2 negativ reguliert werden. Der Mechanismus dieser negativen Regulation ist noch unbekannt. Die identifizierten Gene könnten dabei helfen, eine möglichst einfache regulatorische Promotorstruktur zu identifizieren, über die eine negative Regulation vermittelt wird.
2. Es ist noch unbekannt, über welchen Mechanismus Notch-Signale einen Block in der frühen B-Zellentwicklung induzieren und dadurch wahrscheinlich Zellen in die T-Zellrichtung verschieben. In dieser Arbeit wurden viele durch EBNA2 und Notch1C-regulierte Gene identifiziert, die bei dem Notch-induzierten Arrest der B-Zellentwicklung eine Rolle spielen könnten. Um diese Ergebnisse *in vivo* zu verifizieren, sollen Knochenmarkszellen nach Infektion mit retroviralen Konstrukten, die Notch1C, Notch2C bzw. EBNA2 exprimieren, in bestrahlte Mäuse transplantiert

- werden. Arretierte Stadien der B-Zellentwicklung sollen sortiert werden, und durch qRT-PCR untersucht werden, ob die Kandidaten-Gene differentiell exprimiert werden.
3. Des Weiteren ist unbekannt, über welchen Mechanismus Notch-Signale die Entscheidung zwischen FoB Zellen und MZB Zellen bestimmen. Auch hier wurden viele Gene identifiziert, die in diesen Prozess involviert sein könnten. Im Moment ist es leider technisch noch nicht möglich, die differenzielle Expression dieser Gene *in vivo* in MZB-Vorläufer-Zellen nachzuweisen, da Zellen die gerade ein Notch-Signal erhalten haben, nicht identifiziert werden können. Ein Ausweg würde eine Reporter-Maus bieten, in der Zellen, die gerade ein Notch-Signal erhalten haben, identifiziert werden können. Alternativ könnte diese Frage mit einer Maus beantwortet werden, deren B-Zellen induzierbares und detektierbares NotchIC exprimieren.
 4. Die Auswertung der Chip-Analyse hat ergeben, dass Notch-Signale einen negativen Einfluss auf die Immunantwort haben. Die *in vivo* Relevanz dieser Befunde wird im Moment überprüft. Mäuse mit Notch2-defizienten B-Zellen werden mit unterschiedlichen Antigenen immunisiert, um die Immunantwort zu untersuchen.
 5. Um funktionelle Unterschiede zwischen Notch1 und Notch2 und den Einfluss verschiedener Liganden in B-Zellen intensiver zu untersuchen, könnten B-Zellen von Notch1- und Notch2-defizienten Mäusen verwendet werden, die nur den Notch1-Rezeptor oder nur den Notch2-Rezeptor exprimieren. Nach der Stimulierung mit verschiedenen Liganden könnte die Expression einiger in dieser Arbeit identifizierter Zielgene besonders bezüglich der MZB/FoB Entscheidung untersucht werden. Statt Mauszellen könnten an dieser Stelle auch die Hühner B-Zelllinie DT40 verwendet werden, da diese relativ leicht zu manipulieren ist.
 6. Es konnte gezeigt werden, dass NotchIC keinen proliferativen Einfluss auf EBV-immortalisierte B-Zellen in Abwesenheit von EBNA2 hat. Es soll in Zukunft untersucht werden, welchen Einfluss Notch-Signale auf die Proliferation von Zellen haben, wenn sie in Kombination mit anderen stimulatorischen Signalen wie CD40- und BCR-Signalen und wenn sie gemeinsam mit LMP1 und LMP2A, die unabhängig von EBNA2 exprimiert werden, wirken können.

5 Zusammenfassung

Notch-Signale spielen bei der Entwicklung von Lymphozyten eine wichtige Rolle. So induzieren Notch1-Signale in Lymphozyten-Vorläuferzellen im Knochenmark die Entwicklung zu T-Zellen, während Notch2-Signale essentiell für die Differenzierung reifer B-Zellen zu Marginalzonen-B-Zellen sind. Das Epstein-Barr Virus (EBV) infiziert reife B-Zellen und regt diese zur permanenten Proliferation an. EBNA2, das erste Protein, das in EBV-infizierten B-Zellen exprimiert wird, verwendet zur Regulation von Zielgenen den gleichen Signalweg wie Notch und wird deshalb als (partiell) funktionelles Äquivalent eines aktivierten Notch-Rezeptors (NotchIC) bezeichnet. Notch und EBNA2 können sich bezüglich der Muskelzellendifferenzierung gegenseitig ersetzen, die Proliferation in B-Zellen kann dagegen nur EBNA2 induzieren.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, mit Hilfe welcher Zielgene Notch und EBNA2 unterschiedliche und gemeinsame Funktionen vermitteln. Zu diesem Zweck wurde ein Zellsystem etabliert, bei dem Tetracyclin-regulierbares aktives Notch1IC oder Notch2IC in humane reife EBV-immortalisierte B-Zellen eingebracht wurde. In diesem System konnten Notch1IC oder Notch2IC in Abwesenheit von EBNA2 exprimiert werden, sowie EBNA2 in Abwesenheit von NotchIC. Die Expression von Zielgenen wurde anhand einer Microarray-Analyse untersucht. Damit sollten Notch1IC-, Notch2IC- und EBNA2-regulierte Zielgene identifiziert werden. Hierbei wurde vornehmlich auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Notch1IC- und Notch2IC-regulierten Genen, sowie zwischen NotchIC- und EBNA2-regulierten Genen eingegangen.

Durch Notch1IC wurden 270 Gene induziert und 374 Gene reprimiert. Notch2IC konnte 757 Gene induzieren und 959 Gene reprimieren. EBNA2 induzierte 6.250 Gene und reprimierte 6.811 Gene. Die Auswertung der Zielgene in der Clusteranalyse ergab, dass viele Gene reguliert wurden, die mit dem Zellzyklus und der Immunmodulation assoziiert sind. Aus diesem Grund sollten diese beiden Signalwege näher untersucht werden. In dem beschriebenen Zellsystem konnten weder Notch1IC noch Notch2IC die EBNA2-vermittelte Proliferation ersetzen. So konnten Notch1IC und Notch2IC zwar einige Zellzyklus-Gene induzieren, die aber assoziierten eher mit der S-Phase und mit der Mitose. Die von EBNA2 stark induzierten Gene c-Myc und LMP1, sowie die G₁-Phase assoziierten D-Cycline und der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 konnten durch NotchIC nicht oder nur schwach induziert werden. Vermutlich können Notch1IC und Notch2IC die Proliferation weder aufrechterhalten noch induzieren, da sie nicht fähig sind, G₁-Phase Gene, sowie c-Myc

und LMP1 ausreichend stark zu induzieren. Der Einfluss von Notch1IC auf die Immunmodulation war mit der von EBNA2 vergleichbar. Die Repression vieler Gene, die mit der Immunmodulation assoziieren, weist darauf hin, dass sowohl Notch1IC, Notch2IC als auch EBNA2 die Immunantwort negativ regulieren. So könnten B-Zellrezeptor (BCR)-Signale über die Repression von Komponenten und Signalmolekülen des BCR abgeschwächt werden, die Antigenpräsentation über die Repression von MHC-Molekülen vermindert werden und der allgemeine Aktivierungszustand zusätzlich über die Repression von Komplement-, Toll-like- und Fc-Rezeptoren vermindert werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Notch1IC, Notch2IC und EBNA2 den Klassenwechsel negativ beeinflussen. Dies wird möglicherweise über die transkriptionelle Repression der Interleukin-Rezeptoren $IL4R\alpha1$ und $IL13R\alpha1$, sowie über die Modulation von Molekülen des Signalwegs vermittelt, die die Expression von sterilen Transkripten induzieren und somit die Voraussetzung zum Klassenwechsel bilden.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Reagenzien

ABgene, UK	PCR reaction tube
Affymetrix, UK	HGU133 Plus2.0 Microarrays
BectonDickinson (BD) GmbH, Heidelberg, Deutschland	Antikörper für FACS; FITC BrdU Flow Kit; FACS Calibur
BioRad, Hercules, USA	Transblot System; Electrophorese Kammer; Gene Pulser Kuvette, 0,4 cm Elektrode; Elektroporator
Biosource, USA	Antikörper
Costar, Corning Incoperate, Schiphol-Rijk, Niederlande	Reagent Reservoir 50 ml aus Polysteryrol; PCR-Tubes; 96-well Mikrotiter Platte
Dako Cytomation, Dänemark	Antikörper
Diagnostic chemicals limited PEI, USA	Dithiothreitol (DTT)
Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Tischzentrifuge 5415, Reaktionsgefäße verschiedener Größe, BioPhotometer
Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland	Restriktionsenzyme
GE Healthcare Freiburg, Deutschland	Hyperfilm-ECL; ECL-Western Blotting reagent; PVDF membrane
Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland	Maxi-Preparation-Kit für Plasmid Isolation (Jetstar)
Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland	L-Glutamine, Sodium-Pyruvate, Penicillin/Streptomycin; Trypsin-EDTA (1x); Trypan Blue; RPMI
Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf, Deutschland	Zytoperm Inkubator; Laminar flow clean Sterilbank; Zentrifuge
Invitrogen Life Technologies, USA	1 kb DNA ladder; Pre-Stained Protein Ladder; Agarose; Hygromycin
Jackson ImmunoResearch, UK	Antikörper
Kodak, USA	M35 X-OMAT Entwicklermaschine

Metabion, Martinsried, Deutschland	Oligonukleotide
Merck, Darmstadt, Deutschland	Bovine Serum Albumin (BSA)
Miltenyi-Biotec, Bergisch- Gladbach, Deutschland	Ziege-anti-Maus-Beads; LS-Säulen; MACS Separator
Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland	Cryo Vials (Einfrier-Röhrchen); Zellkultur-Flaschen
PAA Laboratories, Pasching, Deutschland	Fetal calf serum (FCS)
Promega, Deutschland	Antikörper
Qiagen, Hilden, Deutschland	QIAquick Gel Extraction Kit; RNeasyMini Kit
Roche Diagnostics, Mannheim, Germany	Alkaline Phosphatase; Ampicillin; Protease Inhibitor; 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR [AMV]; LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green 1; LightCycler capillaries; LightCycler Gerät
Roth, Karlsruhe, Deutschland	Phenol, Acrylamide
Santa Cruz Biotechnology, USA	Antikörper
Sigma, St. Louis, USA	Ethidium-Bromid
Schubert & Weiss, Deutschland	Neubauer Zählkammer

6.1.2 Plasmide

pRTS-1: Von Georg Bornkamm zur Verfügung gestellt. Tet-on Expressions-Plasmid; kodiert für das EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) und den verkürzten Nerve Growth Factor Receptor (Δ NGFR); kodierende Sequenzen für den intrazellulären Teil von Notch1 (Notch1IC), den intrazellulären Teil von Notch2 (Notch2IC) oder Chloramphenicol-Actyl-Transferase (CAT) wurden in die „multiple cloning site“ des pRTS-1 Vektors inseriert; die Expression dieser Sequenzen und des NGFR wird durch den bidirektionalen Tet-O7 Promotor kontrolliert. Die Vektoren wurden in der Arbeit als pRTS-1 N1, pRTS-1 N2 und pRTS-1 CAT bezeichnet. Die Plasmide wurden stabil in EREB2-5 Zellen eingebracht um die Funktion von Notch1 und Notch2 in B-Zellen zu untersuchen.

6.1.3 Bakterien

XL-1blue: Escherichia coli-Stamm

Genotyp: F[']:Tu10 proA+B+ lacIq D (lacZ) M15/recA1 end A1 gyr A96 (Nal^r) thi hsd R17 (rk-mk+) glu V44 rel A1 lac. Der Originalbakterienstamm wurde von der Firma Stratagene bezogen, und von Gerhard Laux zur Verfügung gestellt.

6.1.4 Zelllinien

EREB2-5 Zellen

EREB2-5 ist eine humane konditional immortalisierte lymphoblastoide Zelllinie, die durch die Infektion von primären B-Zellen aus Nabelschnurblut mit einer nicht-transformierenden, EBNA2-defizienten P3HR1 Linie des EBV etabliert wurde, wobei der EBNA2-Defekt durch die Transfektion mit einem Mini EBV-Plasmid, das für ein Östrogen-regulierbares EBNA2 (ER/EBNA2) kodiert, komplementiert wurde (Kempkes et al. 1995). EBNA2 ist ein wichtiger viraler Transkriptionsfaktor, der die Transkription fast aller EBV-Proteine transaktiviert. ER/EBNA2 wird konstitutiv exprimiert, jedoch wird es in Abwesenheit von Östrogen über die Östrogen-Bindedomäne an das Heat-shock Protein 90 (Hsp 90) gebunden und mit einer inkorrekten Faltung an der Membran inaktiv gehalten (Briegel et al. 1996; Francis et al. 1995). In Abwesenheit von EBNA2 weisen EREB2-5 Zellen einen ruhenden Phänotyp auf, der am ehesten reifen, naiven B-Zellen ähnelt, die noch keinen Antigen-Kontakt hatten. In Anwesenheit von Östrogen ist EBNA2 funktionell und kann neben den viralen Genen auch die Expression vieler zellulärer Gene regulieren. Dies führt zur Aktivierung und Proliferation der B-Zelle, die dann einen Phänotyp aufweist, der einer reifen Antigen-aktivierten B-Zelle ähnelt.

CD40L

Maus-Fibroblasten L-Zelllinie, die nach Transfektion humanen CD40-Liganden exprimieren und adhärent wachsen (Garrone et al. 1995).

LTK- (von Bettina Kempkes, gsf)

Kontrollzelllinie zu den CD40L-exprimierenden Zellen, ebenfalls Fibroblasten.

6.2 Molekularbiologische Methoden

Alle Standardmethoden molekularbiologischer Laboratorien, die hier nicht weiter erläutert werden, wurden wie bei (Sambrook and Russel 2001) beschrieben durchgeführt. Bei kommerziellen Produkten wurde gemäß den Herstellerangaben vorgegangen.

6.2.1 Techniken der RNA-Analyse

6.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Gesamt-RNA Isolierung aus humanen und murinen B-Zellen wurden diese bei 200g, 4°C ca. 6 min abzentrifugiert und ohne vorheriges Waschen in 1ml Trizol (Invitrogen) pro 5-10 x 10⁶ Zellen resuspendiert. So behandelte Zellen konnten vor der weiteren Phenol-Chloroform Extraktion, die nach Protokoll durchgeführt wurde, bis zu 8 Wochen bei -80°C gelagert werden. Die Qualität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese in einem 1 % Agarosegel (1xMOPS, 5 % Formaldehyd) bestimmt.

6.2.1.2 Herstellung von cDNA

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) kann RNA in einzelsträngige cDNA transkribiert werden. Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Mit dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim) wurden aus der Gesamt-RNA spezifisch die mRNA-Moleküle umgeschrieben, indem die im Kit enthaltenen Oligo(dT)₁₅ Primer verwendet wurden. Der Reaktionsansatz wurde zur Anlagerung der Primer für 10 min bei 25°C inkubiert. Anschließend erfolgte die reverse Transkription bei 42°C für 1h. Durch Erhitzen auf 99°C für 5 min wurde die RT denaturiert. Die erhaltenen cDNA-Moleküle wurden bei -20°C gelagert und in die quantitativen RT-PCR-Reaktionen eingesetzt.

6.2.1.3 Quantitative RT-PCR

Die quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) mit der LightCycler Methode nach Roche ist eine PCR-Reaktion, die mit einer Faststart Taq DNA-Polymerase und dem dsDNA-spezifischem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green1 arbeitet. Die Taq Polymerase ist mit hitzelabilen Blockgruppen modifiziert und so bei Raumtemperatur inaktiv. Erst durch Erhitzen auf 95° wird die Reaktion gestartet. SYBR Green 1 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch in die kleine Furche der dsDNA interkaliert und dessen Fluoreszenz durch diese Bindung um das 100-fache gesteigert wird. So können die bei der Amplifikation entstehenden Produkte mittels ihrer Fluoreszenz detektiert werden. Die Fluoreszenz wird am Ende jeder Elongationsphase gemessen, was die Kontrolle der Zunahme der DNA-Mengen in „Echt-Zeit“ erlaubt. Die Menge an amplifizierter DNA gibt einen Hinweis darauf, wieviel cDNA zu Beginn in der untersuchten Probe war, die mit den gewählten Primern erkannt werden konnte. Zur Überprüfung der Spezifität wird das amplifizierte Produkt aufgeschmolzen und es ergibt sich eine spezifische Schmelztemperatur. Zusätzlich kann das Produkt mittels

Gelelektrophorese aufgetrennt werden und seine Spezifität anhand der Größe ermittelt werden.

Für die LightCycler Reaktion wurde abweichend vom Protokoll (FastStart DNA Master SYBR Green, Roche) nur 1µl der 1:10 verdünnten cDNA auf ein Reaktionsvolumen von 10 µl eingesetzt. Die Primer für diese Methode waren - soweit möglich - exonübergreifend, um zu vermeiden, dass eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA Amplifikationsprodukte bilden. Die benutzten Primer-Oligonukleotide wurden bei Metabion (München) bezogen. Die PCR-Reaktionen wurden in Glaskapillaren (Roche) in einem LightCycler (Roche) mit folgender Temperaturabfolge in 55 Zyklen durchgeführt:

Denaturierung der DNA

und Aktivierung der Polymerase	95°C	für 10 min
Zyklische Denaturierung	95°C	für 1 s
Zyklische Anlagerung	54-68°C	für 10 s
Zyklische Verlängerung	72°C	für 4 s pro 100 bp
Aufschmelzen	70°C bis 97°C	in 10 s
Abkühlen	40°C	für 15 s

Nummer	Zielgen	Sequenz 5' - 3'	Anlagerungs- Temperatur
vFR3	hIg seq	GAG GAC ACA GCC GTG TAT TAC TG	57°C
Cµ	hIgµ rev	CCG AAT TCA GAC GAG GGG GAA AAG GGT T	57°C
Cγ1	hIgG1 rev	GTT TTG TCA CAA GAT TTG GGC TC	68°C
Cδ	hIgD rev	AGC GGA AGA TCT CCT TCT TA	54°C
CD21	hCD21 seq	AGA TCC TAA GAG GCC GAA TGG	57°C
CD21	hCD21 rev	CAC ATA GCC AGG GTT ACA GC	57°C
63	hIgβ seq	GGA AGC AGG AGA TGG ACG AGA AT	61°C
64	hIgβ rev	TTG TCC AGC AGG AAG ATA GG	61°C
89	mGAPDH seq	TCG TCC CGT AGA CAA AAT G	54°C
90	mGAPDH rev	GAG ATG ATG ACC CGT TTG G	54°C
111	hIgα seq	CAG GAG TCC TCC AAG CTC T	57°C
112	hIgα rev	ACG TGT AGT TGC CAT GGA G	57°C
139	mIgE GLT seq	GCA GAA GAT GGC TTC GAA TAA GAA CAG T	61°C
140	mIgE GLT rev	TCG TTG AAT GAT GGA GGA TGT GTC ACG T	61°C
151	mHes1 seq	TGC CAG CTG ATA TAA TGG AG	65°C
152	mHes1 rev	GCG GTA TTT CCC CAA CAC	65°C
163	mCD21 seq	TTC ACC TGC AGT TGT GCT TC	63°C

164	mCD21 rev	AGG CGG TAG CTA GGT GAA CA	63°C
165	mAID seq	GGA GAC CGA TAT GGA CAG CCT TCT G	57°C
166	mAID rev	TCA AAA TCC CAA CAT ACG AAA TGC	57°C
169	m I71F JI seq	GGC CCT TCC AGA TCT TTG AG	61°C
170	m I71F JI rev	GGA TCC AGA GTT CCA GGT CAC T	61°C
175	hIL4Ra1 seq	GGC AGA TTT CAG AAT CTA TAA CG	57°C
176	hIL4Ra1 rev	TGA GCA TCC TGG ATT ATT ATA GC	57°C
179	hIL13Ra1 seq	TAC TTT GGT TGT TCC TTT GAT CT	57°C
180	hIL13Ra1 rev	CAT TTC TCT CAA ATT CTG GAT TC	57°C
181	mASCL1 seq	CAA CTA CTC CAA CGA CTT GAA CT	65°C
182	mASCL1 rev	TGA GAA CAT TGC ATC TAG TGA AG	65°C
183	hASCL1 seq	AAC AAG AAG ATG AGT AAG GTG GA	57°C
184	hASCL1 rev	CAC TGA CAA GAA AGC ACT AAA GA	57°C
203	hMYBL2 seq	AGA AAC ATG CTG CGT TTG TA	54°C
204	hMYBL2 rev	AGT TGT CGG CAA GGA TAG AG	54°C
208	hribProt123a	CTC CTA AAG CTG AAG CCA AA	57°C
209	hribProt123a rev	GCC TGT TTA ATC TGG TGC TT	57°C
214	mMYB seq	TTA GAA CTC CAG CTA TCA AAA GG	58°C
215	mMYB rev	CAG GTG TCA TTA AAA CAG AGC TT	58°C
216	mMYBL2 seq	TCT CTC CTT CCC AGT TTC TG	58°C
217	mMYBL2 rev	CAG GCT TTC TCT TCT GCT TC	58°C
218	mMYBL1 seq	TCC TTT ACA TCA ACC CCA AT	58°C
219	mMYBL1 rev	TTT GTC CCA GCT CTC TAA GG	58°C
226	hMYC seq	CTT GTA CCT GCA GGA TCT GA	63°C
227	hMYC rev	AGT TGT GCT GAT GTG TGG AG	63°C

Die entstandenen PCR-Produkte wurden zur Erstellung einer Eichgerade seriell verdünnt, um später die Effizienz dieser PCR-Reaktion errechnen zu können. Folgende Verdünnungsserie wurde erstellt: 10^{-3} ; 10^{-5} ; 10^{-7} ; 10^{-9} und Wasser als Negativkontrolle. Während der Amplifikation nimmt die Fluoreszenz des Reaktionsansatzes mit steigender Zykluszahl zu. Diese Fluoreszenzzunahme wird von dem LightCycler gemessen und eine Kurve erstellt. Das LightCycler-Programm ermittelt aus dieser Amplifikationskurve den crossing point (Cp). Dieser gibt die Anzahl der Zyklen an, die nötig sind um eine definierte Menge an PCR-Produkt zu erzeugen. So ist der Cp des 10^{-3} Verdünnungsansatzes kleiner als der des 10^{-5} Ansatzes.

Trägt man den Logarithmus der Konzentrationen gegen die Anzahl der Zyklen auf, die nötig waren, um den Cp zu erreichen, erhält man die Eichgerade. Die Effizienz (E) der Reaktion errechnete sich mit Hilfe der Steigung (m) der Eichgeraden mit folgender Formel:

$$E = 10^{1/m}$$

Um die Menge an Zieltranskript quantifizieren zu können, wurde die relative Quantifizierungsmethode angewendet, die auf der relativen mRNA Expression eines Zielgens im Vergleich zu einem Referenzgen basiert. Die Expression muriner Gene wurde auf GAPDH standardisiert, die humaner Gene zu verschiedenen Zeitpunkten in den Notch1IC-, Notch2IC, CAT- und EBNA2-exprimierenden Zelllinien auf das humane ribosomale Protein L23a. L23a wurde speziell für die verwendete Kinetik ausgewählt, da die Schwankungen unter allen experimentellen Bedingungen mit 7 % sehr niedrig lagen und L23a stark exprimiert wurde (Abb. 6.1).

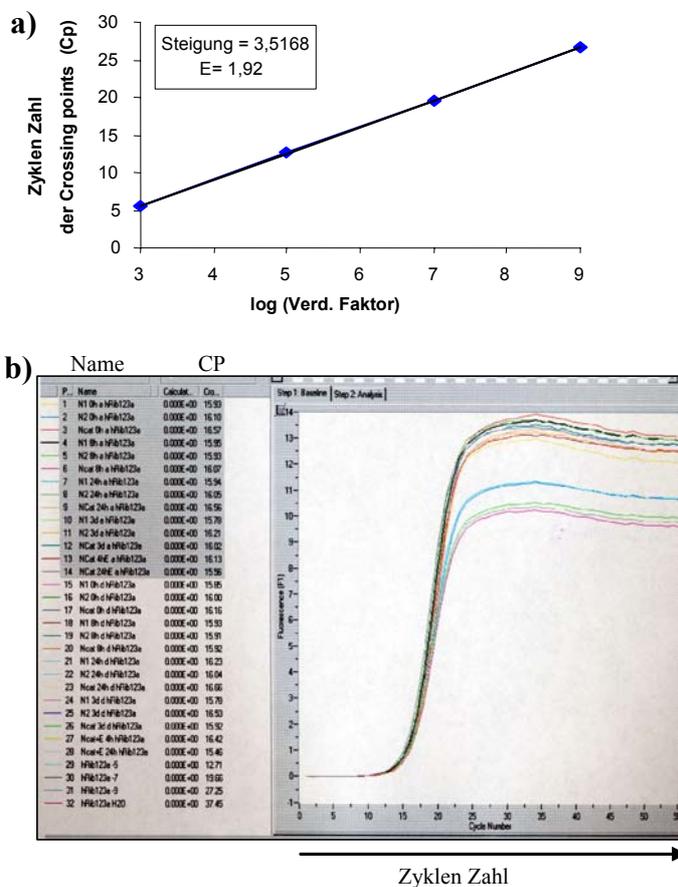


Abb. 6.1 qRT-PCR Effizienz und Standardisierung auf das ribosomale Protein L23a

a) Für jeden LightCycler Lauf wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} und 10^{-9}) mitgeführt, um die Effizienz der Reaktion zu bestimmen. Die Crossing Points (Cp) wurden gegen den Verdünnungsfaktor (logarithmiert) aufgetragen und die Steigung der Gerade in die Berechnung der Effizienz wie folgt einbezogen: $E=10^{(1/m)}$, m (Steigung)

b) Das Diagramm zeigt die Fluoreszenzkurven, die während der PCR in „Real Time“ gemessen werden, für das Transkript des ribosomalen Proteins L23a. Die Kurven geben die markierten Proben auf der linken Seite wieder. Am Crossing Point (Cp) überschreitet das Fluoreszenz-Signal das Hintergrund-Signal. Ein beinahe simultaner Anstieg der Kurven und die sehr ähnlichen Cps deuten auf eine gleiche Ausgangsmenge des Zieltranskripts in allen Proben hin.

Wenn nun K die Anzahl der PCR-Produkte darstellt, die am Crossing Point präsent sind, T_0 die Ausgangskonzentration der Probe und C_p die Anzahl der Zyklen, die nötig sind um die definierte Menge an PCR-Produkt zu erhalten, dann ergibt sich folgende Gleichung:

$$K_{(ges)Cp} = T_{(gest)0} (E_{ges})^{Cp(ges)}$$

Gleiches gilt für das Referenzgen: $K_{(Ref)Cp} = T_{(Ref)0} (E_{Ref})^{Cp(Ref)}$

Da die Menge an PCR-Produkt am C_p für alle Proben gleich ist, ergibt sich folgende Formel:

$$T_{0(\text{ges})} (E_{\text{ges}})^{Cp(\text{ges})} = T_{0(\text{Ref})} (E_{\text{Ref}})^{Cp(\text{Ref})}$$

Wird T_0 der Referenzgenreaktion gleich 1 gesetzt, so ergibt sich für die Errechnung der relativen Kopienzahl des gesuchten PCR-Ansatzes:

$$T_{0(\text{ges})} = \frac{E_{\text{Ref}}^{Cp(\text{Ref})}}{E_{\text{ges}}^{Cp(\text{ges})}}$$

Da die Ausgangsmatrix der PCR-Reaktion eine cDNA war, die aus mRNA revers transkribiert wurde, konnte das Ergebnis als die relative Kopienzahl der mRNA, die in den Zellen zum gegebenen Zeitpunkt vorhanden war, normalisiert auf ein Haushaltsgen, angegeben werden.

Zusätzlich konnte das Verhältnis (Ratio) der relativen mRNA Mengen in einer Probe zu denen in einer anderen Probe bestimmt werden. Dies wurde für mRNA Mengen in einer Kinetik angewandt, bei der stets auf den Zeitpunkt $t = 0\text{h}$ normalisiert wurde.

$$\text{Ratio}_{\text{Time}} = \frac{(T_{0(\text{gesucht})})_{\text{Probe}}}{(T_{0(\text{gesucht})})_{\text{Kontrolle}}}$$

Die Auswertung wurde mithilfe der Excel Software (Microsoft) durchgeführt.

6.2.2 Spezifischer Proteinnachweis

6.2.2.1 Isolierung und Quantifizierung von Gesamt-Protein

Für Western-Blot-Analysen wurden ca. 3×10^6 Zellen mit PBS gewaschen und in ca. 60 μl 2xLämmli-Puffer (2,5 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 0,12 M Tris pH 6.8) aufgenommen. Um eine Degradation durch Proteasen zu vermindern wurden Proteasen-Inhibitoren zugesetzt (Protease Inhibitor Complete Mini Tablets, Roche). Die Proben wurden 5min bei 100°C gekocht und gut gemischt. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels Bradford Reagenz (DC Protein Assay, Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers. Die Lysate konnten bis zur Durchführung des Experiments bei -20°C gelagert werden.

6.2.2.2 SDS PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese)

Protein-Lysate wurden ihrer Größe nach in einem SDS (0,1 %) Polyacrylamid Gel (SDS PAGE) aufgetrennt. Den Proben in Lämmli-Puffer wurden 20 % (v/v) Probenpuffer

(Bromphenol blue solution, 0.5 M DTT) zugesetzt und sie wurden 5min bei 100°C aufgekocht. Die Auftrennung der Proben (20-60µg) erfolgte in einem 8 % - 12 % Polyacrylamidgel in Lämmli-Laufpuffer (25 mM Tris base, 0.2 M glycine, 0.1 % SDS) bei 100V in einer Elektrophoresekammer von Bio-Rad.

6.2.2.3 Western-Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden bei 100V auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert. Um unspezifische Bindungen an die Membran zu verhindern, wurde diese mit 5 % Magermilchpulver in PBS für 30 – 60min bei RT geblockt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primär-Antikörper in 5 % BSA TBST (0,1 % Tween) inkubiert. Die Membran wurde dann dreimal 10min mit TBST gewaschen und für 2 – 4h mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper in 5 % BSA TBST bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST wurde die Chemolumineszenzreaktion mit Hilfe des ECL Kits bzw. des ECL Advance™ Western Blotting Detection Kits gestartet und auf ECL-Chemolumineszenzfilmen visualisiert (alle drei GE Healthcare, Freiburg). Die Quantifizierung wurde mit der AIDA Software durchgeführt.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
α -Actin	Maus	1:1.000	Santa Cruz
α-Tubulin	Maus	1:20.000	Promega
α-LMP1 (CS1-4)	Maus	1:1.000	Dako
α-Myc	Kaninchen	1:2.000	Santa Cruz
α-PCNA	Maus	1:10.000	Promega
α-Notch1(C-20) SC-6014	Ziege	1:500	Ursula Strobl, gsf
α-Notch2	Ratte	1:2 Überstand	Elisabeth Kremmer, gsf
α-Rb	Maus	1:2.000	Santa Cruz
α-Ratte HRP	Ziege	1:5.000	Jackson ImmunoResearch
α-Kaninchen HRP	Ziege	1:10.000	Biosource
α-Maus HRP	Ziege	1:5.000	Promega

6.2.3 Affymetrix Oligonukleotid Microarrays

Die Verwendung von Oligonukleotid Microarrays (Genchips) ermöglicht die gleichzeitige Analyse der Expression tausender Transkripte. Hierzu werden Biotin-markierte cRNAs mit einem Genchip hybridisiert, der aus einem Glassubstrat (1,28 x 1,28cm) besteht und auf dem

jedes einzelne Gen durch ein oder mehrere Proben-Sets repräsentiert wird. Jedes Proben-Set besteht aus 11-16 Probenpaaren, die wiederum aus zwei Probenzellen bestehen: Einer „Perfect Match“ (PM)- und einer „Mismatch“ (MM)-Probenzelle. Jede Probenzelle (24 x 24µm) enthält ca. 10^7 Kopien einer bestimmten DNA-Oligonukleotid Probe (25mer). Das PM-Oligomer ist identisch zur Sequenz einer bestimmten Probe, während das MM-Oligomer in der Mitte der Sequenz eine Transversion aufweist und somit der Kontrolle unspezifischer Bindungen dient.

Die Intensitäten jedes einzelnen Probenpaares werden dazu verwendet, eine qualitative und quantitative Expressionsmessung durchzuführen. Werden die Expressionsdaten mit denen eines Kontrollchips verglichen, so kann eine Aussage über die relative Abundanz eines Transkripts gemacht werden. Die Oligonukleotid-Proben werden auf der Basis von Standard-Hybridisierungskriterien ausgewählt, wobei jedoch 3'-Bereiche eines Gens bevorzugt werden, da diese während der cDNA-Synthese zuverlässiger synthetisiert werden. Die Probenpaare eines Proben-Sets sind aus statistischen Gründen über den gesamten Chip verteilt.

In dieser Arbeit wurde der Human Genome U133 Plus2.0 (HGU133 Plus2.0) Chip verwendet, da er momentan die umfassendste Genanalyse im humanen System bietet. 39.500 Gene werden durch 47.000 Transkripte repräsentiert, welche wiederum durch 55.000 Proben-Sets dargestellt werden.

6.2.3.1 Präparation der RNA Proben und Synthese der cDNA

Gesamt-RNA wurde wie unter 6.2.1.1 beschrieben isoliert. Die cDNA Synthese wurde in zwei Schritten mithilfe des „Microarray cDNA Synthesis Kit“ von Roche nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 10µg Gesamt-RNA eingesetzt. Anschließend wurde die doppelsträngige cDNA mit dem „Microarray target Purification Kit“ von Roche aufgereinigt.

6.2.3.2 Synthese und Fragmentierung der Biotin-markierten cRNA

Für die Synthese von Biotin-markierter cRNA wurde ds cDNA als Ausgangsmaterial verwendet. Mit dem „Microarray RNA Target Synthesis Kit“ wurde eine *in vitro* Transkription durchgeführt. Hierbei produziert die T7-RNA-Polymerase in Gegenwart von biotynilierten UTPs einzelsträngige RNA-Moleküle (cRNA). Eine anschließende Reinigung der cRNA erfolgte mit dem „RNeasyMini“ Kit (Qiagen). Die Elution erfolgte in 42µl; die Konzentration musste mindestens 0,6µg/µl betragen. War dies nicht der Fall, wurde im Anschluss eine Ethanol-Fällung durchgeführt und die cRNA in kleinerem Volumen

aufgenommen. Anschließend wurden 20µg cRNA in Fragmentierungspuffer für 35 min bei 95°C fragmentiert. Der Ansatz wurde bis zur Hybridisierung bei -20°C gelagert.

6.2.3.3 Präparation von Kontroll-cRNA

Die markierten Kontroll-cRNAs BioB, BioC und BioD und Cre dienten als Hybridisierungsstandard zur Abschätzung der Expressionshöhe der RNA-Transkripte. Weiterhin wurde sie zur Normalisierung der Expressionshöhe verschiedener Experimente während der Vergleichsanalyse benutzt. Die 100x Stocklösungen der Kontroll-cRNAs BioB (15 nM), BioC (50nM) und Cre (1 µM) wurden von Roche Diagnostics, Penzberg zur Verfügung gestellt.

6.2.3.4 Hybridisierung, Färben, Waschen und Scannen der Genchips

10 µg fragmentierte cRNA und der 100x Kontroll-cRNA Stock wurden für 5min bei 65°C denaturiert und in einen Hybridisierungsmix gegeben. Die Mischung wurde bei 99°C für weitere 5min denaturiert und anschließend für 5min auf 45°C abgekühlt und abzentrifugiert. Die Genchips wurden für 10min bei 45°C mit 1x MES Puffer prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte dann rotierend mit 200µl des abzentrifugierten Hybridisierungscocktails für 16h bei 45°C. Anschließend wurde der Chip in der Waschstation Affymetrix Fluidics Station 400 computergesteuert zuerst unter nicht stringenten Bedingungen (10x 2 mixes/25°C) und dann unter stringenten Bedingungen (4x 15 mixes/50°C) nach dem Programm EukGE-WS2-v3 gewaschen. Zur Detektion und Verstärkung der Fluoreszenzsignale wurden die Chips nacheinander mit den Antikörper-Lösungen gefärbt und anschließend gewaschen. Die Chips wurden mit einer Auflösung von 3µm/Pixel mit dem HP GeneArray-Scanner (Affymetrix) gescannt. Zur korrekten Erkennung der einzelnen Probenzellen wurde ein Gitter über den gesamten Chip positioniert (Grid-Alignment). Die Orientierung des Gitters erfolgte anhand der Kontroll-Oligonukleotide, die am Rand des Chips hybridisieren. Um falsche Hybridisierungssignale durch Verschmutzung ausschließen zu können, wurden die einzelnen gescannten Chips auf eine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenzsignale hin untersucht.

Die Rohdaten des gescannten Chips wurden in einer DAT-Datei gespeichert, bei der jede Probenzelle aus 64 Pixeln (8x8) definiert ist. Aus diesen 64 Pixeln wird ein einzelner Intensitätswert für jede Probenzelle berechnet, der das Hybridisierungslevel für diese Probenzelle angibt. Um den Intensitätswert einer Probenzellen nicht durch Fluoreszenzsignale benachbarter Probenzellen zu verfälschen, werden die begrenzenden 28 Pixel einer Probenzelle zur Berechnung des Intensitätswertes ausgeschlossen. Es wird nur die

Intensitätsverteilung der verbleibenden 36 Pixel im Innern berechnet. Der Intensitätswert, der mit dem 75. Perzentil der Verteilung assoziiert ist, wird als Durchschnittswert (Average Intensity) für die Probenzelle verwendet. Diese Information wird dann als CEL-Datei gespeichert.

6.2.3.5 Statische Algorithmen für die Auswertung der Genchips

Zur Auswertung der Rohdaten der Genchips wurden zusätzlich zur Microarray Suite 5.0 (MAS5.0) von Affymetrix (Beschreibungen der Algorithmen http://www.Affymetrix.com/products/statistical_algorithms_reference_guide_content.html) die Programme „Significance Analysis of Microarrays (SAM) (Tusher et al. 2001) und „dCHIP“ (<http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip>) verwendet.

6.2.3.6 „Single Array“-Analyse

Mithilfe der „Single Array“-Analyse lassen sich die Daten des Expressionsprofils der verwendeten RNA ermitteln. Sie bietet die Grundlage, um Vergleiche zwischen „experiment“- und „baseline“-Chips (Kontroll-Chips) durchzuführen. Diese Analyse erzeugt einen „detection p-value“, einen „detection call“ und ein „signal“. Der „detection p-value“ wurde folgendermaßen bestimmt: Für jedes Probenpaar wurde der „discrimination score“ (R) ermittelt $\{R = (PM - MM) / (PM + MM)\}$, der das Verhältnis der spezifischen Intensität (PM - MM) angibt. Die Berechnung des „detection p-values“ beruht auf der nicht-parametrischen Methode nach Wilcoxon. Dabei wird der „discrimination score“ für jedes Probenpaar gegen einen benutzerdefinierten Grenzwert τ (empfohlener Wert: 0,015) getestet und ein Rang bestimmt, wie weit R von τ entfernt ist. Je größer dabei die Differenz ist, desto kleiner wird der „detection p-value“. Dieser Parameter wird dann für den „detection call“ verwendet, der „present calls“, „marginal call“ und „absent calls“ definiert, indem er mit benutzerdefinierten Grenzwerten α_1 und α_2 verglichen wird. „detection p-values“ $< \alpha_1$ (empfohlener Wert 0,04) definieren einen „present call“, Werte zwischen α_1 und α_2 (empfohlener Wert 0,06) einen „marginal call“ und Werte $< \alpha_2$ einen „absent call“.

Die relative Expressionshöhe eines Transkripts auf dem jeweiligen Proben-Set wird durch den „signal“-Wert repräsentiert. Die Berechnung beruht auf dem „One Step Tukey’s Biweight Estimate“ (<http://mathworld.wolfram.com/TukeysBiweight.html>). In einem Probenpaar wird mittels „signal rules“ aus der MM-Intensität ein so genanntes Streusignal ermittelt, das von der Intensität des PM subtrahiert wird. Diese „echte“ Intensität wird dann zur Basis 2 logarithmiert und entsprechend ihres Abstands zum Durchschnitt aller Probenpaare gewichtet. Damit vermeidet man, dass Ausreißer das „signal“ verfälschen. Der

Durchschnitt der gewichteten Intensitätswerte entspricht dann dem metrischen „signal“, das in der CHP-Datei angegeben wird.

6.2.3.7 Vergleichsanalyse und lineare Normalisierung

In der Vergleichsanalyse werden zwei Genchips miteinander verglichen, um Änderungen in der Genexpression zwischen „experiment“ und „baseline“ zu detektieren und quantifizieren. Die verwendeten Algorithmen ermitteln einen „change p-value“, einen „change call“ und eine „signal log ratio“.

Bevor die Vergleichsanalyse durchgeführt wird, müssen die biologischen und technischen Variationen zwischen den zu vergleichenden Chips korrigiert werden. Hierzu werden die Intensitäten der Proben-Sets des Experiment-Chips mit einem Faktor linear auf die Intensitäten des Kontroll-Chips normalisiert. Wie bei der „single array“-Analyse wird auch in der Vergleichsanalyse der Wilcoxon Test angewendet. Jedes Proben-Set der Kontroll-Genchips wird mit dem entsprechenden Proben-Set der Experiment-Genchips verglichen. Es wird ein „change p-value“ berechnet, der ein Ansteigen (p-value nahe 0), ein Abfallen (p-value nahe 1) oder keine Änderung (p-value um 0,5) in der Genexpression angibt. Diese Werte werden mit benutzerdefinierten Grenzwerten γ_1 und γ_2 verglichen und es werden folgende „change calls“ ermittelt: „increase“, „marginal increase“, „no change“, „decrease“ oder „marginal decrease“. Die „signal log ratio“ gibt die Größe und Änderungsrichtung eines Proben-Sets in der Vergleichsanalyse an. Um Ausreißer zu eliminieren wird analog zur „single array“-Analyse die Tukey`sBiweight-Methode angewandt. Die Probenpaar-Intensitäten der beiden Chips werden miteinander verglichen und die „signal log ratios“ werden entsprechend ihres Abstands zum Durchschnitt aller „Probenpaar-Ratios“ gewichtet. In der CHP-Datei werden zusätzlich zu der „signal log ratio“ noch die niedrigste („signal log ratio low“) bzw. die größte („signal log ratio high“) Ratio eines Probenpaares angegeben.

6.2.3.8 GC-RMA Normalisierung und Cluster-Analyse

Die Normalisierung der dChip-generierten Daten erfolgte nach der GC-RMA (Robust Multi-Chip Analysis) Methode. Diese entspricht einer so genannten Quantil-Normalisierung. Hierbei werden die Intensitäten so eingestellt, dass sie eine gleiche Verteilung produzieren. Speziell für die GC-RMA ist, dass die Intensitäten der Proben als Funktion des GC-Gehalts modelliert werden. Dies bedeutet, dass für Proben mit einem höheren GC-Gehalt aufgrund verstärkter Bindung höhere Intensitätswerte erwartet werden. Nach erfolgter Normalisierung wurde für die Detektion von differentiell exprimierten Genen die permutationsbasierte Methode „SAM“ (Significance Analysis of Microarrays) nach Tusher (Tusher et al. 2001)

angewendet. Zuerst wird die relative Differenz der Gen-Expression bei verschiedenen Versuchsbedingungen unter Berücksichtigung der Variabilität in den verschiedenen Replikaten berechnet. Der Datensatz wird dann mehrfach permutiert und die relativen Differenzen auf Basis der permutierten Daten neu kalkuliert. Für die meisten Gene sind die Werte aus den originalen und permutierten Datensätzen ungefähr gleich. Gene, bei denen sich diese Werte um mehr als einen bestimmten Grenzwert unterscheiden, werden als differentiell exprimiert definiert. Basierend auf der Anzahl der Gene, die bei einem bestimmten Grenzwert definiert wurde, wurde eine Fehlerquote (False Discovery Rate, FDR) berechnet. Anschließend wurde mit den differentiell regulierten Genen ein hierarchisches Clustern nach Eisen (Eisen et al. 1998) durchgeführt, d.h. es wurden Gene aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Genexpression zusammen gruppiert. Für die Cluster-Analyse wurde das Programm „dCHIP“ verwendet. Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Software „Cluster“ und „Treeview“, die beide als Freeware im Internet angeboten werden. Durch eine nachfolgende „Geneontology“-Analyse konnte ermittelt werden, welche funktionellen Gengruppen in den einzelnen Clustern vertreten sind.

6.3 Zellkultur

6.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Umluft-Sterilbank (Heraeus, Düsseldorf) und unter Verwendung steriler Pipetten sowie Lösungen durchgeführt. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Zellen bei Zentrifugationsschritten bei 1200rpm (ca. 300g) für 6min zentrifugiert. Für die Waschschrte wurde steriles PBS oder RPMI, 10% FKS verwendet. Die Zellen wurden im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden jeden zweiten Tag gefüttert bzw. gesplittet.

Vollmedium für B-Zellen

500ml RPMI 1640 Medium (Gibco, Paisley, Schottland)

60 ml FCS (Boehringer, Mannheim)

6 ml Penicillin/Streptomycin (100x) (Gibco, Paisley, Schottland)

6ml Glutamin (100x) (Gibco, Paisley, Schottland)

6ml Pyruvat (100x) (Gibco, Paisley, Schottland)

Bei Zellen, die sich unter Hygromycin-Selektion befanden, wurde dem Vollmedium 75µg Hygromycin B (Invitrogen, Deutschland) pro ml Medium zugegeben. Zur Kultivierung von proliferierenden EREB2-5 Zellen wurde dem Medium 1µM Östrogen zugesetzt.

6.3.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde mit Neubauer-Zählkammern lichtmikroskopisch bestimmt, wobei tote Zellen durch die Färbung mit Trypanblau ausgeschlossen wurden.

6.3.3 Ablösen von adhärennten Zellen

Adhärennte Zellen wurden zum Passagieren oder Ernten durch kurzzeitige Behandlung mit Versene in Suspension gebracht. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 37°C warmem Versene (Gibco BRL, Paisly Schottland) 4-8min inkubiert. Die Reaktion wurde danach mit dem zweifachen Volumen Zellkulturmedium gestoppt, die Zellen wurden anschließend zentrifugiert und je nach Verwendungszweck in Medium aufgenommen.

6.3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Adhärennte Zellen und Suspensionszellen wurden einen Tag vor dem Einfrieren mit frischem Medium gefüttert. Zum Einfrieren wurden sie in Einzelzellsuspension gebracht, zentrifugiert und in kaltem Einfriermedium (50 % FKS; 10 % DMSO; 40 % Medium) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in Einfrier-Röhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) zunächst bei -80°C eingefroren und nach zwei Tagen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Um ein zu schnelles Einfrieren zu verhindern, wurden die Röhrchen dick in Zellstoff eingewickelt.

Beim Auftauen wurden die Zellen durch Zugabe von Medium schnell auf 37°C erwärmt und im zehnfachen Volumen Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen, um das DMSO zu entfernen, zentrifugiert und in neuem Medium aufgenommen.

6.3.5 Kultivieren von EREB2-5 Zellen

EREB2-5 Zellen sind EBV-immortalisierte, humane B-Zellen, die in Suspension wachsen. Zum Entfernen des Östrogens aus EREB2-5 Zellen werden diese dreimal in kaltem RPMI Medium mit 10 % FKS (Waschmedium) gewaschen. Hierzu werden die Zellen bei 300g für 6 min, 4°C sedimentiert, der Überstand gut abgenommen und anschließend in Waschmedium gut resuspendiert. Zwischen dem 2. und dem 3. Waschschrift findet eine Inkubation im Waschmedium von 20min bei RT statt, um die Effizienz der Östrogenentfernung zu erhöhen.

Die Zellen werden anschließend in einer Dichte von 4×10^5 in Östrogen-freiem Vollmedium für B-Zellen aufgenommen.

Das verwendete Waschmedium kann nach Zugabe der Zuätze für Vollmedium in späteren Versuchen für die Kultivierung des entsprechenden Zellklons weiter verwendet werden.

6.3.6 Kultivieren von adhärenen LTK- und CD40L exprimierenden Zellen

LTK- Zellen und CD40L-exprimierende Zellen wuchsen adhärent und wurden zur späteren Kokultivierung in Vollmedium für B-Zellen gehalten.

Kokultivierung von EREB2-5 Zellen mit LTK- oder CD40L exprimierenden Zellen

Für die Kokultivierung mit EREB2-5 Zellen wurden 1×10^5 CD40L und 2×10^5 LTK- pro Loch in eine 6-Well-Platte gegeben, ca. drei Tage expandieren gelassen (nicht ganz konfluent) und dann mit 7.500 Rad (ca. 120min) bestrahlt um eine weitere Expansion zu verhindern. Anschließend wurden zu diesen Zellen B-Zellen (1×10^6 wenn mit Östrogen, mind. 2×10^6 wenn ohne Östrogen) dazugegeben und in Vollmedium für B-Zellen kultiviert. Sollte eine Kokultivierung schon nach zwei Tagen erfolgen, so wurden $1,5 \times 10^5$ CD40L bzw. $2,5 \times 10^5$ LTK- Zellen pro Sechs-Loch ausgesät und expandiert.

6.3.7 In Vitro Proliferations-Assay und BrdU-Assay

Zur Untersuchung des Überlebens- und Proliferationsverhaltens von veränderten EREB2-5 Zellen wurde täglich über acht Tage hinweg die Zellzahl bestimmt und der Anteil der NGFR-positiven Zellen mittels FACS Analyse ermittelt. Zusätzlich wurde mithilfe des Einbaus von BrdU (Bromodesoxy-Uridin) in sich teilende Zellen mittels anschließender FACS Analyse der Anteil der Zellen bestimmt, die proliferieren (FITC BrdU Flow Kit, BD). Die Analyse wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

6.3.8 Generierung stabiler Notch1IC-, Notch2IC- und CAT-exprimierender EREB2-5 Zellen

6.3.8.1 Transfektion von EREB2-5 Zellen

Transiente Transfektion von EREB2-5 Zellen

Durch Elektroporation wurde DNA in EREB2-5 Zellen eingebracht. Hierzu wurde ein „Gene Pulser“ der Firma Biorad (Hercules, USA) verwendet. Pro Transfektionsansatz wurden 10^7 Zellen, die einen Tag zuvor gefüttert wurden, um eine optimale Proliferation zu erreichen,

6min bei 300g, 4°C pelletiert. Anschließend wurden die Zellen einmal in kaltem RPMI ohne FKS gewaschen, in 250µL kaltem RPMI ohne FKS aufgenommen und in eine 4mm breite „Gene Pulser“ Küvette überführt. Je nach Transfektionsansatz wurden unterschiedliche Mengen an DNA (meist 10-20µg) zugegeben und durch „Schnippsen“ mit den Zellen vermischt. Ein Kondensator mit der Kapazität von 1mF wurde mit 230V aufgeladen und über die Küvette mit dem Transfektionsansatz entladen. Direkt nach der Transfektion wurden 500µl eiskaltes FKS zu den Zellen gegeben, die 10min später in 10ml 37°C warmes RPMI Vollmedium mit 10-20 % FKS überführt wurden. Anschließend wurden die Zellen wie üblich bei 37°C und 5 % CO₂ Partialdruck inkubiert.

Stabile Transfektion von EREB2-5 Zellen

Die stabile Transfektion von EREB2-5 Zellen wurde wie die transiente Transfektion durchgeführt. Es wurden jeweils 10µg der Plasmide pRTS-1 hNotch1IC, pRTS-1 hNotch2IC und pRTS-1 CAT transfiziert.

6.3.8.2 Selektion transfizierter EREB2-5 Zellen

Mit der Selektion der transfizierten EREB2-5 Zellen wurde sieben Tage nach der Transfektion begonnen. Es wurden 75µg Hygromycin (Invitrogen) eingesetzt und die gesamte Population wurde selektiert. Nach vier Wochen unter Selektion wurden die Zellen auf Funktionalität getestet, ein Teil in flüssigem Stickstoff zur späteren Verwendung eingefroren und der Rest für Versuche in Kultur expandiert.

6.3.8.3 Isolierung von Notch1IC-, Notch2IC- und CAT-exprimierenden Zellen

Da Notch1IC oder Notch2IC oder CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase) aufgrund des bidirektionalen Tet-O7 Promotors nach Zugabe von 100ng Doxycyclin pro ml Medium gemeinsam mit dem ΔNGFR exprimiert werden, konnten Notch1IC-, Notch2IC- und CAT-exprimierende Zellen über den ΔNGFR isoliert werden. Dies geschah mithilfe des MACS (Magnetic Cell Sorting) Systems der Firma Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers. Zur Detektion des NGFR wurden die Zellen in 1:20 verdünntem Hybridom-Überstand (Elisabeth Kremmer, GSF, München) für 20min bei 4°C inkubiert. Zur Detektion des Erstantikörpers und zur Bindung der gefärbten Zellen wurden Microbeads (kleine metallene Kügelchen) verwendet, die mit Ziege-anti-Maus-Antikörpern gekoppelt waren. Zellen, die so markiert waren, konnten bei der anschließenden Reinigung über eine Säule isoliert werden. Die Ausbeute von positiven Zellen lag je nach Klon bei 10 – 50 %.

6.4 Durchflusszytometrie

Für die Analyse über Durchflusszytometrie müssen die Zellen als Einzelzellen vorliegen. Die Zellen wurden zuerst mit FACS-Puffer (PBS; 0,5-1% BSA) gewaschen, um mögliche unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Anschließend wurden sie mit einer Kombination von FITC- und PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern gefärbt, die in FACS-Puffer verdünnt waren. Es wurden jeweils 5×10^5 Zellen für ca. 15min gefärbt und dann nochmals in FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Puffer für die Analyse aufgenommen. Zusätzlich wurde TOPRO-3 (Molecular Probes) zugegeben, um die toten Zellen anzufärben.

Alle Analysen wurden mit einem FACSCalibur™ (BD-Biociences) durchgeführt und die Resultate mit der CELLQuest™ Software ausgewertet. Es wurden je Färbung $1-3 \times 10^4$ lebendige Zellen aufgenommen, die sich innerhalb des „EREB2-5-Fensters“, welches durch eine bestimmte Größe der Zellen und die lichtbrechenden Eigenschaften der Zelle definiert ist, befanden. Zusätzlich wurden auch noch die TOPRO-positiven und somit toten Zellen aus dieser Population ausgeschlossen.

Antikörper für FACS-Färbungen:

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
NGFR-PE	1:10	BD
IgM-PE	1:100	BD
CD21-FITC	1:10	BD

7 Literatur

- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J. I., Yang, L., Marti, G. E., Moore, T., Hudson, J., Jr., Lu, L., Lewis, D. B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W. C., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Armitage, J. O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M. R., Byrd, J. C., Botstein, D., Brown, P. O., and Staudt, L. M.: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403: 503-11, 2000
- Allman, D., Aster, J. C., and Pear, W. S.: Notch signaling in hematopoiesis and early lymphocyte development. *Immunol Rev* 187: 75-86, 2002
- Ansieau, S., Strobl, L. J., and Leutz, A.: Activation of the Notch-regulated transcription factor CBF1/RBP-Jkappa through the 13SE1A oncoprotein. *Genes Dev* 15: 380-5, 2001
- Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D. J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U., and Edlund, H.: Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400: 877-81, 1999
- Axelson, H.: The Notch signaling cascade in neuroblastoma: role of the basic helix-loop-helix proteins HASH-1 and HES-1. *Cancer Lett* 204: 171-8, 2004
- 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.: Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *Embo J* 19: 3337-48, 2000
- Bocchetta, M., Miele, L., Pass, H. I., and Carbone, M.: Notch-1 induction, a novel activity of SV40 required for growth of SV40-transformed human mesothelial cells. *Oncogene* 22: 81-9, 2003
- Bornkamm, G. W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J. M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A., Chapman, R. D., Nimmerjahn, F., Mautner, J., Hillen, W., Bujard, H., and Feuillard, J.: Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* 33: e137, 2005
- Bossy, D., Milili, M., Zucman, J., Thomas, G., Fougereau, M., and Schiff, C.: Organization and expression of the lambda-like genes that contribute to the mu-psi light chain complex in human pre-B cells. *Int Immunol* 3: 1081-90, 1991
- Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K., Menkel, A., Eilers, M., and Luscher, B.: Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* 15: 2042-7, 2001
- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M.: Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* 18: 5321-33, 1999
- Briegel, K., Bartunek, P., Stengl, G., Lim, K. C., Beug, H., Engel, J. D., and Zenke, M.: Regulation and function of transcription factor GATA-1 during red blood cell differentiation. *Development* 122: 3839-50, 1996
- Burgstahler, R., Kempkes, B., Steube, K., and Lipp, M.: Expression of the chemokine receptor BLR2/EBI1 is specifically transactivated by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 737-43, 1995

- Cahir-McFarland, E. D., Carter, K., Rosenwald, A., Giltnane, J. M., Henrickson, S. E., Staudt, L. M., and Kieff, E.: Role of NF-kappa B in cell survival and transcription of latent membrane protein 1-expressing or Epstein-Barr virus latency III-infected cells. *J Virol* 78: 4108-19, 2004
- Cariappa, A., Tang, M., Parng, C., Nebelitskiy, E., Carroll, M., Georgopoulos, K., and Pillai, S.: The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* 14: 603-15, 2001
- Chiles, T. C.: Regulation and function of cyclin D2 in B lymphocyte subsets. *J Immunol* 173: 2901-7, 2004
- Choi, J. W., Pampono, C., Vukmanovic, S., and Meruelo, D.: Characterization of the transcriptional expression of Notch-1 signaling pathway members, Deltex and HES-1, in developing mouse thymocytes. *Dev Comp Immunol* 26: 575-88, 2002
- Cinamon, G., Matloubian, M., Lesneski, M. J., Xu, Y., Low, C., Lu, T., Proia, R. L., and Cyster, J. G.: Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat Immunol* 5: 713-20, 2004
- Cohen, J. I.: Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 343: 481-92, 2000
- Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N., and Golub, T. R.: Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3260-5, 2000
- Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimber, U., Rousselet, G., Pavlish, O., Banchereau, J., Tursz, T., Bornkamm, G., and Lenoir, G. M.: Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J Virol* 64: 1002-13, 1990
- Davis, R. L. and Turner, D. L.: Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20: 8342-57, 2001
- de la Fuente, M. A., Tovar, V., Villamor, N., Zapater, N., Pizcueta, P., Campo, E., Bosch, J., and Engel, P.: Molecular characterization and expression of a novel human leukocyte cell-surface marker homologous to mouse Ly-9. *Blood* 97: 3513-20, 2001
- Defetos, M. L., Huang, E., Ojala, E. W., Forbush, K. A., and Bevan, M. J.: Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes. *Immunity* 13: 73-84, 2000
- Dirmeier, U., Hoffmann, R., Kilger, E., Schultheiss, U., Briseno, C., Gires, O., Kieser, A., Eick, D., Sugden, B., and Hammerschmidt, W.: Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene* 24: 1711-7, 2005
- Dumont, E., Fuchs, K. P., Bommer, G., Christoph, B., Kremmer, E., and Kempkes, B.: Neoplastic transformation by Notch is independent of transcriptional activation by RBP-J signalling. *Oncogene* 19: 556-61, 2000
- Dumortier, A., Jeannet, R., Kirstetter, P., Kleinmann, E., Sellars, M., dos Santos, N. R., Thibault, C., Barths, J., Ghysdael, J., Punt, J. A., Kastner, P., and Chan, S.: Notch activation is an early and critical event during T-Cell leukemogenesis in Ikaros-deficient mice. *Mol Cell Biol* 26: 209-20, 2006
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D.: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14863-8, 1998
- Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D., and Sklar, J.: TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66: 649-61, 1991
- Epstein, M. A., Achong, B. G., and Barr, Y. M.: Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 15: 702-3, 1964

- Everly, D. N., Jr., Mainou, B. A., and Raab-Traub, N.: Induction of Id1 and Id3 by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus and regulation of p27/Kip and cyclin-dependent kinase 2 in rodent fibroblast transformation. *J Virol* 78: 13470-8, 2004
- Feldman, B. J., Hampton, T., and Cleary, M. L.: A carboxy-terminal deletion mutant of Notch1 accelerates lymphoid oncogenesis in E2A-PBX1 transgenic mice. *Blood* 96: 1906-13, 2000
- Felli, M. P., Vacca, A., Calce, A., Bellavia, D., Campese, A. F., Grillo, R., Di Giovine, M., Checquolo, S., Talora, C., Palermo, R., Di Mario, G., Frati, L., Gulino, A., and Screpanti, I.: PKC theta mediates pre-TCR signaling and contributes to Notch3-induced T-cell leukemia. *Oncogene* 24: 992-1000, 2005
- Francis, M. K., Phinney, D. G., and Ryder, K.: Analysis of the hormone-dependent regulation of a JunD-estrogen receptor chimera. *J Biol Chem* 270: 11502-13, 1995
- Frank, M. and Kemler, R.: Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol* 14: 557-62, 2002
- Fryer, C. J., Lamar, E., Turbachova, I., Kintner, C., and Jones, K. A.: Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev* 16: 1397-411, 2002
- Fuchs, K. P., Bommer, G., Dumont, E., Christoph, B., Vidal, M., Kremmer, E., and Kempkes, B.: Mutational analysis of the J recombination signal sequence binding protein (RBP-J)/Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) and RBP-J/Notch interaction. *Eur J Biochem* 268: 4639-46, 2001
- Garrone, P., Neidhardt, E. M., Garcia, E., Galibert, L., van Kooten, C., and Banchereau, J.: Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 182: 1265-73, 1995
- Gartel, A. L. and Shchors, K.: Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res* 283: 17-21, 2003
- Gartel, A. L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., and Tyner, A. L.: Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4510-5, 2001
- Geha, R. S., Jabara, H. H., and Brodeur, S. R.: The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol* 3: 721-32, 2003
- Girard, L., Hanna, Z., Beaulieu, N., Hoemann, C. D., Simard, C., Kozak, C. A., and Jolicoeur, P.: Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTVD/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis. *Genes Dev* 10: 1930-44, 1996
- Glynne, R., Ghandour, G., Rayner, J., Mack, D. H., and Goodnow, C. C.: B-lymphocyte quiescence, tolerance and activation as viewed by global gene expression profiling on microarrays. *Immunol Rev* 176: 216-46, 2000
- Gordadze, A. V., Peng, R., Tan, J., Liu, G., Sutton, R., Kempkes, B., Bornkamm, G. W., and Ling, P. D.: Notch1IC partially replaces EBNA2 function in B cells immortalized by Epstein-Barr virus. *J Virol* 75: 5899-912, 2001
- Grossman, S. R., Johannsen, E., Tong, X., Yalamanchili, R., and Kieff, E.: The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7568-72, 1994
- Gupta-Rossi, N., Storck, S., Griebel, P. J., Reynaud, C. A., Weill, J. C., and Dahan, A.: Specific over-expression of deltex and a new Kelch-like protein in human germinal center B cells. *Mol Immunol* 39: 791-9, 2003
- Haines, N. and Irvine, K. D.: Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 786-97, 2003
- Haltiwanger, R. S. and Stanley, P.: Modulation of receptor signaling by glycosylation: fringe is an O-fucose-beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1573: 328-35, 2002

- Hamada, Y., Kadokawa, Y., Okabe, M., Ikawa, M., Coleman, J. R., and Tsujimoto, Y.: Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development* 126: 3415-24, 1999
- Han, H., Tanigaki, K., Yamamoto, N., Kuroda, K., Yoshimoto, M., Nakahata, T., Ikuta, K., and Honjo, T.: Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol* 14: 637-45, 2002
- Harada, S. and Kieff, E.: Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J Virol* 71: 6611-8, 1997
- Henkel, T., Ling, P. D., Hayward, S. D., and Peterson, M. G.: Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science* 265: 92-5, 1994
- Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J. F., Obaya, A. J., O'Connell, B. C., Mateyak, M. K., Tam, W., Kohlhuber, F., Dang, C. V., Sedivy, J. M., Eick, D., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W.: Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2229-34, 2000
- Hoebeke, I., De Smedt, M., Van de Walle, I., Reynvoet, K., De Smet, G., Plum, J., and Leclercq, G.: Overexpression of HES-1 is not sufficient to impose T-cell differentiation on human hematopoietic stem cells. *Blood* 107: 2879-81, 2006
- Hofelmayer, H., Strobl, L. J., Marschall, G., Bornkamm, G. W., and Zimmer-Strobl, U.: Activated Notch1 can transiently substitute for EBNA2 in the maintenance of proliferation of LMP1-expressing immortalized B cells. *J Virol* 75: 2033-40, 2001
- Hoyer, K. K., French, S. W., Turner, D. E., Nguyen, M. T., Renard, M., Malone, C. S., Knoetig, S., Qi, C. F., Su, T. T., Cheroutre, H., Wall, R., Rawlings, D. J., Morse, H. C., 3rd, and Teitell, M. A.: Dysregulated TCL1 promotes multiple classes of mature B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14392-7, 2002
- Hozumi, K., Negishi, N., Suzuki, D., Abe, N., Sotomaru, Y., Tamaoki, N., Mailhos, C., Ish-Horowicz, D., Habu, S., and Owen, M. J.: Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat Immunol* 5: 638-44, 2004
- Hsieh, J. J., Nofziger, D. E., Weinmaster, G., and Hayward, S. D.: Epstein-Barr virus immortalization: Notch2 interacts with CBF1 and blocks differentiation. *J Virol* 71: 1938-45, 1997
- Huang, E. Y., Gallegos, A. M., Richards, S. M., Lehar, S. M., and Bevan, M. J.: Surface expression of Notch1 on thymocytes: correlation with the double-negative to double-positive transition. *J Immunol* 171: 2296-304, 2003
- Hubmann, R., Schwarzmeier, J. D., Shehata, M., Hilgarth, M., Duechler, M., Dettke, M., and Berger, R.: Notch2 is involved in the overexpression of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99: 3742-7, 2002
- Iso, T., Kedes, L., and Hamamori, Y.: HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 194: 237-55, 2003
- Jaleco, A. C., Neves, H., Hooijberg, E., Gameiro, P., Clode, N., Haury, M., Henrique, D., and Parreira, L.: Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J Exp Med* 194: 991-1002, 2001
- Janeway, C. A. T., Paul, Walport, Mark; Shlomchik, Mark.: Immunobiology. *Garland Publishing, New York and London 6th ed.* , 2005
- Jeffries, S., Robbins, D. J., and Capobianco, A. J.: 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, 2002
- Jiang, Z., Zamanian-Daryoush, M., Nie, H., Silva, A. M., Williams, B. R., and Li, X.: Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent

- pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J Biol Chem* 278: 16713-9, 2003
- Johansen, L. M., Deppmann, C. D., Erickson, K. D., Coffin, W. F., 3rd, Thornton, T. M., Humphrey, S. E., Martin, J. M., and Taparowsky, E. J.: EBNA2 and activated Notch induce expression of BATF. *J Virol* 77: 6029-40, 2003
- Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Mathas, S., Stein, H., and Dorken, B.: Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 99: 3398-403, 2002
- Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G. W., and Kempkes, B.: The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* 73: 4481-4, 1999
- Kaye, K. M., Izumi, K. M., and Kieff, E.: Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9150-4, 1993
- Kempkes, B., Pawlita, M., Zimmer-Strobl, U., Eissner, G., Laux, G., and Bornkamm, G. W.: Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-estrogen receptor fusion proteins transactivate viral and cellular genes and interact with RBP-J kappa in a conditional fashion. *Virology* 214: 675-9, 1995
- Kidd, S., Kelley, M. R., and Young, M. W.: 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, 1986
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., and Hammerschmidt, W.: Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *Embo J* 17: 1700-9, 1998
- Kirberg, J., Gschwendner, C., Dangy, J. P., Ruckerl, F., Frommer, F., and Bachl, J.: Proviral integration of an Abelson-murine leukemia virus deregulates BCLF-expression in the hypermutating pre-B cell line 18-81. *Mol Immunol* 42: 1235-42, 2005
- 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.: Murine homologs of *deltex* define a novel gene family involved in vertebrate Notch signaling and neurogenesis. *Int J Dev Neurosci* 19: 21-35, 2001
- Kopan, R., Nye, J. S., and Weintraub, H.: 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, 1994
- Kozar, K., Ciemerych, M. A., Rebel, V. I., Shigematsu, H., Zagozdzon, A., Sicinska, E., Geng, Y., Yu, Q., Bhattacharya, S., Bronson, R. T., Akashi, K., and Sicinski, P.: Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 118: 477-91, 2004
- Kraman, M. and McCright, B.: Functional conservation of Notch1 and Notch2 intracellular domains. *Faseb J* 19: 1311-3, 2005
- Krebs, L. T., Deftos, M. L., Bevan, M. J., and Gridley, T.: The *Nrarp* gene encodes an ankyrin-repeat protein that is transcriptionally regulated by the notch signaling pathway. *Dev Biol* 238: 110-9, 2001
- Krebs, L. T., Xue, Y., Norton, C. R., Shutter, J. R., Maguire, M., Sundberg, J. P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., Smith, G. H., Stark, K. L., and Gridley, T.: Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 14: 1343-52, 2000
- Krebs, L. T., Xue, Y., Norton, C. R., Sundberg, J. P., Beatus, P., Lendahl, U., Joutel, A., and Gridley, T.: Characterization of Notch3-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a Notch1 mutation. *Genesis* 37: 139-43, 2003

- Kumanogoh, A., Shikina, T., Watanabe, C., Takegahara, N., Suzuki, K., Yamamoto, M., Takamatsu, H., Prasad, D. V., Mizui, M., Toyofuku, T., Tamura, M., Watanabe, D., Parnes, J. R., and Kikutani, H.: Requirement for CD100-CD72 interactions in fine-tuning of B-cell antigen receptor signaling and homeostatic maintenance of the B-cell compartment. *Int Immunol* 17: 1277-82, 2005
- Kuppers, R.: B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 3: 801-12, 2003
- Kuppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R., and Hansmann, M. L.: Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10962-6, 1994
- Kuppers, R., Scherwing, I., Brauninger, A., Rajewsky, K., and Hansmann, M. L.: Biology of Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 13 Suppl 1: 11-8, 2002
- Kuroda, K., Han, H., Tani, S., Tanigaki, K., Tun, T., Furukawa, T., Taniguchi, Y., Kurooka, H., Hamada, Y., Toyokuni, S., and Honjo, T.: Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity* 18: 301-12, 2003
- Kurooka, H. and Honjo, T.: Functional interaction between the mouse notch1 intracellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5. *J Biol Chem* 275: 17211-20, 2000
- Kurosaki, T.: Regulation of B cell fates by BCR signaling components. *Curr Opin Immunol* 14: 341-7, 2002
- Le Roux, A., Kerdiles, B., Walls, D., Dedieu, J. F., and Perricaudet, M.: The Epstein-Barr virus determined nuclear antigens EBNA-3A, -3B, and -3C repress EBNA-2-mediated transactivation of the viral terminal protein 1 gene promoter. *Virology* 205: 596-602, 1994
- Le Stunff, H., Mikami, A., Giussani, P., Hobson, J. P., Jolly, P. S., Milstien, S., and Spiegel, S.: Role of sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in epidermal growth factor-induced chemotaxis. *J Biol Chem* 279: 34290-7, 2004
- Lee, K. Y., Helbing, C. C., Choi, K. S., Johnston, R. N., and Wang, J. H.: Neuronal Cdc2-like kinase (Nclk) binds and phosphorylates the retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 272: 5622-6, 1997
- Liu, Y. J., de Bouteiller, O., and Fugier-Vivier, I.: Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. *Curr Opin Immunol* 9: 256-62, 1997
- Lodish, H. B., Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E.: Molecular Cell Biology 4th Edition. New York: W. H. Freeman & Co.; c2000. , 2000
- Longnecker, R.: Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv Cancer Res* 79: 175-200, 2000
- Maccioni, R. B., Otth, C., Concha, II, and Munoz, J. P.: The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur J Biochem* 268: 1518-27, 2001
- MacLennan, I. C., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M., Zuniga, E., Cook, M. C., and Vinuesa, C. G.: Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 194: 8-18, 2003
- Maier, S., Santak, M., Mantik, A., Grabusic, K., Kremmer, E., Hammerschmidt, W., and Kempkes, B.: A somatic knockout of CBF1 in a human B-cell line reveals that induction of CD21 and CCR7 by EBNA-2 is strictly CBF1 dependent and that downregulation of immunoglobulin M is partially CBF1 independent. *J Virol* 79: 8784-92, 2005

- Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P., and Barbacid, M.: Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118: 493-504, 2004
- Martin, F. and Kearney, J. F.: Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2: 323-35, 2002
- Matsuno, K., Eastman, D., Mitsiades, T., Quinn, A. M., Carcanciu, M. L., Ordentlich, P., Kadesch, T., and Artavanis-Tsakonas, S.: Human deltex is a conserved regulator of Notch signalling. *Nat Genet* 19: 74-8, 1998
- McHeyzer-Williams, M. G.: B cells as effectors. *Curr Opin Immunol* 15: 354-61, 2003
- Miele, L.: Notch signaling. *Clin Cancer Res* 12: 1074-9, 2006
- Milner, L. A., Bigas, A., Kopan, R., Brashem-Stein, C., Bernstein, I. D., and Martin, D. I.: Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13014-9, 1996
- Monticelli, S., Ghittoni, R., Kabesch, M., and Vercelli, D.: Myb proteins repress human Ig epsilon germline transcription by inhibiting STAT6-dependent promoter activation. *Mol Immunol* 38: 1129-38, 2002
- Morgan, T. H.: The theory of the gene. *Am Nat*, 1917
- Morimura, T., Goitsuka, R., Zhang, Y., Saito, I., Reth, M., and Kitamura, D.: Cell cycle arrest and apoptosis induced by Notch1 in B cells. *J Biol Chem* 275: 36523-31, 2000
- Morimura, T., Miyatani, S., Kitamura, D., and Goitsuka, R.: Notch signaling suppresses IgH gene expression in chicken B cells: implication in spatially restricted expression of Serrate2/Notch1 in the bursa of Fabricius. *J Immunol* 166: 3277-83, 2001
- Muller, G. and Lipp, M.: Shaping up adaptive immunity: the impact of CCR7 and CXCR5 on lymphocyte trafficking. *Microcirculation* 10: 325-34, 2003
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T.: Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102: 553-63, 2000
- Neuberger, M. S., Di Noia, J. M., Beale, R. C., Williams, G. T., Yang, Z., and Rada, C.: Somatic hypermutation at A.T pairs: polymerase error versus dUTP incorporation. *Nat Rev Immunol* 5: 171-8, 2005
- Nielsen, C. H. and Leslie, R. G.: Complement's participation in acquired immunity. *J Leukoc Biol* 72: 249-61, 2002
- Niuro, H. and Clark, E. A.: Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2: 945-56, 2002
- Nitsche, F., Bell, A., and Rickinson, A.: Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2-mediated transactivation of latent membrane protein 1 expression: a role for the W1W2 repeat domain. *J Virol* 71: 6619-28, 1997
- Nye, J. S., Kopan, R., and Axel, R.: An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development* 120: 2421-30, 1994
- O'Hagan, R. C., Schreiber-Agus, N., Chen, K., David, G., Engelman, J. A., Schwab, R., Alland, L., Thomson, C., Ronning, D. R., Sacchettini, J. C., Meltzer, P., and DePinho, R. A.: Gene-target recognition among members of the myc superfamily and implications for oncogenesis. *Nat Genet* 24: 113-9, 2000
- Ohtani, N., Brennan, P., Gaubatz, S., Sanij, E., Hertzog, P., Wolvetang, E., Ghysdael, J., Rowe, M., and Hara, E.: Epstein-Barr virus LMP1 blocks p16INK4a-RB pathway by promoting nuclear export of E2F4/5. *J Cell Biol* 162: 173-83, 2003
- Ordentlich, P., Lin, A., Shen, C. P., Blaumueller, C., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S., and Kadesch, T.: Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Mol Cell Biol* 18: 2230-9, 1998
- 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.: SHARP is

- a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. *Embo J* 21: 5417-26, 2002
- Parks, A. L., Klueg, K. M., Stout, J. R., and Muskavitch, M. A.: Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127: 1373-85, 2000
- Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P., and Tsai, L. H.: Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402: 615-22, 1999
- Peaker, C. J.: Transmembrane signalling by the B-cell antigen receptor. *Curr Opin Immunol* 6: 359-63, 1994
- Pear, W. S., Aster, J. C., Scott, M. L., Hasserjian, R. P., Soffer, B., Sklar, J., and Baltimore, D.: Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med* 183: 2283-91, 1996
- Peng, C. W., Xue, Y., Zhao, B., Johannsen, E., Kieff, E., and Harada, S.: Direct interactions between Epstein-Barr virus leader protein LP and the EBNA2 acidic domain underlie coordinate transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1033-8, 2004
- Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F. G., Bakkour, S., Lee, J. Y., Kadesch, T., Hardy, R. R., Aster, J. C., and Pear, W. S.: Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11: 299-308, 1999
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R., and Aguet, M.: Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10: 547-58, 1999
- Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J. C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P., Miele, L., Aguet, M., Radtke, F., and Dotto, G. P.: Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *Embo J* 20: 3427-36, 2001
- Reichlin, A., Hu, Y., Meffre, E., Nagaoka, H., Gong, S., Kraus, M., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M. C.: B cell development is arrested at the immature B cell stage in mice carrying a mutation in the cytoplasmic domain of immunoglobulin beta. *J Exp Med* 193: 13-23, 2001
- Reizis, B. and Leder, P.: Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes Dev* 16: 295-300, 2002
- Reynolds, T. C., Smith, S. D., and Sklar, J.: Analysis of DNA surrounding the breakpoints of chromosomal translocations involving the beta T cell receptor gene in human lymphoblastic neoplasms. *Cell* 50: 107-17, 1987
- Robey, E., Chang, D., Itano, A., Cado, D., Alexander, H., Lans, D., Weinmaster, G., and Salmon, P.: An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell* 87: 483-92, 1996
- Romer, S., Saunders, U., Jack, H. M., and Jehn, B. M.: Notch1 enhances B-cell receptor-induced apoptosis in mature activated B cells without affecting cell cycle progression and surface IgM expression. *Cell Death Differ* 10: 833-44, 2003
- Roper, K., Gregory, S. L., and Brown, N. H.: The 'spectraplakins': cytoskeletal giants with characteristics of both spectrin and plakin families. *J Cell Sci* 115: 4215-25, 2002
- Rosenkilde, M. M., Benced-Jensen, T., Andersen, H., Holst, P. J., Kledal, T. N., Luttichau, H. R., Larsen, J. K., Christensen, J. P., and Schwartz, T. W.: Molecular pharmacological phenotyping of EBI2. An orphan seven-transmembrane receptor with constitutive activity. *J Biol Chem* 281: 13199-208, 2006
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., Nakagami-Yamaguchi, E., Hamada, Y., Aizawa,

- S., and Hirai, H.: Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18: 675-85, 2003
- Sakai, T., Taniguchi, Y., Tamura, K., Minoguchi, S., Fukuhara, T., Strobl, L. J., Zimmer-Strobl, U., Bornkamm, G. W., and Honjo, T.: Functional replacement of the intracellular region of the Notch1 receptor by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* 72: 6034-9, 1998
- Sambrook, J. and Russel, D. W.: Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001
- Sanchez, I. and Dynlacht, B. D.: New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol* 16: 311-21, 2005
- Schmitt, T. M. and Zuniga-Pflucker, J. C.: Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 17: 749-56, 2002
- Schroeder, T. and Just, U.: Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. *Embo J* 19: 2558-68, 2000
- Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G. W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U. H., and Eick, D.: The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res* 29: 397-406, 2001
- Schwarzmeier, J. D., Hubmann, R., Duchler, M., Jager, U., and Shehata, M.: Regulation of CD23 expression by Notch2 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 46: 157-65, 2005
- Schwering, I., Brauning, A., Klein, U., Jungnickel, B., Tinguely, M., Diehl, V., Hansmann, M. L., Dalla-Favera, R., Rajewsky, K., and Kuppers, R.: Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 101: 1505-12, 2003
- Sinclair, A. J., Palmero, I., Peters, G., and Farrell, P. J.: EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Embo J* 13: 3321-8, 1994
- Singh, H., Medina, K. L., and Pongubala, J. M.: Contingent gene regulatory networks and B cell fate specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4949-53, 2005
- Song, X., Tao, Y., Zeng, L., Yang, J., Tang, F., Lee, L. M., Gong, J., Wu, Q., and Cao, Y.: Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 modulates cyclin D1 by c-Jun/Jun B heterodimers. *Sci China C Life Sci* 48: 385-93, 2005
- Spender, L. C., Cornish, G. H., Sullivan, A., and Farrell, P. J.: Expression of transcription factor AML-2 (RUNX3, CBF(alpha)-3) is induced by Epstein-Barr virus EBNA-2 and correlates with the B-cell activation phenotype. *J Virol* 76: 4919-27, 2002
- Strobl, L. J., Hofelmayr, H., Marschall, G., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W., and Zimmer-Strobl, U.: Activated Notch1 modulates gene expression in B cells similarly to Epstein-Barr viral nuclear antigen 2. *J Virol* 74: 1727-35, 2000
- Swiatek, P. J., Lindsell, C. E., del Amo, F. F., Weinmaster, G., and Gridley, T.: Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev* 8: 707-19, 1994
- Talora, C., Campese, A. F., Bellavia, D., Pascucci, M., Checquolo, S., Groppioni, M., Frati, L., von Boehmer, H., Gulino, A., and Screpanti, I.: Pre-TCR-triggered ERK signalling-dependent downregulation of E2A activity in Notch3-induced T-cell lymphoma. *EMBO Rep* 4: 1067-72, 2003
- Tanigaki, K., Han, H., Yamamoto, N., Tashiro, K., Ikegawa, M., Kuroda, K., Suzuki, A., Nakano, T., and Honjo, T.: Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat Immunol* 3: 443-50, 2002
- Teitell, M. A.: The TCL1 family of oncoproteins: co-activators of transformation. *Nat Rev Cancer* 5: 640-8, 2005

- Thorley-Lawson, D. A. and Babcock, G. J.: A model for persistent infection with Epstein-Barr virus: the stealth virus of human B cells. *Life Sci* 65: 1433-53, 1999
- Torres, R. M., Flaswinkel, H., Reth, M., and Rajewsky, K.: Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex. *Science* 272: 1804-8, 1996
- Tsutsui, T., Hesabi, B., Moons, D. S., Pandolfi, P. P., Hansel, K. S., Koff, A., and Kiyokawa, H.: Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity. *Mol Cell Biol* 19: 7011-9, 1999
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., and Chu, G.: Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5116-21, 2001
- Tuveson, D. A., Carter, R. H., Soltoff, S. P., and Fearon, D. T.: CD19 of B cells as a surrogate kinase insert region to bind phosphatidylinositol 3-kinase. *Science* 260: 986-9, 1993
- Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N., and Kikutani, H.: Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 286: 300-3, 1999
- Vercauteren, S. M. and Sutherland, H. J.: Constitutively active Notch4 promotes early human hematopoietic progenitor cell maintenance while inhibiting differentiation and causes lymphoid abnormalities in vivo. *Blood* 104: 2315-22, 2004
- Wallberg, A. E., Pedersen, K., Lendahl, U., and Roeder, R. G.: p300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro. *Mol Cell Biol* 22: 7812-9, 2002
- Waltzer, L., Logeat, F., Brou, C., Israel, A., Sergeant, A., and Manet, E.: The human J kappa recombination signal sequence binding protein (RBP-J kappa) targets the Epstein-Barr virus EBNA2 protein to its DNA responsive elements. *Embo J* 13: 5633-8, 1994
- Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E.: An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43: 831-40, 1985
- Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A., and Kieff, E.: Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol* 64: 2309-18, 1990
- Wang, F., Gregory, C. D., Rowe, M., Rickinson, A. B., Wang, D., Birkenbach, M., Kikutani, H., Kishimoto, T., and Kieff, E.: Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 3452-6, 1987
- Wang, L., Grossman, S. R., and Kieff, E.: Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP, and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 430-5, 2000
- Wang, S. E., Wu, F. Y., Chen, H., Shamay, M., Zheng, Q., and Hayward, G. S.: Early activation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA, RAP, and MTA promoters by the tetradecanoyl phorbol acetate-induced AP1 pathway. *J Virol* 78: 4248-67, 2004
- West, J. T. and Wood, C.: The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 regulator of transcription activation (RTA) in control of gene expression. *Oncogene* 22: 5150-63, 2003
- Wharton, K. A., Johansen, K. M., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S.: Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 43: 567-81, 1985
- Wilson, A., MacDonald, H. R., and Radtke, F.: Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J Exp Med* 194: 1003-12, 2001

- Witt, C. M., Hurez, V., Swindle, C. S., Hamada, Y., and Klug, C. A.: Activated Notch2 potentiates CD8 lineage maturation and promotes the selective development of B1 B cells. *Mol Cell Biol* 23: 8637-50, 2003
- Wu, L., Aster, J. C., Blacklow, S. C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S., and Griffin, J. D.: MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet* 26: 484-9, 2000
- Xu, Z. P., Dutra, A., Stellrecht, C. M., Wu, C., Piatigorsky, J., and Saunders, G. F.: Functional and structural characterization of the human gene BHLHB5, encoding a basic helix-loop-helix transcription factor. *Genomics* 80: 311-8, 2002
- Yamadori, T., Baba, Y., Matsushita, M., Hashimoto, S., Kurosaki, M., Kurosaki, T., Kishimoto, T., and Tsukada, S.: Bruton's tyrosine kinase activity is negatively regulated by Sab, the Btk-SH3 domain-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6341-6, 1999
- Yokoyama, K., Su Ih, I. H., Tezuka, T., Yasuda, T., Mikoshiba, K., Tarakhovsky, A., and Yamamoto, T.: BANK regulates BCR-induced calcium mobilization by promoting tyrosine phosphorylation of IP(3) receptor. *Embo J* 21: 83-92, 2002
- Young, L. S. and Rickinson, A. B.: Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4: 757-68, 2004
- Yun, T. J. and Bevan, M. J.: Notch-regulated ankyrin-repeat protein inhibits Notch1 signaling: multiple Notch1 signaling pathways involved in T cell development. *J Immunol* 170: 5834-41, 2003
- Zhang, J., Chen, H., Weinmaster, G., and Hayward, S. D.: Epstein-Barr virus BamHi-a rightward transcript-encoded RPMS protein interacts with the CBF1-associated corepressor CIR to negatively regulate the activity of EBNA2 and NotchIC. *J Virol* 75: 2946-56, 2001
- Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J. J., Chen, L., and Hayward, S. D.: A role for SKIP in EBNA2 activation of CBF1-repressed promoters. *J Virol* 74: 1939-47, 2000
- Zimber-Strobl, U., Kempkes, B., Marschall, G., Zeidler, R., Van Kooten, C., Banchereau, J., Bornkamm, G. W., and Hammerschmidt, W.: Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) is not sufficient to maintain proliferation of B cells but both it and activated CD40 can prolong their survival. *Embo J* 15: 7070-8, 1996
- Zimber-Strobl, U., Strobl, L. J., Meitinger, C., Hinrichs, R., Sakai, T., Furukawa, T., Honjo, T., and Bornkamm, G. W.: Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of *Drosophila* Suppressor of Hairless. *Embo J* 13: 4973-82, 1994
- Zweidler-McKay, P. A., He, Y., Xu, L., Rodriguez, C. G., Karnell, F. G., Carpenter, A. C., Aster, J. C., Allman, D., and Pear, W. S.: Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. *Blood* 106: 3898-906, 2005

Danksagung

Vielen Dank an Herrn **Prof. Dr. Dirk Eick** für die Betreuung meiner Promotion und die Herstellung des Kontakts zu meinen Kooperationspartnern. Ein Dank auch an Herrn **Prof. Dr. Georg Bornkamm**, für die Möglichkeit die Promotion an seinem Institut durchführen zu können.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau **PD Dr. Ursula Strobl** bedanken, für die Aufnahme in ihre tolle Arbeitsgruppe, die ständige Bereitschaft auf Fragen zu antworten, für kritische und konstruktive Diskussionen und über das Fachliche hinaus, für ihren Familiensinn und die angenehme Art, mit Menschen umzugehen.

Da ich bereits die tolle Arbeitsgruppe erwähnt habe: Einen lieben Dank an **Caro Hojer**, die mir mit gutem Kaffee und einer steten Auswahl an ungesunden Dingen das Doktoranden-Leben versüßt hat, die meine Schweden-Liebe teilt und die mich in die Geheimnisse von EndNote eingeweiht hat. Ein herzlicher Dank geht an **Dr. Cornelia Hömig**, die trotz ihrer 24h-Schichten mit mir ins Theater und in eine traumhaft antike Weihnachtsausstellung gegangen ist und mich gleich zu Beginn mit toten Mäusen im Gefrierschrank erschreckt hat. Vielen Dank auch an **Julia Rastelli**, die forsche Forscherin, mit der man sich über die Keimzentrumsreaktion genauso gut unterhalten kann wie über Bio-Produkte. Einen herzlichen Dank an **Franziska Hampel**, die mit ihren tausend guten Fragen auch mein Wissen erweitert hat, die meine LightCycler-Leidenschaft teilt und mir die Tücken der Formatierung in Word näher gebracht hat. Vielen Dank an **Gabi Marschall**, die mich heldenhaft mit Mäusemilzen versorgt hat und die für die Organisation in unserer Gruppe unersetzlich ist. Vielen Dank auch an **Dr. Lothar Strobl** für die Versorgung mit neuer Literatur und seine besonnene Art.

Weiterhin möchte ich einigen Mitstreitern aus der KMOLBI danken: **Judith Reschke**, meiner lieben Fressfreundin und Western-Expertin, die mir stets mit Rat (Western) und Tat (Essen) zur Seite gestanden hat. **Stephi Tobollik**, ebenso Western-Expertin und Wegbegleiterin seit meinen ersten Tagen in München, deren Labor- und Lebensweg erfreulich parallel zu meinem verläuft. **Dr. Florian Rückerl**, der berühmte Patentanwalt, der mal alle unsere Patente durchbringen wird und mit dem man prima segeln und Skifahren kann und **Dr. Maren Mierau**, nicht zuletzt für die Erstellung des „Promotions-Protokolls“. Außerdem möchte ich **Dr. Nathalie Uyttersprot** für ihre Hilfsbereitschaft bezüglich B-Zell-Fragen und für die französischen Abende danken, **Dr. Gerhard Laux** für seine unendliche Geduld bei allen Computer- und sonstigen Fragen, **Birgit Schrezenmeir** und **Sylvia Manglkammer** für viel

Organisatorisches und Süßigkeiten-Spenden für die armen ausgehungerten Forscher, allen Mitarbeitern der **KMOLBI** für das sehr angenehme Arbeitsklima und schließlich allen **Lunch-Club-Girls** für die kulinarisch wertvollen Donnerstag.

Meinen Kooperationspartnern, die mich bei der Durchführung und der Analyse der Microarray-Chips angeleitet und unterstützt haben, möchte ich ganz besonders danken: **Ute Bär, Dr. Helmut Burtscher, Dr. Ulrich Weidle** bei Roche Diagnostics, Penzberg und **Dr. Reinhard Hoffmann** vom Max-von-Pettenkofer Institut in München.

Meinen **Eltern, Schwiegereltern** und **Geschwistern** danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und das Verständnis gegenüber der „verrückten“ Biologin, sowie für die liebevolle Betreuung von Magdalena in den heißen Phasen dieser Arbeit.

Magdalena Kohlhof, meiner süßen Tochter, danke ich, dass sie mich gelehrt hat, dass eine Promotion nicht alles auf der Welt ist. Und vor allem meinem Mann, **Christian Kohlhof**, danke ich für Verständnis und Unterstützung während der „guten und schlechten“ Zeiten dieser Promotion und einem für einen Nicht-Biologen wahnsinnigen Interesse für die kleinen unsichtbaren Dinge, die in einer Zelle passieren.

Veröffentlichungen

Paper

Schroeder T, **Kohlhof H**, Rieber N, Just U; J Immunol. 2003 Jun 1; 170(11):5538-48

“Notch signalling induces multilineage myeloid differentiation and up-regulates PU.1 expression.”

Poster

Hella Kohlhof, Franziska Hampel, Reinhard Hoffmann, Helmut Burtscher, Ulrich H. Weidle, Dirk Eick, Ursula Zimmer-Strobl and Lothar Strobl

German Society of Immunology, Studiengruppe *Biology of B Lymphocytes*

4th B Cell Forum, Kloster Banz, 2. - 4. März, 2006

“The Role of Notch and EBNA2 in B Cell Development and Activation”

Lebenslauf Hella Kohlhof

Name Hella Kohlhof, geb. Herberger
Adresse Alramstr. 27 b
81371 München
Telefon 0171/6512137
Fax 089/74688716
E-Mail hella.kohlhof@gmx.de

Nationalität Deutsch
Geburtsdatum 31.12.1972
Geburtsort Krefeld
Familienstand verheiratet, eine Tochter

Ausbildung

29. Januar 2007

Mündliche Prüfung zur Erlangung des Doktorgrades

Mai 2002 – Oktober 2002

und September 2003 – September 2006

Promotion in der Arbeitsgruppe PD Dr. Ursula Strobl an der GSF, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München
Titel der Arbeit: „Untersuchungen zur funktionellen Äquivalenz zwischen Notch und EBNA2 in EBV-immortalisierten B-Zellen“

Juni 2005

Forschungsaufenthalt im Labor von Dr. Helmut Burtscher, Roche Diagnostics, Penzberg

1998 - 2002

Ludwig-Maximilians-Universität, München
Abschluss: Diplom Biologin, Note „sehr gut“ (1,2)
Fächer: Humangenetik, Immunologie, Biochemie, Zoologie
Diplomarbeit bei Prof. Dr. Ursula Just an der GSF, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München
Titel der Arbeit: „Untersuchungen zur Wirkung von aktiviertem Notch auf hämatopoetische Stammzellen“

Januar 2000 - Juni 2000

Göteborgs Universität, Göteborg, Schweden
Europäisches Austauschprogramm „Sokrates“
Kurse: Immunologie, Humangenetik, Schwedisch

1996 - 1998

RWTH (Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule)
Aachen
Vordiplom Biologie, Gesamtnote: „gut“

1992 - 1994

Schule für Medizinisch-Technische Assistenten an der RWTH Aachen

Abschluss: Medizinisch-Technische Assistentin (Labor)

1983 - 1992

Luise-von-Duesberg-Gymnasium, Kempen

Abschluss: Abitur

1979 - 1983

Gemeinschaftsgrundschule Vorst, Tönisvorst

Berufserfahrung

Oktober 2006 - Januar 2007

Postdoc in der Arbeitsgruppe PD Dr. Ursula Strobl an der GSF, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München

Januar 1995 - September 1996

RWTH Aachen, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie

Medizinisch-Technische Assistentin

Zusatzinformationen

Mutterschutz und Erziehungszeit vom 27.10.2002 bis 31.8.2003

München, im Februar 2007

Tabellenverzeichnis

- A1** Funktionelle Gengruppen in den verschiedenen Clustern Notch1IC-differenziell exprimierter Gene
- A2** Funktionelle Gengruppen in den verschiedenen Clustern Notch2IC-differenziell exprimierter Gene
- A3** Die 50 am stärksten durch Notch1IC induzierten Proben-Sets
- A4** Die 50 am stärksten durch Notch2IC induzierten Proben-Sets
- A5** Die 50 am stärksten durch EBNA2 induzierten Proben-Sets
- A6** Gengruppen-Vergleich der Gene, die am stärksten durch das jeweilige Transgen induziert wurden
- A7** Die 50 am stärksten durch Notch1IC reprimierten Proben-Sets
- A8** Die 50 am stärksten durch Notch2IC reprimierten Proben-Sets
- A9** Die 50 am stärksten durch EBNA2 reprimierten Proben-Sets
- A10** Singulär regulierte Gene
- A11** Zellzyklus-assoziierte Gene, die durch Notch1IC nach 3d reguliert werden
- A12** Zellzyklus-assoziierte Gene, die durch Notch2IC nach 3d reguliert werden
- A13** Durch Notch1IC-reprimierte Gene, die mit der Immunantwort assoziieren
- A14** Durch Notch2IC-reprimierte Gene, die mit der Immunantwort assoziieren
- A15** Durch EBNA2-reprimierte Gene, die mit der Immunantwort assoziieren

Tab. A1 Funktionelle Gengruppen in den verschiedenen Clustern	Cluster1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6	Cluster 7	Cluster 8
Notch1IC	↓ 8h/24h	↓ 3d	↑ 8h/24h	↑ 24h/3d	↑ 3d/24h	↑ max 24h	↑ 24h	↑ 3d
AAA ATPase, central region							3	
antigen presentation	3							
antigen processing	3							
biopolymer metabolism		3		3				
Biosynthesis of steroids // KEGG							4	
carboxy-lyase activity				3				
catalytic activity				3				
cell cycle				4	4			5
cell cycle arrest								3
cell cycle checkpoint				3	3			
cell division					5			4
cell organization and biogenesis				3				
Cell_cycle_KEGG // GenMAPP				4	3			3
cellular localization				3				
cellular metabolism				4				
cellular physiological process				4				
chemokine activity							3	
chemokine receptor binding							3	
Cholesterol_Biosynthesis // GenMAPP							4	
chromosome				4				
chromosome segregation								3
chromosome\, pericentric region								3
Class II histocompatibility antigen, beta chain, beta-1 domain	4	4						
coated pit							3	
condensed chromosome				4				
Cyclin, C-terminal					4			
Cyclin, N-terminal domain					3			
cytoplasm organization and biogenesis				7				
cytoskeleton								3
D111/G-patch domain				3				
Death effector protein	3							
defense response	4	3						
diacylglycerol binding	3							
DNA metabolism				5				
DNA replication				7				
DNA_replication_Reactome // GenMAPP				8				
DNA-dependent DNA replication				6				
DNA-directed DNA polymerase activity				4				
double-stranded DNA binding				3				
endopeptidase inhibitor activity							3	
establishment of cellular localization				3				
Ets-domain	3							
exonuclease activity				3				
G1 phase					3			
G1 phase of mitotic cell cycle					3			
G1/S transition of mitotic cell cycle				3				
G1_to_S_cell_cycle_Reactome // GenMAPP				3				
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism // KEGG								5
G-protein-coupled receptor binding							3	
helicase activity					3			
Helicase, C-terminal					3			
humoral defense mechanism	3							
humoral defense mechanism (sensu Vertebrata)						3		
humoral immune respons	3					3		
immune response	4	4						
integral to membrane	5							
integral to plasma membrane	3		3					
interphase				3				
interphase of mitotic cell cycle				3				
intracellular				3				
intracellular membrane-bound organelle				4				

Tab. A1 Funktionelle Gengruppen in den verschiedenen Clustern	Cluster1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6	Cluster 7	Cluster 8
Notch1IC	↓ 8h/24h	↓ 3d	↑ 8h/24h	↑ 24h/3d	↑ 3d/24h	↑ max 24h	↑ 24h	↑ 3d
intracellular non-membrane-bound organelle				3				3
intracellular organelle				4				
intracellular signaling cascade"			3					
intracellular transport				3				
intrinsic to membrane	5							
intrinsic to plasma membrane			3					
Kinesin, motor region								3
Ligand-binding domain of nuclear hormone receptor							3	
M phase					4			5
M phase of mitotic cell cycle					4			5
macromolecule metabolism				4				
MCM				4				
membrane	5							
membrane-enclosed lumen				5				
metabolism				5				
Metallo-phosphoesterase	4							
methyltransferase activity				3				
microtubule cytoskeleton								4
microtubule-based movement				3				
microtubule-based process				3				
mitochondrial envelope				3				
mitochondrial membrane				3				
mitosis					4			5
mitotic cell cycle					5			6
non-membrane-bound organelle				3				3
nuclear chromosome				3				
nuclear lumen				5				
nuclear mRNA splicing\, via spliceosome				3				
Nuclear_Receptors // GenMAPP							3	
nucleic acid binding				3	4			
nucleobase\, nucleoside\, nucleotide and nucleic acid metabolism				7				
nucleolus				7				
nucleotide binding				3				
nucleotide biosynthesis				3				
nucleotide metabolism				3				
nucleotidyltransferase activity				4				
nucleus				5				
organelle				4				
organelle lumen				5				
organelle organization and biogenesis				3				
organismal physiological process		3						
phosphate metabolism		3						
phosphorus metabolism		3						
phosphorylation		3						
physiological process				3				
plasma membrane	3							
primary metabolism				4				
protease inhibitor activity							3	
protein amino acid phosphorylation		3						
protein kinase activity		3						
protein modification		3						
protein polymerization				4				
protein-tyrosine kinase activity			3					
purine ribonucleotide metabolism				3				
Pyrimidine metabolism // KEGG				5				
pyrimidine nucleotide metabolism				3				
Pyrin domain	3							
receptor signaling protein activity			3					
regulation of cell cycle				3	4			3
regulation of cellular process								3
regulation of cyclin dependent protein kinase activity					3			

Tab. A1 Funktionelle Gengruppen in den verschiedenen Clustern	Cluster1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6	Cluster 7	Cluster 8
Notch1IC	↓ 8h/24h	↓ 3d	↑ 8h/24h	↑ 24h/3d	↑ 3d/24h	↑ max 24h	↑ 24h	↑ 3d
regulation of DNA metabolism				3				
regulation of progression through cell cycle				3	4			3
response to biotic stimulus	4	4						
response to external stimulus		3						
response to other organism	4	3						
response to pest/ pathogen or parasite	4	3						
response to stimulus		3				3		
ribonucleotide biosynthesis				3				
ribonucleotide metabolism				3				
ribosome biogenesis				7				
ribosome biogenesis and assembly				8				
RNA binding				4				
RNA binding S1				4				
RNA metabolism				6				
RNA processing				6				
RNA splicing), via transesterification reactions				3				
RNA splicing), via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile				3				
rRNA metabolism				7				
rRNA processing				6				
SH2 motif			6					
SH3		3	3					
signal transducer activity			4					
Small chemokine, interleukin-8 like							3	
spindle								6
sterol biosynthesis							3	
sulfur amino acid metabolism							3	
sulfur metabolism							4	
transcription initiation from RNA polymerase II promoter							3	
transferase activity				3				
transferase activity), transferring one-carbon groups				3				
translation factor activity), nucleic acid binding						3		
translation regulator activity						3		
Tubulin/FtsZ, C-terminal				5				
Tubulin/FtsZ, GTPase				4				
unfolded protein binding				3				
Zn-finger, C4-type steroid receptor							3	

Tab. A2 Funktionelle Gengruppen in den verschiedenen Clustern	Cluster1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6	Cluster 7
Notch2IC	U-shape	↑ 3d	↑ 24h/3d	↓	↓ 3d	↑ 24h	↑ 8h/24h
acetyl-CoA metabolism							3
aerobic respiration		3					
alcohol metabolism							5
antigen presentation						9	
ATP-dependent helicase activity		3					
ATP-dependent RNA helicase activity		3					
biopolymer metabolism	3	3	6				
biopolymer modification	3						
Biosynthesis of steroids // KEGG							5
calcium ion binding				3			
calmodulin binding				3			
catalytic activity	3		5				
cell							3
cell communication				3			
cell cycle		6	7				
cell cycle arrest							3
cell cycle checkpoint		3	4				
cell division		3	7				
cell fraction				3			
Cell_cycle_KEGG // GenMAPF	3		6				
cellular lipid metabolism							
cellular metabolism			3				
cellular physiological process			3				
cellular respiration		3					
cholesterol biosynthesis							8
cholesterol metabolism							6
Cholesterol_Biosynthesis // GenMAPF							9
chromatin			3				
Circadian_Exercise // GenMAPF	4						
Class II aldolase/adducin, N-termina				3			
Class II histocompatibility antigen, beta chain, beta-1 domain						9	
Cyclin, C-terminal			3				
Cyclin, N-terminal domain			3				
Cytochrome b5			3				
cytokine binding				3			
cytoplasm organization and biogenesis			3				
defense response					3	9	
dephosphorylator		3					
detection of external stimulus						4	
detection of stimulus						3	
DNA metabolism			9				
DNA polymerase // KEGG			3				
DNA recombination							3
DNA repair			9				
DNA replication			9				
DNA_replication_Reactome // GenMAPF			8				
DNA_replication_Reactome // GenMAPF		3					
DNA-binding SAP		4					
DNA-dependent ATPase activity			3				
DNA-dependent DNA replicator			8				
DNA-directed DNA polymerase activity			5				
Dual specificity protein phosphatase		3					
electron transport							4
endoplasmic reticulum							4
endoplasmic reticulum membrane						3	3
Fatty acid desaturase			3				
Folate biosynthesis // KEGG			3				
G1 phase			3				
G1 phase of mitotic cell cycle			3				
G1_to_S_cell_cycle_Reactome // GenMAPF			5				
generation of precursor metabolites and energy							3
Glutathione metabolism // KEGG	3						
helicase activity		3					
HIN-200/IF120x domain				5			
humoral defense mechanism (sensu Vertebrata)						4	
humoral immune response						4	
hydrolase activity			3				
immune response				4		9	
Immunoglobulin-like						6	
Importin-beta, N-terminal		3					
integral to membrane				3		8	
interphase			3				
interphase of mitotic cell cycle			3				
intracellular		3					
intracellular membrane-bound organelle		3	4				
intracellular organelle		3					
intracellular receptor-mediated signaling pathway							3
intracellular transport		3					
intrinsic to membrane				3		8	
kinase activity					3		
Kinesin, motor region		3					
lipid binding				3			
lipid biosynthesis							6
lipid metabolism	3						3
lysosome						3	
lytic vacuole						3	

Tab. A2 Funktionelle Gengruppen in den verschiedenen Clustern	Cluster1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6	Cluster 7
Notch2IC	U-shape	↑ 3d	↑ 24h/3d	↓	↓ 3d	↑ 24h	↑ 8h/24h
M phase		5	5				
M phase of mitotic cell cycle		5	6				
macromolecule metabolism			4				
MATH	4						
MCM			4				
membrane				3	9		
membrane-bound organelle		3	4				
membrane-enclosed lumen		3					
metabolism	3		3				
MHC Class II alpha chain, alpha-1 domain					4		
microtubule-based process		3					
mitosis		5	6				
mitotic cell cycle		5	5				
monooxygenase activity						3	
Myosin tail 2				3			
negative regulation of progression through cell cycle							3
nuclear envelope-endoplasmic reticulum network					3		3
nuclear export		3					
nuclear lumen		3					
nuclear transport		4					
nucleobase\, nucleoside\, nucleotide and nucleic acid metabolism			4				
nucleobase\, nucleoside\, nucleotide and nucleic acid transport		3					
nucleocytoplasmic transport		3					
nucleolus			3				
nucleotide binding		4					
nucleotide metabolism			3				
Nucleotide Metabolism // GenMAPF			5				
nucleotidyltransferase activity			3				
nucleus		4	5				
One carbon pool by folate // KEGG			4				
organelle		3					
organelle lumen		3					
organelle organization and biogenesis			3				
organismal physiological process					6		
oxidoreductase activity							4
oxidoreductase activity\, acting on paired donors\, with incorporation or reduction of molecular oxygen							3
Paralemmin					3		
Peptidase C1A, papain					4		
phosphoinositide-mediated signaling			5				
physiological process			3				
plasma membrane					4		
positive regulation of physiological process			3				
primary metabolism			3				
Proteasome component region PCI		3					
protein amino acid dephosphorylator		3					
protein amino acid N-linked glycosylator					4		
protein folding							3
protein import into nucleus\, docking		3					
Protein kinase C, phorbol ester/diacylglycerol binding				3			
protein modification	3						
Protein of unknown function DUF29t		3					
Protein of unknown function UPF000t					3		
protein polymerization							3
protein serine/threonine phosphatase activity		3					
Pyrimidine metabolism // KEGG			4				
Pyrin domain				5			
Ras GTPase superfamily					3		
receptor activity					3		
regulation of cell cycle		3	7				
regulation of cell differentiator			3				
regulation of cyclin dependent protein kinase activity			3				
regulation of DNA metabolism			5				
regulation of mitosis		3					
regulation of progression through cell cycle		3	6				
response to biotic stimulus				4			
response to DNA damage stimulus			8				
response to endogenous stimulus			8				
response to external stimulus					3		
response to other organism					6		
response to pest\, pathogen or parasite					6		
response to stimulus			3		6		
response to stress			6		4		
Ribosomal RNA methyltransferase RrmJ/FtsJ		3					
ribosome biogenesis and assembly			4				
RNA binding		3					
RNA helicase activity		4					
RNA metabolism		3					
RNA processing		3					
RNA-dependent ATPase activity		3					
rRNA metabolism			3				
rRNA processing			3				
second-messenger-mediated signaling			3				
signal transducer activity					3		
signal transduction				3			

Tab. A2 Funktionelle Gengruppen in den verschiedenen Clustern	Cluster1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6	Cluster 7
Notch2IC	U-shape	↑ 3d	↑ 24h/3d	↓	↓ 3d	↑ 24h	↑ 8h/24h
small GTPase mediated signal transduction					3		
spindle		3					
steroid biosynthesis						9	
steroid metabolism						7	
sterol biosynthesis						9	
sterol metabolism						9	
teroid hormone receptor signaling pathway							3
Thioredoxin type domair					3		
transferase activity), transferring phosphorus-containing groups				3			
Tubulin/FtsZ, C-terminal						3	
Tubulin/FtsZ, GTPase						3	
unfolded protein binding						3	
vacuole					3		
Yippee-like protein				3			
Zn-finger, Ran-binding		3					

Tab. A3 Die 50 am stärksten induzierten Proben-Sets durch Notch1IC	Name	0h	8h	24h	3d	Ratio 8/0	Ratio 24h/0	Ratio 3d/0	Beschreibung
203394_s_at	hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)	4	488	998	979	110.9	226.9	222.6	Transcriptional repressor of genes that require a bHLH protein for their transcription. May act as a negative regulator of myogenesis by inhibiting the functions of MYOD1 and ASH1 (By similarity).
209987_s_at	achaete-scute complex-like 1 (Drosophila)	4	100	115	446	22.4	25.7	100.1	May play a role at early stages of development of specific neural lineages in most regions of the CNS, and of several lineages in the PNS. Essential for the generation of olfactory and autonomic neurons. Activates transcription by binding to the E box (5'-CANNTG-3').
205554_s_at	deoxyribonuclease I-like 3	29	481	980	1377	16.6	33.7	47.4	Has DNA hydrolytic activity. Does not bind to actin. Cleaves chromatin DNA to nucleosomal units.
203395_s_at	hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)	10	158	323	454	16.0	32.7	46.1	
207363_at	retinoschisis (X-linked, juvenile) 1	37	481	667	489	12.9	17.9	13.1	May be active in cell adhesion processes during retinal development.
225369_at	endothelial cell adhesion molecule	14	180	282	171	12.8	20.1	12.2	Can mediate aggregation most likely through a homophilic molecular interaction (By similarity). Efficient DNA binding requires dimerization with another bHLH protein (By similarity).
44783_s_at	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	8	73	377	426	9.4	48.6	54.9	
213060_s_at	chitinase 3-like 2 /// chitinase 3-like 2	165	1461	6537	5611	8.9	39.7	34.0	k.A.
221679_s_at	abhydrolase domain containing 6	31	268	955	305	8.6	30.7	9.8	k.A.
205544_s_at	complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2	148	1193	2120	1683	8.1	14.3	11.4	Receptor for complement C3d, for the Epstein-Barr virus on human B-cells and T-cells and for HNRPU. Participates in B lymphocytes activation.
204995_at	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	147	1173	1370	1534	8.0	9.3	10.4	p35 is a neuron specific activator of CDK5. The complex p35/CDK5 is required for neurite outgrowth and cortical lamination. Activator of TPKII.
1559618_at	Deltex homolog 1 (Drosophila)	18	137	163	235	7.7	9.2	13.3	Regulator of Notch signaling, a signaling pathway involved in cell-cell communications that regulates a broad spectrum of cell-fate determinations. Mainly acts as a positive regulator of Notch, but it also acts as a negative regulator, depending on the developmental and cell context. Mediates the antineural activity of Notch, possibly by inhibiting the transcriptional activation mediated by MATCH1. Involved in neurogenesis, lymphogenesis and myogenesis, and may also be involved in MZB (Marginal zone B) cell differentiation. Promotes B-cell development at the expense of T-cell development, suggesting that it can antagonize NOTCH1. Functions as an ubiquitin ligase protein in vitro, suggesting that it may regulate the Notch pathway via some ubiquitin ligase activity.
45288_at	abhydrolase domain containing 6	31	208	650	271	6.7	20.9	8.7	k.A.
206115_at	early growth response 3	13	86	599	35	6.4	44.5	2.6	Probable transcription factor involved in muscle spindle development.
241990_at	ras homolog gene family, member V	25	157	933	1128	6.3	37.4	45.3	Displays low GTPase activity and exist predominantly in the GTP-bound form (By similarity).
203823_at	regulator of G-protein signalling 3	40	236	283	250	6.0	7.2	6.3	This gene encodes a member of the regulator of G-protein signaling (RGS) family. This protein is a GTP-ase activating protein which inhibits G-protein mediated signal transduction. The protein is largely cytosolic, but G-protein activation leads to translocation of this protein to the plasma membrane. A nuclear form of this protein has also been described, but its sequence has not been identified. Multiple alternatively spliced transcript variants have been described for this gene but the full-length nature of some transcripts is not yet known.
212124_at	retinoic acid induced 17	208	984	1717	1736	4.7	8.2	8.3	Sharma et al. (2003) showed a direct interaction between RAI17 and AR by cotransfection and immunoprecipitation of simian kidney cell lysates. The transactivation domain of AR and the central region of RAI17 were responsible for the interaction. A strong intrinsic transactivation domain was identified in the C-terminal proline-rich region of RAI17. In human prostate cancer cells, RAI17 augmented the transcriptional activity of AR. Moreover, RAI17 colocalized with AR and SUMO1 (UBL1; 601912) at replication foci throughout S phase, and it was capable of enhancing sumoylation of AR in vivo. Studies using sumoylation-deficient AR mutants suggested that the augmentation of AR activity by RAI17 is dependent on the sumoylation of the receptor. Sharma et al. (2003) concluded that RAI17 is a coregulator of AR.
209695_at	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3	28	112	275	117	4.0	9.8	4.2	The protein encoded by this gene belongs to a small class of prenylated protein tyrosine phosphatases (PTPs). PTPs are cell signaling molecules that play regulatory roles in a variety of cellular processes. This class of PTPs contain a PTP domain and a characteristic C-terminal prenylation motif. Studies of this class of PTPs in mice demonstrated that they were prenylated proteins in vivo, which suggested their association with cell plasma membrane. Overexpression of this gene in mammalian cells was reported to inhibit angiotensin-II induced cell calcium mobilization and promote cell growth. Two alternatively spliced variants exist.
231592_at	X (inactive)-specific transcript	51	199	136	9	3.9	2.6	0.2	k.A.

Tab. A3 Die 50 am stärksten induzierten Proben-Sets durch Notch1IC											
	Name	0h	8h	24h	3d	Ratio 8/0	Ratio 24h/0	Ratio 3d/0	Beschreibung		
206126_at	Burkitt lymphoma receptor 1, GTP binding protein (chemokine (C-X-C motif) receptor 5)	32	118	154	8	3.7	4.8	0.3	Cytokine receptor that binds to BLC. BLR1 exerts possibly a regulatory function in burkitt lymphoma (BL) lymphomagenesis and/or B-cell differentiation. It is a potential candidate for cell-cell interaction, and activation of mature B-lymphocytes in lymphatic tissues. CXCR5 Cytokine receptor that binds to B-lymphocyte chemoattractant (BLC). Involved in B-cell migration into B-cell follicles of spleen and Peyer patches, but not in those of mesenteric or peripheral lymph nodes. Mainly in spleen, in resting B-cells.		
236089_at	Transcribed locus	9	29	205	342	3.3	23.2	38.8			
209933_s_at	CD300A antigen	174	540	1439	2149	3.1	8.3	12.4	Receptor which may contribute to the down-regulation of cytolytic activity in natural killer (NK) cells.		
230218_at	Transcribed locus	33	99	274	152	3.0	8.3	4.6			
201890_at	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	113	311	1431	1795	2.7	12.6	15.8	Provides the precursors necessary for DNA synthesis. Catalyzes the biosynthesis of deoxyribonucleotides from the corresponding ribonucleotides.		
218839_at	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	6	16	235	350	2.6	39.2	58.2			
210052_s_at	TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)	21	56	119	320	2.6	5.6	15.0	In Xenopus egg extracts, Tpx2 is required for the Ran GTP (601179)-dependent assembly of microtubules around chromosomes. Gruss et al. (2002) found that interfering with the function of human TPX2 in HeLa cells caused defects in microtubule organization during mitosis. Suppressing TPX2 expression by RNA interference led to the formation of 2 microtubule asters that did not interact and did not form a spindle. Gruss et al. (2002) concluded that even in the presence of duplicated centrosomes, spindle formation requires the function of TPX2 to generate a stable bipolar spindle with overlapping antiparallel microtubule arrays. 30 PubMed Neighbors		
213478_at	kazrin	23	58	216	118	2.6	9.5	5.2	By mass spectrometry, Kufer et al. (2002) found that TPX2 coimmunoprecipitated specifically with STK6 (602687) from mitotic HeLa cell extracts. Conversely, STK6 could be detected in TPX2 immunoprecipitates. Binding studies demonstrated that the N terminus of TPX2 directly interacted with the C-terminal catalytic domain of STK6. Although kinase activity was not required for their interaction, TPX2 was readily phosphorylated by STK6. Upon small interfering RNA		
207861_at	chemokine (C-C motif) ligand 22	113	264	326	239	2.3	2.9	2.1	May play a role in the trafficking of activated/effector T-lymphocytes to inflammatory sites and other aspects of activated T-lymphocyte physiology. Chemotactic for monocytes, dendritic cells and natural killer cells. Mild chemoattractant for primary activated T-lymphocytes and a potent chemoattractant for chronically activated T-lymphocytes but has no chemoattractant activity for neutrophils, eosinophils, and resting T-lymphocytes. Binds to CCR4. Processed forms MDC(3-69), MDC(5-69) and MDC(7-69) seem not be active.		
214039_s_at	lysosomal associated protein transmembrane 4 beta	14	33	54	108	2.3	3.8	7.5	k.A.		
204197_s_at	runt-related transcription factor 3	292	663	874	643	2.3	3.0	2.2	CBF binds to the core site, 5'-PYGPGYGGT-3', of a number of enhancers and promoters, including murine leukemia virus, polyomavirus enhancer, T-cell receptor enhancers, Ick, IL-3 and GM-CSF promoters.		
209714_s_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)	9	20	84	237	2.3	9.4	26.6	The protein encoded by this gene belongs to the dual specificity protein phosphatase family. It was identified as a cyclin-dependent kinase inhibitor, and has been shown to interact with, and dephosphorylate CDK2 kinase, thus prevent the activation of CDK2 kinase. This gene was reported to be deleted, mutated, or overexpressed in several kinds of cancers.		
235117_at	similar to RIKEN cDNA 2510006C20 gene	72	150	407	340	2.1	5.6	4.7			
210559_s_at	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	11	22	118	196	2.1	10.9	18.0	The protein encoded by this gene is a member of the Ser/Thr protein kinase family. This protein is a catalytic subunit of the highly conserved protein kinase complex known as M-phase promoting factor (MPF), which is essential for G1/S and G2/M phase transitions of eukaryotic cell cycle. Mitotic cyclins stably associate with this protein and function as regulatory subunits. The kinase activity of this protein is controlled by cyclin accumulation and destruction through the cell cycle. The phosphorylation and dephosphorylation of this protein also play important regulatory roles in cell cycle control.		
219968_at	zinc finger protein 589	71	146	219	222	2.0	3.1	3.1	k.A.		
218350_s_at	geminin, DNA replication inhibitor	16	32	264	225	2.0	16.8	14.3	Inhibits DNA replication by preventing the incorporation of MCM complex into prereplication complex (pre-RC). It is degraded during the mitotic phase of the cell cycle. Its destruction at the metaphase-anaphase transition permits replication in the succeeding cell cycle.		
204444_at	kinesin family member 11	45	90	204	430	2.0	4.6	9.7	Motor protein required for establishing a bipolar spindle. Blocking of Eg5 prevents centrosome migration and arrest cells in mitosis with monoastrial microtubule arrays.		
224847_at	cyclin-dependent kinase 6	84	169	332	414	2.0	3.9	4.9	Probably involved in the control of the cell cycle. Interacts with D-type G1 cyclins.		

Tab. A3 Die 50 am stärksten induzierten Proben-Sets durch Notch1IC											
	Name	0h	8h	24h	3d	Ratio 8/0	Ratio 24h/0	Ratio 3d/0	Beschreibung		
205394_at	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	24	47	342	220	2.0	14.4	9.3	Required for checkpoint mediated cell cycle arrest in response to DNA damage or the presence of unreplicated DNA. May also negatively regulate cell cycle progression during unperturbed cell cycles. Recognizes the substrate consensus sequence [R-X-X-S/T]. Binds to and phosphorylates CDC25A, CDC25B and CDC25C. Phosphorylation of CDC25A at Ser-171 and Thr-497 and phosphorylation of CDC25C creates binding sites for 14-3-3 proteins which inhibit CDC25A and CDC25C. Phosphorylation of CDC25A at Ser-74, Ser-122, Ser-171, Ser-271 and Ser-284 promotes proteolysis of CDC25A. Inhibition of CDC25 activity leads to increased inhibitory tyrosine phosphorylation of CDK-cyclin complexes and blocks cell cycle progression. Binds to and phosphorylates RAD51 at Thr-309, which may enhance the association of RAD51 with chromatin and promote DNA repair by homologous recombination. Binds to and phosphorylates TLK1 at Ser-743, which prevents the TLK1-dependent phosphorylation of the chromatin assembly factor ASF1A. This may affect chromatin assembly during S phase or DNA repair. May also phosphorylate multiple		
226390_at	START domain containing 4, sterol regulated	331	650	1422	1901	2.0	4.3	5.7	May be involved in the intracellular transport of sterols or other lipids. May bind cholesterol or other sterols (By similarity).		
220319_s_at	myosin regulatory light chain interacting protein	33	63	26	22	1.9	0.8	0.7	E3 ubiquitin ligase protein that mediates ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of myosin regulatory light chain (MRLC). Stable or transient overexpression of MIR induces proteasomal degradation of MRLC inhibiting neurite outgrowth in presence of NGF. MIR counteracts the stabilization of MRLC by MIR-interacting sapsin-like protein (MSAP/TMEM4) and reduces MSAP-stimulated		
201292_at	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	198	380	702	1719	1.9	3.5	8.7	neurite outgrowth.		
203063_at	protein phosphatase 1F (PP2C domain containing)	47	90	47	16	1.9	1.0	0.3	Dephosphorylates and concomitantly deactivates CaM-kinase II activated upon autophosphorylation, and CaM-kinases IV and I activated upon phosphorylation by CaM-kinase kinase. Promotes apoptosis.		
223130_s_at	myosin regulatory light chain interacting protein	202	384	168	123	1.9	0.8	0.6	k.A.		
1555758_a_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)	8	15	78	255	1.9	9.7	31.6	The protein encoded by this gene belongs to the dual specificity protein phosphatase family. It was identified as a cyclin-dependent kinase inhibitor, and has been shown to interact with, and dephosphorylate CDK2 kinase, thus prevent the activation of CDK2 kinase. This gene was reported to be deleted, mutated, or overexpressed in several kinds of		
226784_at	TWIST neighbor	55	101	194	161	1.9	3.5	2.9	cancers.		
202705_at	cyclin B2	26	46	87	404	1.8	3.4	15.8	Essential for the control of the cell cycle at the G2/M (mitosis) transition.		
205034_at	cyclin E2	11	19	89	169	1.8	8.3	15.7	Essential for the control of the cell cycle at the late G1 and early S phase.		
225834_at	family with sequence similarity 72, member A	7	13	28	97	1.8	3.9	13.6	k.A.		
202870_s_at	CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	7	12	31	218	1.7	4.4	30.7	Required for full ubiquitin ligase activity of the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) and may confer substrate specificity upon the complex. Is regulated by MAD2L1. In metaphase the MAD2L1-CDC20-APC/C ternary complex is inactive and in anaphase the CDC20-APC/C binary complex is active in degrading substrates.		
209623_at	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 2 (beta)	155	262	307	216	1.7	2.0	1.4	k.A.		

Tab. A4 Die 50 am stärksten induzierten Proben-Sets durch Notch2IC	Name	0h	8h	24h	3d	Ratio 8/0	Ratio 24/0	Ratio 3d/0	Beschreibung
203394_s_at	hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)	6	122	420	1941	19.6	67.3	310.9	Transcriptional repressor of genes that require a bHLH protein for their transcription. May act as a negative regulator of myogenesis by inhibiting the functions of MYOD1 and ASH1 (By similarity).
219918_s_at	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly a	7	51	69	154	7.6	10.5	23.3	k.A.
205034_at	cyclin E2	13	67	77	107	5.3	6.0	8.5	Essential for the control of the cell cycle at the late G1 and early S phase.
201710_at	v-myb myeloblastosis viral oncogene homo	23	117	301	455	5.1	13.0	19.6	Transcription factor involved in the regulation of cell survival, proliferation, and differentiation. Transactivates the expression of the CLU gene.
207363_at	retinosischisis (X-linked, juvenile) 1	34	170	337	512	5.0	9.8	15.0	May be active in cell adhesion processes during retinal development.
218115_at	ASF1 anti-silencing function 1 homolog B (S	10	48	70	97	4.8	7.1	9.8	This gene encodes a member of the H3/H4 family of histone chaperone proteins and is similar to the anti-silencing function-1 gene in yeast. The encoded protein is the substrate of the tousel-like kinase family of cell cycle-regulated kinases, and may play a key role in modulating the nucleosome structure of chromatin by ensuring a constant supply of histones at sites of nucleosome assembly.
218585_s_at	denticleless homolog (Drosophila)	35	164	310	377	4.7	9.0	10.9	k.A.
226980_at	DEP domain containing 1B	12	57	108	142	4.7	8.9	11.7	k.A.
203968_s_at	CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cere	6	27	58	106	4.7	9.9	18.0	Involved in the initiation of DNA replication. Also participates in checkpoint controls that ensure DNA replication is completed before mitosis is initiated.
203395_s_at	hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)	14	64	143	500	4.6	10.2	35.9	Transcriptional repressor of genes that require a bHLH protein for their transcription. May act as a negative regulator of myogenesis by inhibiting the functions of MYOD1 and ASH1 (By similarity).
209988_s_at	achaete-scute complex-like 1 (Drosophila)	51	232	324	2227	4.6	6.4	43.9	May play a role at early stages of development of specific neural lineages in most regions of the CNS, and of several lineages in the PNS. Essential for the generation of olfactory and autonomic neurons. Activates transcription by binding to the E box (5'-CANNTG-3').
203349_s_at	ets variant gene 5 (ets-related molecule)	6	29	15	53	4.6	2.3	8.3	Binds to DNA sequences containing the consensus nucleotide core sequence GGAA.
1560358_at	phosphorylase kinase, alpha 2 (liver)	36	158	357	362	4.4	10.1	10.2	Phosphorylase b kinase catalyzes the phosphorylation of serine in certain substrates, including troponin I. The alpha chain may bind calmodulin (By similarity).
212023_s_at	antigen identified by monoclonal antibody K	7	31	63	128	4.3	8.7	17.9	Thought to be required for maintaining cell proliferation.
204825_at	maternal embryonic leucine zipper kinase	42	181	236	307	4.3	5.7	7.4	Phosphorylates ZNF622 and may contribute to its redirection to the nucleus. May be involved in the inhibition of spliceosome assembly during mitosis.
204995_at	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subu	101	426	947	641	4.2	9.3	6.3	p35 is a neuron specific activator of CDK5. The complex p35/CDK5 is required for neurite outgrowth and cortical lamination. Activator of TPKII.
225369_at	endothelial cell adhesion molecule	14	56	127	246	4.1	9.3	18.1	Can mediate aggregation most likely through a homophilic molecular interaction (By similarity).
224753_at	cell division cycle associated 5	7	28	49	75	4.0	7.0	10.8	Regulator of sister chromatid cohesion in mitosis. May act by regulating the ability of the cohesin complex to mediate sister chromatid cohesion, perhaps by altering the nature of the interaction of cohesin with the chromosomes.
209723_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, cla	16	63	78	169	4.0	5.0	10.8	Granzyme B inhibitor.
203213_at	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	50	199	298	372	4.0	6.0	7.5	Plays a key role in the control of the eukaryotic cell cycle. It is required in higher cells for entry into S-phase and mitosis. p34 is a component of the kinase complex that phosphorylates the repetitive C-terminus of RNA polymerase II.
203817_at	---	9	35	173	552	3.9	19.7	62.9	
225655_at	ubiquitin-like, containing PHD and RING fin	65	257	360	475	3.9	5.5	7.3	Putative E3 ubiquitin ligase protein. May participate in methylation-dependent transcriptional regulation. Binds to inverted 5'-CCAAT-3' box 2 in the TOP2A promoter, and activates TOP2A expression. Important for G1/S transition. May be involved in DNA repair and chromosomal stability.
222039_at	hypothetical protein LOC146909	8	31	64	101	3.9	8.2	12.9	k.A.
209377_s_at	high mobility group nucleosomal binding do	63	245	223	171	3.9	3.5	2.7	Thyroid hormone receptors are hormone-dependent transcription factors that regulate expression of a variety of specific target genes. The protein encoded by this gene binds thyroid hormone receptor beta, but only in the presence of thyroid hormone. The encoded protein, a member of the HMGN protein family, is thought to reduce the compactness of the chromatin fiber in nucleosomes, thereby enhancing transcription from chromatin templates. Two transcript variants encoding different isoforms have been found for this gene.
221075_s_at	natural cytotoxicity triggering receptor 2	38	147	278	53	3.9	7.4	1.4	Cytotoxicity-activating receptor that may contribute to the increased efficiency of activated natural killer (NK) cells to mediate tumor cell lysis.
219000_s_at	defective in sister chromatid cohesion homc	19	72	112	96	3.9	6.0	5.2	k.A.
227336_at	deltex homolog 1 (Drosophila)	147	553	756	1592	3.8	5.2	10.9	Regulator of Notch signaling, a signaling pathway involved in cell-cell communications that regulates a broad spectrum of cell-fate determinations. Mainly acts as a positive regulator of Notch, but it also acts as a negative regulator, depending on the developmental and cell context. Mediates the antineural activity of Notch, possibly by inhibiting the transcriptional activation mediated by MATCH1. Involved in neurogenesis, lymphogenesis and myogenesis, and may also be involved in MZB (Marginal zone B) cell differentiation. Promotes B-cell development at the expense of T-cell development, suggesting that it can antagonize NOTCH1. Functions as an ubiquitin ligase protein in vitro, suggesting that it may regulate the Notch pathway via some ubiquitin ligase activity.
219990_at	E2F transcription factor 8	12	44	68	169	3.8	5.8	14.5	k.A.
209773_s_at	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	152	550	1018	1559	3.6	6.7	10.2	Provides the precursors necessary for DNA synthesis. Catalyzes the biosynthesis of deoxyribonucleotides from the corresponding ribonucleotides.

Tab. A4 Die 50 am stärksten induzierten Proben-Sets durch Notch2IC									
Name	0h	8h	24h	3d	Ratio 8/0	Ratio 24/0	Ratio 3d/0	Beschreibung	
223381_at	cell division cycle associated 1	14	51	55	118	3.6	3.9	8.4	The protein encoded by this gene is highly similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Nuf2, a component of a conserved protein complex associated with the centromere. Yeast Nuf2 disappears from the centromere during meiotic prophase when centromeres lose their connection to the spindle pole body, and plays a regulatory role in chromosome segregation. This protein is found to be associated with centromeres of mitotic HeLa cells, which suggests that this protein is a functional homolog of yeast Nuf2. Two alternatively spliced transcript variants encoding the same protein have been reported.
201890_at	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	174	613	1074	1651	3.5	6.2	9.5	Provides the precursors necessary for DNA synthesis. Catalyzes the biosynthesis of deoxyribonucleotides from the corresponding ribonucleotides.
222037_at	MCM4 minichromosome maintenance defic	39	136	184	130	3.5	4.8	3.4	Involved in the control of DNA replication.
226661_at	cell division cycle associated 2	25	86	95	217	3.5	3.8	8.7	k.A.
225834_at	family with sequence similarity 72, member	8	27	48	62	3.4	6.1	7.8	k.A.
206547_s_at	protein phosphatase, EF-hand calcium bind	10	34	120	1289	3.4	12.1	130.8	This gene encodes a member of the serine/threonine protein phosphatase with EF-hand motif family. The protein contains a protein phosphatase catalytic domain, and at least two EF-hand calcium-binding motifs in its C terminus. Although its substrate(s) is unknown, the encoded protein has been suggested to play a role in specific sensory neuron function and/or development. This gene shares high sequence similarity with the <i>Drosophila</i> retinal degeneration C (rdgC) gene. Several alternatively spliced transcript variants, each encoding a distinct isoform, have been described.
219836_at	zinc finger, BED-type containing 2	40	136	523	10	3.4	13.0	0.2	k.A.
218009_s_at	protein regulator of cytokinesis 1	14	48	79	185	3.4	5.5	12.8	This gene encodes a protein that is involved in cytokinesis. The encoded protein is at high level during S and G2/M and drop dramatically after cell exit mitosis and enter G1. It is located in the nucleus during interphase, and becomes associated with mitotic spindles in a highly dynamic manner during mitosis, and localizes to the cell mid-body during cytokinesis. This protein has been shown to be a substrate of several cyclin-dependent kinases (CDKs). At least three alternatively spliced transcript variants encoding distinct isoforms have been observed.
204026_s_at	ZW10 interactor	159	526	641	997	3.3	4.0	6.3	May play a role in targeting HZW10 to the kinetochore at prometaphase. Part of the MIS12 complex, which may be fundamental for kinetochore formation and proper chromosome segregation during mitosis.
212022_s_at	antigen identified by monoclonal antibody K	15	50	68	177	3.3	4.5	11.6	Thought to be required for maintaining cell proliferation.
214641_at	collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture ant	16	52	74	34	3.2	4.7	2.1	Type IV collagen, the major structural component of basement membranes, is a multimeric protein composed of 3 alpha subunits. These subunits are encoded by 6 different genes, alpha 1 through alpha 6, each of which can form a triple helix structure with 2 other subunits to form type IV collagen. This gene encodes alpha 3. In the Goodpasture syndrome, autoantibodies bind to the collagen molecules in the basement membranes of alveoli and glomeruli. The epitopes that elicit these autoantibodies are localized largely to the non-collagenous C-terminal domain of the protein. A specific kinase phosphorylates amino acids in this same C-terminal region and the expression of this kinase is upregulated during pathogenesis. There are multiple alternate transcripts that appear to be unique to this human alpha 3 gene and alternate splicing is restricted to the six exons that encode this C-terminal domain. This gene is also linked to an autosomal recessive form of Alport syndrome. The mutations contributing to this syndrome are also located within the exons that encode
218542_at	chromosome 10 open reading frame 3	8	25	43	88	3.1	5.4	10.9	k.A.
229937_x_at	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, su	54	166	347	227	3.1	6.4	4.2	k.A.
201292_at	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	219	672	947	1175	3.1	4.3	5.4	k.A.
208999_at	septin 8	19	57	45	126	3.0	2.4	6.8	SEPT8 is a member of the highly conserved septin family. Septins are 40- to 60-kD GTPases that assemble as filamentous scaffolds. They are involved in the organization of submembranous structures, in neuronal polarity, and in vesicle trafficking (Blaser et al., 2003). [supplied by OMIM]
222680_s_at	denticleless homolog (<i>Drosophila</i>)	6	18	65	106	3.0	10.8	17.6	k.A.
228636_at	basic helix-loop-helix domain containing, cl	399	1192	1297	849	3.0	3.3	2.1	k.A.
202503_s_at	KIAA0101	198	593	913	1005	3.0	4.6	5.1	k.A.
228868_x_at	DNA replication factor	29	86	139	191	3.0	4.8	6.6	Cooperates with CDC6 to promote the loading of the minichromosome maintenance complex onto chromatin to form the pre-replication complex necessary to initiate DNA replication. Binds DNA in a sequence-, strand-, and conformation-independent manner. Potential oncogene.
218676_s_at	phosphatidylcholine transfer protein	33	96	77	98	2.9	2.3	3.0	Catalyzes the transfer of phosphatidylcholine between membranes (By similarity).
203823_at	regulator of G-protein signalling 3	33	96	143	351	2.9	4.3	10.6	This gene encodes a member of the regulator of G-protein signaling (RGS) family. This protein is a GTP-ase activating protein which inhibits G-protein mediated signal transduction. The protein is largely cytosolic, but G-protein activation leads to translocation of this protein to the plasma membrane. A nuclear form of this protein has also been described, but its sequence has not been identified. Multiple alternatively spliced transcript variants have been described for this gene but the full-length nature of some transcripts is not yet known.

Tab. A5 Die 50 am stärksten induzierten Proben-Sets durch EBNA2	Name	0h	4h	24h	Ratio 4h/0	Ratio 24h/0	Beschreibung
204103_at	chemokine (C-C motif) ligand 4	4	3472	4	824.23	1.0	Monokine with inflammatory and chemokinetic properties. Binds to CCR5. One of the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T-cells. Recombinant MIP-1-beta induces a dose-dependent inhibition of different strains of HIV-1, HIV-2, and simian immunodeficiency virus (SIV). The processed form MIP-1-beta(3-69) retains the abilities to induce down-modulation of surface expression of the chemokine receptor CCR5 and to inhibit the CCR5-mediated entry of HIV-1 in T-cells. MIP-1-beta(3-69) is also a ligand for CCR1 and CCR2 isoform B.
36711_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene hom	7	3498	163	487.54	22.7	Interacts with the upstream promoter region of the oxytocin receptor gene. May be a transcriptional enhancer in the up-regulation of the oxytocin receptor gene at parturition. Since it lacks a putative transactivation domain, it may behave as a transcriptional repressor when it dimerize among himself. May also serve as a transcriptional activator by dimerizing with other (usually larger) basic-zipper proteins and recruiting them to specific DNA-binding sites. May be involved in the cellular stress response.
205114_s_at	chemokine (C-C motif) ligand 3 /// chemokine (C-C motif	13	5403	24	427.82	1.9	Monokine with inflammatory and chemokinetic properties. Binds to CCR1, CCR4 and CCR5. One of the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T-cells. Recombinant MIP-1-alpha induces a dose-dependent inhibition of different strains of HIV-1, HIV-2, and simian immunodeficiency virus (SIV).
214567_s_at	chemokine (C motif) ligand 1 /// chemokine (C motif) liga	6	2275	756	356.41		k.A.
206366_x_at	chemokine (C motif) ligand 2	5	1386	451	305.11	99.3	Chemotactic activity for lymphocytes but not for monocytes or neutrophils (By similarity).
209305_s_at	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	5	1040	435	217.22	90.9	Involved in the regulation of growth and apoptosis. Mediates activation of stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK.
206115_at	early growth response 3	14	2781	21	200.93	1.5	The gene encodes a transcriptional regulator that belongs to the EGR family of C2H2-type zinc-finger proteins. It is an immediate-early growth response gene which is induced by mitogenic stimulation. The protein encoded by this gene participates in the transcriptional regulation of genes in controlling biological rhythm. It may also plays a role in muscle development.
209574_s_at	chromosome 18 open reading frame 1	16	2782	29	173.31	1.8	k.A.
206547_s_at	protein phosphatase, EF-hand calcium binding domain 1	6	957	1042	172.55	187.9	This gene encodes a member of the serine/threonine protein phosphatase with EF-hand motif family. The protein contains a protein phosphatase catalytic domain, and at least two EF-hand calcium-binding motifs in its C terminus. Although its substrate(s) is unknown, the encoded protein has been suggested to play a role in specific sensory neuron function and/or development. This gene shares high sequence similarity with the Drosophila retinal degeneration C (rdgC) gene. Several alternatively spliced transcript variants, each encoding a distinct isoform, have been described.
202643_s_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	24	3927	1097	164.58	46.0	Interacts with NAF1 and inhibits TNF-induced NF-kappa-B-dependent gene expression by interfering with an RIP- or TRAF2-mediated transactivation signal. Inhibitor of programmed cell death. Has a role in the function of the lymphoid system and may contribute to the in vivo effects of TNF (By similarity). Has deubiquitinating activity that is directed towards Lys-48 or Lys-63-linked polyubiquitin chains.
209573_s_at	chromosome 18 open reading frame 1	9	1478	10	158.16	1.1	k.A.
207768_at	early growth response 4	7	1063	16	148.31	2.3	k.A.
202340_x_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	7	1098	8	146.46	1.0	k.A.
226499_at	Similar to ankyrin-repeat protein Nrarp	12	1789	320	143.46	25.7	k.A.
209723_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbu	8	1172	548	143.16	66.9	PI9 belongs to the large superfamily of serine proteinase inhibitors (serpins), which bind to and inactivate serine proteinases. These interactions are involved in many cellular processes, including coagulation, fibrinolysis, complement fixation, matrix remodeling, and apoptosis (Sprecher et al., 1995).[supplied by OMIM]
1558143_a_at	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	28	3923	162	141.16	5.8	The protein encoded by this gene belongs to the BCL-2 protein family. BCL-2 family members form hetero- or homodimers and act as anti- or pro-apoptotic regulators that are involved in a wide variety of cellular activities. The protein encoded by this gene contains a Bcl-2 homology domain 3 (BH3). It has been shown to interact with other members of the BCL-2 protein family, including BCL2, BCL2L1/BCL-X(L), and MCL1, and to act as an apoptotic activator. The expression of this gene can be induced by nerve growth factor (NGF), as well as by the forkhead transcription factor FKHR-L1, which suggests a role of this gene in neuronal and lymphocyte apoptosis. Transgenic studies of the mouse counterpart suggested that this gene functions as an essential initiator of apoptosis in thymocyte-negative selection. Many alternatively spliced transcript variants of this gene have been identified.
204794_at	dual specificity phosphatase 2	75	10482	481	140.17	6.4	Regulates mitogenic signal transduction by dephosphorylating both Thr and Tyr residues on MAP kinases ERK1 and ERK2.
205403_at	interleukin 1 receptor, type II	6	651	9045	107.89	1498.5	Receptor for interleukin-1 alpha (IL-1A), beta (IL-1B), and interleukin-1 receptor antagonist protein (IL-1ra).
209959_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	5	517	5	101.52	1.0	Binds to the B1A response-element.
242727_at	ADP-ribosylation factor-like 8	8	808	85	99.58	10.5	Binds and exchanges GTP and GDP (By similarity).
242814_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbu	9	829	73	96.53	8.5	k.A.
233891_at	Ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2	5	435	5	94.22	1.0	k.A.
1555372_at	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	28	2595	28	93.08	1.0	k.A.
202637_s_at	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinov	48	4027	1146	83.85	23.9	ICAM proteins are ligands for the leukocyte adhesion LFA-1 protein (Integrin alpha-L/beta-2).
219522_at	four jointed box 1 (Drosophila)	30	2537	468	83.44	15.4	k.A.
227856_at	hypothetical protein FLJ39370	7	530	198	79.97	29.9	k.A.
202638_s_at	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinov	64	4871	1498	76.35	23.5	ICAM proteins are ligands for the leukocyte adhesion LFA-1 protein (Integrin alpha-L/beta-2).
232080_at	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin prote	9	637	2485	73.08	285.0	k.A.
213146_at	---	7	527	8	70.59	1.1	k.A.

Tab. A5 Die 50 am stärksten induzierten Proben-Sets durch EBNA2							
	Name	0h	4h	24h	Ratio 4h/0	Ratio 24h/0	Beschreibung
235343_at	Hypothetical protein FLJ12505	15	1021	588	70.32	40.5	k.A.
201627_s_at	insulin induced gene 1	63	4273	225	67.56	3.6	May play a role in growth and differentiation of tissues involved in metabolic control. May play a regulatory role during G0/G1 transition of cell growth.
229221_at	---	8	559	70	67.17	8.5	k.A.
1554676_at	proteoglycan 1, secretory granule	18	1222	117	67.16	6.4	k.A.
235122_at	CDNA clone IMAGE:6254031	9	559	8	64.40	0.9	Members of the ZAS family, such as ZAS3 (HIVEP3), are large proteins that contain a ZAS domain, a modular protein structure consisting of a pair of C2H2 zinc fingers with an acidic-rich region and a serine/threonine-rich sequence. These proteins bind specific DNA sequences, including the kappa-B motif (GGGACTTTCC), in the promoters and enhancer regions of several genes and viruses, including human immunodeficiency virus (HIV). ZAS genes span more than 150 kb and contain at least 10 exons, one of which is longer than 5.5 kb (Allen and Wu, 2004). [supplied by OMIM]
221552_at	abhydrolase domain containing 6	14	864	171	63.91	12.6	k.A.
207574_s_at	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	97	6101	2911	62.89	30.0	Involved in the regulation of growth and apoptosis. Mediates activation of stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK.
232291_at	chromosome 13 open reading frame 25	27	1671	372	62.62	13.9	k.A.
209304_x_at	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	71	4385	2016	61.54	28.3	Involved in the regulation of growth and apoptosis. Mediates activation of stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK.
41386_i_at	---	10	628	9	60.74	0.9	k.A.
216834_at	regulator of G-protein signalling 1	7	401	918	60.65	138.7	Inhibits signal transduction by increasing the GTPase activity of G protein alpha subunits thereby driving them into their inactive GDP-bound form. This protein may be involved in the regulation of B-cell activation and proliferation.
205479_s_at	plasminogen activator, urokinase	6	334	68	59.87	12.1	Potent plasminogen activator and is clinically used for therapy of thrombolytic disorders.
205193_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene hom	9	553	16	59.58	1.8	Interacts with the upstream promoter region of the oxytocin receptor gene. May be a transcriptional enhancer in the up-regulation of the oxytocin receptor gene at parturition. Since it lacks a putative transactivation domain, it may behave as a transcriptional repressor when it dimerize among himself. May also serve as a transcriptional activator by dimerizing with other (usually larger) basic-zipper proteins and recruiting them to specific DNA-binding sites. May be involved in the cellular stress response.
231303_at	chromosome 21 open reading frame 42	12	696	1759	58.65	148.3	k.A.
215843_s_at	tolloid-like 2	4	254	1034	57.85	235.9	Protease which specifically processes pro-lysoyl oxidase. Required for the embryonic development. Predominant protease, which in the development, influences dorsolateral patterning and skeletogenesis.
227037_at	similar to CG12314 gene product	6	347	29	57.49	4.8	k.A.
223948_s_at	transmembrane protease, serine 3	6	349	160	57.37	26.2	Probable protease. Seems to be capable of activating ENaC.
203394_s_at	hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)	6	333	272	57.33	46.8	Transcriptional repressor of genes that require a bHLH protein for their transcription. May act as a negative regulator of myogenesis by inhibiting the functions of MYOD1 and ASH1 (By similarity).
225316_at	major facilitator superfamily domain containing 2	7	408	79	57.27	11.1	k.A.
209324_s_at	regulator of G-protein signalling 16	6	341	23	56.86	3.8	Inhibits signal transduction by increasing the GTPase activity of G protein alpha subunits thereby driving them into their inactive GDP-bound form. Binds to G(i)-alpha and G(o)-alpha, but not to G(s)-alpha. May play a role in regulating the kinetics of signaling in the phototransduction cascade.
226206_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene hom	5	292	9	56.55	1.7	Interacts with the upstream promoter region of the oxytocin receptor gene. May be a transcriptional enhancer in the up-regulation of the oxytocin receptor gene at parturition. Since it lacks a putative transactivation domain, it may behave as a transcriptional repressor when it dimerize among himself. May also serve as a transcriptional activator by dimerizing with other (usually larger) basic-zipper proteins and recruiting them to specific DNA-binding sites. May be involved in the cellular stress response.

Tab. A6 Gengruppen-Vergleich der Gene, die am stärksten durch das jeweilige Transgen induziert wurden	Notch1IC	Notch2IC	EBNA2
Basic helix-loop-helix dimerization domain bHLH		3	
behavior			5
biopolymer metabolism	3		
cation homeostasis			3
cell cycle	7	9	
cell cycle checkpoint	3	4	
cell division	6	7	
cell homeostasis			3
cell ion homeostasis			3
cell proliferation	3		
Cell_cycle_KEGG	5	4	
cellular process	3	3	
chemokine activity			6
chemokine receptor binding			6
chemotaxis			6
chromosome		3	
cytokine activity			3
dephosphorylation	3		
DNA binding		3	
DNA integrity checkpoint		3	
DNA metabolism		3	
DNA replication	3	5	
DNA_replication_Reactome		4	
DNA-dependent DNA replication		4	
extracellular space			3
G-protein-coupled receptor binding			6
homeostasis			3
immune response			3
interphase	4	3	
interphase of mitotic cell cycle	4	3	
intracellular		3	
ion homeostasis			3
IQ calmodulin-binding region		3	
Ligand-binding domain of nuclear hormone receptor			3
ligand-dependent nuclear receptor activity			3
locomotory behavior			5
Low density lipoprotein-receptor, class A			3
M phase	5	4	
M phase of mitotic cell cycle	5	5	
metal ion homeostasis			3
microtubule cytoskeleton organization and biogenesis		3	
mitosis	5	5	
mitotic cell cycle	7	4	
negative regulation of biological process			3
negative regulation of cellular process	3		
negative regulation of progression through cell cycle	3		
negative regulation of signal transduction			4
nervous system development	3		
neurophysiological process			3
nucleus		4	
organismal physiological process			3
phosphoprotein phosphatase activity	3		
protein amino acid dephosphorylation	3		

Tab. A6 Gengruppen-Vergleich der Gene, die am stärksten durch das jeweilige Transgen induziert wurden	Notch1IC	Notch2IC	EBNA2
protein binding		3	
regulation of biological process	4	3	3
regulation of cell cycle	7	6	
regulation of cell differentiation	3	3	
regulation of cellular physiological process	3	3	
regulation of cellular process	4	4	
regulation of cyclin dependent protein kinase activity	6	4	
regulation of DNA metabolism		3	
regulation of enzyme activity	4	4	
regulation of kinase activity	5	4	
regulation of physiological process	3	3	
regulation of progression through cell cycle	7	6	
regulation of protein kinase activity	5	4	
regulation of transferase activity	5	4	
Regulator of G protein			3
response to abiotic stimulus			3
response to chemical stimulus			3
response to external stimulus			3
response to stimulus			3
sensory perception			5
signal transducer activity			3
Small chemokine, interleukin-8 like			6
Smooth_muscle_contraction // GenMAPP			3
spindle	5		
steroid hormone receptor activity			3
system development	3		
taxis			6
viral genome replication			3
viral infectious cycle			3
viral life cycle			3
Zn-finger, C4-type steroid receptor			3

Tab. A7 Die 50 am stärksten reprimierten Proben-Sets durch Notch1IC									
	Name	0h	8h	24h	3d	Ratio 8/0	Ratio 24/0	Ratio 3d/0	Beschreibung
22934_at	Transcribed locus	154	19	12	6	0.125	0.1	0.0	miRNA
230444_at	Transcribed locus, weakly similar to XP_375099	133	21	19	15	0.155	0.1	0.1	k.A.
219452_at	dipeptidase 2	58	9	7	5	0.158	0.1	0.1	Probable metalloprotease which hydrolyzes leukotriene D4 (LTD4) into leukotriene E4 (LTE4) (By similarity).
1564154_at	---	99	17	11	7	0.170	0.1	0.1	k.A.
210904_s_at	interleukin 13 receptor, alpha 1	80	14	8	9	0.171	0.1	0.1	Binds IL13 with a low affinity. Together with IL4R-alpha can form a functional receptor for IL13. Also serves as an alternate accessory protein to the common cytokine receptor gamma chain for IL4 signaling, but cannot replace the function of gamma C in allowing enhanced IL2 binding activity.
211612_s_at	interleukin 13 receptor, alpha 1 /// interleukin 13	73	14	5	7	0.189	0.1	0.1	Binds IL13 with a low affinity. Together with IL4R-alpha can form a functional receptor for IL13. Also serves as an alternate accessory protein to the common cytokine receptor gamma chain for IL4 signaling, but cannot replace the function of gamma C in allowing enhanced IL2 binding activity.
206206_at	CD180 antigen	41	8	8	5	0.192	0.2	0.1	May cooperate with MD-1 and TLR4 to mediate the innate immune response to bacterial lipopolysaccharide (LPS) in B-cells. Leads to NF-kappa-B activation. Also involved in the life/death decision of B-cells (By similarity).
241837_at	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	137	27	10	14	0.200	0.1	0.1	k.A.
1553117_a_at	serine/threonine kinase 38	252	51	18	19	0.203	0.1	0.1	Millward et al. (1995) showed that the kinase activity of STK38 appears to be restricted to itself.
204971_at	cystatin A (stefin A)	428	88	33	74	0.205	0.1	0.2	This is an intracellular thiol proteinase inhibitor.
224046_s_at	phosphodiesterase 7A	351	73	50	30	0.209	0.1	0.1	Plays a role in signal transduction by regulating the intracellular concentration of cyclic nucleotides. This phosphodiesterase is highly specific for cAMP and may have a role in muscle signal transduction.
220146_at	toil-like receptor 7	77	16	13	8	0.212	0.2	0.1	Participates in the innate immune response to microbial agents. Acts via MyD88 and TRAF6, leading to NF-kappa-B activation, cytokine secretion and the inflammatory response (By similarity).
1556606_at	neuron navigator 2	33	7	7	6	0.215	0.2	0.2	k.A.
203504_s_at	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), mem	44	11	6	6	0.241	0.1	0.1	cAMP-dependent and sulfonylurea-sensitive anion transporter. Key gatekeeper influencing intracellular cholesterol transport.
221795_at	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	208	53	13	14	0.253	0.1	0.1	This gene encodes a member of the neurotrophic tyrosine receptor kinase (NTRK) family. This kinase is a membrane-bound receptor that, upon neurotrophin binding, phosphorylates itself and members of the MAPK pathway. Signalling through this kinase leads to cell differentiation. Mutations in this gene have been associated with obesity and mood disorders. Alternate transcriptional splice variants encoding different isoforms have been found for this gene.
201888_s_at	interleukin 13 receptor, alpha 1	121	33	15	15	0.268	0.1	0.1	Binds IL13 with a low affinity. Together with IL4R-alpha can form a functional receptor for IL13. Also serves as an alternate accessory protein to the common cytokine receptor gamma chain for IL4 signaling, but cannot replace the function of gamma C in allowing enhanced IL2 binding activity.
202688_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, mem	29	8	8	7	0.269	0.3	0.2	Cytokine that binds to TNFRSF10A/TRAILR1, TNFRSF10B/TRAILR2, TNFRSF10C/TRAILR3, TNFRSF10D/TRAILR4 and possibly also to TNFRSF11B/OPG. Induces apoptosis. Its activity may be modulated by binding to the decoy receptors TNFRSF10C/TRAILR3, TNFRSF10D/TRAILR4 and TNFRSF11B/OPG that cannot induce apoptosis.
1552343_s_at	phosphodiesterase 7A	45	12	11	9	0.272	0.2	0.2	Plays a role in signal transduction by regulating the intracellular concentration of cyclic nucleotides. This phosphodiesterase is highly specific for cAMP and may have a role in muscle signal transduction.
236545_at	Protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic su	146	42	23	14	0.286	0.2	0.1	k.A.
223358_s_at	Phosphodiesterase 7A	2432	727	525	402	0.299	0.2	0.2	Plays a role in signal transduction by regulating the intracellular concentration of cyclic nucleotides. This phosphodiesterase is highly specific for cAMP and may have a role in muscle signal transduction.
1558186_s_at	chronic lymphocytic leukemia up-regulated 1	239	74	51	14	0.309	0.2	0.1	k.A.
221796_at	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	364	114	12	8	0.314	0.0	0.0	This gene encodes a member of the neurotrophic tyrosine receptor kinase (NTRK) family. This kinase is a membrane-bound receptor that, upon neurotrophin binding, phosphorylates itself and members of the MAPK pathway. Signalling through this kinase leads to cell differentiation. Mutations in this gene have been associated with obesity and mood disorders. Alternate transcriptional splice variants encoding different isoforms have been found for this gene.
224225_s_at	ets variant gene 7 (TEL2 oncogene)	91	29	12	6	0.315	0.1	0.1	Transcriptional repressor; binds to the DNA sequence 5'-CCGGAAGT-3'. Isoform A and isoform C do not seem to have a repressor activity.
227193_at	CDNA FLJ37631 fis, clone BRCCO2015944	285	92	38	51	0.323	0.1	0.2	k.A.
243240_at	Neuronal cell adhesion molecule	185	60	36	13	0.325	0.2	0.1	k.A.
201752_s_at	adducin 3 (gamma)	227	74	55	44	0.326	0.2	0.2	Membrane-cytoskeleton-associated protein that promotes the assembly of the spectrin-actin network. Binds to calmodulin.
240159_at	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter),	36	12	10	9	0.333	0.3	0.3	k.A.
201887_at	interleukin 13 receptor, alpha 1	494	166	31	70	0.336	0.1	0.1	Binds IL13 with a low affinity. Together with IL4R-alpha can form a functional receptor for IL13. Also serves as an alternate accessory protein to the common cytokine receptor gamma chain for IL4 signaling, but cannot replace the function of gamma C in allowing enhanced IL2 binding activity.
238893_at	hypothetical protein LOC338758	178	60	49	38	0.339	0.3	0.2	k.A.
232369_at	Muscleblind-like 2 (Drosophila)	91	31	19	17	0.341	0.2	0.2	k.A.
232034_at	hypothetical protein LOC203274	969	335	191	66	0.346	0.2	0.1	k.A.
1558185_at	chronic lymphocytic leukemia up-regulated 1	899	311	233	51	0.347	0.3	0.1	k.A.

Tab. A7 Die 50 am stärksten reprimierten Proben-Sets durch Notch1IC	Name	0h	8h	24h	3d	Ratio 8/0	Ratio 24/0	Ratio 3d/0	Beschreibung
229309_at	Adrenergic, beta-1-, receptor	63	22	11	8	0.355	0.2	0.1	Beta-adrenergic receptors mediate the catecholamine-induced activation of adenylate cyclase through the action of G proteins. This receptor binds epinephrine and norepinephrine with approximately equal affinity.
205882_x_at	adducin 3 (gamma)	376	139	88	105	0.371	0.2	0.3	Membrane-cytoskeleton-associated protein that promotes the assembly of the spectrin-actin network. Binds to calmodulin.
218999_at	hypothetical protein FLJ11000	25	9	8	8	0.376	0.3	0.3	k.A.
216044_x_at	hypothetical LOC388650	80	31	23	30	0.388	0.3	0.4	k.A.
229053_at	B/K protein	41	16	10	5	0.393	0.2	0.1	k.A.
240743_at	---	81	32	9	11	0.395	0.1	0.1	k.A.
203283_s_at	heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	197	79	60	75	0.400	0.3	0.4	Catalyzes the transfer of sulfate to the C2-position of selected hexuronic acid residues within the maturing heparan sulfate (HS). 2-O-sulfation within HS, particularly of iduronate residues, is essential for HS to participate in a variety of high-affinity ligand-binding interactions and signaling processes. Mediates 2-O-sulfation of both L-iduronyl and D-glucuronyl residues (By similarity).
213664_at	solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity amino acid transporter) member 1	251	101	51	72	0.404	0.2	0.3	Transports L-glutamate and also L- and D-aspartate. Essential for terminating the postsynaptic action of glutamate by rapidly removing released glutamate from the synaptic cleft. Acts as a symport by cotransporting sodium. Negatively regulated by ARL6IP5 (By similarity).
226431_at	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome 9 open reading frame 1	82	33	17	20	0.405	0.2	0.2	k.A.
201753_s_at	adducin 3 (gamma)	668	272	173	182	0.407	0.3	0.3	Membrane-cytoskeleton-associated protein that promotes the assembly of the spectrin-actin network. Binds to calmodulin.
239516_at	Lysophospholipase-like 1	744	303	141	149	0.408	0.2	0.2	k.A.
206707_x_at	chromosome 6 open reading frame 32	474	194	92	101	0.409	0.2	0.2	k.A.
207000_s_at	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit	333	136	113	96	0.409	0.3	0.3	Calcium-dependent, calmodulin-stimulated protein phosphatase. This subunit may have a role in the calmodulin activation of calcineurin.
205786_s_at	integrin, alpha M (complement component receptor 3)	150	61	39	24	0.409	0.3	0.2	Integrin alpha-M/beta-2 is implicated in various adhesive interactions of monocytes, macrophages and granulocytes as well as in mediating the uptake of complement-coated particles. It is identical with CR-3, the receptor for the iC3b fragment of the third complement component. It probably recognizes the R-G-D peptide in C3b. Integrin alpha-M/beta-2 is also a receptor for fibrinogen, factor X and ICAM1. It recognizes P1 and P2 peptides of fibrinogen gamma chain.
225214_at	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 1	340	140	109	101	0.412	0.3	0.3	k.A.
226810_at	Chromosome 6 open reading frame 155	46	19	15	17	0.415	0.3	0.4	k.A.
218113_at	transmembrane protein 2	310	132	59	18	0.426	0.2	0.1	k.A.
212122_at	ras homolog gene family, member Q /// similar to RhoA	526	225	89	35	0.428	0.2	0.1	Plasma membrane-associated small GTPase which cycles between an active GTP-bound and an inactive GDP-bound state. In active state binds to a variety of effector proteins to regulate cellular responses. Involved in epithelial cell polarization processes. May play a role in CFTR trafficking to the plasma membrane. Causes the formation of thin, actin-rich surface projections called filopodia.

Tab. A8 Die 50 am stärksten reprimierten Proben-Sets durch Notch2IC	Name	0h	8h	24h	3d	Ratio 8/0	Ratio 24/0	Ratio 3d/0	Beschreibung
219737_s_at	protocadherin 9	405	5	5	8	0.012	0.0	0.0	Potential calcium-dependent cell-adhesion protein.
235228_at	KIAA1912 protein	1351	35	12	42	0.026	0.0	0.0	k.A.
238919_at	Protocadherin 9	132	7	7	7	0.055	0.1	0.1	Potential calcium-dependent cell-adhesion protein. Chemotactic for monocytes and T-lymphocytes.
204533_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	163	9	7	35	0.056	0.0	0.2	Binds to CXCR3.
205433_at	butyrylcholinesterase	411	25	26	220	0.060	0.1	0.5	Mutant alleles at the BCHE locus are responsible for suxamethonium sensitivity. Homozygous persons sustain prolonged apnea after administration of the muscle relaxant suxamethonium in connection with surgical anesthesia. The activity of pseudocholinesterase in the serum is low and its substrate behavior is atypical. In the absence of the relaxant, the homozygote is at no known disadvantage.
203476_at	trophoblast glycoprotein	1606	100	21	122	0.062	0.0	0.1	Expressed by all types of trophoblasts as early as 9 weeks of development. Specific for trophoblastic cells except for amniotic epithelium. In adult tissues, the expression is limited to a few epithelial cell types but is found on a variety of carcinoma. Antigen 5T4 is overexpressed by a wide spectrum of cancers, including colorectal, ovarian and gastric, but with a limited normal tissue expression. Could be used for tumor immunotherapy.
235278_at	Homo sapiens, clone IMAGE:451316	390	25	12	10	0.065	0.0	0.0	k.A.
208121_s_at	protein tyrosine phosphatase, receptor class 3 subfamily.	95	7	6	6	0.072	0.1	0.1	Belongs to the protein-tyrosine phosphatase family. Receptor class 3 subfamily.
219452_at	dipeptidase 2	190	16	20	7	0.083	0.1	0.0	Probable metalloprotease which hydrolyzes leukotriene D4 (LTD4) into leukotriene E4 (LTE4) (By similarity).
229566_at	hypothetical gene supported by AF08	200	17	14	15	0.083	0.1	0.1	k.A.
1558388_a_at	Hypothetical protein FLJ39630	103	10	7	9	0.093	0.1	0.1	k.A.
1563209_a_at	Homo sapiens, clone IMAGE:451316	167	16	9	9	0.096	0.1	0.1	k.A.
206206_at	CD180 antigen	76	8	8	6	0.105	0.1	0.1	May cooperate with MD-1 and TLR4 to mediate the innate immune response to bacterial lipopolysaccharide (LPS) in B-cells. Leads to NF-kappa-B activation. Also involved in the life/death decision of B-cells (By similarity).
204439_at	interferon-induced protein 44-like	42	4	4	4	0.105	0.1	0.1	k.A.
211612_s_at	interleukin 13 receptor, alpha 1 /// int	49	5	5	5	0.113	0.1	0.1	Binds IL13 with a low affinity. Together with IL4R-alpha can form a functional receptor for IL13. Also serves as an alternate accessory protein to the common cytokine receptor gamma chain for IL4 signaling, but cannot replace the function of gamma C in allowing enhanced IL2 binding activity.
228790_at	hypothetical protein MGC39325	54	6	6	7	0.114	0.1	0.1	k.A.
210448_s_at	purinergic receptor P2X, ligand-gated	886	114	288	1108	0.129	0.3	1.3	Receptor for ATP that acts as a ligand gated ion channel.
211138_s_at	kynurenine 3-monoxygenase (kynur	84	11	11	12	0.134	0.1	0.1	L-kynurenine + NADPH + O(2) = 3-hydroxy-L-
1559965_at	CDNA clone IMAGE:4811567, partial	60	8	8	8	0.135	0.1	0.1	k.A.
228368_at	Rho GTPase activating protein 20	95	13	8	30	0.138	0.1	0.3	Using real-time quantitative PCR, Kalla et al. (2005) found that expression of ARHGAP20 was upregulated about 6-fold in 18 of 22 BCLL tumors examined compared with normal B cells. However, 2 cases with translocations affecting 1 copy of the ARHGAP20 gene, 1 case with monoallelic deletion of chromosome region 11q22-q23, and 1 case with no chromosome 11 deletion showed about 10-fold downregulation of ARHGAP20 expression. 30 PubMed Neighbors
209679_s_at	hypothetical protein from clone 643	33	5	5	5	0.145	0.1	0.1	k.A.
232668_at	Hypothetical protein MGC39325	240	37	27	38	0.156	0.1	0.2	k.A.
227627_at	serum/glucocorticoid regulated kinase	57	9	6	11	0.156	0.1	0.2	Involved in the activation of potassium channels. Mediates cell IL-3-dependent survival signals
1567183_s_at	NTera2D1 cell line mRNA containing	45	7	7	7	0.161	0.2	0.2	k.A.
219032_x_at	opsin 3 (encephalopsin, panopsin)	292	47	25	66	0.162	0.1	0.2	May play a role in encephalic photoreception.
241837_at	AT rich interactive domain 5B (MRF1	113	20	10	7	0.173	0.1	0.1	k.A.
239999_at	Chromosome 21 open reading frame	37	7	6	6	0.176	0.2	0.2	k.A.
230444_at	Transcribed locus, weakly similar to	190	34	30	13	0.179	0.2	0.1	k.A.
1556606_at	neuron navigator 2	30	5	6	5	0.181	0.2	0.2	k.A.
205306_x_at	kynurenine 3-monoxygenase (kynur	25	5	5	6	0.188	0.2	0.2	L-kynurenine + NADPH + O(2) = 3-hydroxy-L-
1563092_at	MRNA full length insert cDNA clone	49	9	9	8	0.188	0.2	0.2	k.A.
205919_at	hemoglobin, epsilon 1 /// hemoglobin	161	31	23	22	0.191	0.1	0.1	The epsilon chain is a beta-type chain of early mammalian embryonic hemoglobin.
212614_at	AT rich interactive domain 5B (MRF1	214	41	23	14	0.191	0.1	0.1	k.A.
214039_s_at	lysosomal associated protein transmem	145	28	15	59	0.194	0.1	0.4	k.A.
224392_s_at	opsin 3 (encephalopsin, panopsin) ///	38	7	7	8	0.197	0.2	0.2	May play a role in encephalic photoreception.
224225_s_at	ets variant gene 7 (TEL2 oncogene)	65	13	5	5	0.201	0.1	0.1	Transcriptional repressor; binds to the DNA sequence 5'-CCGGAAGT-3'. Isoform A and isoform C do not seem to have a repressor activity.
1554586_a_at	Rho-related BTB domain containing 2	43	9	10	8	0.202	0.2	0.2	Ubiquitous, with highest levels in neural tissues. Expression is also detected in fetal lung, heart, and brain. RHOBTB2 is a member of the evolutionarily conserved RHOBTB subfamily of Rho GTPases. For background information on RHOBTBs, see RHOBTB1 (MIM 607351). [supplied by OMIM]
239765_at	---	79	16	15	11	0.205	0.2	0.1	k.A.
204971_at	cystatin A (stefin A)	1334	274	91	226	0.205	0.1	0.2	This is an intracellular thiol proteinase inhibitor.

Tab. A8 Die 50 am stärksten reprimierten Proben-Sets durch Notch2IC	Name	0h	8h	24h	3d	Ratio 8/0	Ratio 24/0	Ratio 3d/0	Beschreibung
201752_s_at	adducin 3 (gamma)	315	65	53	61	0.205	0.2	0.2	Adducins are heteromeric proteins composed of different subunits referred to as adducin alpha, beta and gamma. The three subunits are encoded by distinct genes and belong to a family of membrane skeletal proteins involved in the assembly of spectrin-actin network in erythrocytes and at sites of cell-cell contact in epithelial tissues. While adducins alpha and gamma are ubiquitously expressed, the expression of adducin beta is restricted to brain and hematopoietic tissues. Adducin, originally purified from human erythrocytes, was found to be a heterodimer of adducins alpha and beta. Polymorphisms resulting in amino acid substitutions in these two subunits have been associated with the regulation of blood pressure in an animal model of hypertension. Heterodimers consisting of alpha and gamma subunits have also been described. Structurally, each subunit is comprised of two distinct domains. The amino-terminal region is protease resistant and globular in shape, while the carboxy-terminal region is protease sensitive. The latter contains multiple phosphorylation sites for protein kin
1564154_at	---	123	25	29	6	0.205	0.2	0.1	k.A.
227193_at	CDNA FLJ37631 fis, clone BRCOC2	451	95	39	61	0.210	0.1	0.1	k.A.
204446_s_at	arachidonate 5-lipoxygenase	29	6	6	6	0.211	0.2	0.2	Arachidonate + O(2) = (6E,8Z,11Z,14Z)-(5S)-5-hydroperoxyicoso-6,8,11,14-tetraenoate. This gene encodes a member of the lipoxygenase gene family and plays a dual role in the synthesis of leukotrienes from arachidonic acid. The encoded protein, which is expressed specifically in bone marrow-derived cells, catalyzes the conversion of arachidonic acid to 5(S)-hydroperoxy-6-trans-8,11,14-cis-eicosatetraenoic acid, and further to the allylic epoxide 5(S)-trans-7,9-trans-11,14-cis-eicosatetraenoic acid (leukotriene A4). Leukotrienes are important mediators of a number of inflammatory and allergic conditions. Mutations in the promoter region of this gene lead to a diminished response to antileukotriene drugs used in the treatment of asthma and may also be associated with atherosclerosis and several cancers. Alternatively spliced transcript variants have been observed, but their full-length nature has not been determined.
206134_at	ADAM-like, decysin 1	25	5	5	10	0.212	0.2	0.4	May play an important role in the control of the immune response and during pregnancy (By similarity).
241942_at	peroxidasin homolog-like (Drosophila	246	53	29	53	0.217	0.1	0.2	k.A.
202688_at	tumor necrosis factor (ligand) superfa	38	8	10	8	0.219	0.3	0.2	Cytokine that binds to TNFRSF10A/TRAILR1, TNFRSF10B/TRAILR2, TNFRSF10C/TRAILR3, TNFRSF10D/TRAILR4 and possibly also to TNFRSF11B/OPG. Induces apoptosis. Its activity may be modulated by binding to the decoy receptors TNFRSF10C/TRAILR3, TNFRSF10D/TRAILR4 and TNFRSF11B/OPG that cannot induce apoptosis.
220898_at	---	43	9	9	9	0.221	0.2	0.2	k.A.
224046_s_at	phosphodiesterase 7A	402	89	91	36	0.222	0.2	0.1	Plays a role in signal transduction by regulating the intracellular concentration of cyclic nucleotides. This phosphodiesterase is highly specific for cAMP and may have a role in muscle signal transduction.
201888_s_at	interleukin 13 receptor, alpha 1	89	20	13	16	0.224	0.2	0.2	Binds IL13 with a low affinity. Together with IL4R-alpha can form a functional receptor for IL13. Also serves as an alternate accessory protein to the common cytokine receptor gamma chain for IL4 signaling, but cannot replace the function of gamma C in allowing enhanced IL2 binding activity.
229723_at	T-cell activation GTPase activating p	441	100	89	79	0.226	0.2	0.2	May function as a GTPase-activating protein and may play important roles during T-cell activation.

EBNA2	Name	0h	4h	24h	Ratio 4/0	Ratio 24/0	Beschreibung
229934_at	Transcribed locus	191	6	6	0.03	0.0	miRNA
1559584_a_at	chromosome 16 open reading frame 54	412	13	7	0.03	0.0	k.A.
235743_at	Hypothetical protein MGC61716	218	8	6	0.03	0.0	k.A.
240265_at	TRAF3 interacting protein 3	215	9	8	0.04	0.0	May function as an adapter molecule that regulates TRAF3-mediated JNK activation.
1556821_x_at	Deleted in lymphocytic leukemia, 2	1222	50	182	0.04	0.1	May act as a tumor suppressor.
244679_at	Serine/threonine kinase 38	221	9	8	0.04	0.0	Involved in the regulation of structural processes in differentiating and mature neuronal cells.
241891_at	Dedicator of cytokinesis 8	329	15	50	0.04	0.2	Potential guanine nucleotide exchange factor (GEF). GEF proteins activate some small GTPases by exchanging bound GDP for free GTP (By similarity).
1565566_a_at	Syntaxin 7	183	9	8	0.05	0.0	May be involved in protein trafficking from the plasma membrane to the early endosome (EE) as well as in homotypic fusion of endocytic organelles. Mediates the endocytic trafficking from early endosomes to late endosomes and lysosomes.
241837_at	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	192	9	8	0.05	0.0	DNA-binding protein that binds to the 5'-AATA[CT]-3' core sequence. Probably acts as a transcription regulator. Represses the cytomegalovirus enhancer. Overexpression leads to induction of smooth muscle marker genes, suggesting that it may act as a regulator of smooth muscle cell differentiation and proliferation.
232138_at	Muscleblind-like 2 (Drosophila)	120	6	6	0.05	0.1	May be involved in lipid stores.
230312_at	Transcribed locus	101	5	115	0.05	1.1	k.A.
227193_at	CDNA FLJ37631 fis, clone BRCCO2015944	518	26	54	0.05	0.1	k.A.
236668_at	Homo sapiens, clone IMAGE:5312086, mRNA	171	9	8	0.05	0.0	k.A.
244042_x_at	---	118	6	7	0.05	0.1	k.A.
227948_at	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4	140	8	6	0.05	0.0	Activates CDC42, a member of the Ras-like family of Rho-and Rac proteins, by exchanging bound GDP for free GTP. Plays a role in regulating the actin cytoskeleton and cell shape. Activates MAPK8.
1560814_a_at	hypothetical protein MGC20481	218	12	8	0.06	0.0	k.A.
1565567_at	Syntaxin 7	246	14	13	0.06	0.1	May be involved in protein trafficking from the plasma membrane to the early endosome (EE) as well as in homotypic fusion of endocytic organelles. Mediates the endocytic trafficking from early endosomes to late endosomes and lysosomes.
230444_at	Transcribed locus, weakly similar to XP_375099.1 PRE	149	9	25	0.06	0.2	k.A.
201009_s_at	thioredoxin interacting protein	1021	61	105	0.06	0.1	Junn et al. (2000) found that the C-terminal half of mouse Vdup1 interacted with the redox-active center of thioredoxin (TRX, or TXN; 187700). Mutation of 2 critical cysteines in the Trx active center abrogated the interaction with Vdup1. Transfection of mouse Vdup1 into human embryonic kidney cells reduced the endogenous reducing activity of TRX or the activity of cotransfected TRX. Overexpression of Vdup1 inhibited interaction between Trx and a thiol-specific antioxidant, Pag (PRDX1; 176763), and it inhibited interaction between Trx and Ask1. Treatment of mouse fibroblasts and T-cell hybridoma cells with various stress stimuli, such as hydrogen peroxide or heat shock, induced Vdup1 expression. Exposure of mouse fibroblasts overexpressing Vdup1 to stress resulted in reduced cell proliferation and elevated apoptotic cell death. Junn et al. (2000) concluded that VDUP1 functions as an oxidative stress mediator by inhibiting TRX activity. Wang et al. (2002) found that biomechanical strain or hydrogen peroxide downregulated expression of Vdup1, but not Trx, in rat
1552480_s_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	252	15	10	0.06	0.0	Required for T-cell activation through the antigen receptor. The first PTPase domain has enzymatic activity, while the second one seems to affect the substrate specificity of the first one.
1557383_a_at	CDNA FLJ38112 fis, clone D3OST2002272	182	11	42	0.06	0.2	k.A.
237895_at	Trinucleotide repeat containing 6B	176	11	24	0.06	0.1	k.A.
203708_at	phosphodiesterase 4B, cAMP-specific (phosphodiesterase 4B)	515	32	39	0.06	0.1	May be involved in mediating central nervous system effects of therapeutic agents ranging from antidepressants to antihistaminic and anti-inflammatory agents.
243824_at	LOC441434	258	16	20	0.06	0.1	k.A.
237376_at	Cullin 3	136	9	7	0.06	0.1	Involved in ubiquitination of cyclin E and, in complex with RBX1, of cyclin D1 (in vitro) thus involved in regulation of G1/S transition. Seems not be part of a SCF complex with SKP1. In complex with SPOP, involved in ubiquitination of both PCGF4 and H2AFY.
227921_at	---	203	13	536	0.06	2.6	k.A.
232034_at	hypothetical protein LOC203274	1334	89	53	0.07	0.0	k.A.
239244_at	Transcribed locus	358	24	21	0.07	0.1	k.A.
214862_x_at	MRNA; cDNA DKFZp564G1162 (from clone DKFZp564G1162)	130	9	11	0.07	0.1	k.A.
201008_s_at	thioredoxin interacting protein	622	42	56	0.07	0.1	Junn et al. (2000) found that the C-terminal half of mouse Vdup1 interacted with the redox-active center of thioredoxin (TRX, or TXN; 187700). Mutation of 2 critical cysteines in the Trx active center abrogated the interaction with Vdup1. Transfection of mouse Vdup1 into human embryonic kidney cells reduced the endogenous reducing activity of TRX or the activity of cotransfected TRX. Overexpression of Vdup1 inhibited interaction between Trx and a thiol-specific antioxidant, Pag (PRDX1; 176763), and it inhibited interaction between Trx and Ask1. Treatment of mouse fibroblasts and T-cell hybridoma cells with various stress stimuli, such as hydrogen peroxide or heat shock, induced Vdup1 expression. Exposure of mouse fibroblasts overexpressing Vdup1 to stress resulted in reduced cell proliferation and elevated apoptotic cell death. Junn et al. (2000) concluded that VDUP1 functions as an oxidative stress mediator by inhibiting TRX activity. Wang et al. (2002) found that biomechanical strain or hydrogen peroxide downregulated expression of Vdup1, but not Trx, in rat
213051_at	zinc finger CCCH-type, antiviral 1	555	38	303	0.07	0.5	Summary: This gene encodes a CCCH-type zinc finger protein that is thought to prevent infection by retroviruses. Studies of the rat homolog indicate that the protein may primarily function to inhibit viral gene expression and induce an innate immunity to viral infection. Alternative splicing occurs at this locus and two variants, each encoding distinct isoforms, are described.
1556820_a_at	Deleted in lymphocytic leukemia, 2	350	24	66	0.07	0.2	k.A.
236921_at	Emigin homolog (mouse)	133	9	16	0.07	0.1	k.A.
212122_at	ras homolog gene family, member Q /// similar to ARHGAP21	663	46	17	0.07	0.0	Plasma membrane-associated small GTPase which cycles between an active GTP-bound and an inactive GDP-bound state. In active state binds to a variety of effector proteins to regulate cellular responses. Involved in epithelial cell polarization processes. May play a role in CFTR trafficking to the plasma membrane. Causes the formation of thin, actin-rich surface projections called filopodia.

Tab. A9 Die 50 am stärksten reprimierten Proben-Sets durch EBNA2	Name	0h	4h	24h	Ratio 4/0	Ratio 24/0	Beschreibung
240586_at	Enamelin	171	12	12	0.07	0.1	Involved in the mineralization and structural organization of enamel.
1564154_at	---	188	13	6	0.07	0.0	k.A.
1558186_s_at	chronic lymphocytic leukemia up-regulated 1	273	19	6	0.07	0.0	k.A.
228693_at	chromosome 3 open reading frame 6	109	8	15	0.07	0.1	k.A.
213664_at	solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity gl	221	16	77	0.07	0.3	Transports L-glutamate and also L- and D-aspartate. Essential for terminating the postsynaptic action of glutamate by rapidly removing released glutamate from the synaptic cleft. Acts as a symport by cotransporting sodium. Negatively regulated by ARL6IP5 (By similarity).
239516_at	Lysophospholipase-like 1	786	60	48	0.08	0.1	k.A.
215071_s_at	histone 1, H2ac	229	17	16	0.08	0.1	Histones are basic nuclear proteins that are responsible for the nucleosome structure of the chromosomal fiber in eukaryotes. Two molecules of each of the four core histones (H2A, H2B, H3, and H4) form an octamer, around which approximately 146 bp of DNA is wrapped in repeating units, called nucleosomes. The linker histone, H1, interacts with linker DNA between nucleosomes and functions in the compaction of chromatin into higher order structures. This gene is intronless and encodes a member of the histone H2A family. Transcripts from this gene lack polyA tails but instead contain a palindromic termination element. This gene is found in the large histone gene cluster on chromosome 6.
242693_at	Cell division cycle 2-like 5 (cholinesterase-related cell d	515	39	15	0.08	0.0	May be a controller of the mitotic cell cycle. Involved in the blood cell development (By similarity).
240246_at	CDNA FLJ44826 fis, clone BRACE3046762	121	9	10	0.08	0.1	k.A.
229072_at	Homo sapiens, clone IMAGE:5259272, mRNA	922	71	28	0.08	0.0	k.A.
232668_at	Hypothetical protein MGC39325	252	20	220	0.08	0.9	k.A.
227020_at	yippee-like 2 (Drosophila)	368	29	57	0.08	0.2	Detected in testis, heart, brain, spleen, lung and liver.
229773_at	---	199	16	33	0.08	0.2	k.A.
242509_at	MGC17624 protein	282	23	16	0.08	0.1	k.A.
238593_at	hypothetical protein FLJ22531	591	48	81	0.08	0.1	k.A.
237201_at	Transcribed locus	1037	85	10	0.08	0.0	k.A.

Tab. A10 Singulär regulierte Gene

UNIQUID	Name	0h	8h	24h	3d
Gene, die nur durch Notch11C nach 8h induziert werden, von Notch21C aber zu keinem Zeitpunkt					
220319_s_at	myosin regulatory light chain interacting protein	68	128	66	56
203063_at	protein phosphatase 1f (pp2c domain containing)	68	114	81	38
209623_at	methylcrotonoyl-coenzyme a carboxylase 2 (beta)	188	302	366	277
221931_s_at	seh1-like (s. cerevisiae)	209	314	433	329
201680_x_at	arsenate resistance protein ars2	357	515	608	518
219667_s_at	b-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1	262	380	328	123
Gene, die nur durch Notch21C nach 8h induziert werden, von Notch11C aber zu keinem Zeitpunkt					
209377_s_at	high mobility group nucleosomal binding domain 3	104	252	212	200
219836_at	zinc finger, bed domain containing 2	101	177	349	51
214641_at	collagen, type iv, alpha 3 (goodpasture antigen)	38	79	80	63
228636_at	basic helix-loop-helix domain containing, class b, 5	310	742	776	556
218676_s_at	phosphatidylcholine transfer protein	71	103	89	102
222073_at	gb:ai694562/db_xref=gi:4971902/db_xref=wd72g08.x1/clone=image:2337182/fea=est/cnt=14	180	343	443	256
241370_at	hypothetical protein loc286052	105	171	135	69
222294_s_at	eukaryotic translation initiation factor 2c, 2	59	114	107	98
235766_x_at	eukaryotic translation initiation factor 2c, 2	79	130	155	128
209995_s_at	t-cell leukemia/lymphoma 1a	39	84	58	98
209515_s_at	rab27a, member ras oncogene family	95	138	158	159
202967_at	glutathione s-transferase a4	53	113	82	106
209147_s_at	phosphatidic acid phosphatase type 2a	34	58	50	57
33307_at	cgi-96 protein	115	171	153	197
37424_at	chromosome 6 open reading frame 18	43	77	69	96

Tab. A10 Singulär regulierte Gene

UNIQUID	Name	0h	8h	24h	3d
Gene, die nur durch Notch11C nach 8h reprimiert werden, von Notch21C aber zu keinem Zeitpunkt					
205413_at	chromosome 11 open reading frame 8	46	35	26	26
210450_at	hypothetical protein loc90925	87	62	58	48
203845_at	p300/cbp-associated factor	80	57	52	39
Gene, die nur durch Notch21C nach 8h reprimiert werden, von Notch11C aber zu keinem Zeitpunkt					
1552678_a_at	ubiquitin specific protease 28	103	77	76	74
1555889_a_at	cartilage associated protein	419	289	335	225
1555950_a_at	decay accelerating factor for complement (cd55, cramer blood group system)	250	122	106	185
200871_s_at	prosaposin (variant gaucher disease and variant metachromatic leukodystrophy)	902	489	595	463
200916_at	transgelin 2	906	561	414	733
201064_s_at	poly(a) binding protein, cytoplasmic 4 (inducible form)	724	535	534	399
201576_s_at	galactosidase, beta 1	266	201	166	157
201811_x_at	sh3-domain binding protein 5 (btk-associated)	439	213	210	255
201926_s_at	decay accelerating factor for complement (cd55, cramer blood group system)	222	109	94	164
201941_at	carboxypeptidase d	58	44	41	144
202083_s_at	sec14-like 1 (s. cerevisiae)	52	29	22	50
202146_at	interferon-related developmental regulator 1	199	129	147	284
202147_s_at	interferon-related developmental regulator 1	77	49	60	118
204140_at	tyrosylprotein sulfotransferase 1	99	72	60	98
204528_s_at	nucleosome assembly protein 1-like 1	1298	941	929	784
205419_at	epstein-barr virus induced gene 2 (lymphocyte-specific g protein-coupled receptor)	1384	787	1041	693
205433_at	butyrylcholinesterase	306	58	57	183
205919_at	hemoglobin, epsilon 1	182	75	74	75
206134_at	adam-like, decysin 1	64	16	11	30
206337_at	chemokine (c-c motif) receptor 7	1105	525	419	920
208029_s_at	lysosomal associated protein transmembrane 4 beta	48	27	22	40
208456_s_at	related ras viral (r-ras) oncogene homolog 2	153	69	74	94
209142_s_at	ubiquitin-conjugating enzyme e2g 1 (ubc7 homolog, c. elegans)	694	509	471	468
210448_s_at	purinergic receptor p2x, ligand-gated ion channel, 5	557	144	246	682
210749_x_at	discoidin domain receptor family, member 1	169	126	117	159
211071_s_at	all1-fused gene from chromosome 1q	207	142	103	159
211563_s_at	chromosome 19 open reading frame 2	221	166	170	136
212096_s_at	mitochondrial tumor suppressor 1	74	46	52	127
212577_at	kiaa0650 protein	300	191	146	203
213034_at	kiaa0999 protein	262	192	175	259
213864_s_at	nucleosome assembly protein 1-like 1	2700	2005	2019	1946
214039_s_at	lysosomal associated protein transmembrane 4 beta	158	54	48	102
215621_s_at	immunoglobulin heavy constant delta	50	21	19	16
215734_at	gb:aw182303/db_xref=gi:6450763/db_xref=xj41a06.x1/clone=image:2659762/fea=dna/cnt=3	114	83	78	52
217552_x_at	complement component (3b/4b) receptor 1, including knops blood group system	260	100	211	163
218035_s_at	rna-binding protein	220	256	203	194
218058_at	cxxc finger 1 (phd domain)	289	196	176	158
218319_at	pellino homolog 1 (drosophila)	462	304	227	447
218717_s_at	leprecan-like 1	77	53	25	44
218935_at	eh-domain containing 3	166	113	108	93
219032_x_at	opsin 3 (encephalopsin, panopsin)	195	77	63	95
219497_s_at	b-cell cll/lymphoma 11a (zinc finger protein)	594	249	405	347
219498_s_at	b-cell cll/lymphoma 11a (zinc finger protein)	265	134	221	158
219667_s_at	b-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1	601	433	656	213
219737_s_at	protocadherin 9	464	16	9	38
220083_x_at	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase l5	37	22	32	89
222669_s_at	shwachman-bodian-diamond syndrome	234	158	180	285
223259_at	orm1-like 3 (s. cerevisiae)	628	439	370	359
223741_s_at	tweety homolog 2 (drosophila)	87	61	98	316
224392_s_at	opsin 3 (encephalopsin, panopsin)	48	17	24	23
224452_s_at	hypothetical protein mgc12966	286	177	174	167
224870_at	loc441015	459	339	451	353
225080_at	myosin ic	142	80	94	123
225133_at	kruppel-like factor 3 (basic)	257	106	113	205
225763_at	protein kinase substrate mk2s4	861	611	669	475
226711_at	human t-cell leukemia virus enhancer factor	266	180	194	321
227799_at	myosin ig	363	210	180	164
227966_s_at	hypothetical protein bc016861	52	18	14	99
238919_at	protocadherin 9	98	2	1	4
239999_at	chromosome 21 open reading frame 34	54	7	7	11
47105_at	hypothetical protein flj20399	147	105	103	100
48580_at	cxxc finger 1 (phd domain)	495	356	340	314

Tab. A11 Zellzyklus-assoziierte Gene, die durch Notch1IC nach 3d induziert werden

UNIQID	Name	N1 0h	N1 8h	N1 24h	N1 3d	Ration 8h/0h	Ration 24h/0h	Ration 3d/0h
203967_at	CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	5	5	197	162	1.0	39.3	32.4
1555758_a_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase 3) (S. cerevisiae)	8	15	78	255	1.9	9.7	31.6
202870_s_at	CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	7	12	31	218	1.7	4.4	30.7
203764_at	discs, large homolog 7 (Drosophila)	7	9	28	136	1.3	4.1	20.0
202095_s_at	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	6	7	12	125	1.1	1.9	19.7
210559_s_at	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	11	22	118	196	2.1	10.9	18.0
202705_at	cyclin B2	26	46	87	404	1.8	3.4	15.8
205034_at	cyclin E2	11	19	89	169	1.8	8.3	15.7
219148_at	PDZ binding kinase	8	11	104	127	1.4	12.8	15.7
224753_at	cell division cycle associated 5	7	7	90	111	1.1	12.8	15.7
210052_s_at	TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)	21	56	119	320	2.6	5.6	15.0
218350_s_at	geminin, DNA replication inhibitor	16	32	264	225	2.0	16.8	14.3
212020_s_at	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	3	4	6	39	1.1	1.7	11.8
204995_at	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	147	1173	1370	1534	8.0	9.3	10.4
204444_at	kinesin family member 11	45	90	204	430	2.0	4.6	9.7
205394_at	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	24	47	342	220	2.0	14.4	9.3
213226_at	Cyclin A2	36	57	150	235	1.6	4.2	6.6
205046_at	centromere protein E, 312kDa	4	4	4	26	1.0	1.0	6.2
205548_s_at	BTG family, member 3	63	69	253	329	1.1	4.0	5.2
224847_at	cyclin-dependent kinase 6	84	169	332	414	2.0	3.9	4.9
230218_at	Transcribed locus	33	99	274	152	3.0	8.3	4.6
204159_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	43	37	41	179	0.9	1.0	4.1
38158_at	extra spindle poles like 1 (S. cerevisiae)	9	10	12	33	1.2	1.4	3.7
203362_s_at	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	269	302	974	977	1.1	3.6	3.6
206499_s_at	regulator of chromosome condensation 1	94	128	310	273	1.4	3.3	2.9
208795_s_at	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)	424	608	1306	1149	1.4	3.1	2.7
238756_at	Growth arrest-specific 2 like 3	7	7	7	17	1.0	1.0	2.6
201202_at	proliferating cell nuclear antigen	968	1233	3028	2455	1.3	3.1	2.5
214426_x_at	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	37	43	126	88	1.2	3.4	2.4
204197_s_at	runt-related transcription factor 3	292	663	874	643	2.3	3.0	2.2
201479_at	dyskeratosis congenita 1, dyskerin	721	946	1775	1485	1.3	2.5	2.1
214170_x_at	fumarate hydratase	450	525	743	960	1.2	1.6	2.1
214427_at	nucleolar protein 1, 120kDa	403	538	1159	861	1.3	2.9	2.1
201666_at	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor 1)	929	1389	2590	1569	1.5	2.8	1.7
221923_s_at	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	1987	2230	3489	3250	1.1	1.8	1.6
223617_x_at	ATPase family, AAA domain containing 3B	26	32	60	39	1.2	2.3	1.5
228081_at	Cyclin G2	11	8	8	7	0.7	0.7	0.7
204269_at	pim-2 oncogene	678	340	200	382	0.5	0.3	0.6
205992_s_at	interleukin 15	129	171	106	71	1.3	0.8	0.6
217887_s_at	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15	1466	1197	856	817	0.8	0.6	0.6
206332_s_at	interferon, gamma-inducible protein 16	10105	8272	5849	4825	0.8	0.6	0.5
207629_s_at	rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	174	145	91	83	0.8	0.5	0.5
218845_at	dual specificity phosphatase 22	409	304	207	225	0.7	0.5	0.5
221586_s_at	E2F transcription factor 5, p130-binding	291	187	168	137	0.6	0.6	0.5
203845_at	p300/CBP-associated factor	67	36	27	26	0.5	0.4	0.4
210826_x_at	RAD17 homolog (S. pombe)	265	258	135	98	1.0	0.5	0.4
1552263_at	mitogen-activated protein kinase 1	285	238	247	91	0.8	0.9	0.3
206641_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	2442	1518	675	788	0.6	0.3	0.3
207318_s_at	cell division cycle 2-like 5 (cholinesterase-related cell division controller)	1544	846	510	419	0.5	0.3	0.3
212144_at	unc-84 homolog B (C. elegans)	460	390	244	151	0.8	0.5	0.3
212254_s_at	dystonin	998	629	301	207	0.6	0.3	0.2
214641_at	collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	67	48	44	8	0.7	0.7	0.1

Tab. A12 Zellzyklus-assoziierte Gene, die durch Notch2IC nach 3d induziert werden

UNIQID	Name	N2 0h	N2 8h	N2 24h	N2 3d	Ratio 8h/0h	Ratio 24h/0h	Ratio 3d/0h
219918_s_at	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	7	51	69	154	7.6	10.5	23.3
201710_at	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	23	117	301	455	5.1	13.0	19.6
203968_s_at	CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	6	27	58	106	4.7	9.9	18.0
219148_at	PDZ binding kinase	8	21	68	138	2.8	8.8	17.7
219990_at	E2F transcription factor 8	12	44	68	169	3.8	5.8	14.5
209642_at	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	8	21	47	105	2.6	5.7	12.8
218009_s_at	protein regulator of cytokinesis 1	14	48	79	185	3.4	5.5	12.8
212022_s_at	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	15	50	68	177	3.3	4.5	11.6
224753_at	cell division cycle associated 5	7	28	49	75	4.0	7.0	10.8
204126_s_at	CDC45 cell division cycle 45-like (S. cerevisiae)	5	9	19	42	2.0	4.1	9.0
205034_at	cyclin E2	13	67	77	107	5.3	6.0	8.5
223381_at	cell division cycle associated 1	14	51	55	118	3.6	3.9	8.4
219306_at	kinesin family member 15	5	8	9	39	1.5	1.9	7.8
203213_at	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	50	199	298	372	4.0	6.0	7.5
225655_at	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1	65	257	360	475	3.9	5.5	7.3
208999_at	septin 8	19	57	45	126	3.0	2.4	6.8
204444_at	kinesin family member 11	51	125	198	340	2.5	3.9	6.7
218350_s_at	geminin, DNA replication inhibitor	31	70	116	207	2.3	3.8	6.7
228868_x_at	DNA replication factor	29	86	139	191	3.0	4.8	6.6
201041_s_at	dual specificity phosphatase 1	18	17	22	112	1.0	1.3	6.3
202095_s_at	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	5	8	11	35	1.4	1.9	6.3
204026_s_at	ZW10 interactor	159	526	641	997	3.3	4.0	6.3
204995_at	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	101	426	947	641	4.2	9.3	6.3
204318_s_at	G-2 and S-phase expressed 1	9	19	26	55	2.0	2.8	5.9
213226_at	Cyclin A2	45	102	145	244	2.3	3.3	5.5
37028_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	86	102	86	397	1.2	1.0	4.6
204252_at	cyclin-dependent kinase 2	100	203	302	429	2.0	3.0	4.3
213134_x_at	BTG family, member 3	225	371	400	887	1.6	1.8	3.9
230218_at	Transcribed locus	45	71	151	176	1.6	3.3	3.9
202886_s_at	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), beta isoform	26	29	37	87	1.1	1.5	3.4
213253_at	SMC2 structural maintenance of chromosomes 2-like 1 (yeast)	29	56	71	93	1.9	2.4	3.2
214426_x_at	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	43	61	82	119	1.4	1.9	2.8
208931_s_at	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	71	79	69	188	1.1	1.0	2.7
203362_s_at	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	318	434	658	806	1.4	2.1	2.5
212037_at	pinin, desmosome associated protein	354	491	650	880	1.4	1.8	2.5
222608_s_at	anillin, actin binding protein (scraps homolog, Drosophila)	8	9	9	20	1.1	1.1	2.5
225662_at	sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK	82	85	97	206	1.0	1.2	2.5
204826_at	cyclin F	19	39	50	45	2.1	2.7	2.4
224309_s_at	SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae)	1037	1490	1412	2425	1.4	1.4	2.3
204531_s_at	breast cancer 1, early onset	54	94	120	119	1.7	2.2	2.2
208795_s_at	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)	486	674	777	1052	1.4	1.6	2.2
208886_at	H1 histone family, member 0	439	470	403	973	1.1	0.9	2.2
212533_at	WEE1 homolog (S. pombe)	129	178	296	288	1.4	2.3	2.2
214700_x_at	RAP1 interacting factor homolog (yeast)	61	81	82	137	1.3	1.3	2.2
201003_x_at	arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B) /// ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 /// ubiquitin-conjugating enzyme variant Kua /// ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	103	140	153	215	1.4	1.5	2.1
208676_s_at	proliferation-associated 2G4, 38kDa	581	715	904	1231	1.2	1.6	2.1
201202_at	proliferating cell nuclear antigen	1151	1962	2058	2260	1.7	1.8	2.0
205178_s_at	retinoblastoma binding protein 6	652	854	793	1309	1.3	1.2	2.0
206499_s_at	regulator of chromosome condensation 1	131	125	202	254	1.0	1.5	1.9
213918_s_at	Nipped-B homolog (Drosophila)	374	470	444	696	1.3	1.2	1.9
213378_s_at	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 11 (CHL1-like helicase homolog, S. cerevisiae)	37	46	56	67	1.3	1.5	1.8
235846_at	Fibrinogen silencer binding protein	6	6	6	11	1.0	1.0	1.8
201479_at	dyskeratosis congenita 1, dyskerin	918	941	1291	1597	1.0	1.4	1.7
203449_s_at	telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1	482	461	511	805	1.0	1.1	1.7
209056_s_at	CDC5 cell division cycle 5-like (S. pombe)	578	708	653	965	1.2	1.1	1.7
217880_at	Cell division cycle 27	268	311	251	448	1.2	0.9	1.7
215438_x_at	G1 to S phase transition 1	796	770	964	1254	1.0	1.2	1.6
202362_at	RAP1A, member of RAS oncogene family	1987	1950	1866	2964	1.0	0.9	1.5
204053_x_at	phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)	1020	1123	1244	1527	1.1	1.2	1.5
207983_s_at	stromal antigen 2	262	304	290	388	1.2	1.1	1.5
208174_x_at	U2(RNU2) small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 2	222	237	244	343	1.1	1.1	1.5
216237_s_at	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae)	510	897	936	773	1.8	1.8	1.5
217941_s_at	erbB2 interacting protein	1757	2091	2190	2654	1.2	1.2	1.5
225552_x_at	aurora kinase A interacting protein 1	589	768	674	872	1.3	1.1	1.5
207405_s_at	RAD17 homolog (S. pombe)	1057	894	704	541	0.8	0.7	0.5
214022_s_at	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	2417	1575	1718	1175	0.7	0.7	0.5
225610_at	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 2	1781	1263	1025	889	0.7	0.6	0.5
203685_at	B-cell CLL/lymphoma 2	416	189	203	170	0.5	0.5	0.4
215051_x_at	allograft inflammatory factor 1	1271	865	668	459	0.7	0.5	0.4
242362_at	Cullin 3	451	227	201	188	0.5	0.4	0.4
1552263_at	mitogen-activated protein kinase 1	273	247	336	82	0.9	1.2	0.3
204269_at	pim-2 oncogene	718	314	165	220	0.4	0.2	0.3
205677_s_at	deleted in lymphocytic leukemia, 1	465	212	234	135	0.5	0.5	0.3
209339_at	seven in absentia homolog 2 (Drosophila) /// seven in absentia homolog 2 (Drosophila)	90	74	115	26	0.8	1.3	0.3
212144_at	unc-84 homolog B (C. elegans)	389	305	265	114	0.8	0.7	0.3
228991_at	Cell division cycle 2-like 5 (cholinesterase-related cell division controller)	1100	501	339	278	0.5	0.3	0.3
232098_at	dystonin	194	127	114	53	0.7	0.6	0.3
215586_at	Protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, beta isoform (calcineurin A beta)	77	47	31	14	0.6	0.4	0.2
235683_at	sestrin 3	91	39	34	14	0.4	0.4	0.2

Tab. A13 Durch Notch1IC-reprimierte Gene, die mit der Immunantwort assoziieren.

UNIQID	Name	0h	8h	24h	3d	Ratio 8h/0h	Ratio 24h/0h	Ratio 3d/0h
206206_at	CD180 antigen	41	8	8	5	0.2	0.2	0.1
220146_at	toll-like receptor 7	77	16	13	8	0.2	0.2	0.1
202688_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 /// tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	29	8	8	7	0.3	0.3	0.2
207681_at	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	25	11	10	10	0.4	0.4	0.4
201850_at	capping protein (actin filament), gelsolin-like	992	447	148	51	0.5	0.1	0.1
205671_s_at	major histocompatibility complex, class II, DO beta	1413	673	393	118	0.5	0.3	0.1
206417_at	cyclic nucleotide gated channel alpha 1	29	15	6	6	0.5	0.2	0.2
208651_x_at	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	881	521	329	187	0.6	0.4	0.2
202902_s_at	cathepsin S	687	415	281	211	0.6	0.4	0.3
206641_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	2442	1518	675	788	0.6	0.3	0.3
215967_s_at	lymphocyte antigen 9	185	121	99	10	0.7	0.5	0.1
232431_at	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	1329	887	655	553	0.7	0.5	0.4
221491_x_at	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1 /// major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	395	275	218	57	0.7	0.6	0.1
203528_at	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4D	492	344	195	112	0.7	0.4	0.2
203932_at	major histocompatibility complex, class II, DM beta	8359	6077	3834	2680	0.7	0.5	0.3
229111_at	Mannan-binding lectin serine protease 2	655	484	377	205	0.7	0.6	0.3
218380_at	NACHT, leucine rich repeat and PYD (pyrin domain) containing 1	110	82	45	26	0.7	0.4	0.2
206584_at	lymphocyte antigen 96	703	525	341	202	0.7	0.5	0.3
209823_x_at	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	5600	4303	3075	1255	0.8	0.5	0.2
221601_s_at	Fas apoptotic inhibitory molecule 3 /// Fas apoptotic inhibitory molecule 3	7028	5659	4088	2117	0.8	0.6	0.3
235478_at	DNA cross-link repair 1C (PSO2 homolog, S. cerevisiae)	323	263	224	141	0.8	0.7	0.4
206332_s_at	interferon, gamma-inducible protein 16	10105	8272	5849	4825	0.8	0.6	0.5
212203_x_at	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	737	665	705	540	0.9	1.0	0.7
208306_x_at	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	11437	10801	9305	5523	0.9	0.8	0.5
229750_at	POU domain, class 2, transcription factor 2	366	348	240	86	1.0	0.7	0.2
203416_at	CD53 antigen	8679	9363	8510	4920	1.1	1.0	0.6
204961_s_at	neutrophil cytosolic factor 1 (47kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 1)	345	427	440	164	1.2	1.3	0.5
204786_s_at	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	499	648	461	312	1.3	0.9	0.6
205992_s_at	interleukin 15	129	171	106	71	1.3	0.8	0.6
211583_x_at	natural cytotoxicity triggering receptor 3	100	144	77	28	1.4	0.8	0.3
206126_at	Burkitt lymphoma receptor 1, GTP binding protein (chemokine (C-X-C motif) receptor 5)	32	118	154	8	3.7	4.8	0.3

Tab. A14 Durch Notch2IC-reprimierte Gene, die mit der Immunantwort assoziieren.

UNIQUID	Name	0h	8h	24h	3d	R 8h/0h	R 24h/0h	R 3d/0h
204533_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	163	9	7	35	0.1	0.0	0.2
206206_at	CD180 antigen	76	8	8	6	0.1	0.1	0.1
227627_at	serum/glucoocorticoid regulated kinase-like	57	9	6	11	0.2	0.1	0.2
219032_x_at	opsin 3 (encephalopsin, panopsin)	292	47	25	66	0.2	0.1	0.2
204446_s_at	arachidonate 5-lipoxygenase	29	6	6	6	0.2	0.2	0.2
202688_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 /// tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	38	8	10	8	0.2	0.3	0.2
230877_at	immunoglobulin heavy constant delta	293	68	35	43	0.2	0.1	0.1
206513_at	absent in melanoma 2	551	166	172	66	0.3	0.3	0.1
201850_at	capping protein (actin filament), gelsolin-like	1410	435	320	181	0.3	0.2	0.1
1555950_a_a	decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)	362	123	117	247	0.3	0.3	0.7
205790_at	src family associated phosphoprotein 1	36	12	9	7	0.3	0.2	0.2
213436_at	cannabinoid receptor 1 (brain)	341	121	72	29	0.4	0.2	0.1
208650_s_at	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	962	352	352	168	0.4	0.4	0.2
205229_s_at	coagulation factor C homolog, coxlin (Limulus polyphemus)	1197	451	321	255	0.4	0.3	0.2
206437_at	endothelial differentiation, G-protein-coupled receptor 6	898	339	276	161	0.4	0.3	0.2
217552_x_at	complement component (3b/4b) receptor 1, including Knops blood group system	155	59	170	123	0.4	1.1	0.8
203518_at	lysosomal trafficking regulator	213	81	64	102	0.4	0.3	0.5
202869_at	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	211	83	67	57	0.4	0.3	0.3
206337_at	chemokine (C-C motif) receptor 7 /// chemokine (C-C motif) receptor 7	1315	549	413	1071	0.4	0.3	0.8
203233_at	interleukin 4 receptor	1482	635	594	208	0.4	0.4	0.1
203685_at	B-cell CLL/lymphoma 2	416	189	203	170	0.5	0.5	0.4
204972_at	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	9	4	4	5	0.5	0.5	0.5
227091_at	KIAA1505 protein	61	29	21	31	0.5	0.3	0.5
204980_at	clock homolog (mouse)	427	206	94	105	0.5	0.2	0.2
213170_at	glutathione peroxidase 7	46	23	17	16	0.5	0.4	0.3
206983_at	chemokine (C-C motif) receptor 6	221	111	218	38	0.5	1.0	0.2
204567_s_at	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	489	249	43	102	0.5	0.1	0.2
239122_at	Interleukin 24	311	159	128	85	0.5	0.4	0.3
228647_at	Homo sapiens, clone IMAGE:3621928, mRNA, partial cds	208	111	128	47	0.5	0.6	0.2
1552497_a_a	SLAM family member 6	614	331	323	150	0.5	0.5	0.2
205419_at	Epstein-Barr virus induced gene 2 (lymphocyte-specific G protein-coupled receptor)	2753	1498	2018	1117	0.5	0.7	0.4
201136_at	proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched)	623	344	207	169	0.6	0.3	0.3
222547_at	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	237	133	125	104	0.6	0.5	0.4
206584_at	lymphocyte antigen 96	872	505	448	302	0.6	0.5	0.3
231747_at	cysteinyl leukotriene receptor 1	1263	739	819	284	0.6	0.6	0.2
203315_at	NCK adaptor protein 2	526	315	245	257	0.6	0.5	0.5
235388_at	chromodomain helicase DNA binding protein 9	379	228	196	200	0.6	0.5	0.5
205297_s_at	CD79B antigen (immunoglobulin-associated beta)	1993	1224	1088	589	0.6	0.5	0.3
204140_at	tyrosylprotein sulfotransferase 1	24	15	14	35	0.6	0.6	1.5
221601_s_at	Fas apoptotic inhibitory molecule 3 /// Fas apoptotic inhibitory molecule 3	7675	4781	4680	2349	0.6	0.6	0.3
201952_at	activated leukocyte cell adhesion molecule	153	95	181	29	0.6	1.2	0.2
209670_at	T cell receptor alpha constant /// T cell receptor alpha constant	1517	954	911	627	0.6	0.6	0.4
202172_at	zinc finger protein 161	375	239	223	363	0.6	0.6	1.0
215946_x_at	similar to omega protein	275	179	105	60	0.7	0.4	0.2
214022_s_at	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	2417	1575	1718	1175	0.7	0.7	0.5
202902_s_at	cathepsin S	576	377	345	146	0.7	0.6	0.3
205101_at	MHC class II transactivator	966	644	667	183	0.7	0.7	0.2
224925_at	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent RAC exchanger 1	771	517	582	308	0.7	0.8	0.4
213685_at	Gene from PAC 886K2, chromosome 1	30	21	22	21	0.7	0.7	0.7
218746_at	TAP binding protein-like	101	68	47	34	0.7	0.5	0.3
224499_s_at	activation-induced cytidine deaminase /// activation-induced cytidine deaminase	8082	5487	1893	2104	0.7	0.2	0.3
211563_s_at	chromosome 19 open reading frame 2	347	236	289	197	0.7	0.8	0.6
215051_x_at	allograft inflammatory factor 1	1271	865	668	459	0.7	0.5	0.4
228068_at	Spleen tyrosine kinase	1078	744	851	496	0.7	0.8	0.5
210370_s_at	lymphocyte antigen 9	44	31	43	10	0.7	1.0	0.2
201064_s_at	poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 (inducible form)	1246	915	925	634	0.7	0.7	0.5
221796_at	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	125	92	17	8	0.7	0.1	0.1
218696_at	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	4273	3150	1764	2036	0.7	0.4	0.5
205671_s_at	major histocompatibility complex, class II, DO beta	1370	1024	888	140	0.7	0.6	0.1
206641_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	2239	1686	1101	401	0.8	0.5	0.2
206332_s_at	interferon, gamma-inducible protein 16	11264	8524	7437	5813	0.8	0.7	0.5
225636_at	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa	2003	1548	1173	1140	0.8	0.6	0.6
232431_at	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	1035	804	712	400	0.8	0.7	0.4
221491_x_at	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1 /// major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	377	294	268	66	0.8	0.7	0.2
208072_s_at	diacylglycerol kinase, delta 130kDa	800	625	532	230	0.8	0.7	0.3
211991_s_at	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	14109	11126	11902	4657	0.8	0.8	0.3
52940_at	single Ig IL-1R-related molecule	177	140	127	79	0.8	0.7	0.4
206200_s_at	annexin A11	2189	1736	1662	1099	0.8	0.8	0.5
207945_s_at	casein kinase 1, delta	392	311	239	513	0.8	0.6	1.3
226878_at	major histocompatibility complex, class II, DO alpha	1789	1432	1057	348	0.8	0.6	0.2
205901_at	prepronociceptin	2046	1642	1201	397	0.8	0.6	0.2

Tab. A14 Durch Notch2IC-reprimierte Gene, die mit der Immunantwort assoziieren.

UNIQID	Name	0h	8h	24h	3d	R 8h/0h	R 24h/0h	R 3d/0h
209480_at	Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1 /// Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	1615	1305	1236	434	0.8	0.8	0.3
220146_at	toll-like receptor 7	38	31	29	11	0.8	0.8	0.3
219947_at	C-type lectin domain family 4, member A	39	32	27	179	0.8	0.7	4.5
228343_at	POU domain, class 2, transcription factor 2	706	579	640	239	0.8	0.9	0.3
203932_at	major histocompatibility complex, class II, DM beta /// major histocompatibility complex, class II, DM beta	8398	6931	5192	2699	0.8	0.6	0.3
201106_at	glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase)	1851	1527	1372	1805	0.8	0.7	1.0
214048_at	methyl-CpG binding domain protein 4	419	346	282	155	0.8	0.7	0.4
220059_at	BCR downstream signaling 1	2572	2130	2076	1385	0.8	0.8	0.5
201432_at	catalase	2743	2273	2353	1267	0.8	0.9	0.5
208959_s_at	thioredoxin domain containing 4 (endoplasmic reticulum)	3144	2612	2226	1016	0.8	0.7	0.3
203416_at	CD53 antigen	8755	7394	8495	4629	0.8	1.0	0.5
204949_at	intercellular adhesion molecule 3	2728	2306	2908	795	0.8	1.1	0.3
207405_s_at	RAD17 homolog (S. pombe)	1057	894	704	541	0.8	0.7	0.5
204960_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C-associated protein	2356	2066	1793	995	0.9	0.8	0.4
1555779_a_a	CD79A antigen (immunoglobulin-associated alpha)	3925	3467	3043	1900	0.9	0.8	0.5
201137_s_at	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	10790	9666	9936	3830	0.9	0.9	0.4
200904_at	Major histocompatibility complex, class I, E	2664	2403	2068	1475	0.9	0.8	0.6
1552263_at	mitogen-activated protein kinase 1	273	247	336	82	0.9	1.2	0.3
208783_s_at	membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen)	936	853	769	483	0.9	0.8	0.5
203528_at	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4D	404	376	423	126	0.9	1.0	0.3
209674_at	cryptochrome 1 (photolyase-like)	688	649	439	756	0.9	0.6	1.1
217478_s_at	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	7429	7116	5668	1984	1.0	0.8	0.3
212671_s_at	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1 /// major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 2	9581	9197	6556	2947	1.0	0.7	0.3
226277_at	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) binding protein	690	662	577	371	1.0	0.8	0.5
209619_at	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)	21647	20826	20821	14269	1.0	1.0	0.7
219939_s_at	cold shock domain containing E1, RNA-binding	1749	1688	1523	1278	1.0	0.9	0.7
209374_s_at	immunoglobulin heavy constant mu	12922	12556	9677	5873	1.0	0.7	0.5
210356_x_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	7493	7389	7834	4377	1.0	1.0	0.6
208306_x_at	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	10890	10885	9835	5986	1.0	0.9	0.5
215666_at	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	92	94	67	22	1.0	0.7	0.2
201641_at	bone marrow stromal cell antigen 2	935	972	1277	564	1.0	1.4	0.6
226482_s_at	F11 receptor	730	763	607	371	1.0	0.8	0.5
200611_s_at	WD repeat domain 1	1700	1979	1504	1257	1.2	0.9	0.7
217168_s_at	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	1757	2098	2144	1238	1.2	1.2	0.7
218463_s_at	MUS81 endonuclease homolog (yeast)	410	513	542	291	1.3	1.3	0.7
220068_at	pre-B lymphocyte gene 3	1596	2287	3293	737	1.4	2.1	0.5

Tab. A15 Durch EBNA2-reprimierte Gene, die mit der Immunantwort assoziieren.

UNIQID	Name	0h	4h	24h	Ratio 4h/0h	Ratio 24h/0h
1552584_at	interleukin 12 receptor, beta 1	129	95	35	0.7	0.3
1554240_a_a	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)	21	9	5	0.5	0.3
1555779_a_a	CD79A antigen (immunoglobulin-associated alpha)	4655	2776	421	0.6	0.1
1555811_at	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	70	47	22	0.7	0.3
1560587_s_a	peroxiredoxin 5	2490	1955	1457	0.8	0.6
200748_s_at	ferritin, heavy polypeptide 1	4699	3562	2454	0.8	0.5
200904_at	Major histocompatibility complex, class I, E	3037	1091	433	0.4	0.1
201137_s_at	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	11328	10210	2533	0.9	0.2
201315_x_at	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	2387	1733	721	0.7	0.3
201403_s_at	microsomal glutathione S-transferase 3	190	129	236	0.7	1.2
201641_at	bone marrow stromal cell antigen 2	679	485	1093	0.7	1.6
201850_at	capping protein (actin filament), gelsolin-like	1589	922	17	0.6	0.0
201998_at	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1	5767	10961	2672	1.9	0.5
202105_at	immunoglobulin (CD79A) binding protein 1	1062	676	385	0.6	0.4
202171_at	zinc finger protein 161	599	246	684	0.4	1.1
202530_at	mitogen-activated protein kinase 14	236	47	314	0.2	1.3
202531_at	interferon regulatory factor 1	228	71	119	0.3	0.5
202659_at	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 10	840	584	405	0.7	0.5
202688_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 /// tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	61	7	8	0.1	0.1
202758_s_at	regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein	721	463	483	0.6	0.7
202803_s_at	integrin, beta 2 (antigen CD18 (p95), lymphocyte function-associated antigen 1; macrophage antigen 1 (mac-1) beta subunit)	444	470	168	1.1	0.4
203233_at	interleukin 4 receptor	1585	764	174	0.5	0.1
203275_at	interferon regulatory factor 2	648	195	293	0.3	0.5
203315_at	NCK adaptor protein 2	597	98	519	0.2	0.9
203518_at	lysosomal trafficking regulator	230	87	33	0.4	0.1
203523_at	lymphocyte-specific protein 1	1373	799	244	0.6	0.2
203528_at	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4D	472	91	49	0.2	0.1
203624_at	DNA segment on chromosome X and Y (unique) 155 expressed sequence	402	372	193	0.9	0.5
203921_at	carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-O) sulfotransferase 2	788	200	272	0.3	0.3
203932_at	major histocompatibility complex, class II, DM beta /// major histocompatibility complex, class II, DM beta	9016	6522	679	0.7	0.1
203964_at	N-myc (and STAT) interactor	534	208	359	0.4	0.7
204140_at	tyrosylprotein sulfotransferase 1	32	12	23	0.4	0.7
204174_at	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	1776	721	163	0.4	0.1
204265_s_at	G-protein signalling modulator 3 (AGS3-like, C. elegans)	828	305	27	0.4	0.0
204279_at	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional protease 2)	322	154	283	0.5	0.9
204446_s_at	arachidonate 5-lipoxygenase	21	7	6	0.3	0.3
204549_at	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon	76	47	48	0.6	0.6
204639_at	adenosine deaminase	160	104	782	0.7	4.9
204891_s_at	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	635	655	218	1.0	0.3
204959_at	myeloid cell nuclear differentiation antigen /// myeloid cell nuclear differentiation antigen	594	293	63	0.5	0.1
204960_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C-associated protein	2779	1487	146	0.5	0.1
204961_s_at	neutrophil cytosolic factor 1 (47kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 1)	496	137	7	0.3	0.0
205081_at	cysteine-rich protein 1 (intestinal)	381	314	117	0.8	0.3
205098_at	chemokine (C-C motif) receptor 1	49	6	6	0.1	0.1
205101_at	MHC class II transactivator	929	1179	159	1.3	0.2
205147_x_at	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa	560	349	29	0.6	0.1
205267_at	POU domain, class 2, associating factor 1	8012	6916	2560	0.9	0.3
205269_at	lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)	319	1824	22	5.7	0.1
205297_s_at	CD79B antigen (immunoglobulin-associated beta)	2351	423	59	0.2	0.0
205367_at	adaptor protein with pleckstrin homology and src homology 2 domains	1012	532	74	0.5	0.1
205484_at	signaling threshold regulating transmembrane adaptor 1 /// signaling threshold regulating transmembrane adaptor 1	412	70	103	0.2	0.3
205497_at	zinc finger protein 175	51	32	58	0.6	1.1
205659_at	histone deacetylase 9	145	43	30	0.3	0.2
205671_s_at	major histocompatibility complex, class II, DO beta	1534	667	65	0.4	0.0
205790_at	src family associated phosphoprotein 1	18	10	6	0.6	0.3
205859_at	lymphocyte antigen 86	1304	847	150	0.7	0.1
205904_at	MHC class I polypeptide-related sequence A	60	23	59	0.4	1.0
205987_at	CD1C antigen, c polypeptide	24	10	7	0.4	0.3
205992_s_at	interleukin 15	151	26	383	0.2	2.5
206150_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7 /// tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7	714	571	110	0.8	0.2
206200_s_at	annexin A11	2503	1354	644	0.5	0.3
206206_at	CD180 antigen	50	7	5	0.1	0.1
206247_at	MHC class I polypeptide-related sequence B	486	303	856	0.6	1.8
206417_at	cyclic nucleotide gated channel alpha 1	32	11	7	0.3	0.2
206437_at	endothelial differentiation, G-protein-coupled receptor 6	1197	215	144	0.2	0.1
206513_at	absent in melanoma 2	236	40	10	0.2	0.0
206569_at	interleukin 24	136	55	13	0.4	0.1
206584_at	lymphocyte antigen 96	853	446	61	0.5	0.1

Tab. A15 Durch EBNA2-reprimierte Gene, die mit der Immunantwort assoziieren.

UNIQID	Name	0h	4h	24h	Ratio 4h/0h	Ratio 24h/0h
206641_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	2281	573	343	0.3	0.2
206983_at	chemokine (C-C motif) receptor 6	381	174	23	0.5	0.1
207113_s_at	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	123	624	8	5.1	0.1
207339_s_at	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	11956	5930	102	0.5	0.0
207641_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B	88	52	51	0.6	0.6
207681_at	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	34	11	10	0.3	0.3
207777_s_at	SP140 nuclear body protein	595	188	102	0.3	0.2
208072_s_at	diacylglycerol kinase, delta 130kDa	963	545	128	0.6	0.1
208306_x_at	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	10899	11270	5906	1.0	0.5
208405_s_at	CD164 antigen, sialomucin	2296	1717	1281	0.8	0.6
208438_s_at	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog	741	450	7	0.6	0.0
208783_s_at	membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen)	1109	511	577	0.5	0.5
208829_at	TAP binding protein (tapasin)	1252	849	1174	0.7	0.9
208965_s_at	interferon, gamma-inducible protein 16	5469	1540	794	0.3	0.1
209040_s_at	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional protease 7)	692	329	636	0.5	0.9
209124_at	myeloid differentiation primary response gene (88)	695	764	500	1.1	0.7
209140_x_at	major histocompatibility complex, class I, B	12166	10395	8309	0.9	0.7
209268_at	vacuolar protein sorting 45A (yeast)	155	56	106	0.4	0.7
209354_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)	265	184	55	0.7	0.2
209575_at	interleukin 10 receptor, beta	711	246	234	0.4	0.3
209619_at	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)	21536	20771	14728	1.0	0.7
209648_x_at	suppressor of cytokine signaling 5	99	52	123	0.5	1.2
209728_at	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	5417	5280	1776	1.0	0.3
209788_s_at	type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator	362	278	209	0.8	0.6
209795_at	CD69 antigen (p60, early T-cell activation antigen)	689	6433	119	9.3	0.2
209828_s_at	interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)	140	157	12	1.1	0.1
210017_at	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	476	795	350	1.7	0.7
210136_at	myelin basic protein	472	259	81	0.6	0.2
210176_at	toll-like receptor 1	244	152	20	0.6	0.1
210244_at	cathelicidin antimicrobial peptide	78	68	5	0.9	0.1
210268_at	nuclear transcription factor, X-box binding 1	63	81	28	1.3	0.4
210528_at	major histocompatibility complex, class I-related	108	27	18	0.3	0.2
210763_x_at	natural cytotoxicity triggering receptor 3	85	51	9	0.6	0.1
210889_s_at	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	339	156	52	0.5	0.2
210972_x_at	T cell receptor alpha locus /// T cell receptor delta variable 2 /// T cell receptor alpha variable 20 /// T cell receptor alpha joining 17 /// T cell receptor alpha constant	1517	1856	710	1.2	0.5
210982_s_at	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	13727	14140	7176	1.0	0.5
211582_x_at	leukocyte specific transcript 1	37	29	13	0.8	0.3
211649_x_at	Immunoglobulin heavy constant mu /// Immunoglobulin heavy constant mu	178	143	58	0.8	0.3
211656_x_at	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1 /// major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	4465	4294	1863	1.0	0.4
211771_s_at	POU domain, class 2, transcription factor 2 /// POU domain, class 2, transcription factor 2	343	125	16	0.4	0.0
211796_s_at	T cell receptor beta variable 21-1 /// T cell receptor beta variable 19 /// T cell receptor beta variable 5-4 /// T cell receptor beta variable 3-1 /// T cell receptor beta constant 1	2653	2161	684	0.8	0.3
211799_x_at	Major histocompatibility complex, class I, C	2629	2141	1494	0.8	0.6
211902_x_at	T cell receptor alpha locus	605	719	355	1.2	0.6
211991_s_at	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	14016	13177	4360	0.9	0.3
212195_at	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	126	77	331	0.6	2.6
212203_x_at	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	790	612	413	0.8	0.5
212592_at	Immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	14716	10609	1754	0.7	0.1
212827_at	immunoglobulin heavy constant mu /// immunoglobulin heavy constant mu	15422	10694	2447	0.7	0.2
213193_x_at	T cell receptor beta variable 19 /// T cell receptor beta variable 19 /// T cell receptor beta constant 1 /// T cell receptor beta constant 1	385	332	154	0.9	0.4
213566_at	ribonuclease, RNase A family, k6 /// ribonuclease, RNase A family, k6	172	38	5	0.2	0.0
213604_at	Gene from PAC 886K2, chromosome 1	284	456	145	1.6	0.5
213674_x_at	immunoglobulin heavy constant delta	72	37	7	0.5	0.1
213831_at	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	4539	4199	1554	0.9	0.3
214467_at	G protein-coupled receptor 65	351	485	140	1.4	0.4
214677_x_at	immunoglobulin lambda locus /// immunoglobulin lambda constant 1 (Mcg marker) /// immunoglobulin lambda constant 2 (Kern-Oz- marker) /// immunoglobulin lambda variable 2-14 /// immunoglobulin lambda joining 3	2003	553	157	0.3	0.1
215051_x_at	allograft inflammatory factor 1	885	562	163	0.6	0.2
215925_s_at	CD72 antigen	113	35	10	0.3	0.1
215933_s_at	hematopoietically expressed homeobox	1915	515	389	0.3	0.2
216241_s_at	transcription elongation factor A (SII), 1	4906	2142	2894	0.4	0.6
216288_at	cysteinyl leukotriene receptor 1	89	13	12	0.2	0.1
217022_s_at	immunoglobulin heavy constant alpha 1 /// immunoglobulin heavy constant alpha 2 (A2m marker) /// hypothetical protein MGC27165	139	20	7	0.1	0.0
217436_x_at	HLA-G histocompatibility antigen, class I, G /// major histocompatibility complex, class I, H (pseudogene)	2135	1696	1354	0.8	0.6

Tab. A15 Durch EBNA2-reprimierte Gene, die mit der Immunantwort assoziieren.

UNIQUID	Name	0h	4h	24h	Ratio 4h/0h	Ratio 24h/0h
217478_s_at	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	7842	6316	767	0.8	0.1
217552_x_at	complement component (3b/4b) receptor 1, including Knops blood group system	296	264	53	0.9	0.2
218380_at	NACHT, leucine rich repeat and PYD (pyrin domain) containing 1	155	59	15	0.4	0.1
218636_s_at	mannosidase, alpha, class 1B, member 1	78	51	49	0.7	0.6
219620_x_at	hypothetical protein FLJ20245	10	6	4	0.6	0.4
219947_at	C-type lectin domain family 4, member A	27	274	16	10.1	0.6
220054_at	interleukin 23, alpha subunit p19	283	218	66	0.8	0.2
220059_at	BCR downstream signaling 1	2735	1728	240	0.6	0.1
220146_at	toll-like receptor 7	51	14	9	0.3	0.2
221087_s_at	apolipoprotein L, 3	257	77	37	0.3	0.1
221491_x_at	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1 /// major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	444	443	53	1.0	0.1
221581_s_at	linker for activation of T cells family, member 2	2075	1320	1069	0.6	0.5
221601_s_at	Fas apoptotic inhibitory molecule 3 /// Fas apoptotic inhibitory molecule 3	7988	5592	175	0.7	0.0
221653_x_at	apolipoprotein L, 2	80	50	50	0.6	0.6
221671_x_at	immunoglobulin kappa constant /// immunoglobulin kappa variable 1-5	24213	22917	17454	1.0	0.7
221875_x_at	major histocompatibility complex, class I, F	4555	3573	3123	0.8	0.7
221969_at	Paired box gene 5 (B-cell lineage specific activator)	3890	3944	1565	1.0	0.4
222266_at	Chromosome 19 open reading frame 2	441	672	199	1.5	0.5
222292_at	CD40 antigen (TNF receptor superfamily member 5)	312	883	169	2.8	0.5
222868_s_at	interleukin 18 binding protein	61	83	13	1.4	0.2
223000_s_at	F11 receptor	265	132	158	0.5	0.6
223434_at	guanylate binding protein 3	34	10	12	0.3	0.4
223465_at	collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) binding protein	216	63	85	0.3	0.4
223626_x_at	family with sequence similarity 14, member A	307	258	92	0.8	0.3
224499_s_at	activation-induced cytidine deaminase /// activation-induced cytidine deaminase	8248	1472	5817	0.2	0.7
224711_at	Solute carrier family 25, member 29	494	274	379	0.6	0.8
224925_at	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent RAC exchanger 1	768	326	166	0.4	0.2
225595_at	MRNA; cDNA DKFZp566P1124 (from clone DKFZp566P1124)	58	19	37	0.3	0.6
225609_at	glutathione reductase	577	365	572	0.6	1.0
225636_at	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa	2348	830	499	0.4	0.2
225661_at	interferon (alpha, beta and omega) receptor 1	134	59	102	0.4	0.8
226218_at	Interleukin 7 receptor	10	489	6	48.8	0.6
226343_at	Dipeptidylpeptidase 8	732	354	309	0.5	0.4
226474_at	nucleotide-binding oligomerization domains 27	576	181	146	0.3	0.3
226878_at	major histocompatibility complex, class II, DO alpha	1925	1156	226	0.6	0.1
227354_at	phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1	181	63	184	0.4	1.0
227462_at	Leukocyte-derived arginine aminopeptidase	236	42	133	0.2	0.6
228620_at	Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator /// MRNA; cDNA DKFZp686G1498 (from clone DKFZp686G1498)	74	28	42	0.4	0.6
229111_at	Mannan-binding lectin serine protease 2	590	294	76	0.5	0.1
230128_at	Immunoglobulin lambda variable 3-21	989	119	64	0.1	0.1
230735_at	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	186	55	44	0.3	0.2
231124_x_at	Lymphocyte antigen 9	149	53	22	0.4	0.1
231418_at	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	1636	1285	210	0.8	0.1
232311_at	Beta-2-microglobulin	236	103	53	0.4	0.2
232431_at	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	1174	960	448	0.8	0.4
232614_at	B-cell CLL/lymphoma 2	302	665	117	2.2	0.4
235286_at	Chemokine-like factor super family 1	185	24	22	0.1	0.1
235478_at	DNA cross-link repair 1C (PSO2 homolog, S. cerevisiae)	334	51	20	0.2	0.1
235531_at	Interleukin 17 receptor B	26	14	15	0.6	0.6
236235_at	Itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase (mouse)	18	10	11	0.6	0.6
236293_at	Ras homolog gene family, member H	1830	271	152	0.2	0.1
236924_at	Glomulin, FKBP associated protein	144	82	91	0.6	0.6
237104_at	Cathepsin S	274	55	41	0.2	0.1
237625_s_at	Anti-HIV-1 gp120 V3 loop antibody DO142-10 light chain variable region	3142	1316	502	0.4	0.2
238735_at	Transcription factor 12 (HTF4, helix-loop-helix transcription factors 4)	78	23	48	0.3	0.6
239876_at	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	75	391	42	5.2	0.6
241435_at	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	810	326	191	0.4	0.2
241751_at	oral-facial-digital syndrome 1	67	15	18	0.2	0.3
241808_at	Interleukin 7	57	12	43	0.2	0.7
242903_at	Interferon gamma receptor 1	242	245	9	1.0	0.0
242946_at	CD53 antigen	875	491	46	0.6	0.1
242961_x_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	165	59	53	0.4	0.3
243559_at	Zinc finger protein 148 (pHZ-52)	36	20	15	0.5	0.4
243798_at	B-cell CLL/lymphoma 9-like	19	37	10	2.0	0.6
244023_at	Spleen tyrosine kinase	178	25	16	0.1	0.1
244172_at	B-cell linker	856	242	297	0.3	0.3
266_s_at	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	1226	119	143	0.1	0.1
31845_at	E74-like factor 4 (ets domain transcription factor)	203	79	82	0.4	0.4
38964_r_at	Wiskott-Aldrich syndrome (eczema-thrombocytopenia)	392	233	186	0.6	0.5
52940_at	single Ig IL-1R-related molecule	215	133	51	0.6	0.2