

AUS DEM INSTITUT FÜR KLINISCHE MOLEKULARBIOLOGIE UND TUMORGENETIK DER
GSF – FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT, MÜNCHEN

Vorstand: Prof. Dr. med. G. Bornkamm

**Analyse der Zielgene von Notch
bei der Regulation von Proliferation und Differenzierung
myeloischer Stamm- und Vorläuferzellen**

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

vorgelegt von
Nikolaus Peter Rieber

aus
Tübingen

2005

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. G. W. Bornkamm

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. Schmetzer

Prof. Dr. J. P. Johnson

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. T. Schroeder

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2005

Für Kathrin

INHALTSVERZEICHNIS

I ZUSAMMENFASSUNG	8
II EINLEITUNG	10
II.1 Hämatopoese	10
II.1.1 Zellen der Hämatopoese	10
II.1.2 Regulation der Hämatopoese	12
II.1.2.1 Hämatopoetische Wachstumsfaktoren	12
II.1.2.2 Transkriptionelle Kontrolle der Hämatopoese	13
II.2 Zelllinien als in vitro Modell hämatopoetischer Entwicklung	19
II.2.1 32D Zelllinien	19
II.2.2 FDCP-mix Zelllinien	20
II.3 Notch	20
II.3.1 Struktur	21
II.3.1.1 Domänen des Notch-Proteins	21
II.3.1.2 Reifungsmechanismen	22
II.3.2 Aktivierung und Signalübertragung	22
II.3.2.1 Liganden von Notch	22
II.3.2.2 Ligandenabhängige Aktivierung von Notch	22
II.3.2.3 Intrazelluläre Signalübertragung	24
II.3.2.3.1 CSL- bzw. RBP-J-abhängige Signalübertragung	24
II.3.2.3.2 CSL- bzw. RBP-J-unabhängige Signalübertragung	25
II.3.3 Biologische Funktion	25
II.3.3.1 Allgemein	25
II.3.3.2 Bedeutung von Notch in Säugetieren	26
II.3.3.3 Notch-assoziierte Krankheiten beim Menschen	27
II.3.3.4 Bedeutung von Notch für die Hämatopoese	29
II.3.3.4.1 Lymphatisches System	29
II.3.3.4.2 Myeloisches System und hämatopoetische Stammzellen	31
II.3.4 Zielgene von Notch in Säugetieren	33
II.4 Das Tamoxifen-induzierbare System: ein Konstrukt, um Notch1^{IC} konditionell aktivieren zu können	33
III FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	35

IV ERGEBNISSE	36
IV.1 FDCP-mix A7 Zellen können durch geeignete Mediumbedingungen in Erythrozyten bzw. Granulozyten und Makrophagen differenzieren	36
IV.1.1 Anhand von Zytospin-Präparaten können die Zellen während der Differenzierung morphologisch unterschieden und differentiell ausgezählt werden	36
IV.1.2 Auf RNA-Ebene zeigt sich während der Differenzierungskinetik die charakteristische Regulation von wichtigen mye-loischen Transkriptionsfaktoren, Zytokinrezeptoren sowie differenzierungsabhängigen Funktionsproteinen	39
IV.2 Effekte von aktiviertem Notch1^{IC} auf die RNA-Expression wichtiger myeloischer Transkriptionsfaktoren, Zytokinrezeptoren, sowie differenzierungsabhängiger Funktionsproteine	41
IV.2.1 Effekte von aktiviertem Notch1 ^{IC} auf die Expression der myeloischen Transkriptionsfaktoren PU.1, C/EBP α und GATA-1	42
IV.2.1.1 Aktiviertes Notch1 ^{IC} induziert PU.1 Expression in 32D Zellen	42
IV.2.1.2 Aktiviertes Notch1 ^{IC} induziert PU.1 Expression in FDCP-mix Zellen	43
IV.2.1.3 PU.1 ist ein direktes Notch-Zielgen	45
IV.2.1.4 Aktiviertes Notch1 ^{IC} zeigt keinen Effekt auf C/EBP α Expression	47
IV.2.1.5 Aktiviertes Notch1 ^{IC} zeigt keinen Effekt auf GATA-1 Expression	48
IV.2.2 Effekte von aktiviertem Notch1 ^{IC} auf die Expression der Zytokinrezeptoren M-CSF-Rezeptor, G-CSF-Rezeptor und Erythropoetin-Rezeptor	48
IV.2.2.1 Aktiviertes Notch1 ^{IC} induziert M-CSF-Rezeptor Expression	48
IV.2.2.2 Der M-CSF-Rezeptor ist ein indirektes Notch-Zielgen	50
IV.2.2.3 Effekte von aktiviertem Notch1 ^{IC} auf die Expression des G-CSF-Rezeptors	50
IV.2.2.4 Effekte von aktiviertem Notch1 ^{IC} auf die Expression des Erythropoetin-Rezeptors	50
IV.2.3 Effekte von aktiviertem Notch1 ^{IC} auf die RNA-Expression der differenzierungsabhängigen Proteine Myeloperoxidase und β -Globin	51
IV.2.3.1 Aktivierung von Notch1 ^{IC} führt nach 12h zu einer Verringerung der Myeloperoxidase mRNA	51
IV.2.3.2 Aktivierung von Notch1 ^{IC} führt zu einer leichten Erhöhung der β -Globin Expression	52
IV.3 Notch Zielgene aus der Analyse von Atlas cDNA Filtern	54
IV.3.1 Versuchsprinzip	54
IV.3.2 Auswertung der Atlas cDNA Filter	56
V DISKUSSION	68
VI MATERIALIEN UND METHODEN	79
VI.1 Molekularbiologische Methoden	79
VI.1.1 Puffer und Lösungen	79

Inhaltsverzeichnis	7
<hr/>	
VI.1.2 Allgemeine Methoden	79
VI.1.2.1 Präparation von Plasmid DNA	79
VI.1.2.2 Enzymatischer Verdau	80
VI.1.2.3 Extraktion von Fragmenten aus TAE-Agarose-Gelen	80
VI.1.3 Nachweis spezifischer RNA Expression	80
VI.1.3.1 RNA-Isolierung	80
VI.1.3.2 Northern Blot	80
VI.1.3.3 Hybridisierung mit spezifischen Sonden	81
VI.1.3.4 Quantifizierung von Genexpressionsstärken	81
VI.1.3.5 Atlas cDNA-Filter	82
VI.2 Zellkulturmethoden	82
VI.2.1 Bestimmung von Zelldichten	82
VI.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	82
VI.2.3 Kontrolle auf Kontamination mit Mycoplasmen	83
VI.2.4 Herstellung und Färbung von Zytospinpräparaten	83
VI.2.5 FDCP-mix Zellkultur	83
VI.2.6 32D Zellkultur	84
VII LITERATURVERZEICHNIS	85
DANKSAGUNG	99
LEBENS LAUF	100

I ZUSAMMENFASSUNG

Zelllinienentscheidungen in der Hämatopoese werden eingeleitet und sind abhängig von der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Es ist allerdings bisher nicht geklärt, ob die initiale Aktivierung früher hämatopoetischer Transkriptionsfaktoren durch bisher unbekannte extrinsische Signale oder durch ein zellinternes autonomes Programm erfolgt.

Notch Rezeptoren sind evolutionär hoch konservierte Transmembranrezeptoren, die an der Regulation von Zelllinienentscheidungen, Differenzierung und Proliferation in verschiedenen embryonalen und adulten Geweben beteiligt sind. Die Expression von Notch Rezeptoren auf hämatopoetischen Zellen und der dazugehörigen Liganden wie Jagged1 auf Knochenmarksstromazellen deutet auf eine Bedeutung von Notch in der Regulation der Hämatopoese. Vor Kurzem konnte die Induktion der myeloischen Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen durch Notch nachgewiesen werden. Die molekularen Mechanismen dieses Prozesses sind dabei noch völlig unklar. Darin Einblick zu gewinnen wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit durch die Suche nach Zielgenen von Notch in der Myelopoese versucht.

Dazu wurden die multipotente myeloische Stammzelllinie FDCP-mix und die granulozytäre Vorläuferzelllinie 32D mit einem durch Tamoxifen aktivierbarem Notch als Zellsysteme gewählt. In dieser Arbeit durchgeführte zytokingesteuerte Differenzierungskinetiken konnten bestätigen, dass die verwendeten FDCP-mix Zellen während ihrer Differenzierung in reife Granulozyten, Makrophagen und Erythrozyten auf RNA-Ebene charakteristische Regulationen von wichtigen myeloischen Transkriptionsfaktoren, Zytokinrezeptoren sowie differenzierungsabhängigen Funktionsproteinen durchlaufen. Sie stellen somit ein optimales Zellsystem zur Analyse von Notch-Zielgenen in der Myelopoese dar.

Mit dem Tamoxifen-induzierbaren System der Notchaktivierung wurden zuerst bekannte, zentrale Regulationsfaktoren der Myelopoese auf eine Induktion durch Notch im Northern Blot untersucht. Dabei stellte sich als entscheidendes Ergebnis sowohl in 32D als auch FDCP-mix Zellen die direkte, spezifische Induktion des frühen myeloischen Transkriptionsfaktors PU.1 heraus, von dem bekannt ist, dass er myeloische Differenzierung initiiert. Außerdem kam es zu einer indirekten Hochregulation des M-CSF-Rezeptors, der als wichtiges Zielgen von PU.1 bekannt ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein extrinsisches Signal, im Organismus durch den Jagged / Notch Signalweg vermittelt, zu einer Aktivierung eines frühen hämatopoetischen Transkriptionsfaktors führt, welcher Zelllinienentscheidungen in der Hä-

matopoese bestimmt. In Zusammenschau mit den biologischen Wirkungen von Notch in der Hämatopoese weist dies darauf hin, dass extrinsische Mechanismen eine wichtige Rolle in der Regulation der Hämatopoese spielen dürften.

Durch ein neu zu etablierendes cDNA-Filter Screening-Verfahren konnten dann als weitere wichtige Zielgene von Notch in der Hämatopoese u.a. der *Interferon Regulatory Factor-1* (IRF-1), der Interleukin1-Rezeptor-Antagonist (IL1RA), der Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 (TNFR2), sowie c-myc und myb identifiziert werden.

II EINLEITUNG

II.1 Hämatopoese

Die Hämatopoese dient der Aufrechterhaltung der Funktionen des Blut- und Immunsystems. Das Blut übernimmt vielfältige Aufgaben für den Transport von Atemgasen, Energie-, Abfall- und Signalstoffen im Körper. Das Immunsystem dient der Abwehr von in den Körper eingedrungenen Fremdkörpern und Krankheitserregern, der Bekämpfung körpereigener maligner Zellen, sowie dem Abbau von totem Gewebe.

Der Ort der Hämatopoese ist beim gesunden, erwachsenen Menschen das Knochenmark, in dem aus wenigen pluripotenten Stammzellen alle Zellen des Blut- und Immunsystems hervorgehen. Jeden Tag sterben etwa 4×10^{10} Blutzellen (Cronkite, 1976), die in gleicher Zahl und Spezifität nachgebildet werden müssen. Dieser Vorgang muss streng reguliert vor sich gehen, da es ansonsten zu schwerwiegenden Erkrankungen wie Anämien, Immundefekten oder Leukämien kommen kann.

II.1.1 Zellen der Hämatopoese

Alle Blutzellen entstehen durch Proliferation und Differenzierung aus pluripotenten Stammzellen, die sowohl die Fähigkeit zur Selbsterneuerung als auch zur Differenzierung in alle Linien des hämatopoetischen Systems besitzen (Abb. 1). Eine konstante Zahl an Blutzellstammzellen wird dabei nach derzeitiger Modellvorstellung durch den Prozess der asymmetrischen Teilung garantiert, bei dem bei jeder Teilung einer Stammzelle zwei ungleiche Tochterzellen entstehen. Eine Tochterzelle bleibt dabei identisch zur Mutterzelle, während die andere proliferiert und differenziert. Multipotente Vorläuferzellen haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung bereits verloren, können aber noch in mehr als eine Richtung differenzieren. Reifere Vorläuferzellen sind hingegen schon auf eine bestimmte Zelllinie determiniert. Allgemein nimmt mit zunehmender Differenzierung die Fähigkeit zur Proliferation ab. Während sich Stammzellen unbegrenzt teilen können, haben ausdifferenzierte Zellen die Möglichkeit zur Proliferation verloren. Damit wird gewährleistet, dass die absterbende Zahl an reifen Blutzellen aus wenigen Stammzellen ständig nachgebildet werden kann, ohne dass sich zu viele reife Formen durch unkontrollierte Proliferation im peripheren Blut und Immunsystem anreichern können.

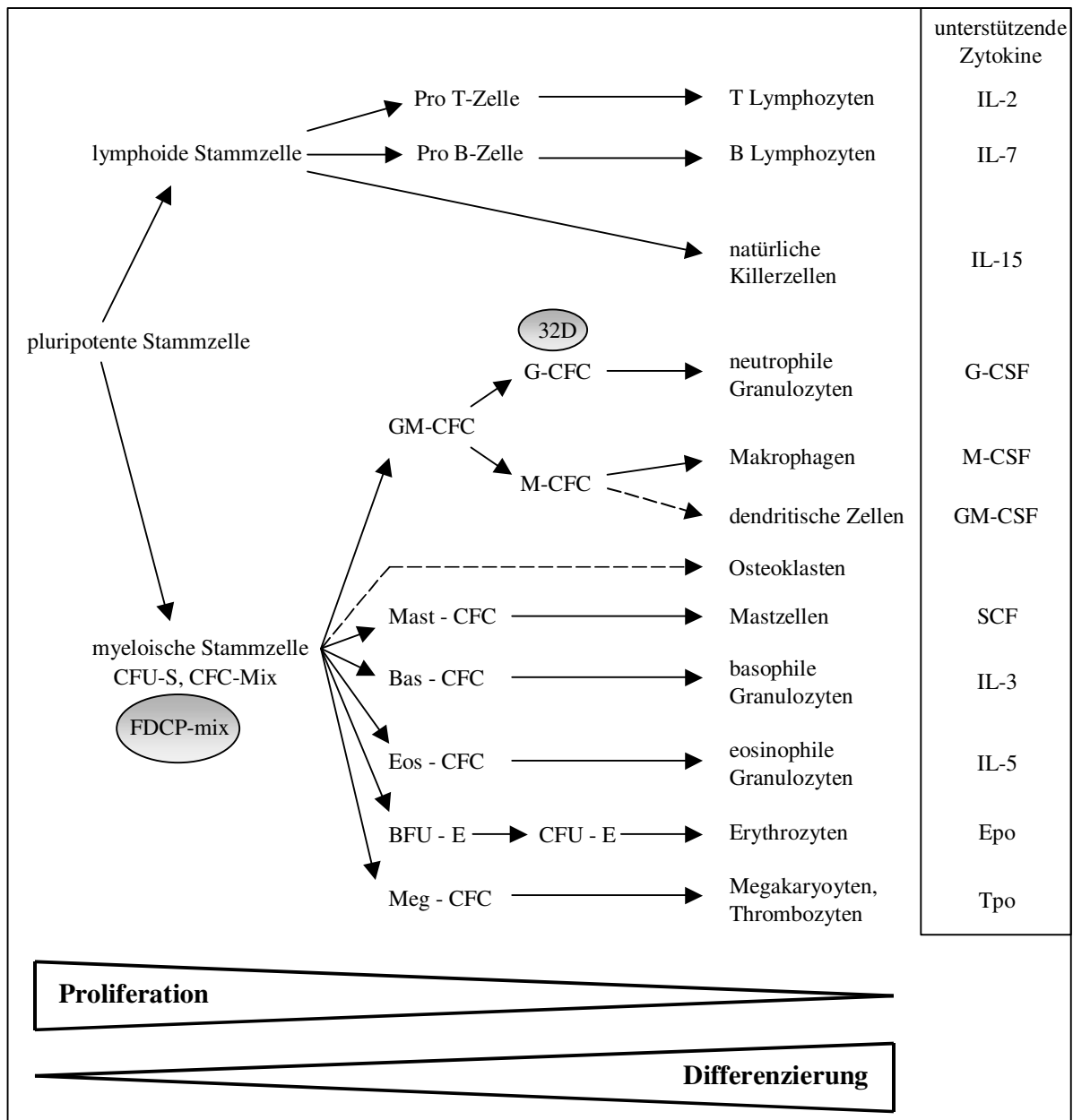


Abbildung 1: Das hämatopoetische System (Abb. nach Schroeder, 2001)

Gezeigt sind die wichtigsten Stufen der adulten Hämatopoese (Dexter und Spooncer, 1987; Kondo et al., 1997). Bei gestrichelten Pfeilen werden zusätzliche Differenzierungswege diskutiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien FDCP-mix und 32D sind entsprechend ihrem Differenzierungspotential in dieses Schema eingeordnet. Ausgewählte Zytokine, die die jeweilige Differenzierungsrichtung unterstützen, sind angegeben. Die Möglichkeit der Proliferation nimmt mit steigender Differenzierung ab.

CFU-S: Milzkolonie bildende Zelle; **CFC-mix:** große Kolonie bildende Zelle mit gemischtem Potenzial; **BFU:** "burst forming unit", große kompakte Kolonie bildende Zelle; **CFC:** Kolonie bildende Zelle; **G:** neutrophile Granulozyten; **M:** Makrophagen; **Bas:** basophile Granulozyten; **Eos:** eosinophile Granulozyten; **E:** Erythrozyten; **Meg:** Megakaryozyten;

Für den kontrollierten Ablauf dieser Vorgänge ist die Umgebung des Knochenmarks von entscheidender Bedeutung, da hier die notwendigen Signale für Selbsterneuerung, Differenzierung, Proliferation und Apoptose bereitgestellt werden. Zu den Blutzellen der unterschiedlichsten Differenzierungsstufen enthält das Knochenmark neben Fettzellen auch Endothel- und Stromazellen, die in engem Kontakt mit den Blutzellen stehen und für die Steuerung der Hämatopoese essentiell sind (Dexter et al., 1984; Dexter et al., 1990). Stromazellen können das Wachstum von Stamm- und Vorläuferzellen stimulieren oder inhibieren. Dies erreichen sie zum Teil über die Synthese verschiedenster hämatopoetischer Wachstumsfaktoren. Außerdem synthetisieren sie die Moleküle der Extrazellulärmatrix, wie Glykoproteine und Proteoglykane. Diese können die Wachstumsfaktoren binden und sie den hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen somit lokal begrenzt präsentieren (Dexter et al., 1990).

Bisher ist es nicht möglich, die Wirkung von Stromazellen auf frühe Blutzellen durch definierte Faktorbedingungen nachzustellen (zusammengefasst in von Kalle et al., 1998; Brugger et al., 2000). Dies deutet darauf hin, dass neben sezernierten Faktoren auch direkte Zell-Zell-Kontakte zwischen Knochenmarksstromazellen und hämatopoetischen Zellen notwendig sind. Hierbei dürften u.a. die auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen vorhandenen Notch-Rezeptoren und ihre membranständigen Liganden, die von Knochenmarksstromazellen exprimiert werden, einen entscheidenden Beitrag leisten.

II.1.2 Regulation der Hämatopoese

II.1.2.1 Hämatopoetische Wachstumsfaktoren

In den letzten zwei Jahrzehnten konnte eine Vielzahl an extrazellulären Wachstumsfaktoren (Zytokine) identifiziert werden, die eine wichtige Rolle in der Regulation der Hämatopoese einnehmen (Abb. 1) (zusammengefasst in Greenberger, 2000). Sie wirken sowohl stimulierend als auch inhibierend auf Vorgänge der Differenzierung, Proliferation und Apoptose ein. Einige davon, wie der Stammzellfaktor, Interleukin 3, GM-CSF, wirken dabei auf mehrere Zellreihen, während andere, spätere Faktoren wie Erythropoetin, Thrombopoetin, M-CSF oder G-CSF ihren Einfluss nur noch auf einzelne Zellreihen ausüben können.

Es ist bislang allerdings noch nicht geklärt, ob Wachstumsfaktoren auch aktiv in Zellenentscheidungen der Stamm- und Vorläuferzellen eingreifen können. Zwei gegensätzliche Modelle wurden dazu postuliert: das stochastische (intrinsische) Modell und das induktive (extrinsische) Modell der Hämatopoese.

Das zuerst von Till et al. beschriebene stochastische Modell (Till et al., 1964) geht davon aus, dass die Festlegung einer multipotenten Vorläuferzelle auf eine bestimmte Linie auf einem stochastischen Prozess beruht. Die darauffolgende Differenzierung in eine bestimmte Zelle folgt einem vorbestimmten Programm. Wachstumsfaktoren werden nur gebraucht, um das Überleben und die Proliferation der festgelegten Vorläuferzelle zu ermöglichen. Das induktive Modell (zusammengefasst in Metcalf, 1998) geht dagegen davon aus, dass die Wachstumsfaktoren einen direkten Einfluss auf die Differenzierung der Zellen haben, so dass die Linienentscheidung einer Zelle davon abhängt, welcher Wachstumsfaktor auf sie einwirkt. Ein weiteres Modell, als Hybridmodell bezeichnet, enthält sowohl Aspekte des stochastischen als auch des induktiven Modells (Just et al., 1991). Es geht davon aus, dass jede Zelle über ein spezifisches offenes Genprogramm verfügt. Das bedeutet, dass in einer Zelle nur diejenigen Gene induziert werden können, die bereits in einer offenen Chromatinstruktur vorliegen. Welches dieser verfügbaren Gene dann exprimiert wird, wird durch äußere Einflüsse wie z.B. Zytokinsignale bestimmt.

Sehr interessant sind in der laufenden Diskussion Ergebnisse aus Versuchen, bei denen Zytokinrezeptoren in Vorläuferzellen durch genetische Manipulation eingebracht wurden (Goldsmith et al., 1998). Wurde z.B. der G-CSF-Rezeptor in erythroiden Vorläuferzellen zur Expression gebracht, so war ihr Überleben, aber auch ihre Differenzierung in Erythrozyten nicht mehr von Erythropoetin abhängig, sondern konnte genauso mit G-CSF erreicht werden. Entsprechende Ergebnisse konnten durch Einbringen des Somatotropin-Rezeptors und des Thrombopoetin-Rezeptors erzielt werden. Die linienspezifische Wirkung der Zytokine wird also offensichtlich durch die linienspezifische Expression der entsprechenden Rezeptoren vermittelt. Somit scheint die Aufgabe zumindest der späten Faktoren vor allem darin zu bestehen, selektiv das Überleben einer bestimmten Zellreihe entsprechend der physiologischen Bedürfnisse des Organismus zu sichern.

II.1.2.2 Transkriptionelle Kontrolle der Hämatopoese

Die Zellen der Hämatopoese unterscheiden sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Proteinexpression. Verantwortlich dafür ist letztlich ein unterschiedliches Transkriptionsprogramm, dass externe Signale und endogene Einflüsse integriert und durch Transkriptionsfaktoren gesteuert wird (zusammengefasst in Barreda und Belosevic, 2001). Transkriptionsfaktoren können dabei sowohl verstärkend als auch vermindernd auf die Genexpression wirken. Ihre Bindungsaffinität an DNA-Sequenzen, ihre relative Konzentration in der Zelle und das Vorhandensein von Kofaktoren sind dabei entscheidend für die Genaktivierung. In ihrer dreidimen-

sionalen Struktur zeichnen sie sich vor allem durch Zinkfinger-, Helix-Turn-Helix-, Helix-Loop-Helix- und Leuzin-Zipper-Motive aus.

Transkriptionsfaktoren sind für die Regulation der Hämatopoese essentiell. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Expression linienspezifischer Gene durch das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren reguliert wird, die zu den bestimmten Stadien der Differenzierung in hämatopoetischen Zellen präsent sind. Daher kann die Linienzugehörigkeit und das Stadium der Differenzierung einer hämatopoetischen Zelle durch das Muster der in ihr vorhandenen Transkriptionsfaktoren charakterisiert werden.

Transkriptionsfaktoren scheinen im Vergleich zu Zytokinen und ihren Rezeptoren allein ein breiteres Spektrum an Regulationsmöglichkeiten zu besitzen. Dies zeigen Versuche von Anderson und Kollegen (Anderson et al., 1998; Anderson et al., 1999), bei denen sie den myeloischen Transkriptionsfaktor PU.1 sowie den G-CSF-Rezeptor und M-CSF-Rezeptor in eine myeloische Vorläuferzelllinie einbrachten, die für PU.1 defizient war und weder den G-CSF-Rezeptor noch den M-CSF-Rezeptor besaß, aber unter IL-3 überleben konnte. Die Einführung des G-CSF-Rezeptors führte zu verstärkter Proliferation und Überleben dieser Zellen bei Zugabe von G-CSF. Jedoch war weder eine Änderung der Oberflächenmarker oder der Genexpression, noch funktionelle Zeichen der Differenzierung in reife neutrophile Granulozyten feststellbar. Entsprechend zeigte auch die Einführung des M-CSF-Rezeptors nur ein verstärktes Überleben und Wachstum bei M-CSF Gabe, jedoch keine verstärkte Differenzierung in die monozytäre Richtung. Im Gegensatz dazu führte die Wiederherstellung der PU.1 Expression in dieser Zellreihe zur Expression sowohl des G-CSF-Rezeptors und M-CSF-Rezeptors, als auch zur Expression einer Reihe von anderen Proteinen, die mit der myeloischen Differenzierung in Verbindung gebracht werden. Unter G-CSF Bedingungen entwickelten sich nun reife Granulozyten, unter M-CSF Bedingungen reife Makrophagen. Der Transkriptionsfaktor PU.1 übernimmt also zusätzliche Aufgaben im Rahmen der hämatopoetischen Differenzierung, die über die alleinige Wirkung der individuellen Zytokine und ihrer Rezeptoren hinausgehen.

Im Folgenden werden die Charakteristika von drei Hauptvertretern der hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren, PU.1, C/EBP α , und GATA-1, beschrieben. Ihre postulierte Wirkung auf die hämatopoetische Differenzierung soll durch ein stark vereinfachtes Modell (Tenen et al., 1997) dargestellt werden (Abb. 2).

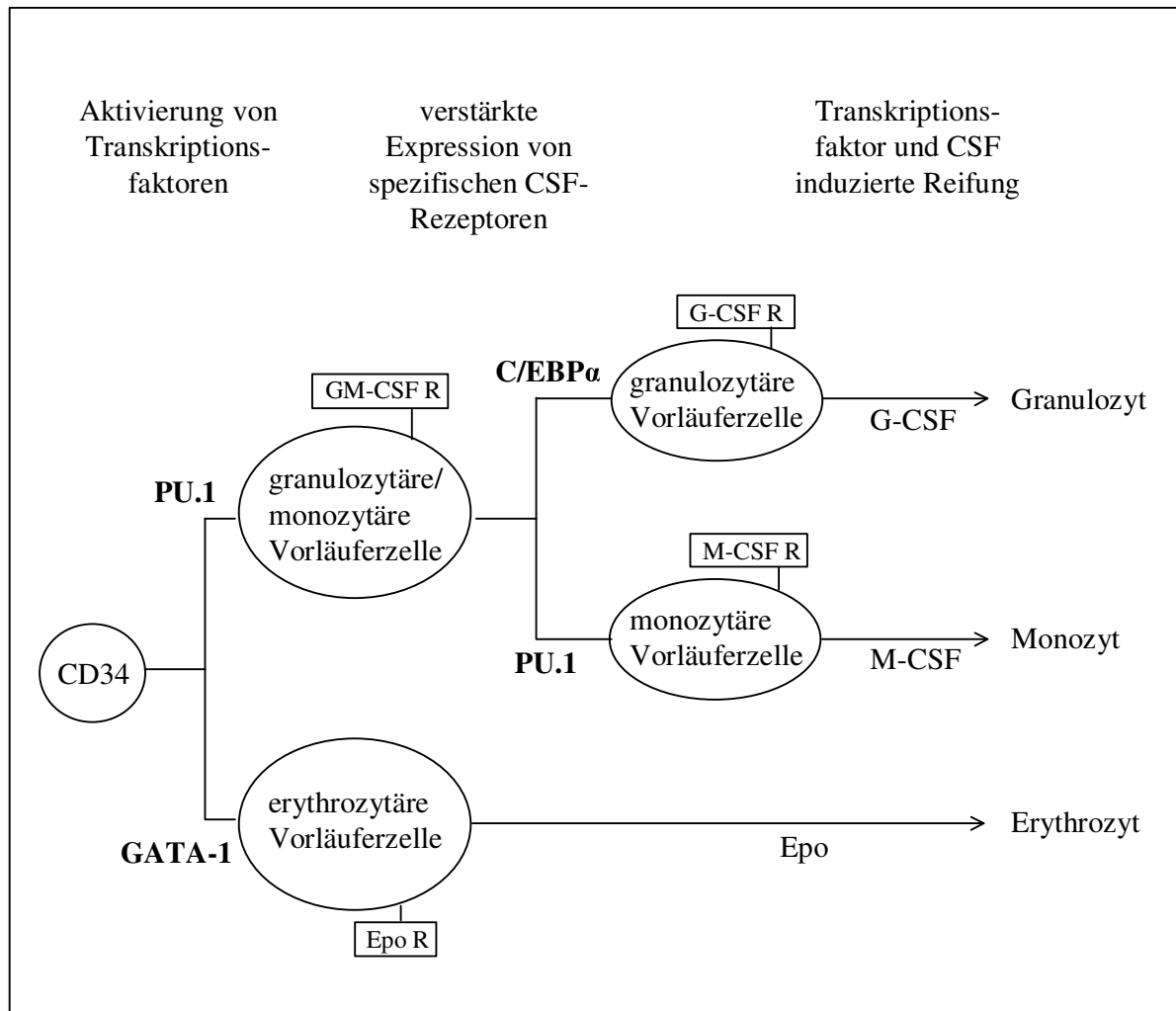


Abbildung 2: Modell zur Wirkung von Transkriptionsfaktoren in der hämatopoetischen Differenzierung (Tenen et al., 1997)

In diesem Modell sind in einer CD 34⁺ hämatopoetischen Stammzelle sowohl Transkriptionsfaktoren als auch spezifische Wachstumsfaktor-Rezeptoren nur gering exprimiert. Durch bisher noch nicht identifizierte Signale, z.B. durch Interaktionen mit Stromazellen, werden spezifische Transkriptionsfaktoren wie GATA-1 oder PU.1 hochreguliert. Dies führt wiederum zur gesteigerten Expression spezifischer Wachstumsfaktor-Rezeptoren und damit zur Proliferation, Differenzierung und Unterdrückung der Apoptose von bestimmten Linien. Die Suppression bestimmter Transkriptionsfaktoren (wie z.B. GATA-1 während der granulözytär-monozytären Differenzierung) dürfte zusätzlich eine wichtige Rolle spielen.

PU.1

PU.1 (früher Spi-1) ist entscheidend an der Erzeugung funktionsfähiger Zellen sowohl aus dem myeloischen System (Makrophagen, Dendritische Zellen und Neutrophile) als auch aus dem lymphatischen System (B- und T-Lymphozyten) beteiligt (Singh et al., 1999; Guerriero et al., 2000). Identifiziert wurde dieser Transkriptionsfaktor durch seine Überexpression in

Friend-Virus-induzierter-Erythroleukämie (Moreau-Gachelin et al., 1988). Bei dieser Art der Leukämie kommt es zur Insertion eines Retrovirus, des „spleen focus forming virus“ (SFFV) in das zelluläre Genom in der Nähe des Genlocus für PU.1 bzw. Spi-1 (für SFFV proviral integration). Wahrscheinlich durch Enhancer in den retroviralen „long terminal repeats“ (LTR) kommt es zur Hochregulation von PU.1 mRNA Expression. Dies dürfte für den Block der Differenzierung auf Höhe der Erythroblasten verantwortlich sein, der für die Friend Virus Erythroleukämie typisch ist (Schuetze et al., 1992). PU.1 kann damit als Protoonkogen bezeichnet werden. Es wird zur Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren gezählt, deren Mitglieder charakteristische Sequenzen im Bereich der DNA-Bindungsdomäne aufweisen (Macleod et al., 1992). PU.1 zeigt ein spezifisches Muster der Expression in der Hämatopoese. Es wird in Granulozyten, Monozyten und in B-Zellen exprimiert, aber nicht in reifen T-Zellen. Zu Beginn der hämatopoetischen Differenzierung ist die PU.1 mRNA bereits in multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert und wird spezifisch mit der myeloischen Differenzierung auf etwa das 3fache hochreguliert (Cross et al., 1994). Mäuseembryonen mit einer gentechnisch erzeugten homozygoten Mutation in der DNA-Bindungsdomäne von PU.1 sterben zu einem späten Gestationszeitpunkt. Diese Embryonen produzieren normale Mengen an Megakaryozyten und erythroiden Vorläuferzellen, wobei einige eine Beeinträchtigung der Erythroblasten-Reifung zeigen. Es kam immer zu einem Defekt in der Bildung von Vorläuferzellen für B- und T-Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten (Scott et al., 1994). Dabei sind die Effekte des Funktionsverlusts für B-Zellen und Makrophagen schwerwiegender als für T-Zellen und Neutrophile (DeKoter et al., 1998).

Die Frage, welche Differenzierungsrichtung PU.1 induziert, ist nach neuen Erkenntnissen auch eine Frage der zellulären Konzentration an PU.1-Protein. Eine niedrige Konzentration in hämatopoetischen Vorläuferzellen induziert eine B-Zelldifferenzierung, wohingegen eine hohe Konzentration Makrophagendifferenzierung induziert und B-Zelldifferenzierung blockt (DeKoter und Singh, 2000). In multipotenten myeloischen Stammzellen führte die Überexpression von PU.1 unter Bedingungen, die normalerweise nur Selbsterneuerung erlauben, zu einer verringerten Selbsterneuerungskapazität und einer Festlegung auf eine Makrophagen- und Granulozyten-Differenzierung (McIvor et al., 2003).

Zu den wichtigsten Zielgenen des Transkriptionsfaktors PU.1 zählen die Gene für den M-CSF-Rezeptor (Zhang, 1994), GM-CSF-Rezeptor (Hohaus et al., 1995), G-CSF-Rezeptor (Smith et al., 1996) und Mac-1 (CD11b) (Pahl et al., 1993) für die myeloische Differenzierung und das Gen für den IL-7-Rezeptor (DeKoter und Singh, 2000) für die B-lymphoide Differenzierung. Für die PU.1-Expression selbst ist bisher nur eine positive Autoregulation

(Chen et al., 1995) und in granulozytären Vorläuferzellen und B-lymphoiden Zellen eine Hochregulation durch C/EBP α bekannt (Wang et al., 1999).

C/EBP α

C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein) gehört zur Gruppe der Leuzin-Zipper Transkriptionsfaktoren (Landschulz et al., 1989). Aufmerksamkeit erfuhr er als erstes als ein Regulator von verschiedenen hepatozytären und adipozytären Genen. C/EBP α wird in diesen Zellen während der Differenzierung hochreguliert und Expression von C/EBP α induziert Differenzierung (Lin und Lane, 1994). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass C/EBP α generell Zellproliferation unterbinden kann und somit einen Tumorsuppressor darstellt (zusammengefasst in Tenen, 1997). Im hämatopoetischen System ist seine Expression auf monozytäre und granulozytäre Linien beschränkt. Sie ist am Höchsten zu Beginn der Differenzierung und wird im weiteren Verlauf in monozytären Linien frühzeitig herunterreguliert, wohingegen sie in der granulozytären Differenzierung länger bestehen bleibt. Gezielte Ausschaltung des C/EBP α -Gens in Mäusen konnte zeigen, dass ohne C/EBP α keine reifen Granulozyten generiert werden können, die Produktion von Monozyten und Makrophagen aber unbeeinflusst bleibt. Die Ausschaltung von C/EBP α führte u.a. zu einer starken Repression des G-CSF-Rezeptors, so dass die Zellen auf G-CSF Signale nicht mehr ansprechen (Zhang et al., 1997). Diese Versuche zeigen eine Bedeutung des C/EBP α -Signalweges für die granulozytäre, nicht aber für die monozytäre Differenzierung.

GATA-1

GATA-1 ist ein Zink-Finger Transkriptionsfaktor, der an das DNA-Motiv G-A-T-A bindet, welches in der Promotorregion verschiedener erythroider Gene vorkommt. GATA-1 wird innerhalb des Blutsystems in erythroiden, megakaryozytären und eosinophilen Linien, in Mastzelllinien sowie in multipotenten Vorläuferzellen exprimiert und ist ein bedeutender Transkriptionsfaktor verschiedener erythroider Gene (zusammengefasst in Shivdasani und Orkin, 1996). Eine Überexpression in multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen führt zu einem Block der monozytären und granulozytären Differenzierung und induziert erythroide, megakaryozytäre und eosinophile Eigenschaften. Ein gezieltes Ausschalten des GATA-1 Gens führt zu einem Block der erythroiden Differenzierung auf der Stufe der Proerythroblasten mit nachfolgender Apoptose dieser Zellen, wohingegen alle anderen Blutzelllinien weiter gebildet werden können (Pevny et al., 1991; Pevny et al., 1995; Weiss und Orkin, 1995). GATA-1 Expression scheint daher für das Überleben und die terminale Differenzierung von erythroiden Vorläufern unerlässlich zu sein.

Neben den bereits genannten wurde die Bedeutung verschiedener anderer Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese beschrieben (zusammengefasst in Shivdasani und Orkin, 1996; Tenen et al., 1997; Friedman, 2002), darunter Pax5, C/EBP β , GATA-2, AML1, SCL/TAL-1, verschiedene Homeobox-Gene, c-myb und c-myc, welche hier aber nicht näher besprochen werden sollen.

Interaktionen zwischen hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren

Neue Erkenntnisse weisen darauf hin, dass linienspezifische Transkriptionsfaktoren nicht nur das genetische Programm ihrer eigenen Linie aktivieren, sondern auch die jeweiligen spezifischen Transkriptionsfaktoren anderer Linien unterdrücken. GATA-1 blockiert PU.1 dadurch, dass es dessen Interaktion mit seinem essentiellen Co-Aktivator c-Jun verhindert (Zhang et al., 1999). PU.1 seinerseits blockiert die GATA-1 Funktion dadurch, dass es dessen Bindung an die DNA verhindert (Zhang et al., 2000a). Diese Interaktionen führten zu folgender Modellvorstellung der hämatopoetischen Differenzierung (Cantor und Orkin, 2001). In einer hämatopoetischen Vorläuferzelle blockieren sich schwach exprimierte linienspezifische Transkriptionsfaktoren zweier entgegenstehender Linien gegenseitig und halten sich dabei in etwa die Waage, so dass das genetische Programm keiner der beiden Linien abgerufen wird und die Zelle in einem undifferenzierten Zustand verbleibt. Wird ein Faktor aber, entweder durch einen stochastischen Prozess (endogenes Modell, siehe oben) oder aber durch noch nicht näher beschriebene Einflüsse der Umgebung (exogenes Modell, siehe oben), auf einmal vermehrt exprimiert oder durch Proteininteraktionen in seiner Wirkung verstärkt, so kann er seine Zielgene aktivieren und die Differenzierung in seiner Richtung vorantreiben, während er das genetische Programm der anderen Linie weiter blockiert. Hierbei ist auch von Bedeutung, dass sich Transkriptionsfaktoren in ihrer Expression häufig autoregulativ verstärken können.

Mit diesem Modell kann auch die Plastizität hämatopoetischer Zellen erklärt werden. Bis vor Kurzem war man der Auffassung, dass eine Zelle, wenn erst einmal auf eine bestimmte Linie festgelegt, nicht mehr zu entdifferenzieren sei. Folgt man nun aber obigem Modell, so würde man durch Überexpression eines entgegenstehenden Transkriptionsfaktors in einer schon auf eine andere Linie festgelegten Zelle deren zelllinienspezifisches genetisches Programm blockieren und so wieder einen multipotenten Status der Zelle erreichen. Überexprimiert man dann den entgegenstehenden Transkriptionsfaktor noch weiter, würde man nach der Entdifferenzierung sogar die Differenzierung in eine neue Zelllinie erreichen. Tatsächlich konnten Wissenschaftler zeigen, dass sie durch Überexpression von GATA-1 in einer myelo-

monozytären Zelllinie vom Affen eine Neuprogrammierung in Eosinophile, Thromboplasten und Erythroblasten erreichten (Kulesa et al., 1995).

II.2 Zelllinien als in vitro Modell hämatopoetischer Entwicklung

Die Untersuchung von primären Blutzellen ist prinzipiell sicherlich die aussagekräftigste Methode, um Mechanismen der Hämatopoese zu erforschen. Leider gibt es jedoch verschiedene Einschränkungen bei der Verwendung von primären Blutzellen. Zum einen ist es sehr schwierig und zum Teil unmöglich, genug primäre Zellen als Ausgangsmaterial für bestimmte molekularbiologische Versuche zu gewinnen. Außerdem haben Blutzellen eine sehr begrenzte Lebensdauer, die die Herstellung stabiler transgener Linien praktisch unmöglich macht. Ein weiterer Punkt, der vor allem Blutstammzellen und multipotente Vorläuferzellen betrifft, ist die rasche Spontandifferenzierung. Es ist derzeit noch nicht möglich, Blutstammzellen an der Differenzierung zu hindern und sie über einen längeren Zeitraum undifferenziert in Kultur zu halten. Aus dieser Problematik ergibt sich die Notwendigkeit zur Verwendung von hämatopoetischen Zelllinien, welche in vitro unbegrenzt vermehrt werden können. Man muss sich dabei aber immer im Klaren sein, dass es sich um ein Modell handelt, und dass die Aussagekraft eines Experiments stark von der jeweils verwendeten Zelllinie abhängt.

II.2.1 32D Zelllinien

32D Zellen sind häufig verwendete granulozytäre Vorläuferzellen, welche aus murinen Knochenmarkslangzeitkulturen isoliert wurden (Greenberger et al., 1983). Man kann sie in vitro unbegrenzt in Kultur halten und genetisch manipulieren. Ihre Differenzierung in neutrophile Granulozyten kann durch geeignete Mediumbedingungen induziert werden (Valtieri et al., 1987). 32D Zellen sind nicht leukämogen und daher besser geeignet als viele andere Zelllinien leukämischen Ursprungs. Allerdings sind die Aussagemöglichkeiten dieses Zellsystems begrenzt durch das eingeschränkte Differenzierungspotential, das fehlende Ansprechen auf die meisten hämatopoetischen Zytokine und eine hohe Rate an Spontanmutationen der 32D Zellen.

II.2.2 FDCP-mix Zelllinien

FDCP-mix (factor dependent cell from Paterson Institute with mixed differentiation potential) Zellen sind faktorabhängige, multipotente myeloische Stammzellen, die durch retrovirale Insertionsmutagenese aus Knochenmarkslangzeitkulturen etabliert wurden (Spooncer et al., 1984; Spooncer et al., 1986; Just et al., 2000). Sie können in vitro unbegrenzt in undifferenziertem Zustand gehalten werden, und zwar sowohl in einer Suspensionskultur in Gegenwart von IL-3, als auch ohne Zugabe eines Faktors in Kokultur mit bestimmten Stromazelllinien oder primären Stromazellen aus dem Knochenmark. Durch geeignete Mediumbedingungen können die Zellen in Makrophagen, eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten, Mastzellen, Osteoklasten und dendritische Zellen differenzieren (Abb. 1) (Spooncer et al., 1986; Just et al., 1991; Hagenaars et al., 1991; Ford et al., 1992; Schroeder et al., 2000; Schroeder, 2001). Die Differenzierung kann dabei gerichtet und synchronisiert induziert werden.

Transgene Linien können über Transfektion (Schroeder und Just, 2000b) oder Infektion (Just et al., 1991) hergestellt werden. FDCP-mix Zellen haben einen normalen Karyotyp und sind nach Injektion in Mäuse nicht leukämogen (Spooncer et al., 1984; Just et al., 1994). Es ist möglich, mit FDCP-mix Zellen das Blutsystem bestrahlter Mäuse kurzfristig zu rekonstituieren (Spooncer et al., 1984). Daraus folgt, dass in vivo die Kontrolle von Selbsterneuerung und Differenzierung völlig normal ist. In vitro weisen FDCP-mix Zellen eine erhöhte Selbsterneuerungskapazität auf, entsprechen aber in den übrigen biologischen Eigenschaften im Gegensatz zu den meisten anderen hämatopoetischen Zelllinien weitgehend primären Zellen. Somit stellen FDCP-mix Zellen eines der Zellsysteme dar, die der normalen Hämatopoese am nächsten kommen. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche mit FDCP-mix Zellen wurde der Klon A7 (Spooncer et al., 1984; Spooncer et al., 1986) verwendet.

II.3 Notch

Notch ist ein in der Evolution stark konservierter Transmembranrezeptor, der in verschiedensten embryonalen und adulten Geweben eine entscheidende Rolle in der Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Zellen spielt (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Die Bedeutung von Notch wurde zuerst in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* erkannt. Bereits im Jahre 1919 beschrieb Moohr eine Mutation in einem Fliegenstamm, bei der neben anderen schweren Entwicklungsfehlern auch Einkerbungen in den Flügeln auftraten. Diese Mutation nannte er „Notch“ (= Einkerbung) (Moohr, 1919). 1985 wurde dann das Notch Gen isoliert

(Wharton et al., 1985) und seitdem in vielen Organismen beschrieben. Während in *Drosophila* nur ein Notch Gen gefunden wurde, verfügen Säugetiere über vier stark verwandte Notch Gene (Notch1-4) mit teils unterschiedlicher, teils überlappender Expression und Funktion.

II.3.1 Struktur

II.3.1.1 Domänen des Notch-Proteins

Die Struktur des Notch Rezeptors (Abb. 3) ist in den unterschiedlichsten Organismen stark konserviert (zusammengefasst in Fleming, 1998). Notch ist ein 300 kDa großer Transmembranrezeptor mit einer einzelnen Transmembrandomäne. Der Rezeptor präsentiert sich als ein Heterodimer, bestehend aus extrazellulärem und intrazellulärem Teil, die nicht-kovalent verbunden sind.

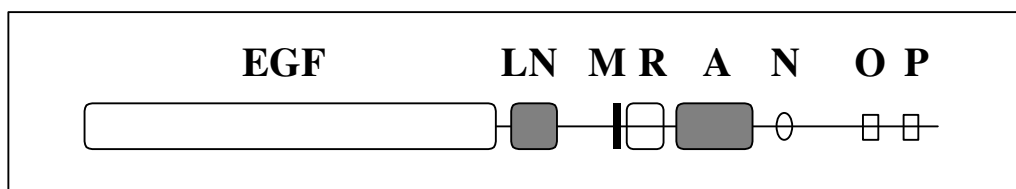


Abbildung 3: Domänen des murinen Notch1 Rezeptors (Abb. nach Schroeder, 2001)

EGF: EGF Wiederholungen; **LN:** LN Wiederholungen; **M:** Transmembrandomäne; **R:** RAM23 Domäne; **A:** Ankyrin Wiederholungen; **N:** Kernlokalisationssequenz; **O:** OPA Sequenz; **P:** PEST Sequenz;

Der extrazelluläre Teil weist zwei Domänen auf. Eine davon besteht aus einer je nach Notch Protein unterschiedlichen Anzahl an EGF (epidermal growth factor)-Wiederholungen, welche auch in anderen Proteinen wie dem Epidermalen Wachstumsfaktor vorkommen. Diese EGF-Wiederholungen sind wichtig für die Bindung von Liganden an den Notch Rezeptor. Die zweite Extrazellulärdomäne besteht aus spezifischen LIN12-Notch(LN) Wiederholungen, die u.a. an der Stabilisierung der Ligandenbindung beteiligt sind (Rebay et al., 1991). Am Übergang vom extrazellulären zum intrazellulären Teil befindet sich die Transmembrandomäne, in deren Bereich wichtige Aktivierungsschritte stattfinden (zusammengefasst in Mumm und Kopan, 2000). Der intrazelluläre Anteil besteht aus einer RAM-Domäne, Ankyrin-Wiederholungen, einer Kernlokalisationssequenz und einer OPA(Glutamin-reiche Sequenz)- und PEST-Region (Prolin-Glutamin-Serin-Threonin-reiche Sequenz). Die für Notch Proteine spezifische RAM23-Domäne und die Ankyrin-Wiederholungen spielen eine ent-

scheidende Rolle für die Bindung an CSL-Proteine (Tamura et al., 1995; Matsuno et al., 1997), welche für die Signaltransduktion von Notch verantwortlich sind (siehe unten). Außerdem bindet Deltex, ein wichtiger Modulator des Notch Signalwegs, an die Ankyrin-Wiederholungen (Diederich et al., 1994). Die C-terminale PEST-Sequenz wird mit der Destabilisierung aktivierter Notch Proteine in Verbindung gebracht. Darüber hinaus wurde eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne für den C-terminalen Bereich beschrieben (Kurooka et al., 1998).

II.3.1.2 Reifungsmechanismen

Bevor Notch nach der Translation an die Zelloberfläche gelangt, wird es in der extrazellulären Domäne an einer mit S1 bezeichneten Stelle durch eine Furin-ähnliche Protease gespalten (Blamueller et al., 1997). Daraufhin werden die entstandenen zwei Untereinheiten im Trans-Golgi zu einem heterodimeren Rezeptor zusammengesetzt, bei dem die zwei Untereinheiten durch eine Ca^{2+} -abhängige nicht-kovalente Bindung zusammengehalten werden. In dieser Form wird der Notch-Rezeptor mit seiner einzelnen Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert.

II.3.2 Aktivierung und Signalübertragung

II.3.2.1 Liganden von Notch

Notch wird durch Liganden der DSL-Gruppe aktiviert. Dazu zählen Delta und Serrate in *Drosophila*, Lag-2 und Apx-1 in *C. elegans*, sowie Delta-like (Dll)1, 3 und 4 (homolog zu Delta) und Jagged 1 und 2 (homolog zu Serrate) in Säugetieren (zusammengefasst in Fleming, 1998; Maillard et al., 2003). Es handelt sich dabei um Transmembranproteine, die genau wie Notch über mehrere EGF-Wiederholungen in der Extrazellulärdomäne verfügen. Zusätzlich enthalten sie eine charakteristische, cysteinreiche Domäne (DSL-Domäne), die für die Bindung an Notch notwendig ist. Präferenzen und Unterschiede in der Interaktion der verschiedenen Liganden mit den verschiedenen Notch-Rezeptoren (Notch1-4) werden zur Zeit mit Nachdruck erforscht, sind aber im Moment noch nicht ausreichend verstanden.

II.3.2.2 Ligandenabhängige Aktivierung von Notch

Die Interaktion zwischen Notch-Rezeptor und Ligand führt zu zwei aufeinander folgenden Spaltungen, in deren Folge die intrazelluläre Notch-Domäne (Notch^{IC}) von der Plasma-

membran freigesetzt wird. Der im Weiteren genauer beschriebene Vorgang wird als Regulierte Intramembranöse Proteolyse (RIP) bezeichnet (zusammengefasst in Weinmaster, 2000):

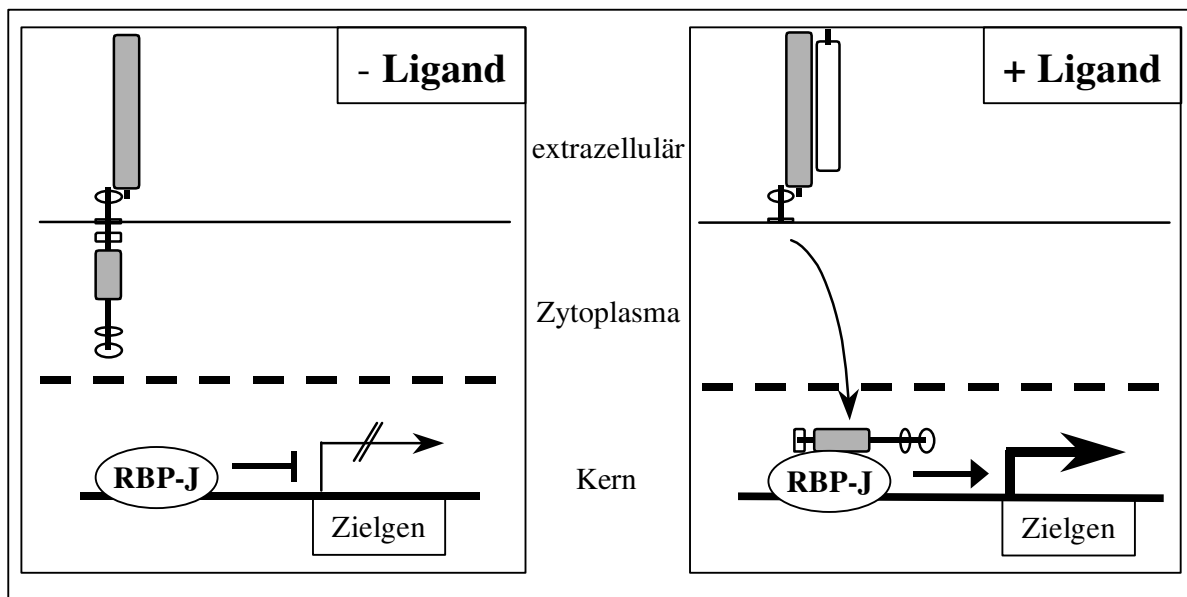


Abbildung 4: Die RBP-J abhängige Signalübertragung von Notch (Abb. nach Schroeder, 2001)

Durch Bindung eines Liganden der DSL-Gruppe kommt es im Notch-Rezeptor zu einer Konformationsänderung, woraufhin der Rezeptor an einer mit S2-bezeichneten Stelle kurz oberhalb der Transmembrandomäne durch die ADAM-Metalloproteinase TACE (TNFalpha konvertierendes Enzym) gespalten wird. Diese Spaltung führt dazu, dass eine Stelle S3 innerhalb der Transmembrandomäne freigelegt wird, an welcher nun durch eine proteolytische Spaltung durch einen Multiproteinkomplex mit γ -Secretase-Aktivität die intrazelluläre Domäne von Notch (Notch^{IC}) abgespalten und dadurch von der Plasmamembran abgelöst wird. Entscheidend beteiligt an diesem Multiproteinkomplex sind dabei die im Zusammenhang mit dem Morbus Alzheimer stehenden Preseniline (Struhl und Greenwald, 1999) und Nicastrin (Li et al., 2003). Die pharmakologische Unterdrückung der γ -Secretase-Aktivität oder die genetische Inaktivierung der Preseniline oder von Nicastrin blockiert die Signalübertragung von Notch (Zhang et al., 2000b; Li et al., 2003).

Nach der Abspaltung gelangt Notch^{IC} in den Zellkern, um dort seine Wirkung auf transkriptioneller Ebene zu entfalten (siehe unten). Von großer Bedeutung in diesem Zusammenhang war die Entdeckung, dass verkürzte Notch-Rezeptoren, welche ausschließlich die intrazelluläre Domäne von Notch (Notch^{IC}) repräsentieren, als konstitutiv aktive Form wirken

(Kopan et al., 1994). Diese Tatsache ist von großem Nutzen für die Notch-Forschung. Man kann nun eine Aktivierung von Notch dadurch erreichen, dass man Notch^{IC} direkt in den Zellen exprimiert, und muss nicht mehr Notch exprimierende und Liganden exprimierende Zelllinien aufwendig kulturell kultivieren.

II.3.2.3 Intrazelluläre Signalübertragung

II.3.2.3.1 CSL- bzw. RBP-J-abhängige Signalübertragung

Nachdem Notch^{IC} von der Zellmembran abgespalten wurde, gelangt es mit Hilfe seines Kernlokalisierungssignals in den Zellkern, wo es über seine RAM Domäne und die Ankyrin-Wiederholungen an CSL-Proteine bindet (CSL für CBF1/ „C promoter binding factor“ bzw. RBP-J / „recombination recognition sequence binding protein at the J_k site in Säugetieren, Suppressor of Hairless (SuH) in *Drosophila melanogaster* und Lag-1 in *C. elegans*) (Matsunami et al., 1989; Fortini und Artavanis-Tsakonas, 1994). Der Vereinfachung halber und weil in dieser Arbeit ausschließlich Ergebnisse von Säugetierzellen präsentiert werden, soll im Folgenden RBP-J stellvertretend für alle CSL-Proteine stehen. In Abwesenheit von Notch^{IC} wirkt RBP-J als ein transkriptioneller Repressor (Dou et al., 1994; Hsieh und Hayward, 1995), wobei hier Mechanismen wirksam werden, die u.a. mit der Deacetylierung von Histonen in Zusammenhang stehen. Es ist bekannt, dass eine verminderte Acetylierung von Histonen in Bereichen von nicht transkribierten Genen zu finden ist, während eine vermehrte Acetylierung mit verstärkter Transkriptionsaktivität einhergeht. Der zugrunde liegende Mechanismus basiert wohl auf der veränderten Zugänglichkeit der Chromatinstruktur für die Transkriptionsmaschinerie (zusammengefasst in Kornberg und Lorch, 1999).

RBP-J bindet dabei an wenigstens zwei Korepressorkomplexe: den SMRT/NcoR/Histon-deacetylase 1 (HDAC1)-Komplex (Kao et al., 1998) und den CIR/HDAC2/SAP30-Komplex (Hsieh et al., 1999; Zhou et al., 2000). Notch^{IC} kann diese Interaktion von RBP-J und Korepressorkomplexen unterbinden, indem es an RBP-J bindet (Hsieh et al., 1999; Zhou et al., 2000). Zusätzlich ermöglicht Notch, dass daraufhin Koaktivatoren der Transkription wie die Histonacetyltransferasen PCAF und GCN5 sowie Proteine der Mastermind-like Familie (MAML) an den Notch-RBP-J-Komplex binden. Über eine Rekrutierung von weiteren Proteinen wie dem globalen Koaktivator CBP/p300 in den transkriptionellen Aktivierungskomplex wird dann eine verstärkte Transkription von Notch-Zielgenen erreicht (Kurooka und Honjo, 2000; Fryer et al., 2002; Wu et al., 2002).

Somit ist insgesamt durch Aktivierung des Notch-Signalweges aus einem Korepressorkomplex ein Koaktivatorkomplex entstanden. Dieser führt dazu, dass die Transkription be-

stimmter Notch-Zielgene wie HES-1 (Jarriault et al., 1995) induziert wird, welches dann seinerseits z.B. in Muskelzellen durch Blockade der MyoD-Expression die Muskelzelldifferenzierung inhibiert (Kuroda et al., 1999).

II.3.2.3.2 CSL- bzw. RBP-J-unabhängige Signalübertragung

Neben dem CSL-abhängigen Signalübertragungsweg scheint es auch eine CSL-unabhängige Signalübertragung von Notch zu geben. So wurde in Säugetierzellen u.a. ein Signalweg über das intrazelluläre, Notch bindende Protein Deltex postuliert. Deltex ist ein zytoplasmatisches Zinkfingerprotein, das an die Ankyrin-Wiederholungen von Notch bindet, und die Überexpression von Deltex kann in derselben Weise wie die Expression von Notch^{IC} unabhängig von der Transaktivierung des RBP-J Weges die Aktivität der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren E47 bzw. MASH1 verringern (Ordentlich et al., 1998; Yamamoto et al., 2001). Dabei ist E47 u.a. an der B-Zell spezifischen Immunglobulin-Gentranskription und der frühen B-Zell-Entwicklung beteiligt, während MASH1 eine wichtige Rolle in einem frühen Differenzierungsschritt von neuronalen Vorläuferzellen übernimmt.

Auch in der Muskelzelldifferenzierung (Shawber et al., 1996) und der Entwicklung der Epidermis in *Drosophila* (Zecchini et al., 1999) wurden mögliche CSL-unabhängige Signalwege von Notch beschrieben, die im Detail aber noch wenig aufgeklärt sind.

II.3.3 Biologische Funktion

II.3.3.1 Allgemein

Am längsten erforscht sind die biologischen Funktionen von Notch an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Deshalb sollen die grundlegenden Funktionen dieses Rezeptors an ihr erklärt werden (zusammengefasst in Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

In *Drosophila* wird Notch für eine normale Neurogenese, Epidermogenese, Myogenese, Oogenese, Augenentwicklung, Herzentwicklung, Beinentwicklung und Flügelentwicklung benötigt. Grundsätzlich gibt es mindestens zwei unterschiedliche Mechanismen, mit denen Notch Zelllinienentscheidungen beeinflusst: die laterale Spezifizierung und die induktive Signalgebung.

Mit lateraler Spezifizierung bezeichnet man einen Prozess, bei dem zwei zunächst entwicklungsgeschichtlich identische, benachbarte Zellen sich zu unterschiedlichen Zelltypen

weiterentwickeln. Dies soll am Beispiel der Entwicklung von definierten Mengen an Neuroblasten und epidermalen Vorläuferzellen aus zuvor undifferenzierten ektodermalen Zellen in *Drosophila* verdeutlicht werden. Ursprünglich sind in allen undifferenzierten Ektodermzellen äquivalente Mengen an Notch und dem Notch-Liganden Delta exprimiert. Sobald es in einer Zelle aber durch noch unbekannte äußere Einflüsse oder interne stochastische Prozesse zu einer gering erhöhten Delta-Expression kommt, führt dies in den angrenzenden Zellen über den Delta-Notch-Signalweg zu einer Herunterregulation von Delta und Hochregulation von Notch. Im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus erzeugt dies in der Delta-überexprimierenden-Zelle wiederum eine weitere Steigerung der Delta-Expression sowie eine Herunterregulation ihres Notch-Rezeptors. Durch diesen Vorgang entsteht ein geordnetes Muster von zwei unterschiedlichen Zelltypen: ein Signalgeber und ein Signalempfänger. Nur Zellen mit hoher Delta-Expression differenzieren zu Nervenzellen, Zellen mit hoher Notch-Expression werden zu epidermalen Zellen (laterale Spezifizierung).

Ein zweiter Mechanismus von Notch ist die induktive Signalgebung, bei der Notch-Rezeptor und -Ligand auf unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden, und die ligandentragende Zelle den Entwicklungsfortgang der Notch-exprimierenden Zelle beeinflusst. Hierbei ist zu beachten, dass Aktivierung von Notch nicht nur, wie anfangs vermutet, Differenzierung blockieren kann, sondern sie auch je nach Zelltyp und biologischem Zusammenhang induzieren kann.

Notch hat aber nicht nur einen Einfluss auf die Differenzierung von Zellen, sondern auch auf die Proliferation und Apoptose verschiedenster Gewebe. So bewirkt es einerseits einen Zellzyklus-Arrest in der sogenannten nicht-proliferierenden Region an der Grenze zwischen dorsalem und ventralem Teil des Flügels von *Drosophila*. In einer angrenzenden Region induziert aktiviertes Notch aber andererseits auch wieder mitotische Aktivität (zusammengefasst in Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

II.3.3.2 Bedeutung von Notch in Säugetieren

In den letzten Jahren gab es sehr viele Arbeiten, die einen Einfluss von Notch auf die Entwicklung verschiedenster Gewebe sowohl in der Embryogenese als auch im adulten Säugetier aufzeigten. Seine enorme Bedeutung wird u.a. auch durch Phänotypen von Mäusen deutlich, welche aufgrund von genetischen Manipulationen defizient für einen Notchrezeptor oder einen Baustein des Notchsignalwegs sind (Swiatek et al., 1994). *Notch1^{-/-}* Mäuse sterben vor Tag 11,5 der Embryonalentwicklung. Sie zeigen u.a. Defekte bei der Somitogenese, Vaskularisierung und Neurogenese sowie einen erhöhten Zelltod. Mäuse mit defektem

Notch2 sterben ebenfalls vor Tag 11,5 der Embryonalentwicklung mit ähnlichen Defekten, wobei die Somitogenese jedoch normal ist (Hamada et al., 1999). Der Phänotyp von Notch3^{-/-} Mäusen konnte noch nicht aufgeklärt werden. Notch4^{-/-} Mäuse sind lebensfähig und zeigen einen unauffälligen Phänotyp. Notch 4 scheint aber überlappende Funktion mit Notch1 zu haben und diese zum Teil in Notch1^{-/-} Mäusen zu übernehmen (Krebs et al., 2000). Erwartungsgemäß zeigen auch Defekte in den Notchliganden Dll-1 und Jagged1 Phänotypen, die Notch^{-/-} Mäusen entsprechen (Hrabe de Angelis et al., 1997; Xue et al., 1999). Die zentrale Rolle, die RBP-J für den Notch-Signalweg spielt, wird durch RBP-J^{-/-} Mäuse verdeutlicht. Diese sterben an Tag 10,5 der Embryonalentwicklung mit Defekten im Wachstum, in der Somitogenese, Neurogenese und Vaskularisierung (Oka et al., 1995).

Die meisten Erkenntnisse über die Wirkungen von Notch auf adulte Gewebe stammen aus Zellkulturversuchen. Sehr gut untersucht ist hierbei der Block der Skelettmuskeldifferenzierung durch aktiviertes Notch (Kopan et al., 1994; Kuroda et al., 1999). Hierfür wurde die C2C12 Myoblastenzelllinie verwendet, welche durch geeignete Mediumbedingungen angeregt werden kann, sich in funktionelle, kontrahierende Myotuben zu differenzieren. Der entscheidende primäre Transkriptionsfaktor der Myoblastendifferenzierung ist MyoD. Aktiviertes Notch führt nun über RBP-J zur Induktion von HES-1, welches seinerseits die MyoD Expression reprimiert und so zum Block der Skelettmuskeldifferenzierung führt.

Notch kann aber nicht nur Differenzierung blockieren, sondern ist je nach biologischem Zusammenhang auch für die Differenzierung von Vorläuferzellen notwendig, wie u.a. für die Adipogenese (Garces et al., 1997) und für die Differenzierung von Keratinozyten (Rangarajan et al., 2001) gezeigt werden konnte. In neuronalen Stammzellen blockiert Notch die Differenzierung zu Neuronen, induziert jedoch die Differenzierung zu Gliazellen (Morrison et al., 2000).

Zusammenfassend kann man sagen, dass Notch eine herausragende Rolle für die Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Säugetierstammzellen fast aller Gewebe spielt, dass aber seine Wirkungen stark vom jeweiligen Zelltyp und dem biologischen Zusammenhang abhängen. Diese enorme Bedeutung und gleichzeitige Komplexität offenbaren ein gewaltiges wissenschaftliches Aufgabenfeld, dessen Erforschung sicherlich erst begonnen hat.

II.3.3.3 Notch-assoziierte Krankheiten beim Menschen

Verschiedene Erkrankungen beim Menschen konnten bisher mit dem Notch-Signalweg in Verbindung gebracht werden (zusammengefasst in Joutel und Tournier-Lasserre, 1998; Gridley, 2003). So ist eine genetische Veränderung im Notch1-Gen für die Entstehung einer

Gruppe von akuten lymphoblastischen T-Zell-Leukämien (T-ALL) verantwortlich (Ellisen et al., 1991). Hierbei kommt es aufgrund einer Chromosomentranslokation zur Bildung einer konstitutiv aktiven Form des Notchrezeptors, auch als TAN-1 bezeichnet, die der intrazellulären Domäne des normalen Notchrezeptors entspricht. Ein ähnlicher Mechanismus spielt übrigens auch eine Rolle bei mit Notch4 assoziierten Mammatumoren der Maus. Durch Insertion des Maus-Mammatumor-Virus (MMTV) in das Notch4-Gen kommt es zur Expression eines verkürzten, der intrazellulären Domäne entsprechenden, konstitutiv aktiven Notch4-Proteins. Verschiedene andere solide Tumoren, darunter Zervix-, Endometrium-, Nierenzell-, Bronchial-, Basalzell- und Mammakarzinome, Pleuramesotheliome und Maligne Melanome, sowie maligne hämatologische Erkrankungen wie Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome, Untergruppen der akuten myeloischen Leukämie und die chronische B-lymphozytäre Leukämie (B-CLL) zeigten dysregulierte Expressionen von Wildtyp-Notch-Rezeptoren, -Liganden und -Zielgenen, wobei je nach Tumorerkrankung und zellulärem Kontext zum Teil erhöhte, zum Teil verminderte Expressionen festgestellt wurden (Nickoloff et al., 2003).

Neben der Rolle bei malignen Erkrankungen sind Störungen im Notchsignalweg für mehrere erbliche Erkrankungen verantwortlich. So wurde eine Mutation im Notch-Liganden Jagged1 als Ursache für das autosomal-dominant erbliche Alagille-Syndrom identifiziert. Dieses Syndrom ist charakterisiert durch eine Hypoplasie der intrahepatischen Gallengänge mit Gefahr der Entwicklung einer biliären Zirrhose, Pulmonalarterienstenose, Gesichtsdysmorphie sowie Wirbelkörperanomalien. Die spezifischen Auswirkungen der Jagged1-Mutation in der Pathogenese dieser Erkrankung sind noch nicht geklärt. Es wird aber angenommen, dass es sich um einen inhibierenden Effekt auf den Notchsignalweg handelt. Die Vielzahl der Gewebe, in denen Jagged1 während der normalen Embryo- und Fetogenese exprimiert wird, spiegelt sich zum Teil in den genannten Symptomen des Alagille-Syndroms wider.

Auch bei einer familiären Form der Fallot-Tetralogie (Pulmonalstenose, Ventrikelseptumdefekt, reitende Aorta, Rechtsherzhypertrophie) konnte eine Mutation im Jagged1-Gen als Ursache identifiziert werden (Eldadah et al., 2001). Dagegen ist eine Mutation im Notch3-Gen verantwortlich für das CADASIL Syndrom (zerebrale autosomale dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie). Hierbei kommt es durchschnittlich um das 45. Lebensjahr, gewöhnlich ohne weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren, zu rezidivierenden subkortikalen ischämischen Hirninfarkten mit zunehmender Demenzentwicklung. Histopathologisch liegen schwerwiegende Läsionen der glatten Gefäßmuskulzellen kleiner zerebraler Arterien vor, die in gewissem Ausmaß aber auch in peripheren Gefäßen, besonders der Haut gefunden werden, so dass es sich bei CADASIL am ehesten um

eine systemische Arteriopathie mit zerebraler Betonung handeln dürfte. Es ist bisher noch nicht eindeutig geklärt, ob die Notch3-Mutation zu einer übermäßigen oder verminderten Aktivierung des Notchsignalwegs führt.

Eine sehr bedeutsame Verbindung besteht auch zwischen dem Notchsignalweg und dem Morbus Alzheimer: Presenilin1, ein entscheidender Faktor der β -Amyloidbildung aus dem β -Amyloid-Vorläuferprotein bei der Alzheimerschen Erkrankung, ist auch maßgeblich an der regulierten intramembranösen Proteolyse (RIP) im Rahmen der Notchaktivierung beteiligt. Es gibt vielversprechende Therapieansätze zur Blockade von Presenilin1 bei Morbus Alzheimer, wobei diese so spezifisch sein müssen, dass nicht durch gleichzeitige Blockade des Notchsignalwegs gravierende Nebenwirkungen auftreten (zusammengefasst in Selkoe, 2001).

Betrachtet man, dass Notch mit so unterschiedlichen Erkrankungen sowohl während der Entwicklung, als auch in adulten Geweben in Verbindung steht, und bedenkt das breite Spektrum seiner physiologischen Funktionen, dürfte es sich bei den genannten Notch-assoziierten Erkrankungen wohl nur um den Beginn einer stetig wachsenden Liste handeln. Die Entschlüsselung der molekularen Wirkmechanismen und der Zielgene von Notch könnte somit einen wichtigen Beitrag für zukünftige Therapieansätze bei einer Vielzahl von Erkrankungen leisten.

II.3.3.4 Bedeutung von Notch für die Hämatopoese

Alle vier Notch-Transkripte sind in hämatopoetischen Zellen exprimiert (Singh et al., 2000). Notch1 ist vor allem in Knochenmarksstamm- und Knochenmarksvorläuferzellen, Makrophagen und Thymozyten exprimiert. Notch2 konnte ebenfalls auf Vorläuferzellen, Thymozyten und B-Zellen gefunden werden. Während Notch3 in den verschiedensten hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, ist Notch4 hauptsächlich in Endothelzellen, aber auch in Makrophagen exprimiert. Die größte Menge an wissenschaftlichen Daten ist aber bei Weitem für die Rolle von Notch1 in der Hämatopoese vorhanden.

Die Notch-Liganden Jagged und Delta-like (Dll) werden von Stromazellen des Knochenmarks, fetalen Leberstromazellen, Thymusepithel und bestimmten hämatopoetischen Zellen exprimiert (Singh et al., 2000).

II.3.3.4.1 Lymphatisches System

Die Funktionen von Notch sind in T-Zellen sehr ausgiebig erforscht (zusammengefasst in Maillard et al., 2003; Radtke et al., 2004). Aufmerksam wurde man auf die Bedeutung von Notch in T-Zellen durch die genetischen Veränderungen bei einer bestimmten Form einer

akuten T-Zell lymphoblastischen Leukämie (siehe oben). In der Folgezeit wurden wichtige Funktionen von Notch in T-Zellen erkannt. Die T-Zell-Entwicklung in $\text{Notch1}^{-/-}$ Knochenmarkzellen ist in einem frühen Stadium ($\text{CD44}^+\text{CD25}^-$) blockiert (Radtke et al., 1999). Notch1 führt in bipotenten T/B-lymphatischen Vorläuferzellen zu einer Zelllinienentscheidung in Richtung T-Zelle. Eine physiologische Rolle bei den Entscheidungen zwischen $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ und CD4^+ versus CD8^+ T-Zell-Schicksal wird zur Zeit kontrovers diskutiert. Die Wirkungen von Notch in der T-Zell-Entwicklung scheinen zumindest zum Teil über HES-1 vermittelt zu werden, denn auch bei $\text{HES-1}^{-/-}$ Mäuseembryonen ist die T-Zell-Entwicklung auf der gleichen Stufe wie bei $\text{Notch1}^{-/-}$ Zellen blockiert (Tomita et al., 1999).

Der Notchsignalweg wurde auch mit der Toleranzentwicklung bei peripheren T-Zellen in Verbindung gebracht (Hoyne et al., 2000). Die Autoren konnten zeigen, dass die Überexpression des Notchliganden *Jagged1* in Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) zur Umwandlung naiver T-Zellen in regulatorische T-Zellen führt, die die Immunantwort auf ein spezifisches Antigen nicht mehr aktivieren, sondern inhibieren. Dies wäre ein möglicher Ansatz, bei Autoimmunkrankheiten und Allergien therapeutisch eine Toleranzentwicklung zu erreichen. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen dieses Effekts ist bisher noch nicht gelungen.

Neben den Funktionen in T-Zellen hat Notch auch wichtige Aufgaben in der späten B-Zell-Entwicklung (zusammengefasst in Maillard et al., 2003; Radtke et al., 2004). Während konditionelle Inaktivierung von RBP-J keinen Effekt auf die Entwicklung unreifer Knochenmarks-B-Zellen zeigte, führte sie in der Milz zu einem Verlust von Marginalzonen-B-Zellen bei gleichzeitigem Überschuss an folliculären B-Zellen (Tanigaki et al., 2002). Dies deutet auf eine Rolle von Notch in der Zelllinienentscheidung zwischen den beiden B-Zelltypen, wohl ausgehend von einer gemeinsamen Vorläuferzelle.

Von den Notch-Rezeptoren ist Notch2 in B-Zellen am stärksten exprimiert, wobei die Expressionsstärke mit dem Reifungsgrad zunimmt und in B-Zellen der Milz am stärksten ist. Konditionelle Inaktivierung von Notch2 führt ebenfalls zum Verlust von Marginalzonen-B-Zellen. Andere Notch-Rezeptoren können die Notch2-Funktion in B-Zellen nicht übernehmen (Saito et al., 2003). In der frühen B-Zell-Entwicklung führt konstitutiv aktives $\text{Notch1}^{\text{IC}}$ zu einem Block der B-Zell-Differenzierung vor oder im Prä-Pro-B-Zell-Stadium (Pui et al., 1999).

Hinweise auf molekulare Mechanismen und vielleicht auch physiologische Zielgene von Notch in B-Zellen erhielt man durch die Beobachtung, dass EBNA2, ein viraler Transkriptionsfaktor des B-lymphotropen Epstein-Barr-Virus (EBV), sich Teilen des Signalwegs des aktivierten zellulären Notch-Proteins bedient. Das u.a. mit der Entstehung von Burkitt

Lymphomen und Nasopharynxkarzinomen assoziierte EBV ist ein onkogenes Virus, welches zur Immortalisierung von B-Zellen führen kann (Cohen et al., 1989). EBNA2 ist dabei einer seiner entscheidenden nukleären Transkriptionsfaktoren, der, genauso wie Notch, selbst nicht an DNA binden kann, sondern seine Wirkung ebenfalls über RBP-J entfaltet (Grossman et al., 1994; Henkel et al., 1994; Waltzer et al., 1994). Es konnte in der Folge gezeigt werden, dass aktiviertes Notch1 in EBV-infizierten B-Zellen verschiedene von EBNA2 regulierte virale und zelluläre Gene ebenfalls regulieren kann (darunter LMP1, LMP2a, BamHI C-Promoter, CD21, c-myc und I μ), auf andere EBNA2 Zielgene wie CD23 jedoch keinen Einfluss hat (Höfelmayr et al., 1999; Strobl et al., 2000). Im Gegensatz dazu scheint aktiviertes Notch2 gerade an der Überexpression von CD23 in B-Zell chronisch lymphatischen Leukämien (B-CLL) beteiligt zu sein (Hubmann et al., 2002).

II.3.3.4.2 Myeloisches System und hämatopoetische Stammzellen

Als Wirkung von Notch auf das myeloische System wurde zuerst eine Verzögerung der Differenzierung und eine Steigerung der Selbsterneuerung von myeloischen Vorläuferzellen beschrieben (Milner et al., 1996). Hierfür wurde die murine granulozytäre Vorläuferzellreihe 32D mit einer konstitutiv aktiven Form von Notch1 (Notch1^{IC}) verwendet. Später konnte dieser Effekt auch gezeigt werden, wenn man 32D Zellen mit einer Knochenmarks- Stromazelllinie kokultivierte, welche den Notch-Liganden Jagged1 exprimierte (Li et al., 1998). Auch andere Autoren, die mit konstitutiv aktivem Notch1 arbeiteten, konnten eine Verzögerung der Differenzierung und vermehrte Selbsterneuerung in myeloischen Zelllinien finden (Varnum-Finney et al., 2000; Kumano et al., 2001). Dagegen stellten Schroeder und Just sowohl in der multipotenten myeloischen Stammzelllinie FDCP-mix als auch in 32D Zellen eine Induktion und Beschleunigung der Differenzierung und eine Verringerung der Selbsterneuerung durch Notch fest (Schroeder und Just, 2000b; Schroeder, 2001; Schroeder et al., 2003). Sie etablierten dabei ein induzierbares System, in dem Notch durch Zugabe von Tamoxifen konditionell aktivierbar ist (siehe unten). Auch bei einer Stimulation endogener Notch-Rezeptoren durch Kokultivierung mit einer Jagged1 exprimierenden Fibroblastenzelllinie kamen sie zu obigen Ergebnissen. In der multipotenten myeloischen Stammzelllinie FDCP-mix war die Differenzierung in neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Erythrozyten beschleunigt, ohne eine Differenzierungsrichtung deutlich zu favorisieren. Die Effekte traten sowohl unter Zytokinbedingungen auf, welche die Differenzierung erlauben oder unterstützen, als auch unter Bedingungen, welche eine Differenzierung normalerweise verhindern und die Selbsterneuerung unterstützen. Die Stärke der Notch-Effekte konnte jedoch durch

Zugabe von Zytokinen beeinflusst werden, woraus sich eine mögliche Verbindung von Notch und Zytokinsignalwegen ergibt. Außerdem konnten Schroeder und Just zeigen, dass eine Aktivierung von Notch die Proliferation von FDCP-mix und 32D Zellen durch einen Block des Zellzyklus in der G0/G1 Phase reduzierte (Schroeder und Just, 2000a; Schroeder, 2001). In einer anderen Arbeit wurde demonstriert, dass der Jagged/Notch-Signalweg die Proliferationsgeschwindigkeit von CD34⁺ humanen Blutstammzellen verringert (Walker et al., 1999). Auch wurde eine Induktion der Reifung von humanen dendritischen Zellen nach Notchaktivierung beschrieben (Weijzen et al., 2002). Bei *in vivo* Experimenten zur Wirkung von Notch auf hämatopoetische Stammzellen konnte kein Block der Differenzierung in myeloische Zellen gefunden werden (Pui et al., 1999), und eine stimulierende Wirkung von Notch1 auf die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in dendritische Zellen konnte festgestellt werden (Cheng et al., 2001). In einer kürzlich erschienenen Arbeit (Kumano et al., 2003) wurde der Einfluss von Notch1 auf die embryonale Entwicklung der frühesten hämatopoetischen Stammzellen aus bestimmten Endothelzellen, die auch als Hämangioblasten bezeichnet werden können, beschrieben. So war bei Notch1^{-/-}-Mäuseembryonen bei Explantationsstudien von Geweben, in denen normalerweise definitive Hämatopoese stattfindet, die Generierung hämatopoetischer Kolonien stark eingeschränkt. Dies konnte in Wildtyp-Mäuseembryonen durch die Anwesenheit von Notchaktivität unterbindende γ -Secretase-Inhibitoren nachgeahmt werden, allerdings nur bis Tag 10,5 der Embryogenese, was darauf deutet, dass Notch1-Aktivierung für die Erzeugung der frühesten hämatopoetischen Stammzellen erforderlich ist, aber nur so lange, bis ein initialer Stammzellpool vorhanden ist.

Notch wirkt also nicht generell, wie anfangs postuliert, der Differenzierung von myeloischen Zellen entgegen und unterstützt auch nicht generell die Proliferation von unreifen Stammzellen. Die stark abweichenden Ergebnisse der unterschiedlichen Arbeitsgruppen können u.a. daraus resultieren, dass bei Systemen mit konstitutiv aktivem Notch1^{IC} auf Klone selektioniert wird, die einen Selektionsvorteil durch einen Block der Differenzierung aufweisen. Dazu passen die Beobachtungen von zwei Gruppen, dass es nicht möglich war, stabile hämatopoetische Stammzelllinien mit konstitutiv aktivem Notch zu generieren (Schroeder, 2001; Morimura et al., 2000).

Die biologischen Funktionen von Notch in der Myelopoese sind um einiges komplexer als zuerst angenommen. Sicher sind sie sehr vom zellulären Kontext und den Zytokinbedingungen abhängig.

II.3.4 Zielgene von Notch in Säugetieren

Zielgene von Notch konnten bisher bezogen auf die breite biologische Wirkung dieses Rezeptors noch nicht ausreichend identifiziert werden. Neben dem bereits genannten HES-1 und den genannten mit EBNA2 gemeinsamen viralen und zellulären Zielgenen in EBV-infizierten B-Zellen (LMP1, LMP2a, BamHI C-Promoter, CD21, c-myc und Igu (Höfelmayr et al., 1999; Strobl et al., 2000)) konnten bisher in Säugetierzellen u.a. HES-5 (Ohtsuka et al., 1999), verschiedene mit HES verwandte HERP bzw. Hey-Gene (Maier und Gessler, 2000), NF-kappaB (Oswald et al., 1998; Cheng et al., 2001), prä-TCR α (Reizis und Leder, 2002), p21 (Rangarajan et al., 2001), Nrarp (Krebs et al., 2001) und GATA-2 (Kumano et al., 2001) als Zielgene von Notch gefunden werden. Von mehreren dieser Zielgene sind wichtige Funktionen innerhalb der Hämatopoese und des Immunsystems bekannt. So wird z.B. NF-kappaB neben verschiedenen Aufgaben in der T-Zell Entwicklung für die Differenzierung von B-Zellen und dendritischen Zellen benötigt. Das Gen für die prä-T-Zell-Rezeptor- α -Kette (prä-TCR α) ist während der frühen Differenzierung von T-Zellen von Bedeutung, während GATA-2 wichtige Funktionen in undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen übernimmt und damit Einfluss auf alle hämatopoetischen Linien hat (zusammengefasst in Shivdasani und Orkin, 1996). Die bisher bekannten Zielgene können aber längst nicht alle Effekte von Notch in der Hämatopoese ausreichend erklären, so dass die Erforschung weiterer Zielgene sowohl für das Verständnis der molekularen Wirkungen von Notch, als auch für die Einsicht in die molekularen Abläufe der Hämatopoese einen wichtigen Beitrag liefern kann.

II.4 Das Tamoxifen-induzierbare System: ein Konstrukt, um Notch1^{IC} konditionell aktivieren zu können

Um erfolgversprechend nach Zielgenen von Notch in der Hämatopoese forschen zu können, ist ein Zellkonstrukt notwendig, bei dem Notch konditionell aktiviert werden kann. Dieses hatten Timm Schroeder und Ursula Just vor Beginn meiner Promotionsarbeit etabliert (Schroeder, 2001). Sie wählten dazu das Östrogen-induzierbare Aktivierungssystem. Dafür wurde der offene Leserahmen für ein Fusionsprotein (NERT) aus Notch1^{IC} und der Hormonbindedomäne (HBD) des humanen Östrogen-Rezeptors (aa 282-595) kloniert. Da Östrogen selber einen Einfluss auf die Proliferationsgeschwindigkeit von FDCP-mix-Zellen hatte, wurde eine mutierte Hormonbindedomäne verwendet, welche durch die Bindung des Östrogen-Antagonisten 4-Hydroxy-Tamoxifen (OHT) aktiviert werden kann (Feil et al., 1997).

OHT für sich hatte keinen Einfluss auf die Proliferation oder Differenzierung von FDCP-mix Zellen. In Abwesenheit von OHT wird die HBD von dem zytoplasmatischen Hitzeschockprotein 90 (HSP90) gebunden und dadurch im Zytoplasma gehalten (Abb. 5). Nach Zugabe und Bindung von OHT an die HBD wird diese vom HSP90 abgelöst und der Komplex von Notch1^{IC} und HBD wandert aufgrund des Kernlokalisationsignals von Notch1^{IC} in den Kern. Hier kann Notch1^{IC} die Transkription seiner Zielgene induzieren.

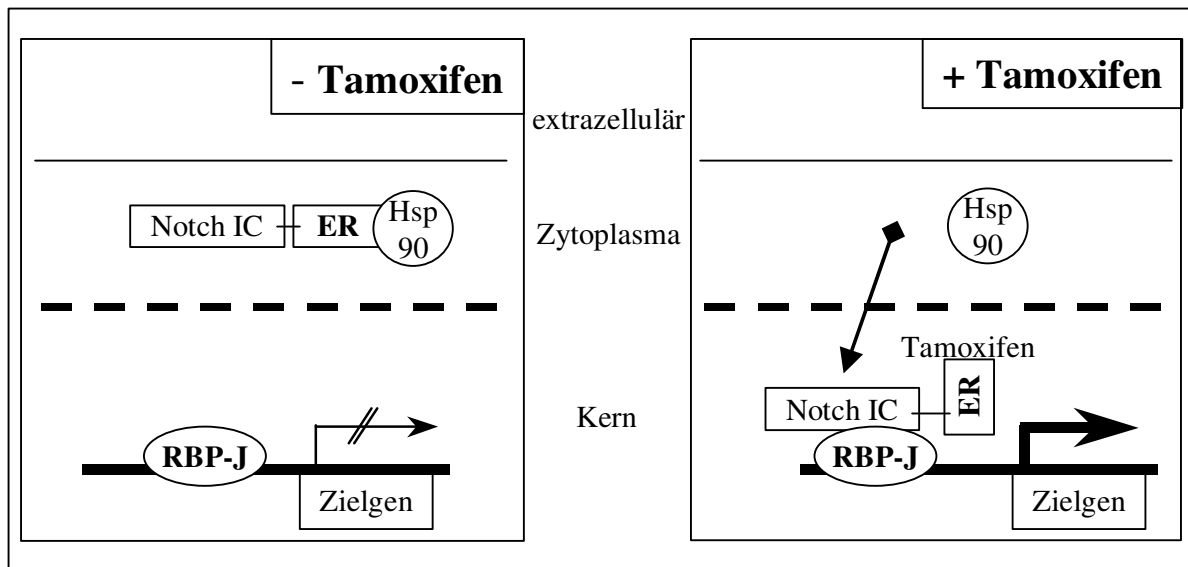


Abbildung 5: Das Tamoxifen-induzierbare System

(ER: Östrogen-Rezeptor; Hsp 90: Hitzeschockprotein 90)

Für die Expression von NERT in hämatopoetischen Zellen wurde der Leserahmen in einen retroviralen Vektor (rneo) kloniert. Die hohe Expression in hämatopoetischen Stammzellen wird dabei durch das 5' LTR und die PBS des murinen embryonalen Stammzellvirus (MESV) erreicht (Grez et al., 1990).

III FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Im Rahmen dieser Arbeit sollten molekulare Mechanismen, mit welchen Notch seine Effekte auf Proliferation und Differenzierung myeloischer Zellen ausübt, untersucht werden. Dazu sollten Zielgene von Notch in myeloischen Stamm- bzw. Vorläuferzelllinien mit unterschiedlichem Differenzierungspotential bestimmt und analysiert werden, sowie eine Einordnung der Ergebnisse in vorhandene Modelle der Regulation der Myelopoese versucht werden.

IV ERGEBNISSE

IV.1 FDCP-mix A7 Zellen können durch geeignete Mediumbedingungen in Erythrozyten bzw. Granulozyten und Makrophagen differenzieren

IV.1.1 Anhand von Zytospin-Präparaten können die Zellen während der Differenzierung morphologisch unterschieden und differentiell ausgezählt werden

Die zytokingesteuerte Differenzierungskinetik der FDCP-mix A7 Zellen wurde wie in Abschnitt VI.2.3 beschrieben durchgeführt, um einerseits das Zellsystem unter den vorliegenden Laborbedingungen für molekulare Analysen von Differenzierungsentscheidungen in der Hämatopoese zu validieren, und andererseits einen Eindruck von den Genexpressionsveränderungen wichtiger Regulationsfaktoren in den verwendeten Zellen während einer zytokingesteuerten Differenzierung zu erhalten.

Es wurden täglich Zytospin-Präparate angefertigt. Die differentielle Auszählung erfolgte im undifferenzierten Zustand, sowie an einem frühen, mittleren und späten Zeitpunkt der Differenzierung. Ausschnitte der zugehörigen Zytospin-Präparate sind in Abb. 6a dargestellt. Es konnten reife Erythrozyten, Makrophagen und Granulozyten in einem für die Mediumbedingungen typischen Verhältnis beobachtet werden. Der Verlauf der einzelnen Zellzahlen ist in Abb. 6b und 6c dargestellt. Zu erkennen ist hierbei u.a. auch, dass unter erythroiden Differenzierungsbedingungen erwartungsgemäß anfangs auch vermehrt Makrophagen entstehen, welche im weiteren Verlauf dann aber wieder deutlich abnehmen. Beachtet werden sollte, dass zu Beginn der Kinetik bereits einige späte granulozytäre Zellen zwischen den eindeutig undifferenzierten Blasten vorhanden waren.

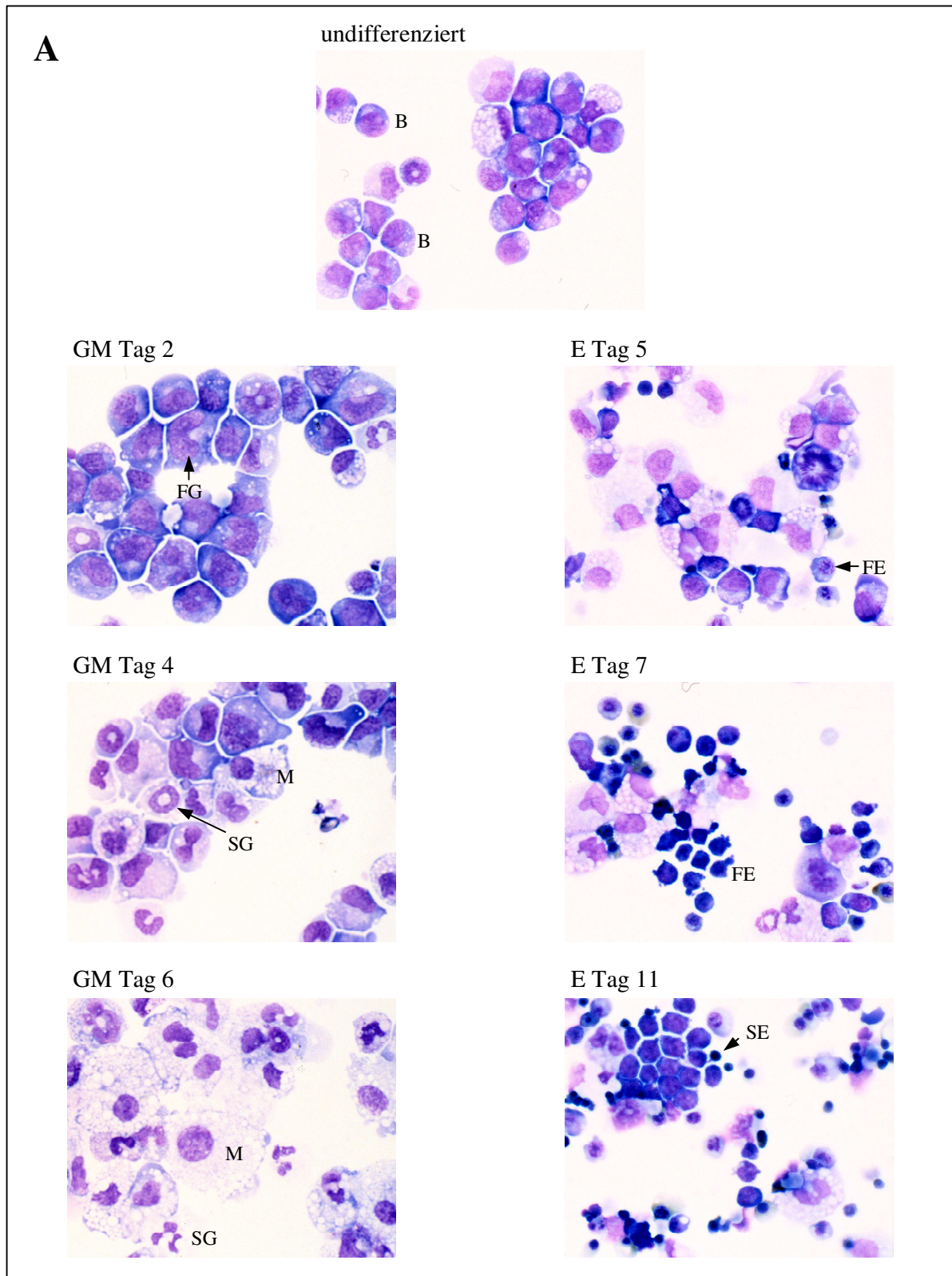
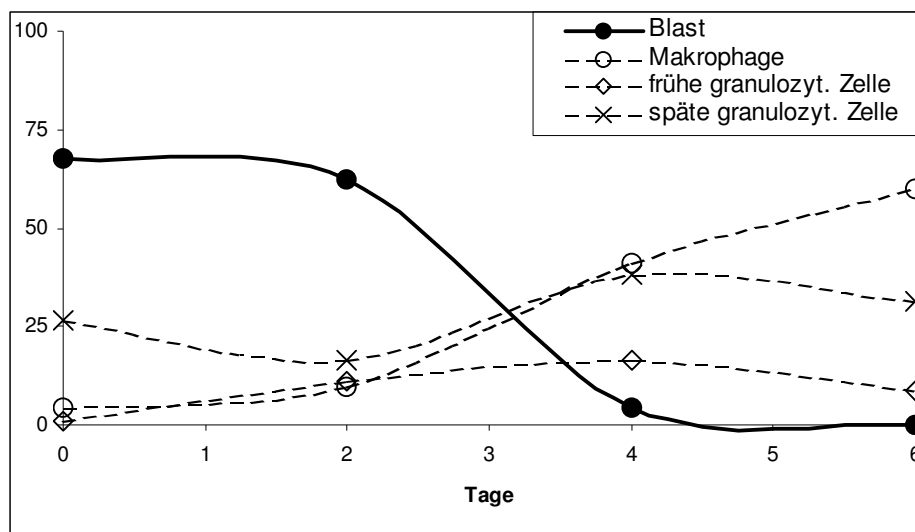
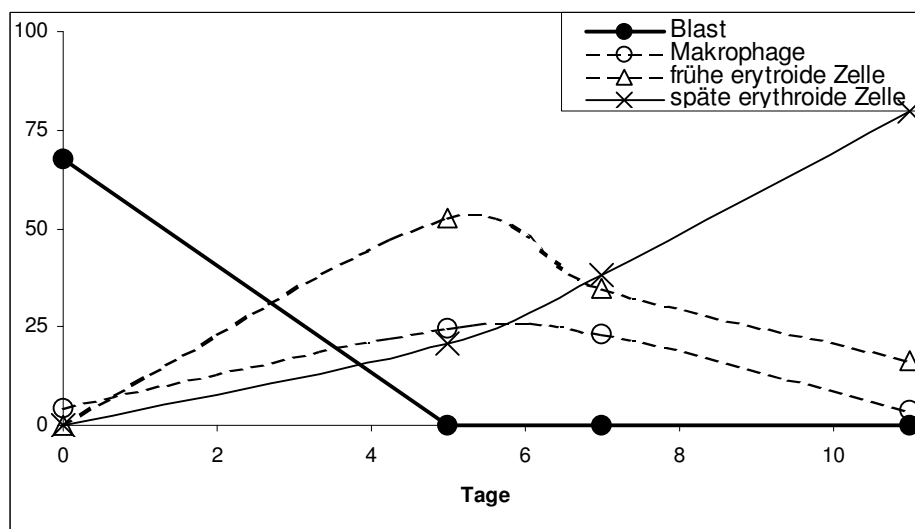


Abbildung 6: Differenzierungskinetik von FDCP-mix A7 Zellen

FDCP-mix Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen kultiviert. Durch Wechsel der Mediumbedingungen wurde eine Differenzierung in Erythrozyten (E) bzw. Granulozyten und Makrophagen (G/M) erreicht.

- (A) Ausschnitte der Zytospin-Präparate; May-Grünwald-Giemsa Färbung, erythroide Mediumbedingungen Tag 7 und 11 zusätzlich Dianisidin-Färbung; Vergrößerung 630fach (B: Blast; FE: frühe erythroide Zelle; FG: frühe granulozytäre Zelle; M: Makrophage; SE: späte erythroide Zelle; SG: späte granulozytäre Zelle)
- (B) Verlauf der Zellzahlen während der Differenzierung unter Granulozyten / Makrophagen - Mediumbedingungen (gezählt durch Dr. T. Schroeder)
- (C) Verlauf der Zellzahlen während der Differenzierung unter erythroiden Mediumbedingungen (gezählt durch Dr. T. Schroeder)

B**C**

IV.1.2 Auf RNA-Ebene zeigt sich während der Differenzierungskinetik die charakteristische Regulation von wichtigen myeloischen Transkriptionsfaktoren, Zytokinrezeptoren sowie differenzierungsabhängigen Funktionsproteinen

Northern Blot-Analysen konnten die unterschiedlichen RNA-Mengen für bestimmte, für den Differenzierungsablauf entscheidende Proteine im Verlauf der erythroiden und Granulozyten/Makrophagen (G/M) - Differenzierung darstellen (Abb. 7). Die Ergebnisse entsprachen dabei im Allgemeinen den an anderer Stelle beschriebenen, für FDCP-mix Zellen üblichen Regulationen (Cross et al., 1994).

So kam es während der erythroiden Differenzierung zuerst zu einer Zunahme des Transkriptionsfaktors GATA-1, gefolgt von einer Hochregulation der Erythropoetin-Rezeptor RNA und der β -Globin RNA. Während der G/M - Differenzierung konnte man eine Verdoppelung der PU.1 RNA, und wahrscheinlich damit zusammenhängend eine deutliche Hochregulation des M-CSF-Rezeptors feststellen. C/EBP α und das auf granulozytäre Zellen beschränkte Protein Myeloperoxidase (MPO) waren schon zu Beginn der G/M - Differenzierung deutlich exprimiert, was für einen bestimmten Anteil an Zellen mit bereits begonnener granulozytärer Differenzierung spricht (siehe auch differentielle Auszählung). In terminalen, granulozytären Stadien werden diese beiden Gene erwartungsgemäß kaum noch exprimiert.

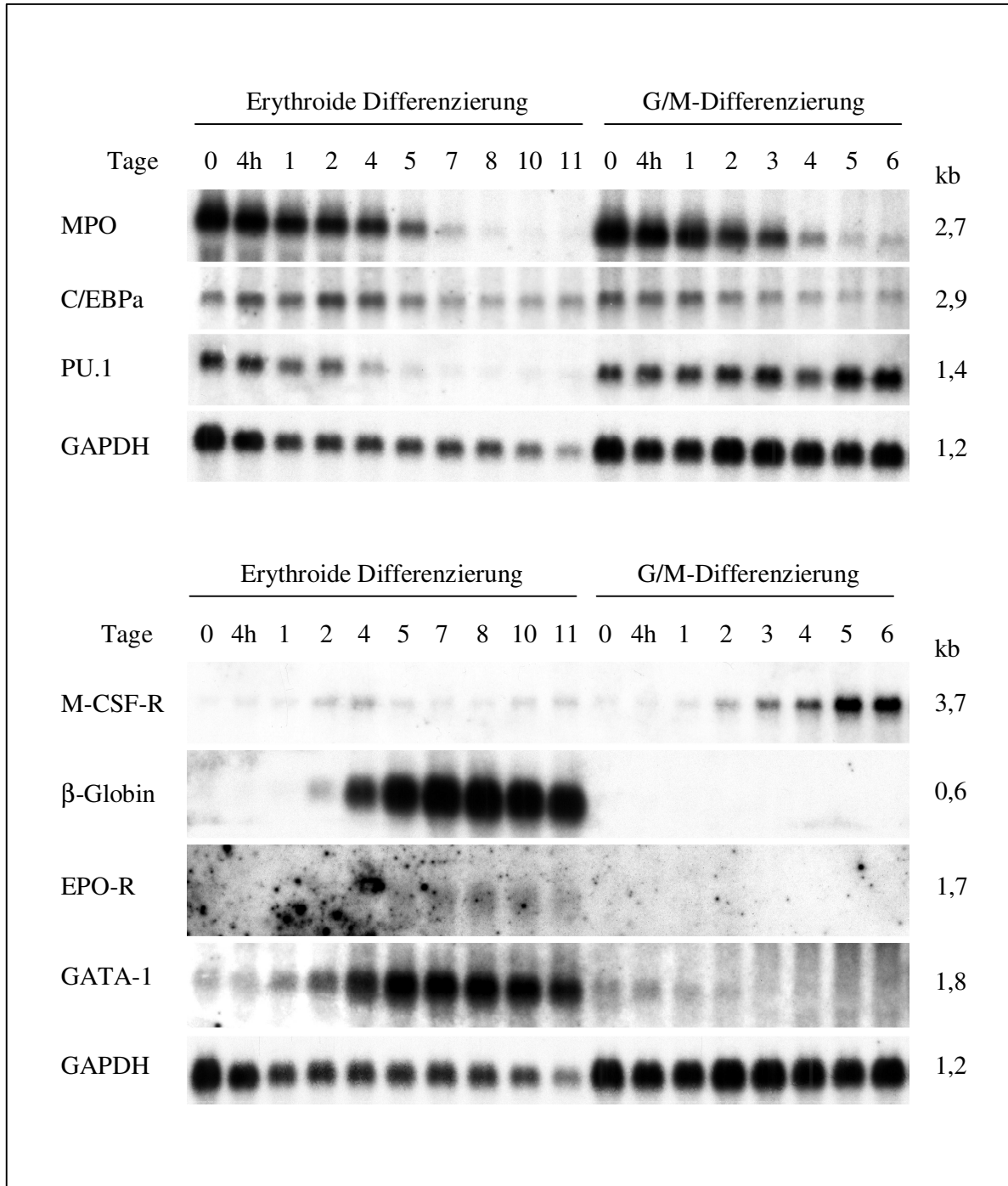


Abbildung 7: Northern Blot Analyse wichtiger myeloischer Gene im Verlauf der Differenzierung

FDCP-mix A7 Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen kultiviert. Durch Änderung der Mediumbedingungen wurde eine Differenzierung in Erythrozyten bzw. Granulozyten und Makrophagen erreicht. Die Gesamt-RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Änderung der Mediumbedingungen isoliert. Die untersuchten myeloischen Gene zeigten einen charakteristischen Verlauf ihrer Expression während der jeweiligen Differenzierung. GAPDH ist als Beladungskontrolle dargestellt. Es ist allerdings im Verlauf der erythroiden Differenzierung selbst nicht konstant exprimiert.

IV.2 Effekte von aktiviertem Notch1^{IC} auf die RNA-Expression wichtiger myeloischer Transkriptionsfaktoren, Zytokinrezeptoren, sowie differenzierungsabhängiger Funktionsproteine

Die Untersuchungen von Schroeder und Just (Schroeder und Just, 2000b; Schroeder, 2001) zeigten, dass Notch in 32D und FDCP-mix Zellen Differenzierung induziert. Die molekularen Mechanismen und die Zielgene über die Notch diese Differenzierungsinduktion in diesen beiden Zelllinien erreicht, waren aber völlig unklar. Ich versuchte deshalb einerseits über cDNA Filter Notch-Zielgene in der Myelopoese zu finden, zum Anderen bediente ich mich eines anerkannten Modells (Tenen et al., 1997, siehe Einleitung Abb. 2) über verschiedene wichtige Transkriptionsfaktoren und Zytokinrezeptoren der Myelopoese und versuchte im Northern Blot herauszufinden, ob aktiviertes Notch1^{IC} hierauf einen regulativen Effekt hat. Da zuerst ein optimaler Zeitpunkt nach Notchaktivierung herausgefunden werden musste, an dem die Genexpression im Vergleich zum Ausgangslevel vor Notchaktivierung auf den cDNA Filtern untersucht werden sollte, wurden zunächst Versuche mit Kinetik-Northern-Blots durchgeführt. Für diese Kinetiken wurden für die 32D Zellen zwei unabhängige Klone mit Tamoxifen induzierbarem Notch (32DrNERTneo21 und 32DrNERTneo31) und ein Kontrollklon (32Drneo1) (Schroeder und Just, 2000b) verwendet. Für die FDCP-mix A7 Zellen wurden vier unabhängige Klone mit induzierbarem Notch (A7rNERTneo24/25/26/32) sowie ebenfalls ein Kontrollklon (A7rneo3) (Schroeder, 2001) untersucht. Die Aktivierung von Notch wurde mit je zwei unterschiedlichen OHT-Konzentrationen durchgeführt: 50nM – die gleiche Konzentration, die Schroeder und Just für die Untersuchung der biologischen Effekte verwendet hatten. Damit erreicht man aber noch nicht die maximal mögliche Notchaktivierung. Diese liegt entsprechend einer Sättigungskinetik um 1µM OHT (Schroeder, persönliche Mitteilung). Daher wurde diese relativ hohe Konzentration zusätzlich verwendet, um eine möglichst hohe Sensitivität in den Genexpressionsanalysen zu erreichen. Die Zellen wurden dabei in gleichbleibendem IL-3 Medium gehalten, so dass die OHT-Zugabe die einzige Änderung darstellte. Die RNA wurde bis 32h nach OHT-Zugabe an bis zu neun Zeitpunkten isoliert, um dann im Northern Blot einen möglichst exakten Verlauf der molekularen Notcheffekte zu erhalten.

IV.2.1 Effekte von aktiviertem Notch1^{IC} auf die Expression der myeloischen Transkriptionsfaktoren PU.1, C/EBP α und GATA-1

IV.2.1.1 Aktiviertes Notch1^{IC} induziert PU.1 Expression in 32D Zellen

PU.1 ist der entscheidende Transkriptionsfaktor für die Differenzierung von multipotenten Knochenmarksstammzellen in Makrophagen, aber auch wichtig für die granulozytäre Differenzierung (siehe oben). In zwei unabhängigen Versuchen mit je zwei 32DrNERTneo Klonen und einem rneo Kontrollklon, sowie einem weiteren unabhängigen Versuch mit einem 32DrNERTneo Klon und einem Kontrollklon konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass Notch1^{IC} die Expression von PU.1 hochreguliert. Die Hochregulation begann bereits nach 2h und war 4h nach Notch-Aktivierung mit etwa dem Vierfachen des Ausgangslevels deutlich zu quantifizieren (Abb. 8). Die Konzentration von OHT (50 nM oder 1 μ M) hatte dabei keinen nennenswerten Einfluss auf die PU.1 Regulation.

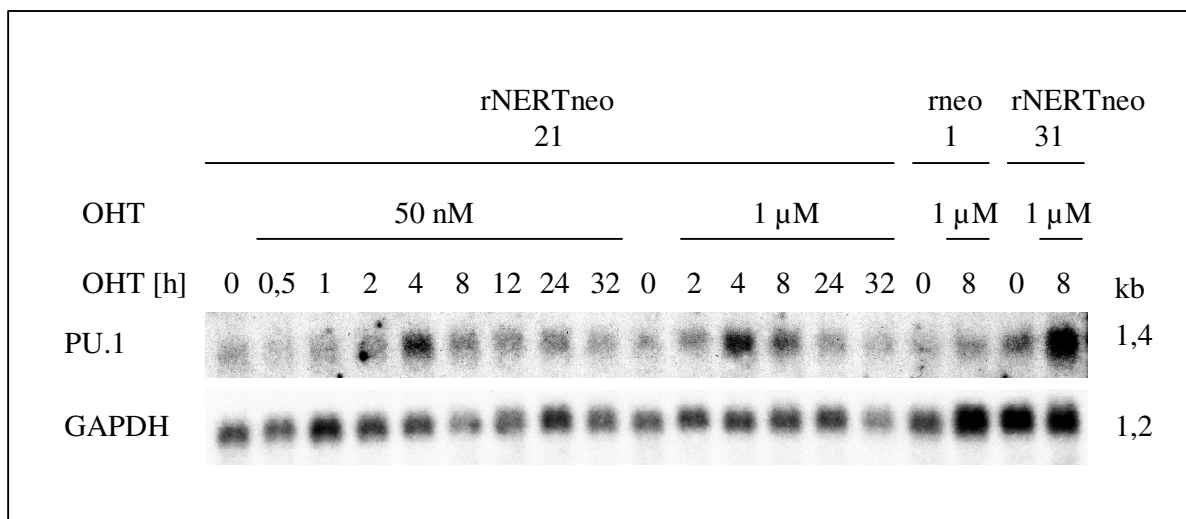


Abbildung 8: Aktiviertes Notch1^{IC} induziert PU.1 Expression in 32D Zellen

32D Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen kultiviert und bis zu 32h mit 50nM bzw. 1 μ M OHT behandelt. Die Gesamt-RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach OHT-Zugabe isoliert. Aktiviertes Notch1^{IC} erhöhte die Menge an PU.1-RNA in den Klonen rNERTneo 21 und rNERTneo 31, jedoch zu keinem Zeitpunkt im Kontrollklon rneo1 (Daten zum Teil nicht gezeigt). GAPDH zeigt die Beladung der Spuren an. Gezeigt ist eins von drei unabhängigen Experimenten mit inhaltlich identischen Ergebnissen.

Der in der Abbildung zu erkennende Rückgang der PU.1 Expression in Klon rNERTneo21 nach 8h korreliert nur zum Teil mit der Beladung, konnte aber in den zwei anderen unabhängigen Versuchen nicht bestätigt werden (Abb. 10a). Im Kontrollklon rneo1 konnte in keinem

Versuch ein Anstieg quantifiziert werden, so dass der Effekt nicht auf einer intrinsischen OHT-Wirkung, sondern lediglich auf der Aktivierung von Notch1^{IC} beruhen konnte.

IV.2.1.2 Aktiviertes Notch1^{IC} induziert PU.1 Expression in FDCP-mix Zellen

Der gleiche Versuch sollte nun für das multipotente myeloische FDCP-mix Zellsystem durchgeführt werden, um herauszufinden, ob Notch auch in dieser frühen Stufe der myeloischen Differenzierung die PU.1-Expression hochreguliert. In zwei unabhängigen Versuchen mit je drei FDCP-mix Klonen mit induzierbarem Notch (A7rNERTneo24/26/32 bzw. A7rNERTneo24/25/32) und einem Kontrollklon (A7rneo3) sowie einem weiteren unabhängigen Versuch mit Klon A7rNERTneo24 und A7rneo3 konnte eine PU.1 Induktion durch Notch gezeigt werden (Abb. 9). Bis auf Klon 32, der in Vorversuchen auch nur eine sehr geringe RBP-J abhängige Transaktivierung und auch nur sehr geringe biologische Effekte nach Notch-Aktivierung durch OHT aufwies (Schroeder, persönliche Mitteilung), zeigten alle A7-Klone mit induzierbarem Notch (A7rNERTneo24/25/26) eine Steigerung der PU.1 Expression nach Notch-Aktivierung durch OHT. Keine Induktion der PU.1 Expression war dagegen im Kontrollklon rneo3 zu erkennen. Am stärksten war die PU.1-Induktion bei Klon 24 und 26. Diese Beobachtung korreliert mit der Tatsache, dass diese beiden Klone auch die höchste Spontandifferenzierung in die granulozytär / monozytäre Richtung besitzen, so dass bei ihnen möglicherweise eine erhöhte Ansprechbarkeit auf Differenzierungssignale in diese Richtung vorliegt.

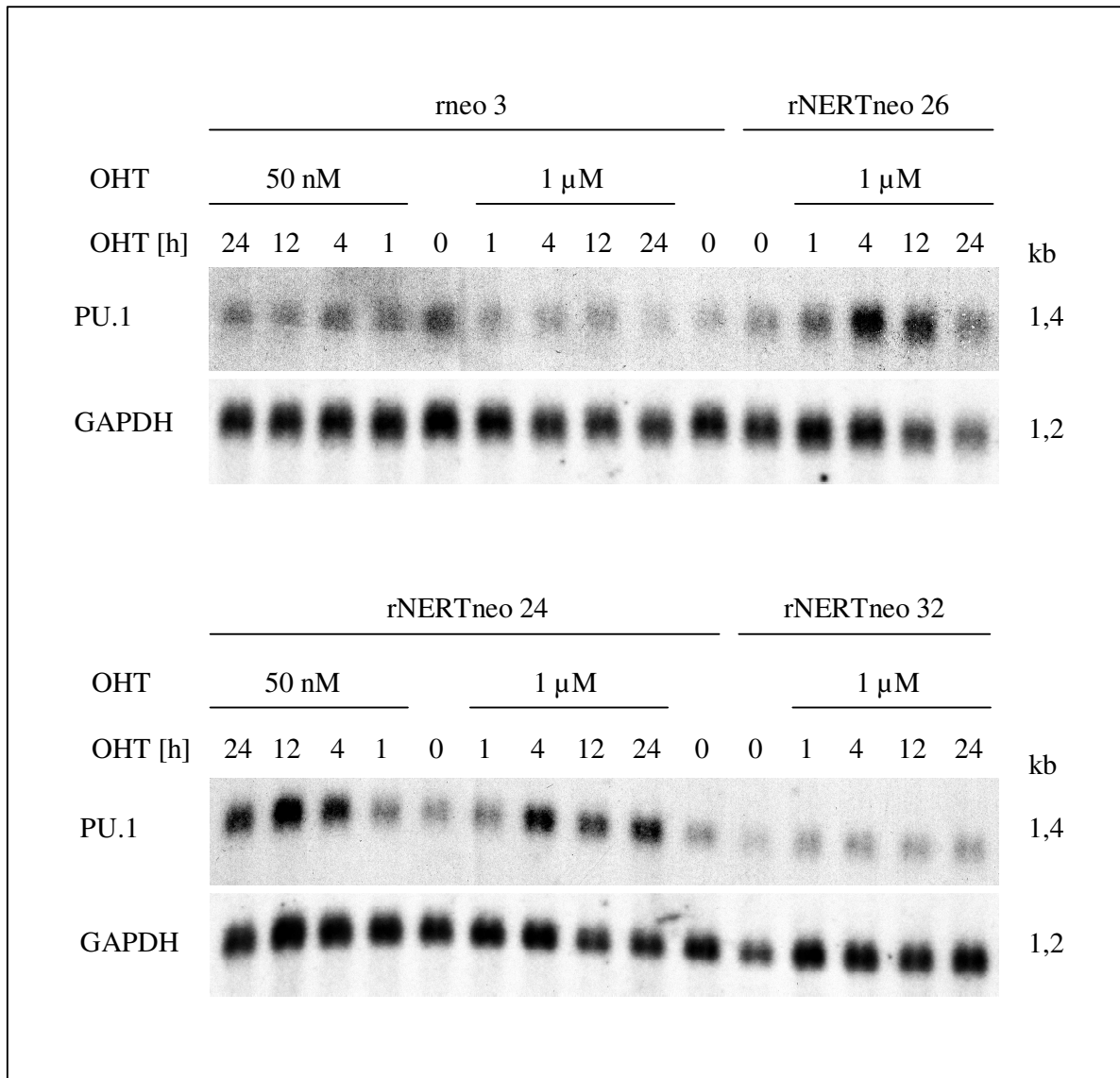


Abbildung 9: Aktiviertes Notch1^{IC} induziert PU.1 Expression in FDCP-mix Zellen

FDCP-mix Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen kultiviert und bis zu 24h mit 50nM bzw. 1μM OHT behandelt. Die Gesamt-RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach OHT-Zugabe isoliert. Aktiviertes Notch1^{IC} erhöhte die Menge an PU.1-RNA in den Klonen rNERTneo 24 und rNERTneo 26, jedoch zu keinem Zeitpunkt im Kontrollklon rneo 3. GAPDH zeigt die Beladung der Spuren an. Gezeigt ist eins von drei unabhängigen Experimenten mit inhaltlich identischen Ergebnissen.

Die Induktion betrug im Durchschnitt der drei unabhängigen Versuche für Klon 24 vier Stunden nach OHT-Zugabe das 2,3fache des Ausgangslevels, was im Bereich der Induktion von PU.1 während einer zytokingesteuerten Differenzierung liegt (siehe Abb. 7). Dieser Wert stieg bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 24h im Durchschnitt auf das 2,6fache an (Tabelle 1). Auch in FDCP-mix Zellen zeigte die höhere OHT-Konzentration von 1μM in Bezug auf die PU.1 Induktion kaum einen Unterschied zur niedrigeren OHT-Konzentration

von 50nM. Allenfalls kann eine geringe Beschleunigung der PU.1 Induktion nach 4h bei der höheren OHT-Konzentration vermutet werden.

[h] nach OHT-Zugabe	rneo 3 [OHT] 50 nM	rneo 3 [OHT] 1 μ M	rNERTneo 24 [OHT] 50 nM	rNERTneo 24 [OHT] 1 μ M
0h	1	1	1	1
1h	1.1		1.1	
4h	1	0.9	2.1	2.4
12h	0.9		2.5	
24h	1.1	0.7	2.6	2.6

Tabelle 1: Aktiviertes Notch1^{IC} induziert PU.1 Expression in FDCP-mix Zellen

Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen PU.1 Expression bezogen auf das Ausgangsniveau bei 0h aus je zwei unabhängigen Versuchen für Klon A7rneo 3 und A7rNERTneo 24. Es bestehen hinsichtlich der PU.1 Induktion nur geringe Unterschiede zwischen der Notchaktivierung durch 50 nM bzw. 1 μ M OHT. Keine Induktion im Kontrollklon rneo 3. Quantifizierung mittels AIDA Image Data Analyser Software, Normalisierung auf GAPDH Expression.

IV.2.1.3 PU.1 ist ein direktes Notch-Zielgen

Um der Frage nachzugehen, ob PU.1 ein direktes Zielgen von Notch ist, oder ob Notch erst andere Proteine induzieren muss, welche dann ihrerseits die PU.1 Expression steigern, wurde Cycloheximid eingesetzt. Cycloheximid blockiert die Proteinsynthese, so dass nach Aktivierung von Notch durch Tamoxifen nur direkte Notcheffekte im Northern Blot ablesbar sind, da potentiell dazwischengeschaltete Proteine nicht synthetisiert werden können. Für dieses Experiment wurden für die 32D Zellen die Klone 32Drneo1(Kontrolle) und 32DrNERTneo21, sowie für die FDCP-mix Zellen Klon A7rneo(Kontrolle) und Klon A7rNERTneo24 verwendet. Es wurde RNA zu den Zeitpunkten 0, 4, 8, 24 Stunden nach OHT Zugabe mit bzw. ohne Cycloheximid-Behandlung isoliert. Es zeigte sich jedoch, dass FDCP-mix Zellen den Einfluss von Cycloheximid über 24h nicht überlebten, so dass kein 24hWert der RNA dieser Zelllinie unter Cycloheximid-Behandlung gewonnen werden konnte.

Um einen möglichen stabilisierenden Einfluss von Cycloheximid auf die RNA der untersuchten Gene berücksichtigen zu können, wurde zu obigen Zeitpunkten auch RNA nach alleiniger Zugabe von Cycloheximid ohne OHT-Zugabe isoliert.

Im Northern Blot bleibt auch unter Cycloheximid-Einwirkung die PU.1 Induktion durch Notch sowohl in 32D, als auch in FDCP-mix Zellen sichtbar, so dass PU.1 als ein direktes

Notch-Zielgen anzusehen ist (Abb. 10). Cycloheximid selbst hatte zwar zusätzlich einen stabilisierenden Effekt auf die PU.1 mRNA, welcher aber durch die Kontrollwerte, bei denen ausschließlich Cycloheximid und kein OHT zugesetzt wurde, abgeglichen werden konnte.

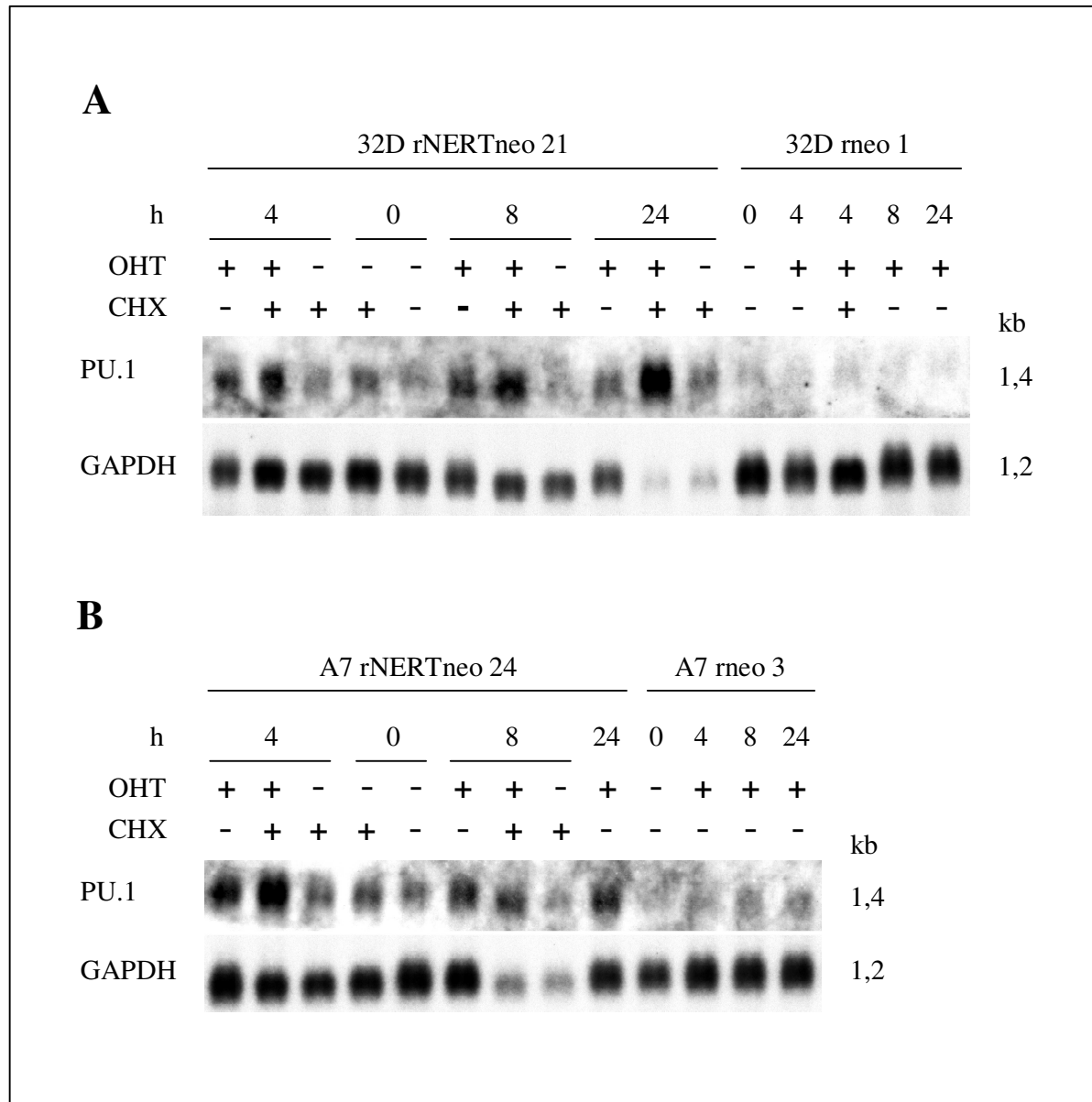


Abbildung 10: PU.1 ist ein direktes Notch-Zielgen

32D Zellen (A) und FDCP-mix Zellen (B) wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen kultiviert und bis zu 24h mit 1 μ M OHT behandelt. Zur Unterbindung der Translation wurde, wo angegeben, Cycloheximid (CHX) zugesetzt. Die Gesamt-RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach OHT-Zugabe isoliert. Auch ohne die Möglichkeit der Proteinsynthese erhöhte aktiviertes Notch1^{IC} die Menge an PU.1-RNA. Der stabilisierende Effekt von CHX auf die PU.1 RNA muss berücksichtigt werden. Keine Zunahme der PU.1-RNA nach OHT-Zugabe wurde in den Kontrollklonen rneo1 bzw. rneo 3 gefunden. GAPDH zeigt die Beladung der Spuren an.

IV.2.1.4 Aktiviertes Notch1^{IC} zeigt keinen Effekt auf C/EBP α Expression

Nachdem die PU.1 Expression durch Notch reguliert wird, war es von großem Interesse, ob auch die beiden anderen bedeutenden myeloischen Transkriptionsfaktoren C/EBP α und GATA-1 durch Notch reguliert werden.

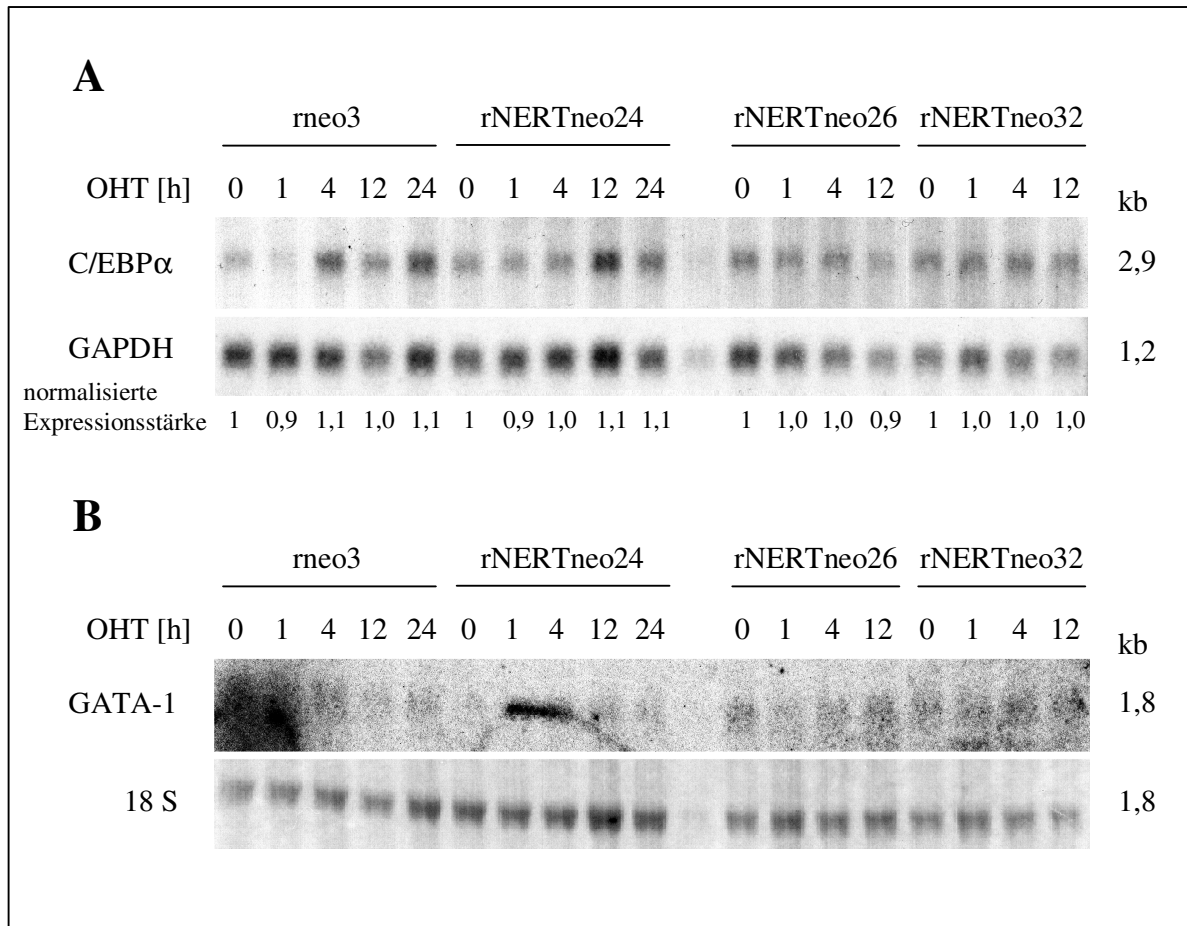


Abbildung 11: Aktiviertes Notch1^{IC} zeigt keinen Effekt auf GATA-1 und C/EBP α Expression

FDCP-mix Klone A7rNERTneo 24, 26 und 32 sowie A7 rneo 3 wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen kultiviert und bis zu 24h mit 1 μ M OHT behandelt. Die Gesamt-RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach OHT-Zugabe isoliert.

- (A) Aktiviertes Notch1^{IC} hatte in keinem der untersuchten Klone einen Effekt auf die Expression der C/EBP α RNA. GAPDH zeigt die Beladung der Spuren an. Wegen der relativ starken Beladungsschwankungen ist die auf GAPDH normalisierte und auf das jeweilige Ausgangsniveau vor OHT-Zugabe bezogene relative Expressionsstärke von C/EBP α angegeben.
- (B) GATA-1 RNA war in den untersuchten Klonen nur schwach exprimiert und wurde durch aktiviertes Notch1^{IC} nicht reguliert. 18S-Ethidiumbromid-Färbung des Agarosegels zeigt die Beladung der Spuren an.

Schließlich hatte Notch nicht nur einen Einfluss auf die Differenzierung von myeloischen Stammzellen in Richtung Makrophagen, sondern beschleunigte auch die Differenzierung in Granulozyten und Erythrozyten (Schroeder und Just, 2000b; Schroeder, 2001; Schroeder et al., 2003), was durch eine alleinige Hochregulierung von PU.1 schwierig zu erklären ist. Im Northern Blot konnte für C/EBP α aber weder in den 32D Klonen 32DrNERTneo21 und 31 noch in den FDCP-mix Klonen A7rNERTneo24/26/32 eine Regulation durch Notch erkannt werden. Während sich im FDCP-mix-System aber in zwei Versuchen eine deutliche nicht regulierte Bande für C/EBP α im Northern darstellte (Abb. 11a), war C/EBP α im 32D-System nicht in detektierbarer Menge exprimiert.

IV.2.1.5 Aktiviertes Notch1^{IC} zeigt keinen Effekt auf GATA-1 Expression

GATA-1 ist ein Haupttranskriptionsfaktor der erythroiden Line. Ob seine Expression durch Notch reguliert ist, sollte im Northern Blot untersucht werden. Es zeigte sich, dass GATA-1 mRNA in undifferenzierten FDCP-mix Zellen nur schwach exprimiert ist. Notch-Aktivierung hatte in den drei A7rNERTneo Klonen 24, 26, 32 soweit beurteilbar keinen Einfluss auf die GATA-1 Expression (Abb. 11b). In 32D Zellen war GATA-1 stärker exprimiert, seine Expression jedoch auch nicht durch Notch reguliert (Daten nicht gezeigt).

IV.2.2 Effekte von aktiviertem Notch1^{IC} auf die Expression der Zytokinrezeptoren M-CSF-Rezeptor, G-CSF-Rezeptor und Erythropoetin-Rezeptor

IV.2.2.1 Aktiviertes Notch1^{IC} induziert M-CSF-Rezeptor Expression

Aus der Literatur war bekannt, dass PU.1 die Transkription des M-CSF-Rezeptors induziert (Zhang, 1994). Es lag daher nahe, auch die Expression des M-CSF-Rezeptors nach Aktivierung von Notch1^{IC} zu untersuchen. In zwei unabhängigen Experimenten konnte für FDCP-mix Zellen gezeigt werden, dass die M-CSF-Rezeptor mRNA vor Notchaktivierung im Northern Blot nicht detektiert werden kann, sie etwa ab 4h nach Notchaktivierung hochreguliert wird und bis zum Ende des Versuchszeitraums von 24h stetig ansteigt (Abb. 12b). Ein entsprechendes Ergebnis lieferte ein Experiment für 32D Zellen, wobei hier der Beobachtungszeitraum 32h nach Notchaktivierung betrug, über den hinweg die M-CSF-Rezeptor Expression stetig zunahm (Abb. 12a).

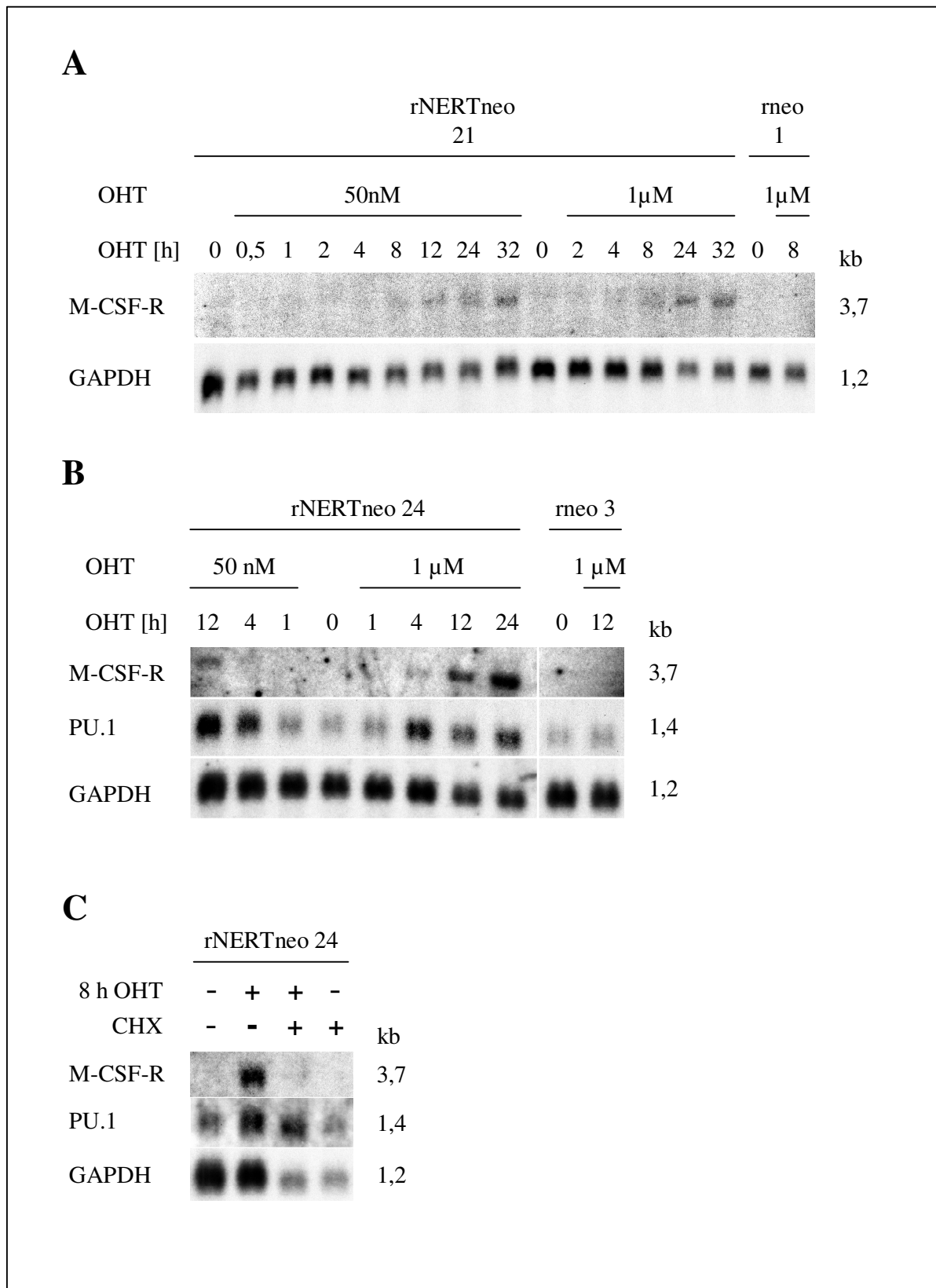


Abbildung 12: Der M-CSF-Rezeptor ist ein indirektes Notch-Zielgen

32D Zellen (A) und FDCP-mix Zellen (B und C) wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen kultiviert und bis zu 32h mit 50nM bzw. 1 μ M OHT behandelt. Die Gesamt-RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach OHT-Zugabe isoliert.

- (A) Aktiviertes Notch1^{IC} erhöhte die Menge an M-CSF-Rezeptor RNA in 32D Zellen.
- (B) Aktiviertes Notch1^{IC} erhöhte die Menge an M-CSF-Rezeptor RNA in FDCP-mix Zellen. Um den möglichen Zusammenhang mit der Hochregulation von PU.1 RNA zu verdeutlichen, ist diese nochmals dargestellt.
- (C) Der M-CSF-Rezeptor ist ein indirektes Zielgen von Notch in FDCP-mix Zellen. Gezeigt ist die Northern Blot Analyse 8h nach OHT-Zugabe. Zur Unterbindung der Translation wurden die Zellen, wo angegeben, mit Cycloheximid (CHX) behandelt. Dies verhinderte den induktiven Effekt von aktiviertem Notch1 auf die Expression des M-CSF-Rezeptors.

IV.2.2.2 Der M-CSF-Rezeptor ist ein indirektes Notch-Zielgen

Es sollte nun mittels des Einsatzes von Cycloheximid untersucht werden, ob der M-CSF-Rezeptor ein direktes oder indirektes Notch-Zielgen ist. Cycloheximid verhinderte die Hochregulation des M-CSF-Rezeptors im Klon A7rNERTneo24, während dieser Klon in den Spuren ohne Cycloheximid-Behandlung 8h nach Notch-Aktivierung eine deutliche Induktion des M-CSF-Rezeptors verzeichnete (Abb. 12c). Damit ist der M-CSF-Rezeptor ein indirektes Zielgen von Notch und wird vermutlich über PU.1 hochreguliert.

IV.2.2.3 Effekte von aktiviertem Notch1^{IC} auf die Expression des G-CSF-Rezeptors

Die mRNA-Expression des G-CSF-Rezeptors war in mehreren Versuchen sowohl in 32D Zellen als auch in FDCP-mix Zellen unterhalb der Detektionsschwelle des Northern Blots, obwohl beide Zelllinien auf G-CSF reagieren. Dies ist jedoch als eine allgemein bekannte Tatsache anzusehen (Ursula Just, persönliche Mitteilung). Eine Aussage über mögliche Effekte von aktiviertem Notch auf die Expression des G-CSF-Rezeptors kann deshalb hier nicht getroffen werden (siehe dazu auch Kapitel IV.3).

IV.2.2.4 Effekte von aktiviertem Notch1^{IC} auf die Expression des Erythropoetin-Rezeptors

Auch der Erythropoetin-Rezeptor ist auf RNA Ebene in undifferenzierten FDCP-mix-Zellen im Northern Blot nicht detektierbar. Erst im Laufe der erythroiden Differenzierung wird seine Bande sichtbar (siehe Differenzierungskinetik, Abb. 7). Aussagen über Effekte von aktiviertem Notch1^{IC} auf die Expression des Erythropoetin-Rezeptors sind deshalb hier nicht möglich (siehe dazu auch hier Kapitel IV.3).

IV.2.3 Effekte von aktiviertem Notch1^{IC} auf die RNA-Expression der differenzierungsabhängigen Proteine Myeloperoxidase und β -Globin

IV.2.3.1 Aktivierung von Notch1^{IC} führt nach 12h zu einer Verringerung der Myeloperoxidase mRNA

Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym der Immunabwehr, welches ausschließlich in myeloischen Zellen gefunden wird. MPO-mRNA wird während der myeloischen Differenzierung auf Stufe der Myeloblasten, Promyelozyten und Promonozyten hochreguliert, verschwindet dann aber während der weiteren Reifung wieder (Rosmarin et al., 1989). Aufgrund dieser starken Assoziation der mRNA-Menge zur myeloischen Differenzierung war es interessant, welchen Einfluss Notchaktivierung hierauf haben würde. In zwei unabhängigen Experimenten für Klon A7rNERTneo24 und einem Experiment für die Klone A7rNERTneo26 und 32 kam es im Northern Blot zu einer starken Verminderung der MPO-Expression ab 12h nach Notchaktivierung zum Teil bis zum völligen Verschwinden des RNA-Signals (Abb. 13). Im Kontrollklon A7neo3 war ein Rückgang in der MPO-Expression nicht zu verzeichnen, jedoch fiel ein allgemein erniedrigtes Expressionsniveau für MPO im Vergleich zu den NERT-Klonen auf. Das durchgeführte Cycloheximid-Experiment konnte keine weitere Erkenntnis bringen, da Cycloheximid selbst das Northern Blot Signal von MPO völlig auslöschte (Daten nicht gezeigt). Versuche in 32D Zellen zeigten uneinheitliche Ergebnisse. Während es in einem Versuch zu einem Rückgang der MPO-Expression nach Notchaktivierung kam, zeigte der unabhängige Wiederholungsversuch gleichbleibende MPO-mRNA Mengen (Daten nicht gezeigt).

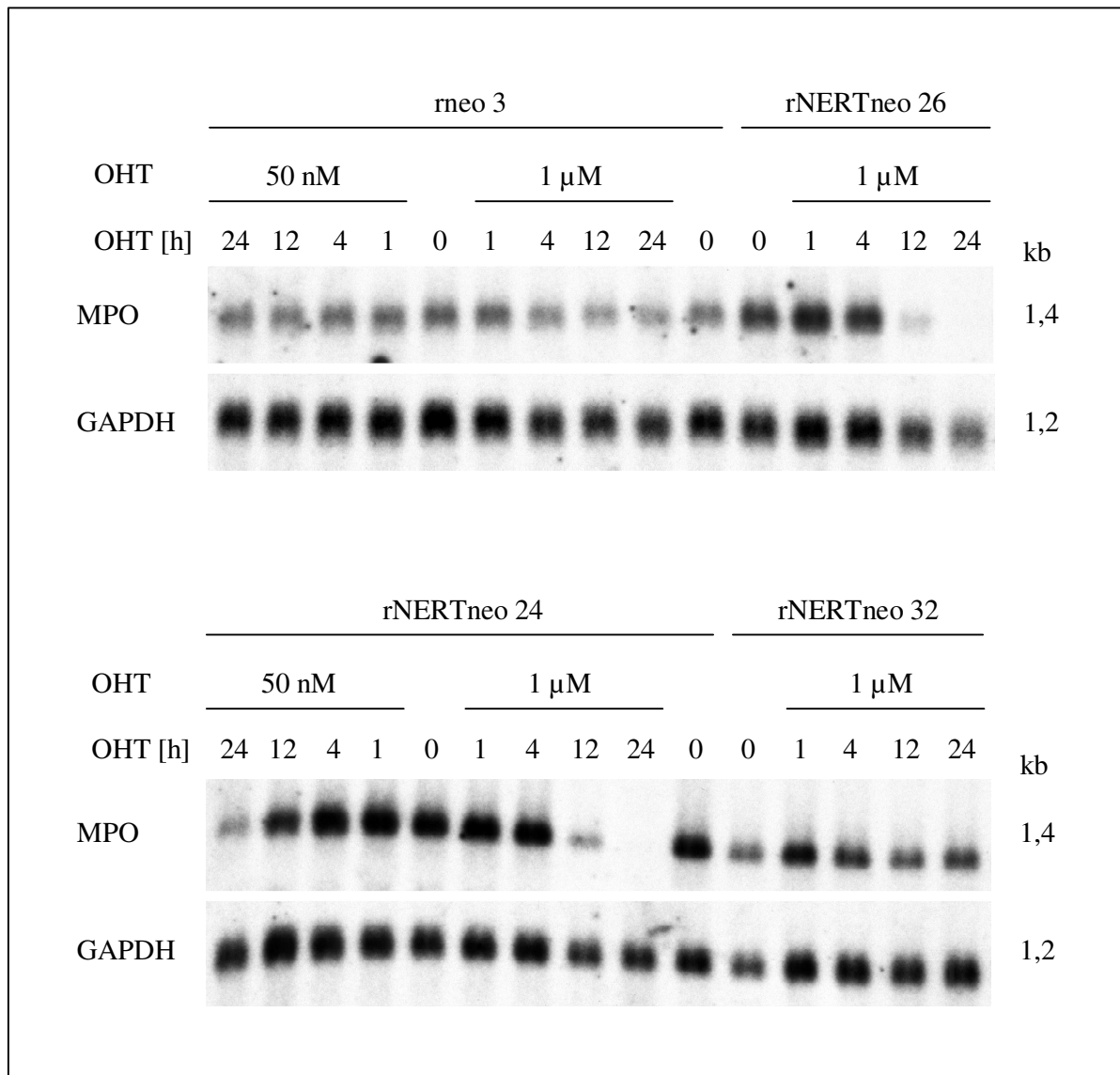


Abbildung 13: Aktiviertes Notch1^{IC} führt zur Verringerung der MPO-Expression in FDCP-mix Zellen

FDCP-mix Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen kultiviert und bis zu 24h mit 50nM bzw. 1μM OHT behandelt. Die Gesamt-RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach OHT-Zugabe isoliert. Etwa 12h nach Notchaktivierung verringerte sich die Menge an Myeloperoxidase (MPO) - RNA in allen drei rNERTneo Klonen. Kein Effekt war dagegen im Kontrollklon rneo 3 zu erkennen. Gezeigt ist eins von zwei unabhängigen Experimenten mit inhaltlich identischen Ergebnissen.

IV.2.3.2 Aktivierung von Notch1^{IC} führt zu einer leichten Erhöhung der β-Globin Expression

Da Notch die Differenzierung von multipotenten myeloischen Vorläuferzellen unter Niedrig-IL-3- und Erythropoetin-Bedingungen auch in Richtung der Erythrozyten beschleunigt (Schroeder, 2001) und RBP-J an die Lokus-Kontroll-Region (LCR) des β-Globin-Gens bindet

(Lam und Bresnick, 1998), stellte sich die interessante Frage, ob Notch über den RBP-J-Signalweg die Expression des β -Globin-Gens erhöhen kann. In zwei hierzu durchgeführten unabhängigen Versuchen konnte 4h nach Notchaktivierung eine leichte Erhöhung der β -Globin Expression auf etwa das 1,6fache im FDCP-mix-Klon A7rNERTneo24 festgestellt werden (Abb. 14). Unter Cycloheximid-Bedingungen fiel diese Erhöhung geringer aus.

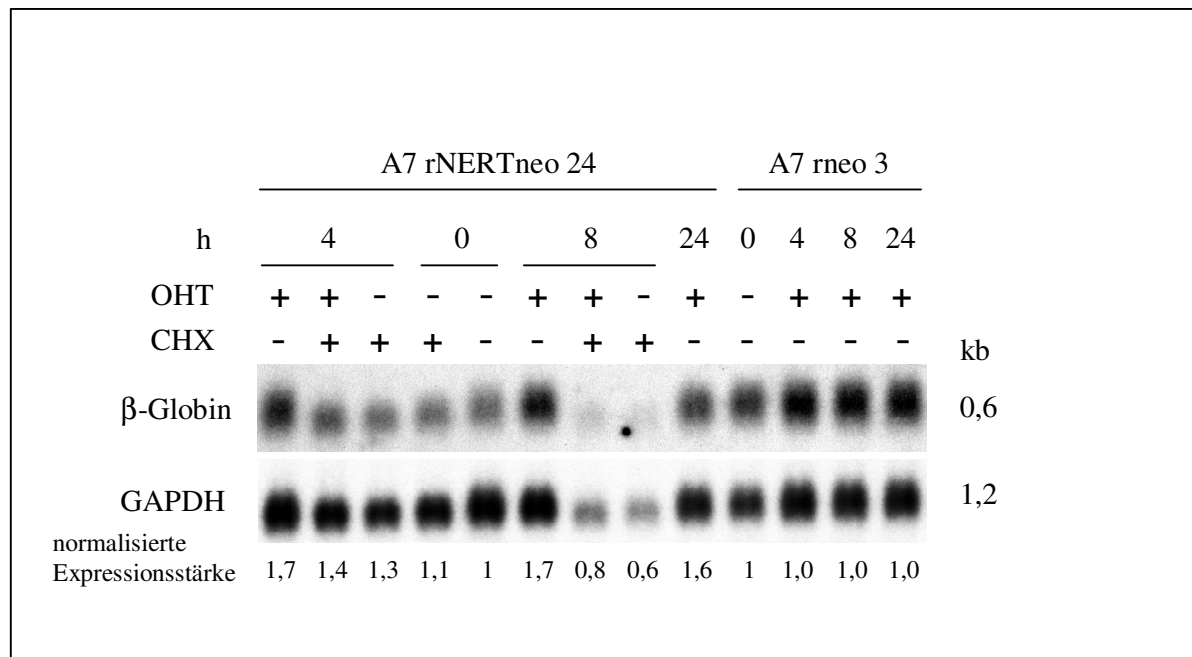


Abbildung 14: Aktiviertes Notch1^{IC} erhöht leicht die β -Globin Expression

FDCP-mix Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen kultiviert und bis zu 24h mit 50nM bzw. 1 μ M OHT behandelt. Zur Unterbindung der Translation wurde, wo angegeben, Cycloheximid (CHX) zugesetzt. Die Gesamt-RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach OHT-Zugabe isoliert. Aktiviertes Notch1^{IC} erhöhte leicht die β -Globin Expression in Klon A7rNERTneo 24, jedoch nicht im Kontrollklon rneo 3. Diese Erhöhung fiel unter CHX-Bedingungen geringer aus. Wegen der relativ starken Beladungsschwankungen und der nur leichten Expressionsänderungen ist die auf GAPDH normalisierte und auf das jeweilige Ausgangsniveau vor OHT- und CHX-Zugabe bezogene relative Expressionsstärke angegeben.

Diese Ergebnisse können allerdings nur einen Hinweis auf einen tatsächlichen induktiven Effekt von Notch1 auf die Expression des β -Globin-Gens geben. Eine endgültige Aussage kann man sich von entsprechenden Expressionsanalysen unter erythroiden Zellkulturbedingungen (Niedrig-IL-3 plus Erythropoetin) erwarten, bei denen diese Effekte unter Umständen deutlich verstärkt auftreten, da auch der beschleunigende Effekt der Notchaktivierung auf die erythroide Differenzierung nur unter diesen Bedingungen zu registrieren war.

IV.3 Notch Zielgene aus der Analyse von Atlas cDNA Filtern

IV.3.1 Versuchsprinzip

Nachdem im Northern Blot gezielt nach dem Einfluss von Notch auf die Expression einzelner Gene, welche in der Differenzierung und Proliferation myeloischer Zellen bekanntermaßen eine wichtige Rolle einnehmen, geforscht wurde, sollte nun mit einer Screening-Methode eine größere Auswahl an Genen auf eine mögliche Regulation durch Notch untersucht werden. Dafür wurden der Atlas cDNA Filter Mouse1.2 und der Atlas cDNA Filter Mouse1.2 II (Clontech,USA) verwendet. Auf diesen Nylon-Filtern sind jeweils 1176 cDNA Fragmente (200-600bp lang) angeordnet. Sie repräsentieren ein breites Spektrum gut charakterisierter Gene aus wichtigen zellulären Signalwegen und Funktionen u.a. aus den Bereichen Onkogene, Tumorsuppressorgene, Zellzyklus, Apoptose, Transkriptionsfaktoren und DNA bindende Proteine, intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle, Rezeptoren und Zelloberflächenantigene. Der Atlas cDNA Filter Mouse1.2 II wurde nach dem Atlas cDNA Filter Mouse1.2 entwickelt und enthält deshalb im Vergleich zu seinem Vorgänger die etwas weniger gut bekannten Gene.

Mit den Atlas-Filtern ist es möglich, die unterschiedlichen Genexpressionsprofile zweier Zellreihen oder zweier unterschiedlicher Zustände einer Zellreihe miteinander zu vergleichen. Bezogen auf die Fragestellung meiner Promotionsarbeit bedeutete dies, das Genexpressionsprofil vor und nach Notchaktivierung in FDCP-mix Zellen zu vergleichen. Nach Auswertung der Northern Blot Ergebnisse für PU.1 und den M-CSF-Rezeptor wurde Klon A7rNERTneo24 wegen der am deutlichsten zu beobachtenden Induktion dieser beiden Zielgene als Versuchsklon für die Atlas Filter ausgewählt. Außerdem sollte auch der Klon A7rneo3 als Kontrolle auf den Atlas Filtern untersucht werden. Als Zeitpunkt nach Notchaktivierung wurde der 4h-Wert gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die PU.1-Induktion schon fast vollständig erreicht war und es außerdem noch ein relativ früher Zeitpunkt ist, bei dem man vor allem primäre Notch-Zielgene ermitteln sollte. Andererseits dürfte man gemäß den Northern Blot Daten auch bei einem Teil der sekundären Zielgene wie dem M-CSF-Rezeptor nach 4h schon eine leichte Veränderung der Expression feststellen. Der Versuchsablauf der cDNA-Filter Analyse ist in Abbildung 15 beschrieben.

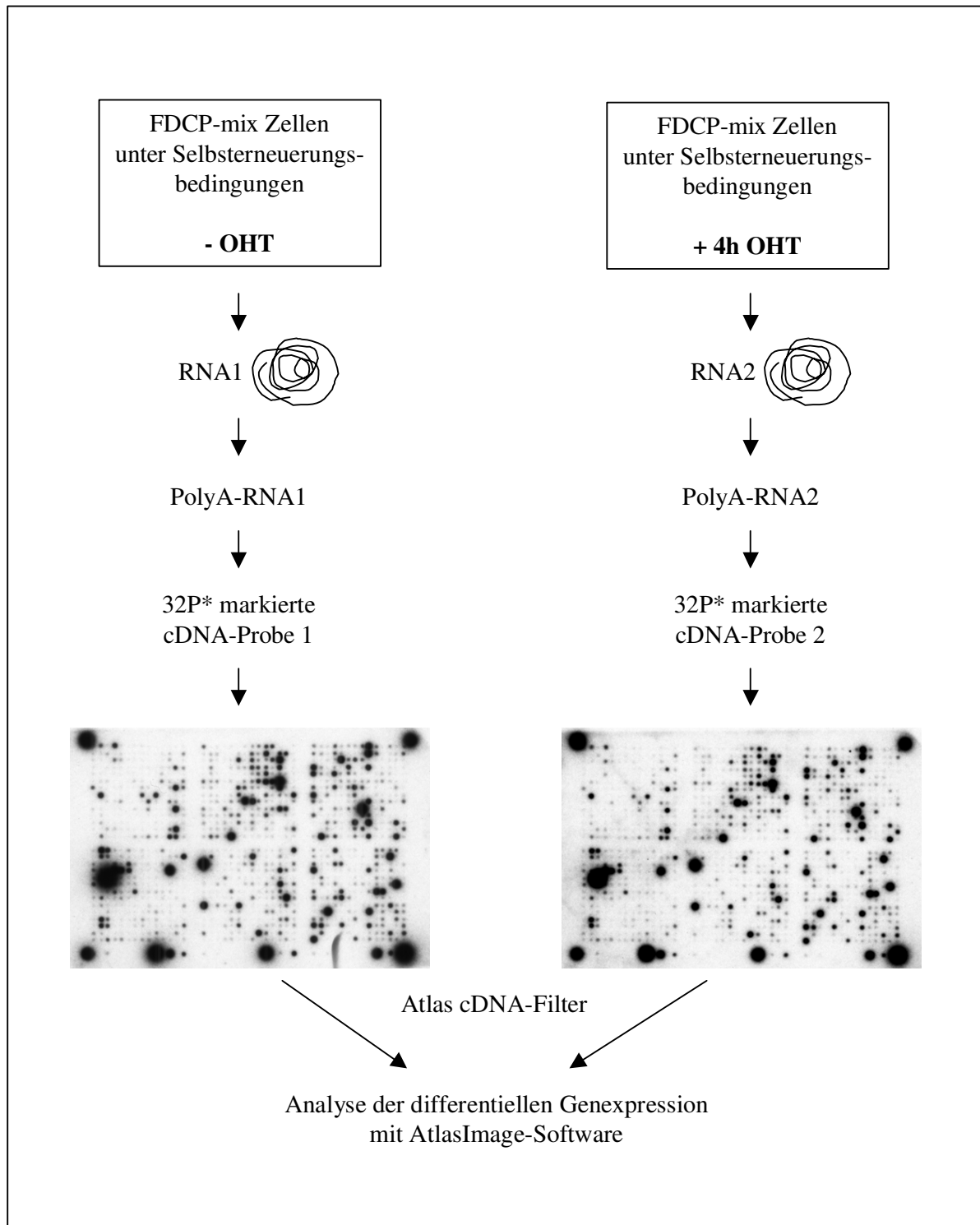


Abbildung 15: Versuchsablauf der cDNA-Filter Analyse

FDCP-mix Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen kultiviert und Gesamt-RNA vor und 4h nach Notchaktivierung durch 1 μ M OHT isoliert. Nach DNase Behandlung und PolyA-Anreicherung wurden die Proben in cDNA transkribiert, mit ³²P radioaktiv markiert und getrennt auf die Filter hybridisiert. Nach stringenter Waschen konnten die Genexpressionen mittels Phosphorimager oder Autoradiographie visualisiert und anschließend mit einem Computerprogramm ausgewertet werden.

IV.3.2 Auswertung der Atlas cDNA Filter

Zur Auswertung wurde ein eigenes Computerprogramm - AtlasImage 1.5 (Clontech, USA) - verwendet. Dieses wertet anhand einer Schablone die Expressionsstärken jedes einzelnen Gens aus und gibt einem die Möglichkeit, die verschiedenen Expressionsprofile gegeneinander zu vergleichen. Das Programm gibt für jedes Gen einen auf ganze Zahlen gerundeten Absolutwert der Intensität an. Zudem legt es die Hintergrundschwärzung des Filters fest und zieht diese vom Absolutwert ab. Beim Vergleich zweier Expressionsprofile kann das Programm die Gesamtintensitäten beider Filter miteinander vergleichen und durch einen Normalisierungsfaktor aneinander angleichen. Hintergrundberechnung und Normalisierung führen zum Absolutwert „berichtigte Intensität“. Durch Bildung des Quotienten aus berichtigter Intensität einer Genexpression nach Notchaktivierung zu berichtigter Intensität einer Genexpression vor Notchaktivierung erhält man das Verhältnis, mit dem bestimmte Gene durch Notch hoch- bzw. herunterreguliert werden.

Folgende Eckwerte wurden - zum Teil auch nach Empfehlung des Herstellers - festgelegt:

- Expression über Hintergrundlevel: Ein Gen wurde als exprimiert angesehen, wenn die berichtigte Intensität mindestens das Zweifache des Hintergrundlevels erreichte.
- Hoch- bzw. Herunterregulation: Ein Gen wurde als durch Notch hoch- bzw. herunterreguliert angesehen, wenn sich der Absolutwert „berichtigte Intensität“ um mindestens das Zweifache des Hintergrundlevels veränderte und der Quotient aus berichtigter Intensität nach Notchaktivierung zu berichtigter Intensität vor Notchaktivierung mindestens 2,0 bzw. 0,5 betrug.

Da es vorkam, dass das Programm den Hintergrundlevel mit dem Absolutwert 0 berechnete, musste in diesem Fall per Augenschein entschieden werden, ab wann eine Signalstärke als tatsächliche Expression eines Gens zu zählen war. Für eine anerkannte Hoch - bzw. Herunterregulation war in diesem Fall eine Änderung der berichtigten Intensität um den Absolutwert 2 eine Voraussetzung. Aufgrund der genannten Kriterien konnte folgende Übersichtsdarstellung der Ergebnisse aus jeweils zwei unabhängigen Versuchen für die cDNA Filter Atlas Mouse1.2 I und II vor und nach Notchaktivierung im Klon A7rNERTneo24 angefertigt werden (Abb. 16).

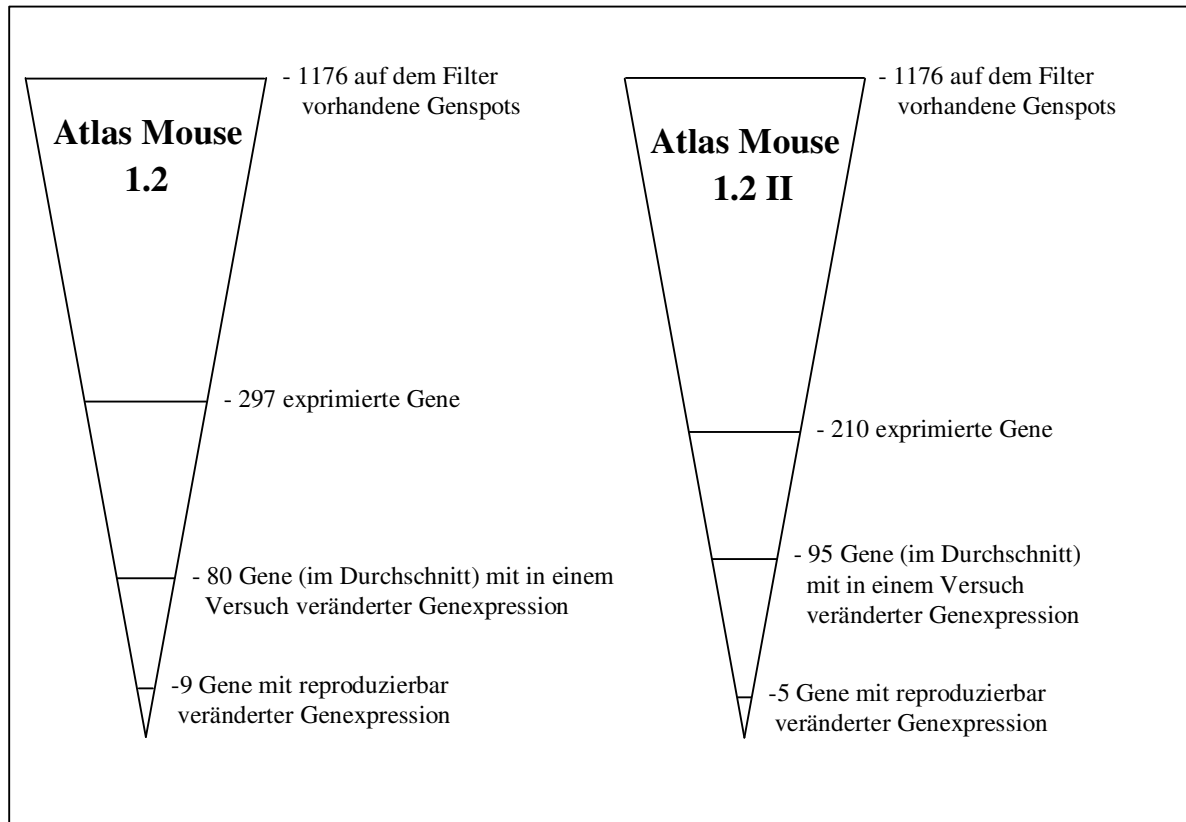


Abbildung 16: Übersicht der Versuchsergebnisse mit Atlas cDNA Expressionsfiltern

Dargestellt sind schematisch die Ergebnisse aus je zwei unabhängigen Versuchen mit Klon A7rNERTneo24 auf den cDNA Expressionsfiltern Atlas Mouse 1.2 und Atlas Mouse 1.2 II. Es wurde die Veränderung der Genexpression 4h nach Notchaktivierung durch OHT untersucht. Als exprimiert wurde ein Gen gewertet, wenn die berichtigte Intensität in beiden unabhängigen Versuchen das Zweifache des Hintergrundlevels betrug. Eine Genexpression galt nach Notchaktivierung als verändert, wenn sich der Absolutwert „berichtigte Intensität“ um mindestens das Zweifache des Hintergrundlevels veränderte und der Quotient aus berichtigter Intensität nach Notchaktivierung zu berichtigter Intensität vor Notchaktivierung mindestens 2,0 bzw. 0,5 betrug.

Somit wurden nach zwei Versuchsdurchgängen insgesamt 14 Gene identifiziert, welche durch Notch reproduzierbar mindestens zweifach reguliert wurden. Bei diesen 14 Genen wurde per Augenschein bestätigt, dass es sich um tatsächliche Änderungen der Signalintensität des zugehörigen Genspots handelt und nicht etwa um Überstrahlungen durch angrenzende Spots oder andere Hintergrundunterschiede. Außerdem wurde das Atlas-Experiment auch mit dem Kontrollklon A7rneo3 auf dem Atlas cDNA Filter Mouse1.2 vor und nach OHT-Zugabe durchgeführt. Als Ergebnis konnten bei allen reproduzierbar regulierten Genen auf diesem Filter intrinsische Effekte durch OHT ausgeschlossen werden. Die 14 durch Notch mindestens zweifach regulierten Gene sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die verschiedenen Bezeichnungen der Gene wurden aus dem AtlasImage-Programm übernommen. Für jedes dieser 14 Gene werden vergrößerte Teilausschnitte der dazugehörigen Region des Filters vor und nach

Notchaktivierung gezeigt (Abb.17). Anzumerken ist, dass PU.1 auf keinem der beiden Filter aufgetragen war, und daher keine Daten zur PU.1-Regulation aus den cDNA-Filter-Experimenten gewonnen werden konnten.

A

Atlas Mouse 1.2

Protein / Gen	Verhältnis ^a	Verhältnis ^a	Intensität ^b	Intensität ^b
	1.Versuch	2.Versuch	- / + OHT 1.Versuch	- / + OHT 2.Versuch
c-Fms proto-oncogene; macrophage colony stimulating factor 1 (CSF-1) receptor	2.9	n.d.	7/20	n.e./3
interferon regulatory factor 1 (IRF1)	2.3	3,0	15/34	2/6
interleukin 1 receptor antagonist	2.2	n.d.	5/11	n.e./2
tumor necrosis factor receptor 2 precursor (TNFR2);	2.1	4,0	27/58	1/4
HMG-box transcription factor from testis (MusSox17)	2,0	3,0	4/8	1/3
AT motif-binding factor (ATBF1)	2,0	3,0	5/10	1/3
helix-loop-helix factor hairy & enhancer of split 1 (HES1)	n.d.	n.d.	n.e./7	n.e./4
MSG-related protein 1 (MRG1); melanocyte specific gene 2 (MSG2);	0.5	0.5	175/88	25/12
c-myc proto-oncogene	0.5	0.5	274/134	37/19

Tabelle 2: Notch-Zielgene aus der Analyse der Atlas-Expressionsfilter

Dargestellt sind diejenigen Gene der cDNA Filter Atlas Mouse 1.2 (**Tab. A**) und Atlas Mouse 1.2 II (**Tab. B**), deren berichtigte Intensität 4h nach OHT-Zugabe in beiden unabhängigen Versuchen auf mindestens das Zweifache des Ausgangswertes erhöht bzw. auf mindestens die Hälfte reduziert wurde und deren berichtigte Intensität sich mindestens um das Zweifache des Hintergrundlevels veränderte. Gene, deren berichtigte Intensität weniger als das Zweifache des Hintergrundlevels betrug, galten als nicht exprimiert (n.e.). Das Verhältnis der berichtigten Intensität vor und nach OHT-Zugabe war in diesem Fall nicht definiert (n.d.). Bei diesen Genen war die absolute Änderung der berichtigten Intensität um mehr als das Zweifache des Hintergrundlevels maßgebend. Die Änderung der Signalintensität wurde in allen Fällen per Augenschein bestätigt. Die Durchführung des Atlas Experiments

mit dem Kontrollklon rneo3 auf dem Filter Atlas Mouse 1.2 zeigte bei keinem der oben angegebenen Gene dieses Filters eine relevante Änderung der Genexpression nach OHT-Zugabe.

^a Verhältnis der berichtigten Intensität (Definition siehe Text) nach OHT-Zugabe zur berichtigten Intensität vor OHT-Zugabe

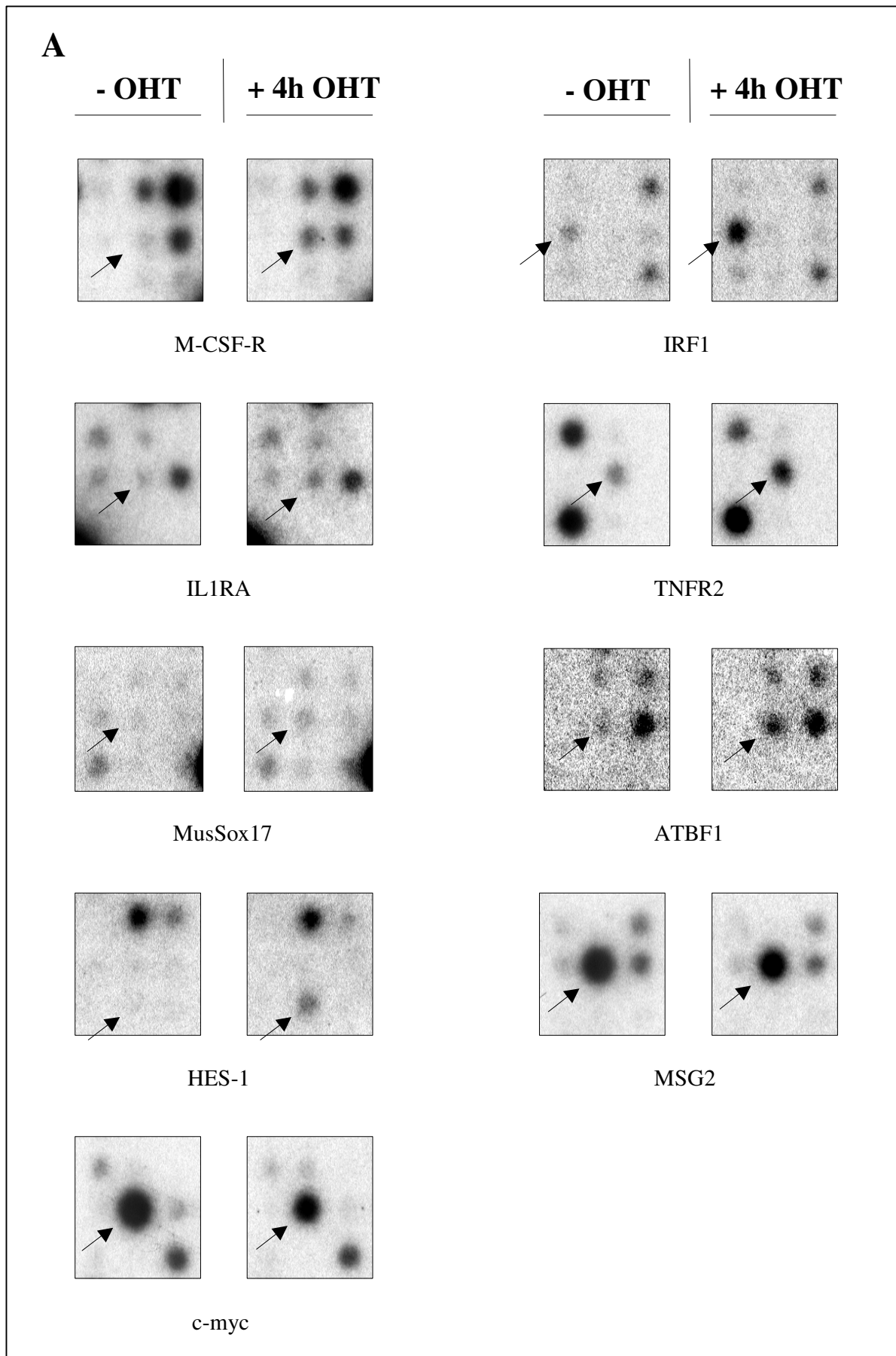
^b Absolutwerte der berichtigten Intensität vor / nach OHT- Zugabe

B

Atlas Mouse 1.2 II

Protein / Gen	Verhältnis ^a		Intensität ^b	
	1.Versuch	2.Versuch	- / + OHT 1.Versuch	- / + OHT 2.Versuch
calpain 5 (CAPN5)	3,0	n.d.	3/9	n.e./4
caspase 6 (CASP6); MCH2	2,0	n.d.	2/4	n.e./3
coagulation factor II receptor (CF2R); thrombin receptor	0.5	0.4	11/6	12/5
myeloblastosis proto-oncogene (MYB)	0,4	0,5	5/2	6/3
high mobility group protein I	0,4	0,5	14/5	8/4

Bei den zugrunde gelegten Kriterien dieser Auswahl an Genen dürfte es sich nun mit großer Wahrscheinlichkeit um echte Zielgene von Notch1 handeln, wobei sie noch durch andere Methoden wie Northern Blot oder quantitative RT-PCR verifiziert werden müssen, was zum Teil schon geschehen ist (siehe Diskussion). Beispielhaft seien hier Ergebnisse des TNFR2 und IL1RA gezeigt, welche auf den im Rahmen meiner Arbeit entstandenen Northern Blots untersucht wurden (Abb.18; Herstellung der Sonden und Hybridisierung Hella Kohlhof). Die beiden Gene konnten hierbei als Zielgene von Notch1 bestätigt werden.



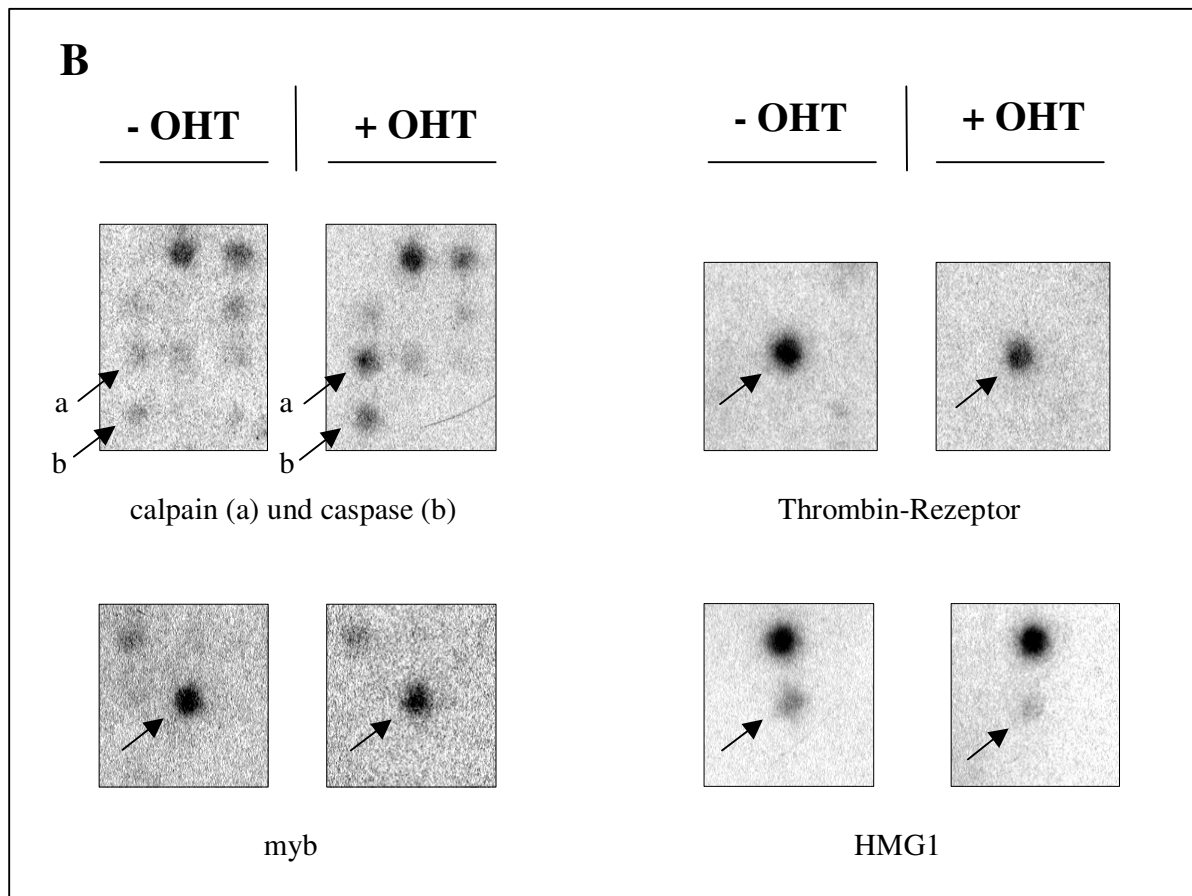


Abbildung 17: Notch-Zielgene auf den Atlasfiltern Mouse1.2 und Mouse1.2 II

Abgebildet sind Detailausschnitte für die 14 regulierten Gene aus Tabelle 2 vor und 4h nach OHT-Zugabe. Die zugehörigen Genspots sind mit Pfeil markiert. Die Belichtungsstärke der umliegenden nicht regulierten Genspots wurde angeglichen, so dass die Veränderung der Genexpression bei den regulierten Genen direkt ersichtlich ist. Es sind die Bilder von einem von zwei Versuchen gezeigt.

(A) Notch-Zielgene auf Atlasfilter Mouse1.2

(B) Notch-Zielgene auf Atlasfilter Mouse1.2 II

Für die Validität der Atlas-Daten spricht u.a. auch, dass zwei der 14 Gene schon als Zielgene von Notch bekannt sind, und zwar zum einen der M-CSF-Rezeptor, der in dieser Arbeit im Northern Blot als Notch-Zielgen identifiziert wurde, und zum anderen HES-1, welches als das am besten bekannte Zielgen des Notch / RBP-J Signalwegs gilt (Jarriault et al., 1995).

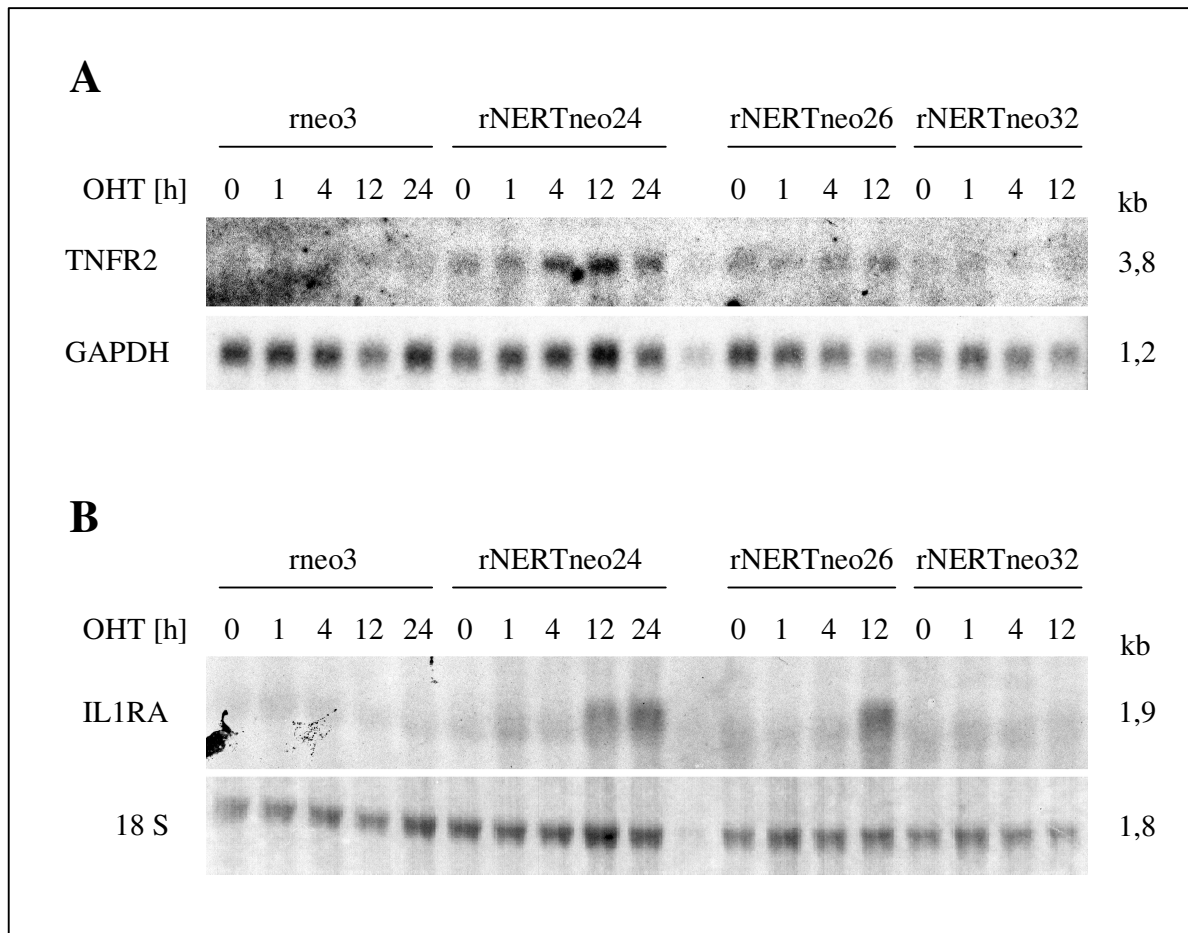


Abbildung 18: Aktiviertes Notch1^{IC} induziert Expression des TNFR2 und IL1RA in FDCP-mix Zellen

FDCP-mix Zellen wurden unter Selbsterneuerungsbedingungen kultiviert und bis zu 24h mit 1 μ M OHT behandelt. Die Gesamt-RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach OHT-Zugabe isoliert. Herstellung der Sonden und Hybridisierung Hella Kohlhof (Kohlhof, 2002).

- (A) Aktiviertes Notch1^{IC} erhöhte die Menge an TNFR2-RNA in den Klonen rNERTneo 24 und rNERTneo 26, jedoch zu keinem Zeitpunkt im Kontrollklon rneo 3. GAPDH zeigt die Beladung der Spuren an.
- (B) Aktiviertes Notch1^{IC} erhöhte die Menge an IL1RA-RNA in den Klonen rNERTneo 24 und rNERTneo 26, jedoch zu keinem Zeitpunkt im Kontrollklon rneo 3. Die Ethidiumbromid-Färbung der 18S-RNA zeigt die Beladung der Spuren an.

Neben diesen relativ deutlich regulierten Genen sollen hier zusätzlich Gene angegeben werden, welche 4h nach Notchaktivierung zwar nur leicht, jedoch reproduzierbar reguliert waren. Die Grenzen für die Änderung des Absolutwertes wurden hierbei belassen (s.o.), um reine Hintergrundschwankungen nicht zu erfassen. Die Schwelle für die relative Änderung der Expression nach Notchaktivierung wurde jedoch auf 1,4fach bzw. 1/1,4fach (= 0,71fach) in beiden Versuchen gesenkt. Dieser Wert wurde gewählt, da Northern Blot Experimente einer Mitarbeiterin unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben, dass relative Änderungen dieser Grö-

Benennung, wie sie zum Beispiel bei dem nukleären Protein Prothymosin α in diesem Atlas Experiment vorhanden waren, durchaus im Northern Blot reproduziert werden können (Kohlhof, 2002). Durch diese Herabsetzung des Schwellenwerts von 2,0 auf 1,4 konnten weitere 14 Gene identifiziert werden, welche als potentiell durch Notch reguliert anzusehen sind (Tab.3). Von besonderer Bedeutung ist bei diesen Werten natürlich eine Bestätigung im Northern Blot.

A

Atlas Mouse 1.2

Protein / Gen	Verhältnis ^a	Verhältnis ^a	Intensität ^b	Intensität ^b
	1.Versuch	2.Versuch	- / + OHT 1.Versuch	- / + OHT 2.Versuch
cyclin D2 (G1/S-specific)	0.7	0.5	28/20	8/4
prothymosin alpha (PTMA)	0.7	0.6	1038/725	167/101
c-myb proto-oncogene protein	0.5	0.6	91/48	9/5
mitochondrial matrix protein P1 precursor; p60 lymphocyte protein; 60-kDa chaperonin; heat shock 60-kDa protein (HSP60);	0.4	0.7	40/16	6/4

Tabelle 3: Durch die Herabsetzung des Schwellenwertes der relativen Expressionsänderung von 2,0 auf 1,4 wurden weitere 14 potentielle Notch-Zielgene identifiziert.

Dargestellt sind diejenigen Gene der cDNA Filter Atlas Mouse 1.2 (**Tab. A**) und Atlas Mouse 1.2 II (**Tab. B**), deren berichtige Intensität 4h nach OHT-Zugabe in beiden unabhängigen Versuchen auf mindestens das 1,4fache des Ausgangswertes erhöht bzw. auf mindestens das 1/1,4fache reduziert wurde und deren berichtige Intensität sich mindestens um das Zweifache des Hintergrundlevels veränderte. Die Änderung der Signalintensität wurde in allen Fällen per Augenschein kontrolliert.

^{a, b}: siehe Tabelle 2

B**Atlas Mouse 1.2 II**

Protein / Gen	Verhältnis ^a		Intensität ^b	
	1.Versuch	2.Versuch	- / + OHT 1.Versuch	- / + OHT 2.Versuch
tumor necrosis factor receptor 1 precursor (TNFR1);	1.7	2.0	12/20	3/6
vasodilator-stimulated phosphoprotein	0.7	0.7	18/12	10/7
low-affinity colony-stimulating factor 2 receptor beta 1 (CSF2RB1)	0.7	0.7	9/6	10/7
importin beta	0.7	0.3	6/4	3/1
low-affinity IgE Fc receptor I alpha	0.6	0.3	14/8	24/8
small inducible cytokine A9	0.4	0.7	7/3	23/15

Mit Hilfe der Atlas Experimente können jedoch nicht nur Ergebnisse zu regulierten Genen gewonnen werden. Es können zum Beispiel auch Aussagen gemacht werden zu Genen, die eine große Bedeutung im Rahmen der Hämatopoese haben, aber auf den cDNA-Filtern nicht durch Notch reguliert sind. Es soll daher nun eine Tabelle gezeigt werden mit einer Auswahl für die Hämatopoese bedeutender Gene, die vor und 4h nach Notchaktivierung in zwei Versuchen entweder keine zu wertende Änderung ihrer Expression zeigen (Tab.4a), oder gar nicht exprimiert sind (Tab.4b). Schließlich soll noch auf die Daten zweier hämatopoetisch wichtiger Gene, EGR1 und Fli-1, eingegangen werden, die eine geringe, aber wiederholte Erhöhung ihrer Expression zeigen (Tab.4c), und somit auch potentielle Zielgene von Notch sein könnten.

A

Protein / Gen	Verhältnis ^a		Intensität ^b	
	1.Versuch	2.Versuch	- / + OHT 1.Versuch	- / + OHT 2.Versuch
CCAAT-binding transcription factor (C/EBP)	0.6	n.d.	7/4	n.e./2
cellular tumor antigen p53	1.0	0.9	23/23	7/6
c-Mpl; thrombopoietin receptor	1.0	2.0	4/4	1/2
endothelial transcription factor GATA-2	0.6	1.0	8/5	2/2
granulocyte colony - stimulating factor receptor precursor (GCSFR)	1.1	n.d.	7/8	n.e./n.e.
granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor precursor (GM-CSF-R)	0.8	1.1	239/190	26/29
H-ras proto-oncogene; p21	0.6	1.3	28/17	4/5
ikaros DNA binding protein	0.8	1.7	23/19	3/5
myeloperoxidase	1.2	0.4	37/44	23/10
NF-kappa-B transcription factor p65 subunit; relA; NFKB3	1.2	1.3	9/11	3/4
nuclear factor kappaB p105 subunit; NFKB1	n.d.	1.0	0/6	2/2
c-jun proto-oncogene; AH119	0.8	1.0	8/6	2/2

B

Protein / Gen

erythropoietin receptor precursor (EPOR)

friend of GATA 1 (FOG); ZFPM1

retinoic acid receptor alpha (RAR-alpha; RARA)

C

Protein / Gen	Verhältnis ^a		Intensität ^b	
	1.Versuch	2.Versuch	- / + OHT 1.Versuch	- / + OHT 2.Versuch
early growth response protein 1 (EGR1);	n.d.	2.0	n.e./5	1/2
Fli-1 ets-related proto-oncogene	1.5	1.2	11/17	5/6

Tabelle 4: Expressionsdaten weiterer Gene mit außerordentlicher Bedeutung für die hämatopoetische Differenzierung

Daten der beiden Atlasfilter Atlas Mouse 1.2 und Atlas Mouse 1.2 II sind in je einer Tabelle zusammengefasst in alphabetischer Reihenfolge dargestellt. Gezeigt sind die Ergebnisse der beiden unabhängigen Versuche. Die ausgewählten Gene sind alle für ihre herausragende Bedeutung in der hämatopoetischen Differenzierung bekannt (zusammengefasst in Shivdasani und Orkin, 1996; Tenen et al., 1997).

- (A) Die gezeigten Gene waren bis auf den G-CSF-Rezeptor in beiden Versuchen exprimiert. Sie wiesen 4h nach OHT-Zugabe nach den zugrunde gelegten Kriterien keine zu wertende Expressionsänderung auf.
- (B) Die gezeigten Gene waren in zwei unabhängigen Versuchen im FDCP-mix Klon A7rNERTneo24 weder vor noch nach OHT-Zugabe nachweisbar exprimiert.
- (C) Die hämatopoetisch wichtigen Gene EGR1 und Fli-1 zeigten in zwei unabhängigen Versuchen 4h nach OHT-Zugabe eine leichte Erhöhung ihrer Genexpression. Bei ihnen war jedoch die Differenz der berichtigten Intensität nach und vor OHT Zugabe zu niedrig, um bei den zugrunde gelegten Kriterien als valide zu gelten, so dass sie in den Tabellen 2 und 3 nicht erscheinen.

^{a, b}: siehe Tabelle 2

Es gab aber auch eine Reihe von bekannten wichtigen Faktoren aus der Hämatopoese (Shivdasani und Orkin, 1996; Tenen, 1997), die auf den Atlas Filtern nicht vorhanden waren, darunter PU.1, GATA-1, Spi-B, AML-1, SCL/TAL1, Evi 1, MZF-1, β -Globin. Außerdem waren mehrere vor Kurzem als Notch-Zielgene erkannte Gene mit zum Teil bekannten Funktionen in der Hämatopoese (prä-TCR α , Igu und CD21) oder ohne bekannte Funktion in der Hämatopoese (HERP bzw. Hey-Gene und Nrarp) ebenfalls auf den Atlas Filtern nicht vorhanden. Über diese Gene konnte deshalb mit der cDNA-Filtertechnik keine Aussage über eine mögliche Regulation durch Notch1 gewonnen werden.

Noch zu erwähnen ist, dass HES-5, ein weiteres wichtiges Zielgen von Notch (Ohtsuka et al., 1999), in zwei Versuchen nicht exprimiert war, und dass im Gegensatz zu HES-1 keine Hochregulation durch Notch festzustellen war. Von besonderem Interesse war auch noch die Genexpression weiterer „interferon regulatory factors (IRF)“. Zu dem in zwei Versuchen deutlich hochregulierten IRF-1 waren noch IRF-2 und IRF-7 auf den Filtern vorhanden. IRF-7 war jedoch in zwei Versuchen nicht exprimiert, wohingegen IRF-2 in beiden Versuchen exprimiert war und dabei einmal nicht durch Notch reguliert und einmal auf das 1,8fache hochreguliert wurde.

V DISKUSSION

Im Rahmen meiner Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass es mit dem Tamoxifen-induzierbaren System möglich ist, Zielgene von Notch1 in der Hämatopoese zu charakterisieren. Von entscheidender Bedeutung für die physiologische Relevanz ist hierbei die Verwendung eines Zellsystems, welches bestmöglich die Bedingungen in primären Blutzellen widerspiegelt. Insbesondere die verwendeten FDCP-mix Zellen, aber auch die nicht leukämischen 32D Zellen zeichnen sich hierdurch aus. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Zelllinien mit unterschiedlichem Differenzierungspotential untersucht, um einerseits unterschiedliche Zielgene von Notch in den verschiedenen Differenzierungsstadien zu erfassen, andererseits aber bei übereinstimmenden Ergebnissen davon ausgehen zu können, keine rein zelllinienspezifischen Effekte abzugreifen. Die zytokingesteuerte Differenzierungskinetik des FDCP-mix A7 Klons konnte darstellen, dass es sich bei den verwendeten Zellen um myeloische Stammzellen handelt, die unter geeigneten Mediumbedingungen u.a. in reife Erythrozyten, Granulozyten und Makrophagen differenzieren. Die zugehörigen Northern Blot Analysen konnten in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (Cross et al., 1994) die differenzierungsabhängige Expression wichtiger myeloischer Transkriptionsfaktoren, Zytokinrezeptoren sowie linienspezifischer Gene zeigen. Dies unterstrich die Eignung von FDCP-mix A7 Zellen für die molekulare Analyse der differenzierungsinduzierenden Wirkung von aktiviertem Notch1.

Eine entscheidende Entdeckung dieser Analyse ist sicherlich die Steigerung der PU.1 Expression durch aktiviertes Notch1^{IC}. PU.1 RNA ist in multipotenten myeloischen Stammzellen gering exprimiert und wird mit Beginn der Granulozyten / Makrophagen - Differenzierung auf etwa das Zwei- bis Dreifache des Ausgangswerts hochreguliert (Abb. 7 und Cross et al., 1994). Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Induktion von PU.1 durch aktiviertes Notch1^{IC} sowohl in den multipotenten myeloischen Stammzellen (FDCP-mix), als auch in den granulozytären Vorläuferzellen (32D) liegt ebenfalls in diesem Bereich. Auch konnte gezeigt werden, dass das Gen für den M-CSF-Rezeptor, ein zentrales Zielgen von PU.1 (Zhang, 1994), welches vor Notchaktivierung in den multipotenten Stamm- und granulozytären Vorläuferzellen nicht exprimiert war, nach Notchaktivierung nun deutlich exprimiert wurde. Im Gegensatz zur PU.1 Induktion war hierfür jedoch Proteinsynthese notwendig und die Steigerung der M-CSF-Rezeptor Expression war gegenüber der von PU.1 zeitlich leicht verzögert. Hingegen hatte die Aktivierung von Notch keinen Einfluss auf C/EBP α , einen weite-

ren wichtigen myeloischen Transkriptionsfaktor, der für die granulozytäre Differenzierung benötigt wird. Dies zeigt zusammen mit den Ergebnissen der Cycloheximid-Versuche, dass Notch spezifisch auf einen hämatopoetischen Transkriptionsfaktor wirkt, und spricht gegen die Möglichkeit, dass PU.1 nur begleitend im Rahmen einer durch Notch induzierten Differenzierung vermehrt exprimiert wird.

Die beschriebenen Ergebnisse auf RNA-Ebene konnten mittlerweile auf Proteinebene im Western Blot (Schroeder et al., 2003) inhaltlich voll bestätigt werden. Im Zusammenhang mit den Daten zur Induktion der myeloischen Differenzierung durch Notch1 (Schroeder und Just, 2000b; Schroeder et al., 2003) wurde daher in unserer Arbeitsgruppe basierend auf früheren theoretischen Überlegungen (Just et al., 1991) ein Modell entwickelt, bei dem es in Blutstammzellen durch Zell-Zell-Kontakte mit Knochenmarksstromazellen zu einer ligandenabhängigen Aktivierung des Notchrezeptors kommt, in deren Folge u.a. die Menge an PU.1 mRNA und Protein erhöht wird. Dies könnte dann der Anstoß zur Expression eines linienspezifischen Genprogramms sein, in dem u.a. Zytokinrezeptoren wie der M-CSF-Rezeptor induziert werden, die die Differenzierung der einstigen Stammzellen zu reifen myeloischen Zellen erlauben. Maßgebliche Unterstützung erfährt dieses Modell durch die Arbeiten von Harinder Singh und Rodney DeKoter zur konzentrationsabhängigen Wirkung des Transkriptionsfaktors PU.1 auf die Entwicklung von B-Zellen und Makrophagen (DeKoter und Singh, 2000). Sie arbeiteten dabei mit PU.1^{-/-} hämatopoetischen Vorläuferzellen aus fetaler Mäuseleber und transfizierten diese mit einem PU.1 und GFP exprimierenden retroviralen Vektor. Retrovirale PU.1 Expression wurde sowohl für die Entwicklung von B-Zellen als auch von Makrophagen benötigt. Entscheidend war jedoch, dass eine niedrige Expression von PU.1 mRNA und Protein mit der Entwicklung von B-Zellen einherging, wohingegen eine hohe Expression mit der Differenzierung zu Makrophagen und dem Block der B-Zell-Entwicklung verbunden war. Eingedenk der Tatsache, dass aktiviertes Notch1^{IC} im lymphatischen System die T-Zellentwicklung fördert und die B-Zellentwicklung in einem frühen Stadium blockiert (Pui et al., 1999), könnte die Induktion von PU.1 durch aktiviertes Notch1^{IC} nicht nur für die Induktion der myeloischen Differenzierung, sondern auch für den Block der B-Zelldifferenzierung verantwortlich sein.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse sind im Lichte der andauernden Diskussion zu bewerten, ob multipotente hämatopoetische Zellen durch Faktoren oder Liganden der natürlichen Umgebung in eine bestimmte Differenzierungsrichtung dirigiert werden (extrinsisches Modell), oder ob solche Faktoren lediglich das Überleben und die Proliferation von Blutzellen ermöglichen, die bereits durch interne stochastische Prozesse auf eine bestimmte

Differenzierungsrichtung festgelegt sind (intrinsisches Modell). Blutzellen vollziehen während ihrer Entwicklung von der undifferenzierten Stammzelle zu den verschiedenen ausdifferenzierten peripheren Formen eine starke Änderung ihres Genexpressionsmusters. Von entscheidender Bedeutung sind hierbei linienbezogene Transkriptionsfaktoren wie PU.1, C/EBP α oder GATA-1. Betrachtet man den Zustand in einer undifferenzierten Stammzelle, so sind dort diese Faktoren zu einem geringen Grad exprimiert. Der Beginn der Differenzierung ist gekennzeichnet durch eine Hochregulation der für eine Linie spezifischen Transkriptionsfaktoren bei gleichzeitiger Inaktivierung der anderen Faktoren. Da bisher für diese frühen Transkriptionsfaktoren trotz intensiver Forschung keine spezifischen extrinsischen Regulationsmechanismen ihrer Genexpression bekannt waren, wurden vor allem stochastische zellinterne Prozesse mit sich verstärkenden Rückkopplungsmechanismen für ihre plötzlich einsetzende, verstärkte Expression verantwortlich gemacht, und damit die Vorstellung einer intrinsischen, stochastischen Regulation der hämatopoetischen Differenzierung unterstützt (zusammengefasst in Cross und Enver, 1997; Tenen et al., 1997; Cantor und Orkin, 2001). Führt man sich jedoch vor Augen, dass Notch1 Rezeptoren in unreifen CD34 positiven Blutstammzellen sowie in myeloischen und lymphatischen Vorläufern vorhanden sind (zusammengefasst in Milner und Bigas, 1999), dass Notchliganden wie Jagged1 in Knochenmarksstromazellen gefunden werden (zusammengefasst in Singh et al., 2000), dass eine Aktivierung von Notch1, sei es durch Ko-Kultur auf ligandenexprimierenden Stromazelllinien oder durch das Tamoxifen-induzierbare System zu einer Induktion der myeloischen Differenzierung führt (Schroeder und Just, 2000b; Schroeder et al., 2003), und dass schließlich die Aktivierung von Notch1 auf molekularer Ebene PU.1 und M-CSF-Rezeptor mRNA und Protein spezifisch induziert, kann man dies als einen deutlichen Hinweis auf eine vornehmlich extrinsisch regulierte hämatopoetische Differenzierung deuten.

Die von Timm Schroeder und Ursula Just erstmals beschriebene Induktion der myeloischen Differenzierung durch aktiviertes Notch (Schroeder und Just, 2000b), die im Widerspruch zu mehreren anderen veröffentlichten Arbeiten steht, welche einen Block der myeloischen Differenzierung durch Notch postulieren (Milner et al., 1996; Li et al., 1998; Varnum-Finney et al., 2000; Kumano et al., 2001), wird durch die in dieser Promotionsarbeit vorgestellten molekularbiologischen Daten nachhaltig unterstützt. Hauptunterschied in den Versuchssystemen ist im Allgemeinen, dass wir ein induzierbares System verwendeten, während die anderen Gruppen eine konstitutiv aktive Form des Notchrezeptors einsetzten. Im letzteren Fall ist die Gefahr gegeben, auf differenzierungsgeblockte Mutanten zu selektionie-

ren, da eine durch konstitutiv aktives Notch stark beschleunigte Differenzierung einen eindeutigen Selektionsnachteil darstellen würde.

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die von Kumano und Kollegen vorgestellte Arbeit (Kumano et al., 2001), die eine aufrechterhaltene GATA-2 Expression für den Block der erythroiden und granulozytären Differenzierung durch ein konstitutiv aktives Notch1^{IC} verantwortlich macht. GATA-2 wird normalerweise während einer zytokingesteuerten Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen herunterreguliert. Dies war nicht der Fall, wenn die Forscher ein konstitutiv aktives Notch1^{IC} in einer Erythroleukämie-Zelllinie bzw. der granulozytären Vorläuferzelllinie 32D exprimierten und darauf selektionierten. Dagegen entsprach in diesen Klonen die Regulation wichtiger anderer hämatopoetischer Transkriptionsfaktoren auf den Differenzierungsstimulus durch geeignete Zytokinbedingungen hin dem Kontrollklon ohne konstitutiv aktives Notch1^{IC}. Bei den in der vorliegenden Doktorarbeit durchgeführten cDNA-Filter Experimenten konnte hingegen 4h nach Notchaktivierung kein Einfluss von Notch1 auf die Expression von GATA-2 gefunden werden (Tab. 4a). Bemerkenswert ist bei den Versuchen von Kumano und Mitarbeitern jedoch noch, dass Überexpression von PU.1, welches die Forscher als Repressor von GATA-2 (Zhang et al., 1999) einsetzten, in den 32D Zellen zur Aufhebung des postulierten Differenzierungsblocks durch aktiviertes Notch1^{IC} führte. Unterstützt durch die in dieser Doktorarbeit vorgelegten Daten sind neben der Repression von GATA-2 zumindest zwei weitere Möglichkeiten der Wirkung von überexprimiertem PU.1 in diesen Zellen denkbar. Zum einen wäre es wiederum möglich, dass bei den verwendeten Klonen differenzierungsgeblockte Mutanten selektioniert wurden und eine Überexpression von PU.1 diesen Differenzierungsblock überwinden kann. Zum Anderen besteht die interessante Möglichkeit, dass das Ausgangsniveau der PU.1-Expression darüber entscheidet, ob aktiviertes Notch1^{IC} in hämatopoetischen Vorläuferzellen eine differenzierungsinduzierende oder differenzierungsblockierende Wirkung hat. Demnach wäre die Wirkung von Notch1 in der Hämatopoese entscheidend vom jeweiligen zellulären Zusammenhang abhängig, was wiederum die Komplexität und Plastizität biologischer Systeme unterstreichen würde. Äußerst aufschlussreich wäre es in dieser Hinsicht, das Ausgangsniveau der PU.1 Expression in den Zellsystemen der verschiedenen sich entgegenstehenden Publikationen zu vergleichen.

Die Induktion der monozytären und granulozytären Differenzierung ist bei einer Induktion von PU.1 durch aktiviertes Notch1^{IC} sehr gut zu verstehen, wenngleich PU.1 zumindest für die granulozytäre Differenzierung nicht der einzige Effektor von Notch sein kann (siehe unten). Schließlich sind auch der M-CSF-Rezeptor, der GM-CSF-Rezeptor und der

G-CSF-Rezeptor gut bekannte Zielgene von PU.1 (Zhang, 1994; Hohaus et al., 1995; Smith et al., 1996). Wie aber ist die Induktion der erythroiden Differenzierung durch Notch1 auf molekularer Ebene zu erklären?

Vermutlich dürfte PU.1 hierfür nicht verantwortlich sein, denn PU.1 interagiert hemmend mit GATA-1, dem entscheidenden Transkriptionsfaktor der erythroiden Linie, indem es seine DNA-Bindung verhindert, und eine Überexpression von PU.1 blockierte die erythroide Differenzierung in der Erythroleukämiezelllinie K562 (Zhang et al., 2000a) und in FDCP-mix Zellen (McIvor et al., 2003). Es dürften also andere, bisher nicht identifizierte Faktoren hierfür ausschlaggebend sein.

Da eine beschleunigte Differenzierung von FDCP-mix Zellen in Erythrozyten durch Aktivierung von Notch1^{IC} nur unter erythroiden Zellkulturbedingungen mit Niedrig-IL-3 und Erythropoetin möglich war (Schroeder, 2001), könnte es sein, dass unter den in dieser Arbeit verwendeten Selbsterneuerungsbedingungen die Zellen auch nicht das Potential besaßen, auf molekularer Ebene spezifische erythroide Veränderungen in erkennbarem Ausmaß zu zeigen. So war z.B. GATA-1 in den untersuchten FDCP-mix Zellen nur minimal exprimiert, eine Regulation durch Notch war nicht zu erkennen. Auch die Versuche zur Regulation des β -Globin-Gens durch Notch1 deuten in diese Richtung. Es war bekannt, dass RBP-J mit hoher Affinität an eine funktionell äußerst wichtige Region der β -Globin-Locus-Kontroll-Region (LCR) bindet (Lam und Bresnick, 1998). Die in meiner Arbeit gefundene, geringe, aber reproduzierbare Erhöhung der β -Globin Expression auf etwa das Eineinhalbfache durch Aktivierung von Notch1^{IC} könnte ein Hinweis auf eine tatsächliche Transaktivierung über die beschriebene RBP-J-Bindungsstelle sein. Vermutlich können jedoch viel umfangreichere und verlässlichere Aussagen über die molekularen Grundlagen der Beschleunigung der erythroiden Differenzierung durch Notch getroffen werden, wenn man die in dieser Arbeit unter Selbsterneuerungsbedingungen dazu durchgeführten Versuche unter erythroiden Bedingungen mit Niedrig-IL-3 plus Erythropoetin wiederholt. In diesem Fall wären auch mögliche sich verstärkende Effekte von Notch und Erythropoetin abgreifbar. Zu weiteren möglichen Gen-Kandidaten, die auf den Atlas Filtern durch Notch reguliert waren und einen differenzierungsbeschleunigenden Effekt auf die erythroide Differenzierung übertragen könnten, möchte ich später noch eingehen.

Sehr interessant war aber auch die in mehreren Versuchen übereinstimmend gefundene deutliche Verminderung der MPO Genexpression in FDCP-mix Zellen ab 12h nach Notchaktivierung. MPO mRNA ist in multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen nicht exprimiert, wird mit Beginn der granulozytären Differenzierung auf ein Maximum im Reifestadi-

um der Promyelozyten hochreguliert und geht danach wieder vollständig zurück (Rosmarin et al., 1989; Ford et al., 1992). Die gezeigte deutliche Expression in den FDCCP-mix A7 Zellen zu Beginn der Differenzierungskinetik spricht für einen relativ großen Teil an Zellen mit bereits begonnener Differenzierung. Somit ist hier nur noch die wieder beginnende Verminderung der MPO-Expression ab Tag 3 der Granulozyten / Makrophagen - Differenzierung zu sehen.

In den Untersuchungen mit aktiviertem Notch1^{IC} wird dieser Prozess erheblich beschleunigt. So beginnt hier schon 12h nach Notchaktivierung der Rückgang der MPO-Expression. Mit den Cycloheximidexperimenten konnte jedoch keine Aussage gewonnen werden, ob dies ein direkter oder indirekter Notcheffekt ist. Die Latenz von 12h spricht jedoch eher für eine indirekte Regulation. Interessant ist dabei, dass PU.1 ein Aktivator der MPO-Expression ist (Ford et al., 1996; Wang et al., 1999). Eine mögliche Erklärung des negativ regulatorischen Effektes auf die MPO-Expression ist sicherlich, dass Notch1^{IC} diejenigen, bisher nicht näher identifizierten Proteine induziert, die für die Unterdrückung der MPO-Expression während der terminalen, zytokingesteuerten Differenzierung verantwortlich sind.

Auffällig war außerdem, dass sich das Ausgangsniveau der MPO-Expression in Klon A7rneo3 und den A7NERT Klonen unterschied. Dies könnte prinzipiell auf eine höhere Rate an Spontandifferenzierung in den A7NERT-Klonen gegenüber dem Kontrollklon A7rneo3 deuten. Da sich die Zellen jedoch morphologisch in Zytospin-Präparaten und in der Expression der anderen untersuchten differenzierungsabhängigen Gene nicht wesentlich unterscheiden, muss diese Möglichkeit als äußerst unwahrscheinlich angesehen werden. Vielmehr dürfte es sich um eine spezifische klonale Varianz der MPO-Expression handeln.

Aus den bisher diskutierten Ergebnissen geht PU.1 als ein entscheidendes Zielgen von Notch in der Hämatopoese hervor. Doch nicht alle Effekte einer Notchaktivierung in multipotenten und granulozytären hämatopoetischen Vorläuferzellen sind damit ausreichend erklärt. So konnte vor Kurzem gezeigt werden, dass die Aktivierung eines PU.1-Östrogen-Rezeptor-Fusionsproteins in 32D Zellen nicht für eine Differenzierung in reife Granulozyten ausreicht (Wang et al., 1999). Einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung weiterer Zielgene von Notch, die u.a. für die Induktion der granulozytären und erythroiden Differenzierung durch Notch mitverantwortlich sein können, konnten die Versuche mit den cDNA Atlasfiltern leisten.

Diese Technik hat sich als eine sehr effektive, verlässliche Screening-Methode herausgestellt. Zuvor bekannte Zielgene von Notch, wie HES-1 oder das Gen für den M-CSF-Rezeptor

wurden mit dieser Methode eindeutig als solche erkannt. Entscheidend für die Validität der Atlasdaten war die Durchführung von je zwei unabhängigen Versuchen für die beiden Atlasfilter Mouse1.2 und Mouse1.2 II. Wiesen nach einem Versuch noch 80 (AtlasMouse1.2) bzw. 95 (AtlasMouse1.2 II) Gene nach Notchaktivierung eine mindestens zweifach veränderte Expression auf, so hatte sich die Zahl nach zwei Versuchen auf 9 bzw. 5 Gene mit reproduzierbar veränderter Expression reduziert. Von diesen 14 Genen wurde eine vorläufige Auswahl von sechs Genen getroffen, die von meiner Kollegin Hella Kohlhof im Northern Blot untersucht wurden (Kohlhof, 2002). Die Sonden dazu wurden mittels PCR anhand von Primern, die bei Clontech zu jedem Gen der Atlasfilter erhältlich sind, hergestellt. Alle sechs Gene bestätigten sich dabei als Zielgene von Notch. Durch die Verwendung von Cycloheximid konnten als direkte Zielgene von Notch der *Interferon Regulatory Factor-1* (IRF-1) und HES-1 bestätigt werden. Indirekt durch Notch reguliert war der Interleukin1-Rezeptor-Antagonist (IL1RA). Wegen sich überlagernden Effekten des Cycloheximids auf die RNA-Stabilität konnte bei *c-myc*, *Myeloblastosis Proto-oncogene* (*myb*) und Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 (TNFR2) nicht geklärt werden, ob die Regulation durch Notch direkt oder indirekt erfolgt. Im Folgenden möchte ich kurz Funktionen dieser im Northern Blot bestätigten Notch-Zielgene nennen und zum Teil ihre mögliche Rolle in der Vermittlung von Notch-Effekten auf multipotente myeloische Stammzellen diskutieren.

Sehr interessante Ergebnisse wurden vor Kurzem für den *Interferon Regulatory Factor-1* (IRF-1) beschrieben, der in unseren Experimenten durch Notch1^{IC} direkt hochreguliert wurde. IRF-1 ist ein basischer Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor, der im Verlauf der Immunantwort und bei Differenzierungs- und Proliferationsentscheidungen in der Hämatopoese regulierend in die Expression verschiedener Gene eingreift (zusammengefasst in Nguyen et al., 1997; Taniguchi et al., 2001). Coccia und Kollegen (Coccia et al., 2001) fanden nun heraus, dass eine Überexpression von IRF-1 in 32D Zellen die granulozytäre Differenzierung unter G-CSF-Bedingungen im Vergleich zu den Kontrollen deutlich beschleunigt. Aber auch ohne G-CSF konnte ein kleiner Anteil der IRF-1 überexprimierenden Zellen im Gegensatz zu den Kontrollen in reife Granulozyten differenzieren. Die Autoren konnten zudem zeigen, dass die IRF-1 Überexpression assoziiert war mit einer deutlichen Verringerung der Expression des *c-myb* Protooncogens, welches auch auf den Atlasfiltern und im Northern Blot nach Notchaktivierung eine reproduzierbare Reduktion seiner Expression aufwies. Die Expression von *c-myb* ist notwendig für das Überleben und die Proliferation von frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen, wohingegen die Herunterregulierung von *c-myb* für die terminale Differenzierung benötigt wird (zusammengefasst in Barreda und Belosevic, 2001). Schon früher wur-

de gezeigt, dass eine Verringerung der c-myb Proteinmenge mittels Expression eines Anti-sense-c-myb-Konstrukts die granulozytäre Differenzierung von 32D Zellen beschleunigen kann (Bellon et al., 1997). Auch in undifferenzierten FDCP-mix Zellen führte die Blockade der myb-Aktivität zu verringerter Selbsterneuerung und Induktion der Differenzierung (White und Weston, 2000). In der Zusammensicht der Daten scheint der beschleunigende Effekt von Notch auf die granulozytäre Differenzierung also zum einen über eine Hochregulation der PU.1 mRNA, zum anderen aber auch über eine vermehrte IRF-1 und eine damit möglicherweise verbundene verringerte c-myb Expression zustande zu kommen.

Gerade die Reduktion der c-myb Expression könnte aber auch ein wichtiger Faktor der Notch-induzierten Differenzierung von multipotenten Zellen in erythroider Richtung sein, da c-myb u.a. über eine blockierende Interaktion mit GATA-1 erythroide Differenzierung hemmt (Takahashi et al., 2000).

Ein ähnliches Expressionsmuster wie c-myb während der hämatopoetischen Differenzierung zeigt der Transkriptionsfaktor c-myc, der aufgrund seiner Überexpression in einer Vielzahl maligner Erkrankungen große medizinische Bedeutung besitzt. In der Hämatopoese ist er in proliferierenden Vorläuferzellen stark exprimiert, und seine Herunterregulation ist notwendig für das Programm zur terminalen Differenzierung (zusammengefasst in Barreda und Belosevic, 2001). Überexpression führt dagegen zu einem Block der terminalen Differenzierung und gesteigerter Proliferation. In unseren Experimenten zeigte sich eine Herunterregulation der c-myc Expression durch aktiviertes Notch1^{IC}, wobei nicht gesagt werden kann, ob dafür Proteinsynthese notwendig ist, da Cycloheximid für sich einen starken stabilisierenden Effekt auf die c-myc Expression ausübt. Die negative Regulation von c-myc durch Notch1 wurde zuvor schon in Burkitt-Lymphom Zellen mit einer t(8;14) Translokation beobachtet, bei denen c-myc durch die Nachbarschaft zu Igu aktiviert ist (Strobl et al., 2000). Der negativ regulierende Einfluss von Notch auf c-myc könnte sowohl für die reduzierte Proliferation als auch für die Induktion der Differenzierung von myeloischen Stamm- und Vorläuferzellen durch aktiviertes Notch1^{IC} (Schroeder und Just, 2000b; Schroeder und Just, 2000a; Schroeder et al., 2003) mitverantwortlich sein.

Ein weiteres durch die cDNA-Filtermethode entdecktes und bereits im Northern Blot bestätigtes Zielgen von Notch1 in FDCP-mix Zellen ist der positiv regulierte Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 (TNFR2). Darüber hinaus war auch der funktionell weitgehend überlappende Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) in den Atlasversuchen nach Notchaktivierung reproduzierbar hochreguliert. Auf TNF α wurde man ursprünglich durch seinen zytotoxischen Effekt auf Maustumoren aufmerksam. Heute gilt er als ein pleiotropes Zytokin mit einer ent-

scheidenden Rolle im Rahmen der Immun- und Entzündungsreaktion. In der Hämatopoese konnte für TNF α je nach Differenzierungsstufe und dem Vorhandensein anderer Zytokine sowohl eine inhibierende als auch eine stimulierende Wirkung auf die Proliferation bestimmter Zellpopulationen festgestellt werden. TNF α kann dabei die Synthese von bestimmten Zytokinen und Zytokinrezeptoren in den Zellen der Hämatopoese induzieren (Rebel et al., 1999). Gerade die Kontextabhängigkeit des Tumornekrosefaktors und damit seiner beiden Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 könnte auf eine biologisch wichtige Verknüpfung mit dem Notchsignalweg hindeuten. Zukünftige Untersuchungen können hier möglicherweise wichtige Erkenntnisse liefern.

Als indirektes, positiv reguliertes Notch-Zielgen konnte der Interleukin1-Rezeptor-Antagonist (IL1RA) identifiziert werden. IL1 ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, das von verschiedenen Zellen im Rahmen der Immunantwort produziert wird und an der Pathogenese von akuten und chronisch entzündlichen Erkrankungen sowie Autoimmunerkrankungen wesentlich beteiligt ist. Der u.a. von Monozyten und Makrophagen produzierte IL1RA kann die Effekte von IL1 selektiv blockieren und somit die Immunantwort regulieren. Er wird z.B. bei Stimulation durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) vermehrt exprimiert. Diese Expressionssteigerung wird u.a. über den Transkriptionsfaktor PU.1 vermittelt, für den im Promotorbereich des IL1RA eine Bindungsstelle vorhanden ist (Smith et al., 1998). Es ist daher gut möglich, dass auch die gefundene indirekte Hochregulation der IL1RA-Expression nach Notchaktivierung durch die gesteigerte PU.1-Expression verursacht wird.

Durch die Atlasversuche konnte außerdem das bekannteste direkte Notch-Zielgen, der Transkriptionsfaktor HES-1, auch in den multipotenten myeloischen Stammzellen FDCP-mix als Notch-Zielgen erkannt werden. Bisher wurde HES-1 innerhalb der Hämatopoese vor allem mit der T-Zell-Entwicklung in Zusammenhang gebracht (siehe II.3.3.4). Über eine Funktion von HES-1 in der Myelopoese ist zur Zeit nichts bekannt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten lassen darauf schließen, dass Notch1 seine Induktion der myeloischen Differenzierung durch Regulation spezifischer in der Hämatopoese zu meist gut bekannter Gene, vor allem aus dem Bereich der Transkriptionsfaktoren und Zytokinsignalwege, erreicht. Hieraus ergeben sich reichhaltige Ansatzpunkte für weitere interessante Untersuchungen.

So sollte man prüfen, ob bei den besprochenen Zielgenen von Notch die Veränderungen auch auf Proteinniveau im Western Blot sichtbar sind. Für PU.1 und den M-CSF-Rezeptor

konnte dies, wie oben erwähnt, schon bestätigt werden (Schroeder et al., 2003). Weiterhin könnte mit der sog. „Run-on“ Technik geprüft werden, ob es sich bei der Induktion von Zielgenen durch Notch definitiv um eine transkriptionelle oder evtl. doch um eine posttranskriptionelle Regulation handelt.

Interessant wäre weiterhin herauszuarbeiten, ob alle direkten Zielgene über RBP-J transaktiviert werden, oder ob für andere Zellsysteme schon beschriebene, alternative Signalwege, z.B. über Deltex, eine Rolle spielen. Dies wäre u.a. durch Verwendung von RBP-J^{-/-} - Zellen durchführbar. Gerade diese Frage ist auch im Hinblick auf die verschiedenen auf den Atlasfiltern negativ regulierten Gene von Bedeutung. Im Falle, dass diese direkt über den Notch / RBP-J Signalweg negativ reguliert werden, wäre dies ein neuer Aspekt jenes Signalwegs, denn bisher ist nur der Genexpression aktivierende Komplex aus RBP-J, Notch und Koaktivatoren beschrieben.

Die Wirkung von Notch wird durch Zytokine, die der Zytokine wiederum durch Notch beeinflusst: IL-3 wirkt der Notchwirkung entgegen, andererseits verstärkt Notch zytokingesteuerte Differenzierung in verschiedene Richtungen (Schroeder und Just, 2000b; Schroeder, 2001; Schroeder et al., 2003). Mit den in dieser Arbeit etablierten molekularbiologischen Untersuchungsmethoden kann die Zielgenanalyse nun relativ schnell unter den verschiedenen Zytokinbedingungen durchgeführt werden, was mögliche Verknüpfungspunkte zwischen dem Notch-Signalweg und den Zytokin-Signalwegen aufzeigen könnte. Dies wäre insbesondere für die Beschleunigung der erythroiden Differenzierung durch aktiviertes Notch1^{IC} von großem Interesse, da diese durch die bisher gefundenen Zielgene nicht ausreichend erklärt ist, auf der anderen Seite aber gerade durch die leichte Erhöhung der β -Globin oder Fli-1 Expression nach Notchaktivierung sich vielversprechende Ansätze bieten.

Entscheidend für kommende Untersuchungen wird aber auch sein, mehr über die Funktion der gefundenen Zielgene in der Myelopoese herauszufinden. Dafür kann ein erster Ansatz sein, die Expression dieser Gene während einer zytokingesteuerten Differenzierung auf den vorliegenden Differenzierungskinetik-Blots zu ermitteln. Darüber hinaus sollten aber funktionelle Tests dieser Gene in den verwendeten FDCP-mix Zellen erfolgen. Dazu kann man die hochregulierten Gene transient überexprimieren und danach u.a. Veränderungen der Morphologie und der Oberflächenmarker beobachten. Diese Untersuchungen sind z.B. unter Verwendung eines Koexpressions- und Sortiersystems auf GFP-Basis recht gut durchzuführen. Die Auswirkungen durch die herunterregulierten Gene können z.B. durch siRNA („small interfering RNA“) -Strategien analysiert werden.

Schließlich soll noch darauf hingewiesen werden, dass bestimmte mit den cDNA-Filtern gefundene Notch-Zielgene (z.B. *melanocyte specific gene2* (MSG2) und *HMG-box transcription factor from testis* (MusSox17)) auch außerhalb der Hämatopoese von Bedeutung sein dürften.

Insgesamt trägt die vorliegende Arbeit dazu bei, die molekularen Mechanismen des Notch-Signalwegs verstehen zu lernen. Notch besitzt viele wichtige Wirkungen in den meisten embryonalen und adulten Geweben. Ein Hauptaspekt ist sicherlich die Regulation der Proliferation und Differenzierung von Stammzellen. Damit hat dieser Rezeptor besondere Bedeutung für die aktuelle Medizin, die große Hoffnungen in die Stammzelltherapie und das „tissue engineering“ legt. Für die Expansion von Stammzellen und die künstliche Anzucht biologischer Gewebe, aber auch für das Verständnis und die daraus möglichen Therapien von benignen und malignen Neoplasien ist ein Wissen über die molekularen Regulationsmechanismen von Proliferation, Differenzierung und Apoptose in Stamm- und Vorläuferzellen essentiell. Hierzu soll meine Promotionsarbeit einen Beitrag leisten.

Im Speziellen wird die Steuerung der hämatopoetischen Differenzierung durch die Ergebnisse dieser Arbeit weiter erfasst. Die Ergebnisse legen eine vornehmlich extrinsische Regulation der hämatopoetischen Differenzierung nahe.

Bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen wie Anämien, Leukämien oder Immundefekten werden seit einiger Zeit Wachstumsfaktoren (z.B. Erythropoetin, G-CSF, GM-CSF) therapeutisch eingesetzt. Diese können aber vermutlich nur das Überleben der jeweiligen Zielzellen ermöglichen und sind deshalb in ihrer Wirkung relativ eingeschränkt. Durch intensive Forschung an den molekularen Grundlagen der hämatopoetischen Differenzierung wird es wahrscheinlich immer besser möglich werden, direkt über Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in Differenzierungsentscheidungen der Hämatopoese einzugreifen und damit neue Therapien für verschiedenste hämatologische Erkrankungen zu entwickeln.

VI MATERIALIEN UND METHODEN

VI.1 Molekularbiologische Methoden

VI.1.1 Puffer und Lösungen

Für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurde deionisiertes Wasser mit einem spezifischen Widerstand von $18,3 \text{ M}\Omega/\text{cm}^3$ (MilliQ-Anlage, Millipore, Deutschland) verwendet. Lösungen, die bei Arbeiten mit RNA verwendet wurden, wurden mit DEPC-H₂O hergestellt. Es wurden folgende Puffer verwendet:

- Churchpuffer: 7% SDS; 10 mM EDTA pH 8,0; 250 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 aus Na₂HPO₄ und NaH₂PO₄
- DNA-Ladepuffer 10x: 1x TAE; 49/50 Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau
- DNA-Laufpuffer: 1x TAE
- RNA-Ladepuffer: 50% Formamid; 15% Formaldehyd; 1x MOPS; 0,1% Bromphenolblau; 15% DEPC- Wasser
- RNA-Laufpuffer: 1x MOPS; 5% Formaldehyd
- Waschpuffer für Northern Blots: 0,1-2x SSC; 0,3 % SDS
- DEPC-Wasser: 0,01% Diethylpyrocarbonat in H₂O
- SSC 20x: 3 M NaCl; 0,3 M Na₃-Citrat; pH 7,5
- TAE 50x: 2 M Tris/HCl; 1 M NaAcetat; 62,5 mM EDTA; pH 8,5

VI.1.2 Allgemeine Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Techniken wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) ausgeführt.

VI.1.2.1 Präparation von Plasmid DNA

Plasmid DNA wurde nach Herstellerangaben mit dem MaxiColumn Kit bzw. mit dem MiniSpin Kit (Qiagen, Deutschland) aus mit Plasmid transformierten E.coli (DH10b) isoliert.

VI.1.2.2 Enzymatischer Verdau

Zum enzymatischen Verdau von Plasmid-DNA wurden Enzyme der Firmen NEB (USA) und Roche (Roche, Deutschland) verwendet. Diagnostische Verdaus liefen 1 h bei 37° C, präparative bis zu 2 h.

VI.1.2.3 Extraktion von Fragmenten aus TAE-Agarose-Gelen

Durch EtBr-Einlagerung wurde das zu eluierende DNA-Fragment unter UV-Licht sichtbar. Die Bande wurde ausgeschnitten und die enthaltene DNA aus dem Agaroseblock mit QiaexII (Qiagen, Deutschland) nach Protokoll eluiert.

VI.1.3 Nachweis spezifischer RNA Expression

VI.1.3.1 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurden die Zellen bei 400 g, RT, 6 min abzentrifugiert. Anschließend wurde die RNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion mit RNA Stat 60 (Tel-Test, USA) nach Herstellerangaben isoliert:

Dabei wurden je $5-10 \times 10^6$ Zellen mit 1 ml RNA Stat 60 durch mehrfaches Pipettieren lysiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei RT belassen und dann 0,2 ml Chloroform pro 1 ml RNA Stat 60 dazugegeben und 15 s stark geschüttelt. Nach erneuten 3 min bei RT wurde der Ansatz bei 12000 g, 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert, worauf sich zwei Phasen bilden. Eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase mit DNA und Proteinen und eine obere wässrige Phase, die die gesamte RNA enthält. Nach Übertragung der wässrigen Phase in ein neues Gefäß wurde die RNA durch Isopropanol gefällt und anschließend mit 75% Ethanol gewaschen. Schließlich wurde die RNA in DEPC-Wasser gelöst und bei -80 °C aufbewahrt.

VI.1.3.2 Northern Blot

Pro Spur wurden 20 µg RNA auf einem 1,2 % Agarosegel (1x MOPS, 5% Formaldehyd) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 2 x 30 min in 10x SSC gewaschen, um Formaldehyd zu entfernen und ein bis zwei Nächte mit 10x SSC auf eine Nylonmembran (BiodyneB, PALL, GB) geblottet. 2h Backen bei 80° C sorgte für Quervernetzung zwischen der RNA und der Nylonmembran.

VI.1.3.3 Hybridisierung mit spezifischen Sonden

Die in Tabelle 5 genannten Sonden wurden mit Hilfe des Random Primed Labeling Kit (Roche, Deutschland) mit α^{32} P dCTP (3000Ci/mmol) (Amersham, Schweden) nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Abweichend vom Protokoll wurde die Klenowreaktion bei RT 3-4h durchgeführt (statt 30min, 37°C), was zu besseren Einbauraten führte. Nach der Reaktion wurden die nicht eingebauten Nukleotide durch Säulenaufreinigung (Nick TM Column50, Amersham, Schweden) abgetrennt. Die Aktivität der Probe wurde in einem Szintillationszähler bestimmt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65° C über Nacht in 15 ml Churchpuffer. Nicht gebundene oder unspezifisch gebundene Nukleotide wurden durch Waschen der Northern Blots mit Waschpuffern steigender Stringenz und Temperatur (bis 65° C) entfernt. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurden Kodak X-ray und Kodak Biomax MS Filme (Kodak, USA) verwendet.

Sonde	verwendete DNA (alles murine Sequenzen)
β -Globin	0,61kb NcoI x XbaI Fragment
C/EBP α	0,42kb EcoRI x HindIII Fragment
Erythropoetinrezeptor	1,8 kb KPN1 Fragment
GAPDH	1,1kb PstI Fragment
GATA-1	1,8 kb gesamte cDNA
G-CSF-Rezeptor	0,75kb BglII x SacI Fragment
M-CSF-Rezeptor	gesamte cDNA in Bluescript Vektor
MPO	gesamte cDNA in PUC19 Vektor
PU.1	gesamte cDNA in Bluescript Vektor

Tabelle 5: verwendete Sonden für Northern Blot Analysen

VI.1.3.4 Quantifizierung von Genexpressionsstärken

Die Genexpressionsstärken wurden aus der Schwärzung der Autoradiographie-Filme mittels des Analyseprogramms AIDA Image Data Analyser 2.0 (Fujifilm, Japan) berechnet.

VI.1.3.5 Atlas cDNA-Filter

Die Versuche mit den Atlas Filtern Mouse1.2 und Mouse1.2 II (Clontech, USA) wurden grundsätzlich nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Reinigung der RNA und Anreicherung von PolyA-RNA wurde wie vom Hersteller empfohlen das Atlas Pure Total RNA Labeling System (Clontech, USA) verwendet. Abweichend vom Protokoll wurde der DNA Verdau zum Schluss auf 5 min bei 37° C und mit nur 5 U DNase pro 100µg RNA verkürzt, da in vorangegangenen Verdaus nach Herstellerprotokoll neben der DNA zum Teil auch die RNA angedaut wurde.

Zur radioaktiven Markierung der cDNA wurde α^{32} P dATP (3000 Ci/mmol) (Amersham, Schweden) verwendet. Die Visualisierung der Expression erfolgte durch den Phosphoimager Fujifilm Bas-1800 (Fujifilm, Japan) bzw. durch Kodak Biomax MS Filme (Kodak, USA) nach verschiedenen Expositionszeiten. Die Auswertung wurde anhand der Phosphoimager-Daten mit dem Programm AtlasImage 1.5 (Clontech, USA) durchgeführt (siehe Abschnitt IV.3). Die Durchführung der Versuche erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. T. Schroeder, die Auswertung in Zusammenarbeit mit Dr. T. Schroeder und Hella Kohlhof.

VI.2 Zellkulturmethoden

Die Zellkultur wurde grundsätzlich von Dr. T. Schroeder betreut und durchgeführt (zu den Methoden siehe auch Schroeder, 2001). Hauptsächlich bei den Versuchen zur Differenzierungskinetik von FDCP-mix Zellen wurden zellbiologische Arbeitstechniken von mir selbständig angewandt.

Alle verwendeten Zellen wurden bei 37° C , 5% CO₂ Partialdruck und 95% relativer Luftfeuchte in einem BB6220 Zellkultur Inkubator (Heraeus, Deutschland) kultiviert.

VI.2.1 Bestimmung von Zelldichten

Die Zelldichten wurden mit Neubauer Zählkammern bestimmt, wobei tote Zellen durch die Färbung mit Trypanblau ausgeschlossen wurden.

VI.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen wurden in dem jeweiligen Proliferationsmedium und 10% DMSO (Sigma, Detschland) eingefroren. Für das Herunterkühlen auf -80° C wurden Cryo 1° C Freezing Container (Nalgene, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurden die

Zellen in flüssigem Stickstoff bei -180°C gelagert. Durch Auftauen der eingefrorenen Zellen konnten diese wieder in Kultur genommen werden. Die Zellen wurden dazu schnell aufgetaut und anschließend wurden 10 ml Medium über 10 min langsam zugetropft. Nach weiteren 10 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen abzentrifugiert und anschließend in entsprechendem Medium in Kultur genommen.

VI.2.3 Kontrolle auf Kontamination mit Mycoplasmen

Der Mycoplasmen Test mit dem Mycoplasma PCR Elisa Kit (Roche, Deutschland) wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. In keiner der verwendeten Zelllinien wurde eine Kontamination mit Mycoplasmen detektiert.

VI.2.4 Herstellung und Färbung von Zytospinpräparaten

Für die Herstellung von Zytospinpräparaten wurden $5-10 \times 10^4$ Suspensionszellen in einer Cytospin3 Zentrifuge (Shandon, England) mit 700 U/min für 7 min auf einen Objektträger zentrifugiert. Getrocknete Präparate wurden 2 min in May-Grünwald-Lösung (Merck, Deutschland) gefärbt und durch das enthaltene Methanol fixiert, in Leitungswasser gespült, 20 min in 5% Giemsa-Lösung gefärbt, wiederum mit Leitungswasser gespült und anschließend getrocknet.

Zum Nachweis von Hämoglobin wurde eine Dianisidin-Färbung verwendet, bei der Hämoglobin im Zytoplasma blau-grau bis oliv-grün angefärbt wird. Getrocknete Zytospinpräparate wurden 10 min bei Raumtemperatur in 100% Methanol fixiert. 5 Volumen 0,2% O-Dianisidin-Lösung (Sigma, Deutschland) wurden mit 1 Volumen 3% Hydrogenperoxid-Lösung und 1 Volumen 1% Natriumnitroferrocyanid-Lösung gemischt. Die Zellen wurden 10 min im Dunkeln darin gefärbt und dann in Leitungswasser gewaschen. Anschließend folgte eine May-Grünwald-Giemsa Gegenfärbung.

Die Anteile der verschiedenen Zellen wurden in blinden Analysen anhand der Morphologie von 100-200 Zellen bestimmt (McDonald et al., 1988; Heckner, 1991).

VI.2.5 FDCP-mix Zellkultur

Die FDCP-mix Zelllinie A7 (Sponcer et al., 1984; Sponcer et al., 1986) wurde in Iscove's Modified Dulbeccos' Medium (IMDM, Gibco, Deutschland) mit einer Osmolarität von 310-320 mosm / kg kultiviert. Das Medium enthielt 20 % vorgetestetes Pferdeserum

(JRH, USA) und 20 % mit murinem Interleukin-3 (mIL-3) konditioniertes Medium (IL-3 CM; entspricht 150 U / ml IL-3) (Karasuyama und Melchers, 1988). Diese Mediumbedingungen stimulierten eine optimale Proliferation der FDCP-mix Zellen und wurden als Selbsterneuerungsbedingungen bezeichnet. Die Zellen wurden in einer Dichte zwischen 1×10^5 Zellen / ml und 1×10^6 Zellen / ml gehalten.

A7NERT Zellen sind FDCP-mix Zellen, welche ein durch Tamoxifen induzierbares Notch1^{IC} enthalten (Schroeder, 2001; Schroeder et al., 2003). Die Translokation von Notch1^{IC} in den Zellkern und damit seine Aktivierung wurde durch 4-Hydroxy-Tamoxifen (Sigma, Deutschland) in einer Konzentration von 50 nM bzw. 1 μ M induziert. Zur Identifizierung von direkten Zielgenen von Notch wurden 75 μ g Cycloheximid (Sigma, Deutschland) pro ml Medium eingesetzt (je 30 min vor Zugabe von Tamoxifen). Cycloheximid blockiert die Translokation der Aminosäuren während der Translation und verhindert somit die Synthese von Proteinen.

Die Differenzierung der FDCP-mix Zellen während der Differenzierungskinetiken wurde durch einen Wechsel der Mediumbedingungen erreicht. Die Zellen wurden in IL-3 freiem Medium gewaschen und in einer Dichte von 2×10^5 / ml in dem entsprechenden Differenzierungsmedium ausgesät. Die Zellen wurden alle 4 Tage mit frischem Medium gefüttert und die Zelldichte wurde zwischen 1×10^5 Zellen / ml und 1×10^6 Zellen / ml gehalten.

Differenzierungsmedium für die Differenzierung in Granulozyten und Makrophagen war IMDM mit 20 % vorgetestetem fötalen Kälberserum (FCS; Sigma, Deutschland), 2 U / ml IL-3 (Roche, Deutschland), 1500 U / ml Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF; Neupogen, Amgen, USA) und 1 % mit murinem GM-CSF konditioniertes Medium (entspricht 100 U / ml).

Differenzierungsmedium für die Differenzierung in Erythrozyten war IMDM mit 20 % vorgetestetem fötalen Kälberserum (FCS; Sigma, Deutschland), 3,5 U / ml IL-3 (Roche, Deutschland) und 5 U / ml humanes Erythropoetin (Roche, Deutschland).

VI.2.6 32D Zellkultur

32D Klon123 Zellen wurden in IMDM (Gibco, Deutschland) mit einer Osmolarität von 310-320 mosm / kg, 20 % vorgetestetem FCS (Sigma, Deutschland) und 15 % mIL-3 konditioniertem Medium kultiviert. Die Zellen wurden in einer Dichte von 4×10^4 Zellen / ml bis 1×10^6 Zellen / ml gehalten.

Aktivierung von Notch durch Tamoxifen und Blockade der Proteinsynthese durch Cycloheximid erfolgte wie unter VI.2.5 beschrieben.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- Anderson, K.L., Smith, K.A., Connors, K., McKercher, S.R., Maki, R.A. and Torbett, B.E. (1998). Myeloid development is selectively disrupted in PU.1 null mice. *Blood* **91**(10): 3702-10.
- Anderson, K.L., Smith, K.A., Perkin, H., Hermanson, G., Anderson, C.G., Jolly, D.J., Maki, R.A. and Torbett, B.E. (1999). PU.1 and the granulocyte- and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. *Blood* **94**(7): 2310-8.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K. and Fortini, M.E. (1995). Notch signaling. *Science* **268**(5208): 225-32.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**(5415): 770-6.
- Barreda, D.R. and Belosevic, M. (2001). Transcriptional regulation of hemopoiesis. *Dev Comp Immunol* **25**(8-9): 763-89.
- Bellon, T., Perrotti, D. and Calabretta, B. (1997). Granulocytic differentiation of normal hematopoietic precursor cells induced by transcription factor PU.1 correlates with negative regulation of the c-myb promoter. *Blood* **90**(5): 1828-39.
- Blaumueller, C.M., Qi, H., Zagouras, P. and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* **90**(2): 281-91.
- Brugger, W., Scheduling, S., Ziegler, B., Buhning, H.J. and Kanz, L. (2000). Ex vivo manipulation of hematopoietic stem and progenitor cells. *Semin Hematol* **37**(1 Suppl 2): 42-9.
- Cantor, A.B. and Orkin, S.H. (2001). Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev* **11**(5): 513-9.
- Chen, H., Ray-Gallet, D., Zhang, P., Hetherington, C.J., Gonzalez, D.A., Zhang, D.E., Moreau-Gachelin, F. and Tenen, D.G. (1995). PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene* **11**(8): 1549-60.
- Cheng, P., Zlobin, A., Volgina, V., Gottipati, S., Osborne, B., Simel, E.J., Miele, L. and Gabrilovich, D.I. (2001). Notch-1 regulates NF-kappaB activity in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* **167**(8): 4458-67.

- Coccia, E.M., Stellacci, E., Valtieri, M., Masella, B., Feccia, T., Marziali, G., Hiscott, J., Testa, U., Peschle, C. and Battistini, A. (2001). Ectopic expression of interferon regulatory factor-1 potentiates granulocytic differentiation. *Biochem J* **360**(Pt 2): 285-94.
- Cohen, J.I., Wang, F., Mannick, J. and Kieff, E. (1989). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23): 9558-62.
- Cronkite, E.P. (1976). Notions about the hemopoietic stem cell. *Hamatol Bluttransfus* **19**: 1-7.
- Cross, M. and Enver, T. (1997). The lineage commitment of haemopoietic progenitor cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**: 609-613.
- Cross, M.A., Heyworth, C.M., Murrell, A.M., Bockamp, E.O., Dexter, T.M. and Green, A.R. (1994). Expression of lineage restricted transcription factors precedes lineage specific differentiation in a multipotent haemopoietic progenitor cell line. *Oncogene* **9**(10): 3013-6.
- DeKoter, R.P. and Singh, H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* **288**(5470): 1439-41.
- DeKoter, R.P., Walsh, J.C. and Singh, H. (1998). PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *Embo J* **17**(15): 4456-68.
- Dexter, T.M., Coutinho, L.H., Spooncer, E., Heyworth, C.M., Daniel, C.P., Schiro, R., Chang, J. and Allen, T.D. (1990). Stromal cells in haemopoiesis. *Ciba Found Symp* **148**: 76-86.
- Dexter, T.M., Simmons, P., Purnell, R.A., Spooncer, E. and Schofield, R. (1984). The regulation of hemopoietic cell development by the stromal cell environment and diffusible regulatory molecules. *Prog Clin Biol Res* **148**: 13-33.
- Dexter, T.M. and Spooncer, E. (1987). Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Annu Rev Cell Biol* **3**: 423-41.
- Diederich, R.J., Matsuno, K., Hing, H. and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). Cytosolic interaction between deltex and Notch ankyrin repeats implicates deltex in the Notch signaling pathway. *Development* **120**(3): 473-81.
- Dou, S., Zeng, X., Cortes, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Honjo, T. and Vales, L.D. (1994). The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* **14**(5): 3310-9.

- Eldadah, Z.A., Hamosh, A., Biery, N.J., Montgomery, R.A., Duke, M., Elkins, R. and Dietz, H.C. (2001). Familial Tetralogy of Fallot caused by mutation in the jagged1 gene. *Hum Mol Genet* **10**(2): 163-9.
- Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D. and Sklar, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**(4): 649-61.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D. and Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* **237**(3): 752-7.
- Fleming, R.J. (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin Cell Dev Biol* **9**(6): 599-607.
- Ford, A.M., Bennett, C.A., Healy, L.E., Towatari, M., Greaves, M.F. and Enver, T. (1996). Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 10838-43.
- Ford, A.M., Healy, L.E., Bennett, C.A., Navarro, E., Spooncer, E. and Greaves, M.F. (1992). Multilineage phenotypes of interleukin-3-dependent progenitor cells. *Blood* **79**(8): 1962-71.
- Fortini, M.E. and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell* **79**(2): 273-82.
- Friedman, A.D. (2002). Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* **21**(21): 3377-90.
- Fryer, C.J., Lamar, E., Turbachova, I., Kintner, C. and Jones, K.A. (2002). Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev* **16**(11): 1397-411.
- Garces, C., Ruiz-Hidalgo, M.J., de Mora, J.F., Park, C., Miele, L., Goldstein, J., Bonvini, E., Porras, A. and Laborda, J. (1997). Notch-1 controls the expression of fatty acid-activated transcription factors and is required for adipogenesis. *J Biol Chem* **272**(47): 29729-34.
- Goldsmith, M.A., Mikami, A., You, Y., Liu, K.D., Thomas, L., Pharr, P. and Longmore, G.D. (1998). Absence of cytokine receptor-dependent specificity in red blood cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 7006-11.
- Greenberger, J.S. (2000). Expression of hematopoietic growth factor receptors on early hematopoietic precursors: detection and regulation. *Curr Opin Hematol* **7**(3): 161-7.

- Greenberger, J.S., Eckner, R.J., Sakakeeny, M., Marks, P., Reid, D., Nabel, G., Hapel, A., Ihle, J.N. and Humphries, K.C. (1983). Interleukin 3-dependent hematopoietic progenitor cell lines. *Fed Proc* **42**(10): 2762-71.
- Grez, M., Akgun, E., Hilberg, F. and Ostertag, W. (1990). Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(23): 9202-6.
- Gridley, T. (2003). Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum Mol Genet* **12**(Spec No 1): R9-13.
- Grossman, S.R., Johannsen, E., Tong, X., Yalamanchili, R. and Kieff, E. (1994). 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**(16): 7568-72.
- Guerriero, A., Langmuir, P.B., Spain, L.M. and Scott, E.W. (2000). PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells. *Blood* **95**(3): 879-85.
- Hagenaars, C.E., Kawilarang-de Haas, E.W., van der Kraan, A.A., Spooncer, E., Dexter, T.M. and Nijweide, P.J. (1991). Interleukin-3-dependent hematopoietic stem cell lines capable of osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res* **6**(9): 947-54.
- Hamada, Y., Kadokawa, Y., Okabe, M., Ikawa, M., Coleman, J.R. and Tsujimoto, Y. (1999). Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development* **126**(15): 3415-24.
- Heckner, F. (1991). *Praktikum der mikroskopischen Hämatologie.*, Urban und Schwarzenberg.
- Henkel, T., Ling, P.D., Hayward, S.D. and Peterson, M.G. (1994). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science* **265**(5168): 92-5.
- Hofelmayr, H., Strobl, L.J., Stein, C., Laux, G., Marschall, G., Bornkamm, G.W. and Zimmer-Strobl, U. (1999). Activated mouse Notch1 transactivates Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-regulated viral promoters. *J Virol* **73**(4): 2770-80.
- Hohaus, S., Petrovick, M.S., Voso, M.T., Sun, Z., Zhang, D.E. and Tenen, D.G. (1995). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol* **15**(10): 5830-45.
- Hoyne, G.F., Le Roux, I., Corsin-Jimenez, M., Tan, K., Dunne, J., Forsyth, L.M., Dallman, M.J., Owen, M.J., Ish-Horowicz, D. and Lamb, J.R. (2000). Serrate1-induced notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4(+) T cells. *Int Immunol* **12**(2): 177-85.

- Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J., 2nd and Gossler, A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* **386**(6626): 717-21.
- Hsieh, J.J. and Hayward, S.D. (1995). Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* **268**(5210): 560-3.
- Hsieh, J.J., Zhou, S., Chen, L., Young, D.B. and Hayward, S.D. (1999). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(1): 23-8.
- Hubmann, R., Schwarzmeier, J.D., Shehata, M., Hilgarth, M., Duechler, M., Dettke, M. and Berger, R. (2002). Notch2 is involved in the overexpression of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **99**(10): 3742-7.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R. and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* **377**(6547): 355-8.
- Joutel, A. and Tournier-Lasserre, E. (1998). Notch signalling pathway and human diseases. *Semin Cell Dev Biol* **9**(6): 619-25.
- Just, U., Boettiger, D., Kan, O., Dexter, T.M. and Spooncer, E. (2000). Insertional mutagenesis as a route to identifying genes involved in self renewal of haemopoietic stem cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **251**: 27-34.
- Just, U., Spooncer, E., Lohler, J., Stocking, C., Ostertag, W. and Dexter, T.M. (1994). Mutants of a multipotent hematopoietic cell line blocked in GM-CSF- induced differentiation are leukemogenic in vivo. *Exp Hematol* **22**(9): 933-40.
- Just, U., Stocking, C., Spooncer, E., Dexter, T.M. and Ostertag, W. (1991). Expression of the GM-CSF gene after retroviral transfer in hematopoietic stem cell lines induces synchronous granulocyte- macrophage differentiation. *Cell* **64**(6): 1163-73.
- Kao, H.Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C.R., Evans, R.M. and Kadesch, T. (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* **12**(15): 2269-77.
- Karasuyama, H. and Melchers, F. (1988). Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur J Immunol* **18**(1): 97-104.
- Kohlhof, H. (2002) Untersuchungen zur Wirkung von aktiviertem Notch auf hämatopoetische Stammzellen, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diplomarbeit, 2002
- Kondo, M., Weissman, I.L. and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**(5): 661-72.

- Kopan, R., Nye, J.S. and Weintraub, H. (1994). The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development* **120**(9): 2385-96.
- Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**(3): 285-94.
- Krebs, L.T., Deftos, M.L., Bevan, M.J. and Gridley, T. (2001). The Nrarp gene encodes an ankyrin-repeat protein that is transcriptionally regulated by the notch signaling pathway. *Dev Biol* **238**(1): 110-9.
- 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. (2000). Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* **14**(11): 1343-52.
- Kulesa, H., Frampton, J. and Graf, T. (1995). GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblasts. *Genes Dev* **9**(10): 1250-62.
- Kumano, K., Chiba, S., Kunisato, A., Sata, M., Saito, T., Nakagami-Yamaguchi, E., Yamaguchi, T., Masuda, S., Shimizu, K., Takahashi, T., Ogawa, S., Hamada, Y. and Hirai, H. (2003). Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity* **18**(5): 699-711.
- Kumano, K., Chiba, S., Shimizu, K., Yamagata, T., Hosoya, N., Saito, T., Takahashi, T., Hamada, Y. and Hirai, H. (2001). Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression. *Blood* **98**(12): 3283-9.
- Kuroda, K., Tani, S., Tamura, K., Minoguchi, S., Kurooka, H. and Honjo, T. (1999). Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. *J Biol Chem* **274**(11): 7238-44.
- Kurooka, H. and Honjo, T. (2000). Functional interaction between the mouse notch1 intracellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5. *J Biol Chem* **275**(22): 17211-20.
- Kurooka, H., Kuroda, K. and Honjo, T. (1998). Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region. *Nucleic Acids Res* **26**(23): 5448-55.
- Lam, L.T. and Bresnick, E.H. (1998). Identity of the beta-globin locus control region binding protein HS2NF5 as the mammalian homolog of the notch-regulated transcription factor suppressor of hairless. *J Biol Chem* **273**(37): 24223-31.

- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L. (1989). The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science* **243**(4899): 1681-8.
- Li, L., Milner, L.A., Deng, Y., Iwata, M., Banta, A., Graf, L., Marcovina, S., Friedman, C., Trask, B.J., Hood, L. and Torok-Storb, B. (1998). The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1. *Immunity* **8**(1): 43-55.
- Li, T., Ma, G., Cai, H., Price, D.L. and Wong, P.C. (2003). Nicastrin is required for assembly of presenilin/gamma-secretase complexes to mediate Notch signaling and for processing and trafficking of beta-amyloid precursor protein in mammals. *J Neurosci* **23**(8): 3272-7.
- Lin, F.T. and Lane, M.D. (1994). CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19): 8757-61.
- Macleod, K., Leprince, D. and Stehelin, D. (1992). The ets gene family. *Trends Biochem Sci* **17**(7): 251-6.
- Maier, M.M. and Gessler, M. (2000). Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. *Biochem Biophys Res Commun* **275**(2): 652-60.
- Maillard, I., Adler, S.H. and Pear, W.S. (2003). Notch and the immune system. *Immunity* **19**(6): 781-91.
- Matsunami, N., Hamaguchi, Y., Yamamoto, Y., Kuze, K., Kangawa, K., Matsuo, H., Kawaichi, M. and Honjo, T. (1989). A protein binding to the J kappa recombination sequence of immunoglobulin genes contains a sequence related to the integrase motif. *Nature* **342**(6252): 934-7.
- Matsuno, K., Go, M.J., Sun, X., Eastman, D.S. and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Suppressor of Hairless-independent events in Notch signaling imply novel pathway elements. *Development* **124**(21): 4265-73.
- McDonald, G., Paul, J. and Cruickshank, B. (1988). Atlas of Hematology., Churchill Livingstone.
- McIvor, Z., Hein, S., Fiegler, H., Schroeder, T., Stocking, C., Just, U. and Cross, M. (2003). Transient expression of PU.1 commits multipotent progenitors to a myeloid fate whereas continued expression favors macrophage over granulocyte differentiation. *Exp Hematol* **31**(1): 39-47.

- Metcalf, D. (1998). Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation. *Blood* **92**(2): 345-7; discussion 352.
- Milner, L.A. and Bigas, A. (1999). Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood* **93**(8): 2431-48.
- Milner, L.A., Bigas, A., Kopan, R., Brashem-Stein, C., Bernstein, I.D. and Martin, D.I. (1996). Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23): 13014-9.
- Moohr, O. (1919). *Genetics* **4**(252).
- Moreau-Gachelin, F., Tavitian, A. and Tambourin, P. (1988). Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* **331**(6153): 277-80.
- Morimura, T., Goitsuka, R., Zhang, Y., Saito, I., Reth, M. and Kitamura, D. (2000). Cell-cycle arrest and apoptosis induced by Notch1 in B cells. *J Biol Chem*.
- Morrison, S.J., Perez, S.E., Qiao, Z., Verdi, J.M., Hicks, C., Weinmaster, G. and Anderson, D.J. (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* **101**(5): 499-510.
- Mumm, J.S. and Kopan, R. (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* **228**(2): 151-65.
- Nguyen, H., Hiscott, J. and Pitha, P.M. (1997). The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**(4): 293-312.
- Nickoloff, B.J., Osborne, B.A. and Miele, L. (2003). Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* **22**(42): 6598-608.
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F. and Kageyama, R. (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *Embo J* **18**(8): 2196-207.
- Oka, C., Nakano, T., Wakeham, A., de la Pompa, J.L., Mori, C., Sakai, T., Okazaki, S., Kawaichi, M., Shiota, K., Mak, T.W. and Honjo, T. (1995). Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development* **121**(10): 3291-301.
- Ordentlich, P., Lin, A., Shen, C.P., Blaumueller, C., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S. and Kadesch, T. (1998). Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Mol Cell Biol* **18**(4): 2230-9.
- Osborne, B. and Miele, L. (1999). Notch and the immune system. *Immunity* **11**(6): 653-63.
- Oswald, F., Liptay, S., Adler, G. and Schmid, R.M. (1998). NF-kappaB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jkappa. *Mol Cell Biol* **18**(4): 2077-88.

- Pahl, H.L., Scheibe, R.J., Zhang, D.E., Chen, H.M., Galson, D.L., Maki, R.A. and Tenen, D.G. (1993). The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *J Biol Chem* **268**(7): 5014-20.
- Pevny, L., Lin, C.S., D'Agati, V., Simon, M.C., Orkin, S.H. and Costantini, F. (1995). Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* **121**(1): 163-72.
- Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H. and Costantini, F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* **349**(6306): 257-60.
- 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. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* **11**(3): 299-308.
- Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S.J. and MacDonald, H.R. (2004). Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* **5**(3): 247-53.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R. and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**(5): 547-58.
- Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J.C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P., Miele, L., Aguet, M., Radtke, F. and Dotto, G.P. (2001). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *Embo J* **20**(13): 3427-36.
- Rebay, I., Fleming, R.J., Fehon, R.G., Cherbas, L., Cherbas, P. and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* **67**(4): 687-99.
- Rebel, V.I., Hartnett, S., Hill, G.R., Lazo-Kallanian, S.B., Ferrara, J.L. and Sieff, C.A. (1999). Essential role for the p55 tumor necrosis factor receptor in regulating hematopoiesis at a stem cell level. *J Exp Med* **190**(10): 1493-504.
- Reizis, B. and Leder, P. (2002). Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes Dev* **16**(3): 295-300.
- Rosmarin, A.G., Weil, S.C., Rosner, G.L., Griffin, J.D., Arnaout, M.A. and Tenen, D.G. (1989). Differential expression of CD11b/CD18 (Mo1) and myeloperoxidase genes during myeloid differentiation. *Blood* **73**(1): 131-6.

- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., Nakagami-Yamaguchi, E., Hamada, Y., Aizawa, S. and Hirai, H. (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* **18**(5): 675-85.
- Sambrook, Fritsch and Maniatis (1989). *Molecular Cloning - A laboratory manual.*, Cold Spring Harbour Press.
- Schroeder, T. (2001). Untersuchung der Funktion von aktiviertem Notch bei der Regulation von Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Diss., 2001.
- Schroeder, T. and Just, U. (2000a). mNotch1 signaling reduces proliferation of myeloid progenitor cells by altering cell-cycle kinetics. *Exp Hematol* **28**(11): 1206-13.
- Schroeder, T. and Just, U. (2000b). Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. *Embo J* **19**(11): 2558-68.
- Schroeder, T., Kohlhof, H., Rieber, N. and Just, U. (2003). Notch signaling induces multilineage myeloid differentiation and up-regulates PU.1 expression. *J Immunol* **170**(11): 5538-48.
- Schroeder, T., Lange, C., Strehl, J. and Just, U. (2000). Generation of functionally mature dendritic cells from the multipotential stem cell line FDCP-mix. *Br J Haematol* **111**(3): 890-7.
- Schuetze, S., Paul, R., Gliniak, B.C. and Kabat, D. (1992). Role of the PU.1 transcription factor in controlling differentiation of Friend erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* **12**(7): 2967-75.
- Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J. and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**(5178): 1573-7.
- Selkoe, D.J. (2001). Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11039-41.
- Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J.J., Lindsell, C., Bogler, O., Hayward, D. and Weinmaster, G. (1996). Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1- independent pathway. *Development* **122**(12): 3765-73.
- Shivdasani, R.A. and Orkin, S.H. (1996). The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* **87**(10): 4025-39.
- Singh, H., DeKoter, R.P. and Walsh, J.C. (1999). PU.1, a shared transcriptional regulator of lymphoid and myeloid cell fates. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**: 13-20.

- Singh, N., Phillips, R.A., Iscove, N.N. and Egan, S.E. (2000). Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis. *Exp Hematol* **28**(5): 527-34.
- Smith, L.T., Hohaus, S., Gonzalez, D.A., Dziennis, S.E. and Tenen, D.G. (1996). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood* **88**(4): 1234-47.
- Smith, M.F., Jr., Carl, V.S., Lodie, T. and Fenton, M.J. (1998). Secretory interleukin-1 receptor antagonist gene expression requires both a PU.1 and a novel composite NF-kappaB/PU.1/GA-binding protein binding site. *J Biol Chem* **273**(37): 24272-9.
- Spooncer, E., Boettiger, D. and Dexter, T.M. (1984). Continuous in vitro generation of multipotential stem cell clones from src-infected cultures. *Nature* **310**(5974): 228-30.
- Spooncer, E., Heyworth, C.M., Dunn, A. and Dexter, T.M. (1986). Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Differentiation* **31**(2): 111-8.
- Strobl, L.J., Hofelmayr, H., Marschall, G., Brielmeier, M., Bornkamm, G.W. and Zimmer-Strobl, U. (2000). Activated Notch1 modulates gene expression in B cells similarly to Epstein-Barr viral nuclear antigen 2. *J Virol* **74**(4): 1727-35.
- Struhl, G. and Greenwald, I. (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in Drosophila. *Nature* **398**(6727): 522-5.
- Swiatek, P.J., Lindsell, C.E., del Amo, F.F., Weinmaster, G. and Gridley, T. (1994). Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev* **8**(6): 707-19.
- Takahashi, T., Suwabe, N., Dai, P., Yamamoto, M., Ishii, S. and Nakano, T. (2000). Inhibitory interaction of c-Myb and GATA-1 via transcriptional co-activator CBP. *Oncogene* **19**(1): 134-40.
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T. and Honjo, T. (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol* **5**(12): 1416-23.
- Tanigaki, K., Han, H., Yamamoto, N., Tashiro, K., Ikegawa, M., Kuroda, K., Suzuki, A., Nakano, T. and Honjo, T. (2002). Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat Immunol* **3**(5): 443-50.
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. and Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* **19**: 623-55.
- Tenen, D.G., Hromas, R., Licht, J.D. and Zhang, D.E. (1997). Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* **90**(2): 489-519.

- Tenen, D.G., Hromas, R., Licht, J. D., Zang, D.-E. (1997). Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* **90**: 489-519.
- Till, J.E., McCulloch, E.A. and Siminovitch, L. (1964). A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen-colony forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **51**: 29-36.
- Tomita, K., Hattori, M., Nakamura, E., Nakanishi, S., Minato, N. and Kageyama, R. (1999). The bHLH gene Hes1 is essential for expansion of early T cell precursors. *Genes Dev* **13**(9): 1203-10.
- Valtieri, M., Tweardy, D.J., Caracciolo, D., Johnson, K., Mavilio, F., Altmann, S., Santoli, D. and Rovera, G. (1987). Cytokine-dependent granulocytic differentiation. Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line. *J Immunol* **138**(11): 3829-35.
- Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., Pear, W.S. and Bernstein, I.D. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med* **6**(11): 1278-81.
- von Kalle, C., Glimm, H., Schulz, G., Mertelsmann, R. and Henschler, R. (1998). New developments in hematopoietic stem cell expansion. *Curr Opin Hematol* **5**(1): 79-86.
- Walker, L., Lynch, M., Silverman, S., Fraser, J., Boulter, J., Weinmaster, G. and Gasson, J.C. (1999). The Notch/Jagged pathway inhibits proliferation of human hematopoietic progenitors in vitro. *Stem Cells* **17**(3): 162-71.
- Waltzer, L., Logeat, F., Brou, C., Israel, A., Sergeant, A. and Manet, E. (1994). 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**(23): 5633-8.
- Wang, X., Scott, E., Sawyers, C.L. and Friedman, A.D. (1999). C/EBPalpha bypasses granulocyte colony-stimulating factor signals to rapidly induce PU.1 gene expression, stimulate granulocytic differentiation, and limit proliferation in 32D cl3 myeloblasts. *Blood* **94**(2): 560-71.
- Weijzen, S., Velders, M.P., Elmishad, A.G., Bacon, P.E., Panella, J.R., Nickoloff, B.J., Miele, L. and Kast, W.M. (2002). The Notch ligand Jagged-1 is able to induce maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *J Immunol* **169**(8): 4273-8.
- Weinmaster, G. (2000). Notch signal transduction: a real rip and more. *Curr Opin Genet Dev* **10**(4): 363-9.

- Weiss, M.J. and Orkin, S.H. (1995). Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9623-7.
- Wharton, K.A., Johansen, K.M., Xu, T. and Artavanis-Tsakonas, S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* **43**(3 Pt 2): 567-81.
- White, J.R. and Weston, K. (2000). Myb is required for self-renewal in a model system of early hematopoiesis. *Oncogene* **19**(9): 1196-205.
- Wu, L., Sun, T., Kobayashi, K., Gao, P. and Griffin, J.D. (2002). Identification of a family of mastermind-like transcriptional coactivators for mammalian notch receptors. *Mol Cell Biol* **22**(21): 7688-700.
- Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C.E., Norton, C.R., Chang, B., Hicks, C., Gendron-Maguire, M., Rand, E.B., Weinmaster, G. and Gridley, T. (1999). Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet* **8**(5): 723-30.
- Yamamoto, N., Yamamoto, S., Inagaki, F., Kawaichi, M., Fukamizu, A., Kishi, N., Matsuno, K., Nakamura, K., Weinmaster, G., Okano, H. and Nakafuku, M. (2001). Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J Biol Chem* **276**(48): 45031-40. Epub 2001 Sep 19.
- Zecchini, V., Brennan, K. and Martinez-Arias, A. (1999). An activity of Notch regulates JNK signalling and affects dorsal closure in Drosophila. *Curr Biol* **9**(9): 460-9.
- Zhang, D.-E., Hetherington, C.J., Chen, H.-M., Tenen, D. (1994). The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 373-381.
- Zhang, D.E., Zhang, P., Wang, N.D., Hetherington, C.J., Darlington, G.J. and Tenen, D.G. (1997). Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha- deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(2): 569-74.
- Zhang, P., Behre, G., Pan, J., Iwama, A., Wara-Aswapati, N., Radomska, H.S., Auron, P.E., Tenen, D.G. and Sun, Z. (1999). Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15): 8705-10.
- Zhang, P., Zhang, X., Iwama, A., Yu, C., Smith, K.A., Mueller, B.U., Narravula, S., Torbett, B.E., Orkin, S.H. and Tenen, D.G. (2000a). PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood* **96**(8): 2641-8.

- Zhang, Z., Nadeau, P., Song, W., Donoviel, D., Yuan, M., Bernstein, A. and Yankner, B.A. (2000b). Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat Cell Biol* **2**(7): 463-5.
- Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J.J., Chen, L., Miyamoto, A., Weinmaster, G. and Hayward, S.D. (2000). SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC to facilitate NotchIC function. *Mol Cell Biol* **20**(7): 2400-10.

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Dr. rer. nat. Timm Schroeder, Frau Professor Dr. med. Ursula Just und Herrn Professor Dr. med. Georg W. Bornkamm für die ausgezeichnete Betreuung meiner Dissertation.

LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Name: Nikolaus Peter Rieber
Adresse: Winterstraße 9
82140 Olching
E-Mail: Nikolaus.Rieber@med.uni-muenchen.de
Geburtsdatum: 18. Dezember 1975
Geburtsort: Tübingen
Eltern: Dr. med. Dorit Rieber
Prof. Dr. med. Ernst Peter Rieber
Geschwister: Dr. med. Johannes Rieber, Franziska Lorenzen,
Dipl. Forstw. Moritz Rieber
Familienstand: ledig

Schulbildung

1982-1986 Grundschole Olching
1986-1995 Gymnasium Olching
6/1995 Abitur

Zivildienst

10/1995-10/1996 Zivildienst in der Kinderkrankenpflege im Dr. von Haunerschen Kinderspital in München

Studium

11/1996-10/2003 Medizinstudent an der LMU München
9/1998 Ärztliche Vorprüfung
8/1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
9/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2002-9/2003 Praktisches Jahr (PJ)
1. Tertial: Chirurgie an der University of Sydney, Australia und Kinderchirurgie im Dr. von Haunerschen Kinderspital der LMU München
2. Tertial: Pädiatrie im Dr. von Haunerschen Kinderspital
3. Tertial: Innere Medizin, LMU-Klinikum Großhadern
10/2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

11/2003-9/2004 Arzt im Praktikum am Dr. von Haunerschen Kinderspital der
LMU München
seit 10/2004 Assistenzarzt in Weiterbildung am Dr. von Haunerschen
Kinderspital der LMU München

Publikation

2003 Schroeder, T., Kohlhof, H., Rieber, N., and Just, U. (2003):
„Notch signaling induces multilineage myeloid differentiation
and up-regulates PU.1 expression“
The Journal of Immunology, 2003 June 1, 170: 5538-48