

Funktionelle Analyse der Intrazellulardomäne des murinen Notch-Liganden Delta-like 1

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Christian Redeker M. Sc.
geboren am 09.09.1981
in Herford

2014

Referent: Prof. Dr. Achim Gossler
Korreferentin: Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn
Tag der Promotion: 05.02.2014

„Überall geht ein früheres Ahnen dem späteren Wissen voraus.“

Alexander von Humboldt (1769-1859)

1 Zusammenfassungen

1.1 Zusammenfassung

Der evolutionär stark konservierte Notch-Signalweg ist ein wichtiger Vermittler in der Kommunikation zwischen benachbarten Zellen. Er hat eine essentielle Bedeutung bei der Regulation von Prozessen während der Embryonalentwicklung.

Durch die interzelluläre Interaktion zwischen dem Notch-Rezeptor und einem Liganden wird eine proteolytische Kaskade induziert, die den Notch-Rezeptor in der juxtamembranen Region und anschließend innerhalb der Transmembrandomäne spaltet. Die Spaltung in der Transmembrandomäne des Notch-Rezeptors führt zur Freisetzung der intrazellulären Domäne von Notch (NICD) ins Zytosol. Die Freisetzung der NICD ins Zytosol ist Voraussetzung für den Transport der NICD in den Nukleus. Im Nukleus bindet die NICD an einen CSL-Transkriptionsfaktor (in Maus RBPjk), der mit weiteren Kofaktoren komplexiert ist. Die Bindung der NICD an den CSL-Transkriptionsfaktor initiiert die Transkription von Notch-Zielgenen. Der Notch-Ligand Delta-like 1 (DLL1) unterliegt derselben proteolytischen Kaskade wie der Notch-Rezeptor. Es erfolgt ebenfalls die Freisetzung der intrazellulären Domäne (DlICD) ins Zytosol. In verschiedenen Studien wurde beobachtet, dass die DlICD im Nukleus nachweisbar war und die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung und den Notch-Signalweg beeinflusst. Dies führte zu der Annahme, dass die DlICD, ähnlich wie die NICD, eine transkriptionelle Funktion übernimmt und eine Bidirektionalität des Notch-Signalweges existiert. Um mögliche Auswirkungen in der embryonalen Entwicklung durch einen potentiellen reversen Notch-Signalweg zu analysieren, wurden für die vorliegende Arbeit drei transgene Mauslinien generiert, die verschiedene DlICD-Varianten konstitutiv überexprimierten.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass die Überexpression aller verwendeten DlICD-Varianten keine Auswirkung auf die embryonale Entwicklung von transgenen Mäusen hatte. Untersuchungen zu wichtigen embryonalen Entwicklungsprozessen (Somitogenese, Myogenese und Neurogenese) ergaben keine Unterschiede in der Expression von Markergenen im Vergleich von transgenen Mäusen mit wildtyp Mäusen. In Western Blot Analysen konnten zusätzliche Spaltungen in der DlICD nachgewiesen werden, die einen Zusammenhang mit der proteasomalen Degradation zeigten. Daher ist eine signalgebende Wirkung der DLL1 durch die intrazelluläre Domäne unwahrscheinlich.

1.2 Abstract

The evolutionary highly conserved Notch signalling pathway is an important mediator between adjacent cells and has a key role in the regulation of developmental processes.

The interaction of the Notch receptor with its ligands induces a proteolytical cleavage process which results in the release of the intracellular domain of Notch (NICD) into the cytosol. The NICD translocates into the nucleus and binds to a transcriptional activator-complex to initiate the transcription of target genes. The Notch ligand Delta-like 1 (DLL1) is processed by the same proteolytical cleavage process and results in the release of the cytoplasmatic domain into the cytosol. A localisation of DICD in the nucleus was observed and effects of overexpressed DICD in cultures cells on cell proliferation, differentiation and Notch target gene expression were already published. These observations give rise to the assumption of a bidirectional Notch pathway.

In this study three different DICD variants were constitutively expressed in mice to analyse the effects of a bidirectional Notch pathway during embryogenesis. The results showed no effect on important embryological processes like somitogenesis, myogenesis and neurogenesis. In western blot analyses an additional cleavage product of the ICD was identified. This shows a connection between detectable DICD cleavage products and proteasomal degradation.

In conclusion the Notch pathway does not seem to be bidirectional and the DICD is rather degraded by the proteasome.

1.3 Schlagworte

Schlagworte: Delta-like 1, intrazelluläre Domäne, Reverser Notch-Signalweg

Key words: delta like 1, intracellular domain, reverse notch signaling

2 Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassungen	4
1.1	Zusammenfassung.....	4
1.2	Abstract	5
1.3	Schlagworte.....	6
2	Inhaltsverzeichnis.....	7
3	Abkürzungsverzeichnis	12
4	Einleitung	14
4.1	Wichtige biologische Einflüsse des Notch-Signalweges	14
4.2	Der kanonische Notch-Signaltransduktionsweg	16
4.3	Die Komponenten des Notch-Signalweges.....	19
4.3.1	Die Notch-Rezeptoren.....	19
4.3.2	Die Notch-Liganden.....	23
4.3.3	Die ADAM-Proteine	24
4.3.4	Der γ -Sekretasekomplex	25
4.4	Das Delta-like 1 Protein (DLL1).....	27
4.5	Die Prozessierung von DLL1	28
4.6	Die intrazelluläre Domäne von DLL1 (D1CD)	28
4.7	Hinweise für einen bidirektionalen reversen Notch-Signalweg.....	30
4.8	Der bidirektionale Eph-Ephrine-Signaltransduktionsweg	31
5	Zielsetzung der Arbeit.....	33
6	Material und Methoden	34
6.1	Materialien	34
6.1.1	Chemikalien	34
6.1.2	Verbrauchsmaterialien	34
6.1.3	Enzyme.....	35
6.1.4	Gensynthesen	35
6.1.5	Primer.....	35
6.1.5.1	Primerliste	36
6.1.6	Plasmide	37
6.1.7	Bakterienstämme.....	37
6.1.8	Bakterien-Nährmedien	37

6.1.9	Säugerzellen	38
6.1.10	Primäre Antikörper.....	39
6.1.11	Sekundäre Antikörper	39
6.1.12	Sonden für <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	40
6.1.13	Datenbanken und Computerprogramme	40
6.2	Molekularbiologische Methoden	42
6.2.1	Präparative Plasmidisolierung.....	42
6.2.2	Transformation von DNA in Bakterien	42
6.2.3	Transfektion von DNA in Säugerzellen.....	42
6.2.4	Restriktionsverdau.....	42
6.2.5	Dephosphorylierung	43
6.2.6	Bestimmung der DNA-Konzentration mittels photometrischer Bestimmung	43
6.2.7	Ligation	43
6.2.8	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	44
6.2.9	Gelelution von DNA aus Agarosegelen.....	44
6.2.10	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	45
6.2.10.1	Taq-Polymerase.....	45
6.2.10.2	Expand High Fidelity Kit.....	46
6.2.11	Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)	47
6.2.11.1	RNA Präparation aus embryonalen Stammzellen (E14tg2) und murinen Embryonen..	47
6.2.11.2	cDNA-Synthese der isolierten RNA von E14tg2a Zellen und Embryonen.....	48
6.2.11.3	Ermittlung der relativen Expression von Genen durch qRT-PCR.....	49
6.2.12	Aufbereitung der DNA für Elektroporation in E14tg2a-Zellen.....	50
6.3	Proteinbiochemische Methoden	51
6.3.1	Poteinisolierung aus Säugerzellen.....	51
6.3.2	Proteinauftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese	51
6.3.3	Western Blot.....	53
6.3.4	Proteinfärbung durch Ponceau-Rot	54
6.3.5	Antikörperinkubation	54
6.4	Zellbiologische Methoden.....	55
6.4.1	Kultivierung von Säugerzellen.....	55
6.4.1.1	Kultivierung von CHO-Zellen	55

6.4.1.2	Immunfluoreszenzfärbungen von transient- und stabil exprimierenden CHO Zellen	56
6.4.2	Kultivierung der E14tg2a-Zellen zur Herstellung von transgenen Mäusen.....	57
6.4.2.1	Kultivierung von E14tg2a-Zellen für <i>in vitro</i> Untersuchungen.....	58
6.4.3	Aggregation und neuronale Differenzierung von E14tg2a-Zellen.....	59
6.4.4	Proliferationsmessung von transgenen E14tg2a-Zellen.....	60
6.4.5	Stabilisierung von Proteinen durch Proteasom-Inhibition.....	60
6.4.6	Inhibition der γ -Sekretase.....	61
6.5	Elektroporation von E14tg2a-Zellen.....	61
6.6	Selektion von <i>Hprt</i> -positiven E14tg2a-Zellen.....	62
6.7	Embryologische Methoden.....	63
6.7.1	Herstellung von chimären Mäusen.....	63
6.7.2	Isolation von Mausembryonen.....	63
6.7.3	DNA-Präparation aus Dottersäcken und Schwanzbiopsien.....	64
6.7.4	Genotypisierung von transgenen Mäusen.....	64
6.7.5	Altersbestimmung von Embryonen.....	66
6.7.6	Fixierung von Embryonen.....	66
6.7.7	Dehydrierung von Embryonen.....	66
6.7.8	Herstellung von <i>in situ</i> Sonden.....	66
6.7.8.1	Ganzpräparat <i>in situ</i> Hybridisierung (WISH).....	68
6.7.8.2	WISH: Hybridisierung.....	68
6.7.8.3	WISH: Entfernung der ungebundenen Sonde.....	68
6.7.8.4	WISH: Entfernung des ungebundenen Antikörpers.....	69
6.7.8.5	WISH: Färbung.....	69
7	Ergebnisse.....	72
7.1	Expression und Prozessierungen von DLL1 in CHO Zellen.....	72
7.1.1	Die Prozessierungen von DLL1.....	72
7.1.2	Inhibition der γ -Sekretasespaltung durch einen Transmembrandomänen austausch im DLL1-Protein.....	75
7.1.3	Inhibition der ADAM-Spaltung durch DLL1-Deletionskonstrukte.....	77
7.2	Überexpression der DICD zur Analyse einer potentiellen Signalwirkung in <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Untersuchungen.....	79
7.3	Überexpressionsstrategie von DICD Varianten in E14tg2a-Zellen und in der Maus	80

7.4	Verschiedene DICD-Varianten zur Überexpressionsanalyse in ES-Zellen und in der Maus.....	82
7.5	Induzierte Expression der drei unterschiedlichen DICD-Varianten in E14tg2a ES-Zellen.....	83
7.6	Proliferationsanalyse in den DICD-Varianten-exprimierenden E14tg2a-Zellen.....	85
7.7	Neuronale Differenzierung von DICDs überexprimierenden E14tg2a-Zellen	87
7.8	Auswirkungen der Überexpression der unterschiedlichen DICD-Varianten in transgenen Mäusen.....	89
7.9	Analyse der Überexpression der DICD-Varianten auf Signalwege und Prozesse der embryonale Entwicklung der Maus	93
7.9.1	Einfluss der Transgen Überexpression auf die Somitogenese	94
7.9.2	Auswirkungen der Überexpression der drei DICD-Varianten auf die Expression des Myogenese-Markergens <i>Myog</i>	95
7.9.3	Einfluss der Überexpression der DICD-Varianten auf die Expression von neurogenen Markern	97
7.9.4	Einfluss der Überexpression von DICD, fDICD und ΔEED auf die Expression von Notch-Zielgenen.....	100
7.9.5	Überexpression von fDICD in <i>Dll1^{LacZ/LacZ}</i> - Embryonen.....	103
7.9.6	Subzelluläre Lokalisation von DLL1 und DICD in transienten und stabil exprimierenden CHO-Zellen.....	105
7.9.7	Quantitative Analyse zum aktiven Transport der DICD in den Nukleus.....	108
8	Diskussion.....	112
8.1	Die potentielle Spaltung von DLL1	112
8.2	Auswirkungen der Überexpression der DICD-Versionen in E14tg2a-Zellen	116
8.3	Die Überexpression der DICD beeinflusst nicht die embryonale Entwicklung der Maus.....	118
8.3.1	DICD-Überexpression zeigte keine regulierenden Einflüsse auf den Notch-Signalweg.....	118
8.3.2	Die Überexpression von DICD beeinflusst nicht die Myogenese	119
8.3.3	Vergleichbare Expression von neuronalen Markergenen in transgenen Mäusen zu wildtyp Mäusen feststellbar	120
8.3.4	Die Ergebnisse deuten nicht auf einen aktiven Kerntransport der DICD hin	121
8.4	Die potentielle Funktion der DICD.....	123

8.5	Mögliche weiterführende Untersuchung zur Bidirektionalität des Notch-Signalweges	125
9	Abbildungsverzeichnis	127
10	Literaturverzeichnis.....	128
11	Wissenschaftliche Veröffentlichung	147
12	Danksagung.....	148
13	Lebenslauf	149
14	Erklärung.....	150

3 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
α	anti
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicilin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO	Chinese Hamster Ovary
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
ECD	extrazelluläre Domäne
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunde
ICD	Intrazellulär Domäne
Ig	Immunglobulin
IRES	Internal ribosomal entry site
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani Medium (Bakterienmedium)
m	Milli

M	Molar
min	Minute
mM	Millimolar
N-Terminus	Amino-Terminus
o. g.	Oben genannt
OD600	optische Dicht bei 600 nm Wellenlänge
Page	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBT	Phosphat gepufferte Salzlösung mit Tween-Zusatz
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
POD	Peroxidase
PSM	Präsomitisches Mesoderm
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TM	Transmembrandomäne
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
üN	über Nacht
WT	Wildtyp
WISH	Gesamtpräparat <i>in-situ</i> -Hybridisierung (whole mount <i>in situ</i> hybridisation)

4 Einleitung

Bei der Entstehung von Lebewesen sind wenige wesentliche Mechanismen erforderlich, die miteinander in Verbindung stehen und durch wenige Signalwege reguliert werden. Diese Signalwege ermöglichen es den Zellen, miteinander zu kommunizieren und auf äußere Signale zu reagieren. Wichtig für die Kommunikation zwischen den Zellen ist ein Austausch von Signalen, die unter anderem durch membranständige Rezeptoren vermittelt werden. Die Rezeptoren werden durch primäre Botenstoffe (Liganden) aktiviert, geben eine spezifische Information ins Zellinnere weiter und können unter anderem die Transkription von Genen beeinflussen. In der Embryogenese sind die Rezeptor-vermittelten Signalwege für die Entwicklung eines Organismus essentiell.

Der, nach dem Notch-Rezeptor benannte, Signalweg besitzt wichtige Bedeutung während der frühen Neurogenese, der Somitogenese, der Myogenese, der Hämatopoese und der Festlegung der Rechts-Links-Achse der inneren Organe. Die Aktivierung des Notch-Signalweges wird durch eine Interaktion zwischen dem Notch-Rezeptor mit einem Liganden initiiert. Ein wichtiger Vertreter der Notch aktivierenden Liganden ist das Delta-like 1 (DLL1) Protein.

4.1 Wichtige biologische Einflüsse des Notch-Signalweges

Der Notch-Signalweg ist ein evolutionär hoch konservierter Signalweg, der von essentieller Bedeutung bei der Vermittlung von Signalen zwischen benachbarten Zellen und der Festlegung von Zellschicksalen ist. Dieser Signaltransduktionsweg ist ein Regulator von vielen bedeutenden embryonalen Entwicklungsprozessen bei wirbel- und wirbellosen Organismen. (Artavanis-Tsakonas et al. 1999; Gridley 2007; Louvi und Artavanis-Tsakonas 2012; Yoon und Gaiano 2005).

Für Vertebraten und für viele Invertebraten ist ein segmentaler Körperaufbau charakteristisch. Diese Segmentierung ist bei Vertebraten anhand der Wirbelsäule zu erkennen. Die Vorläufer der einzelnen Wirbelkörper entwickeln sich bereits während der Embryogenese. Diese Vorläufer (Somiten) werden in der Embryogenese paarweise beidseits des Neuralrohres angelegt (Brand-Saberi et al. 1996) und besitzen ihren Ursprung im paraxialen Mesoderm. Aus den Somiten gehen im weiteren Verlauf der Entwicklung nicht nur die Wirbelkörper,

sondern auch die quergestreifte Muskulatur des Halses, des Rumpfes und der Extremitäten sowie das subkutane Gewebe der Haut hervor.

Die Entstehung der Somiten wird durch einen rhythmisch vorhandenen molekularen Mechanismus reguliert, der als „Segmentierungs-Uhr“ bezeichnet wird.

Hier wird durch die zyklische Expression von unterschiedlichen Genen in der Maus alle 90 Minuten die Bildung eines neuen Somitenpaares induziert. Während der Somitogenese dient der Notch-Signalweg als wichtiger Regulator, indem unter anderem Notch Zielgene oszillierend im Präsomitischen Mesoderm (PSM) exprimiert werden. Welche wichtige Bedeutung der Notch-Signalweg in der Somitogenese einnimmt, wird durch Notch1-, RBPjk- und DLL1 defiziente Mausembryonen verdeutlicht (Conlon et al. 1995; Hrabě de Angelis, M et al. 1997; Oka et al. 1995). Ein Verlust jeweils eines dieser drei Proteine führt zu unterschiedlichen Defekten in der Somitenmorphologie, da die korrekte Etablierung der Somitengrenzen gestört ist. Zusätzlich ist die Polarität der Somiten bei einem Verlust von DLL1 nicht mehr gegeben.

In der fortlaufenden Embryogenese differenzieren die Somiten, durch Signale des umliegenden Gewebes vermittelt, in mesenchymales Sklerotom und Dermomyotom. Aus dem ventralen Sklerotom gehen im weiteren Verlauf der embryonalen Entwicklung die späteren Rippen und die Wirbelkörper hervor. Aus dem dorsalen Dermomyotom bildet sich die Skelettmuskulatur des Rumpfes und der Extremitäten aus (Brand-Saberi und Christ 2000). Diese Muskelentwicklung steht unter der Kontrolle der myogenen Regulationsfaktoren (MRFs, myogenic regulatory factors) *Myf5*, *MyoD*, Myogenin und MRF4. Die MRFs sind Mitglieder der bHLH (basic-Helix-Loop-Helix)-Proteinfamilie und fungieren als wichtige Transkriptionsfaktoren in der myogenen Differenzierung (Weintraub et al. 1991; Zhang et al. 1995; Braun und Arnold 1995; Patapoutian et al. 1995). *In vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass Notch-Signale eine Inhibition der Myogenese auslösen (Shawber et al. 1996; Kopan et al. 1994; Wilson-Rawls et al. 1999). Als ein wichtiger Mediator, der die Expression der MRFs reprimiert, konnte das Notch Zielgen *Hes1* identifiziert werden. Die Transkription des *Hes1*-Gens wird durch eine DLL1 vermittelte Notch Aktivierung initiiert (Jarriault et al. 1998; Kuroda et al. 1999). Ein Verlust von DLL1 resultiert in einer vorzeitigen Muskeldifferenzierung und letztendlich zu einer stark verringerten Muskelmasse. Dies weist auf eine wichtige Funktion von DLL1 in der Regulation der Myogenese hin (Schuster-Gossler et al. 2007a).

Auf zellulärer Ebene beeinflusst der Notch Signalweg das Schicksal benachbarter Zellen, die Rezeptor und/ oder Liganden exprimieren (Artavanis-Tsakonas et al. 1999). Zur Bestimmung eines Zellschicksals reichen schon geringe stochastische Unterschiede der Expressionslevel von Rezeptor oder Liganden aus. Die Verstärkung der Notch Aktivität wird durch positive oder negative Rückkopplung in einer Zelle ausgelöst. Es werden aus dem ursprünglich gleichen Zelltyp zwei unterschiedliche Zellpopulationen gebildet. Bei Invertebraten konnte gezeigt werden, dass für die Festlegung des Zellschicksals bereits die doppelte Menge des Rezeptors oder des Liganden ausreicht, um das Zellschicksal zweier benachbarter Zellen unterschiedlich zu beeinflussen (Greenwald 1998). Dieser Vorgang, der als „*laterale Inhibition*“ bezeichnet wird, ist unter anderem für die Bildung von Neuroblasten während der Neurogenese bei *Drosophila melanogaster* und der Entwicklung der Haarsinneszellenvorläufer im Innenohr von Vertebraten verantwortlich (Muskavitch 1994; Chitnis et al. 1995; Fisher und Caudy 1998; Simpson 1997; Tiedemann et al. 1998).

4.2 Der kanonische Notch-Signaltransduktionsweg

Der Notch-Rezeptor und die Notch-Liganden sind Typ1 Transmembranproteine, die durch direkten Kontakt ein Mittel zur Zell-Zell-Kommunikation darstellen. Der Notch-Rezeptor fungiert funktionell im Notch-Signalweg als membranständiger, spaltbarer Transkriptionsfaktor (Kopan 2002).

Der Notch-Rezeptor wird als Vorläuferprotein im Endoplasmatischem Retikulum (ER) synthetisiert und unterliegt durch eine Furin-ähnliche Konvertase im trans-Golgi Netzwerk einer ersten proteolytischen Spaltung (S1) (siehe Abb. 1). Die Konvertase spaltet das Vorläuferprotein in zwei Proteinfragmente, die als Heterodimer an die Zelloberfläche gelangen (siehe Abb. 2) (Blauwueller et al. 1997; Logeat et al. 1998). Das heterodimere Notch-Protein unterliegt nach der Bindung eines Liganden einer Konformationsänderung, die zur Offenlegung einer Schnittstelle führt. Diese Schnittstelle ist Ansatzpunkt für eine zweite regulatorische proteolytische Spaltung (S2) durch ein ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*)-Protein (Mumm et al. 2000; Brou et al. 2000; Lieber et al. 2002). Die Spaltung hinterlässt ein sogenanntes *Notch Extracellular Truncated* (NEXT) Protein-Fragment, das sich aus der intrazellulären Domäne, der Transmembrandomäne und einem aus 12 Aminosäuren bestehenden extrazellulären Bereich zusammensetzt. Die abgespaltene

extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors wird in die Liganden-exprimierende Zelle endozytiert (trans-Endozytose, siehe Abb. 1). Das NEXT-Fragment ist ein direktes Substrat für eine intramembranäre Spaltung (S3) durch den γ -Sekretasekomplex und führt zur Freisetzung der intrazellulären Domäne des Notch1-Rezeptors (NICD) ins Zytosol (Wolfe 2004). Der γ -Sekretasekomplex schneidet die Transmembrandomäne des Notch Rezeptors ein weiteres Mal und hinterlässt ein Fragment aus 21 Aminosäuren, das N β -Peptid (siehe Abb. 1 S4). Massenspektrometrische Untersuchungen ergaben, dass es mehrere NICD- γ -Sekretase-Spaltprodukte mit unterschiedlichen N-terminale Aminosäuren gibt, deren Funktion bislang unbekannt sind (siehe Abb. 4) (Tagami et al. 2008). Die Kern-Lokalisierungs-Sequenzen (*nuclear localisation sequence*, NLS) in der NICD gewährleisten einen aktiven Transport der NICD in den Nukleus. Im Nukleus interagiert die NICD mit dem DNA-bindenden Transkriptionsfaktor CSL (*CBF1* (Mensch), *Suppressor of hairless* (*Drosophila*), *LAG-1* (*C. elegans*), *RBPjk* (Maus)).

Das CSL-Protein agiert in Abwesenheit der NICD als transkriptioneller Inhibitor in einem Komplex mit den Korepressoren SMRT (*silencing mediator of retinoic and thyroid receptors*), N-CoR (*nuclear receptor corepressor*) und CIR (*CBF1-interacting repressor*). Durch diesen Proteinkomplex werden unterschiedliche Histon-Deacetylasen rekrutiert, die die Lysinreste der Histone deacetylieren. Das führt zu einer dichteren Verpackung des Chromatins und inhibiert die Transkription von Zielgenen (Bray 2006; Lai 2002). Die Bindung der NICD an diesen Komplex bewirkt die Transformation von einem Komplex mit reprimierenden Eigenschaften zu einem Komplex mit aktivierenden Eigenschaften. Für die Bindung der NICD an den CSL-Komplex sind die Notch-intrazellulären RAM- und ANK-Domänen entscheidend, da diese die Bindung an den CSL-Komplex erlauben und die Dissoziation der transkriptionellen Repressoren begünstigen (Friedmann et al. 2008; Bertagna et al. 2008). Die ANK-CSL Verbindung wird von dem Protein Mastermind (MAM) erkannt und dieser ternäre Komplex rekrutiert Histon-Acetyltransferasen, Chromatin-remodeling Faktoren und einen Mediator Komplex um den transkriptionellen Aktivator Komplex zu bilden (Wilson und Kovall 2006; Petcherski und Kimble 2000; Nam et al. 2006; Fryer et al. 2004). Der Aktivator Komplex ermöglicht u. a. in *Drosophila* die Transkription von Mitgliedern der *Hairy/Enhancer of Split* basic-Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren. In Vertebraten sind die prominentesten Notch-Zielgene die homologen Gene der Hes- (*Hes1-7*) und Hey-Familie (*Hey1, Hey2, HeyL*) (Jarriault et al. 1995; Mumm et al. 2000; Logeat et al. 1998; Kopan et al. 1996).

Der Transaktivator-Komplex wird durch eine Ubiquitylierung mit anschließender proteasomaler Degradation der NICD inaktiviert (Baron 2003).

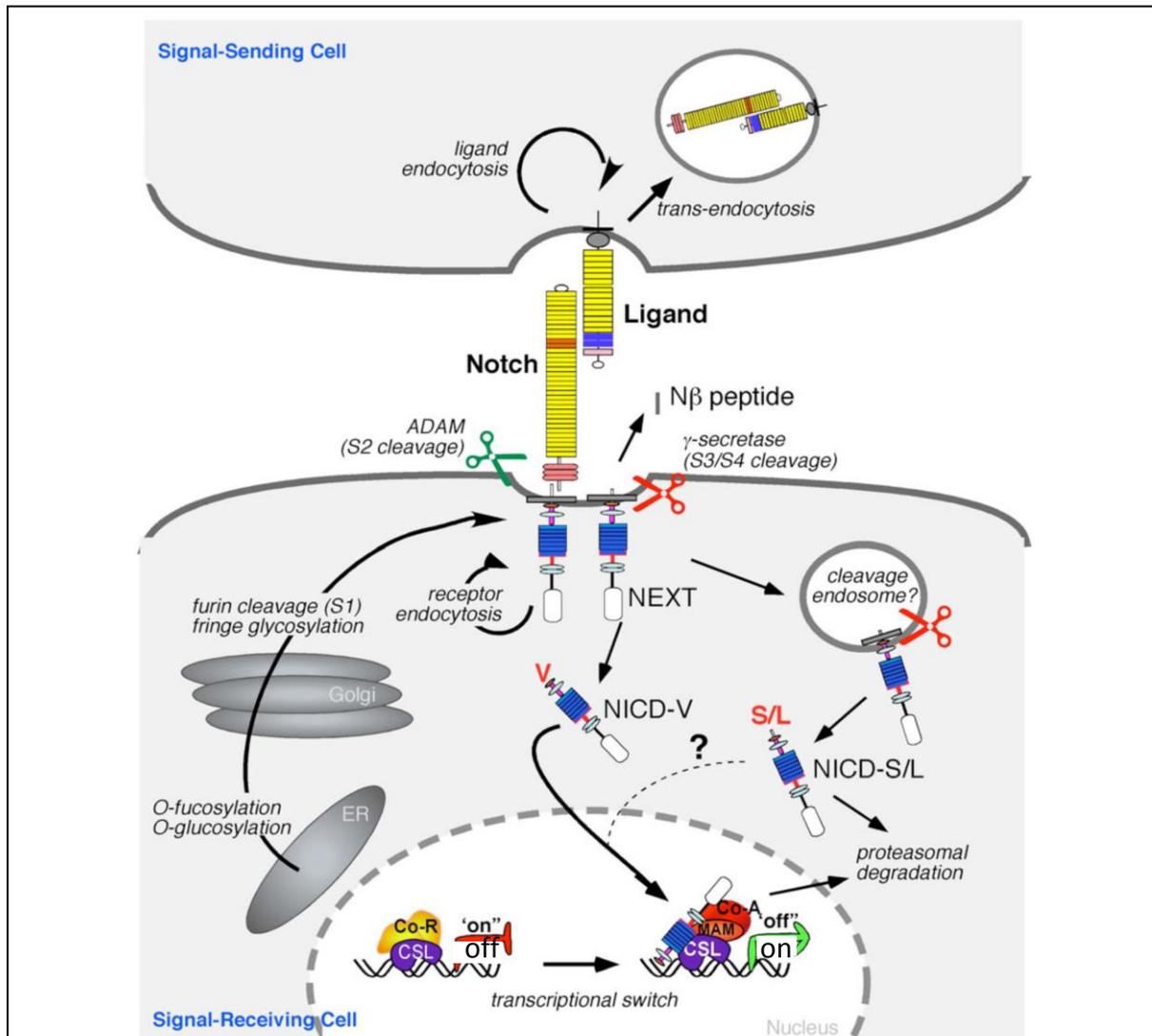


Abb. 1 Schematische Darstellung des kanonischen Notch-Signalweges

Der Notch-Rezeptor wird nach der Synthese im Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch die Glykosyltransferasen O-FUT (POFUT 1 in Vertebraten) und RUMI glykosyliert. Nach einer ersten Spaltung (S1) durch eine Furin-ähnlichen Konvertase im Golgi Netzwerk (Golgi) und einer weiteren Modifikation durch die Glykosyltransferase FRINGE gelangt der Notch-Rezeptor als Heterodimer an die Zelloberfläche. An der Zelloberfläche unterliegt der Notch-Rezeptor nach Bindung eines Liganden einer Konformationsänderung, die dazu führt, dass zwei weitere proteolytische Spaltungen folgen. Ein ADAM-Protein spaltet den Notch-Rezeptor in der juxtamembranen Region (S2) und hinterlässt das membranständige NEXT-Fragment. Das NEXT-Fragment ist ein Substrat für die intramembranäre Spaltung durch den γ -Sekretasekomplex (S3 und S4), die die Intrazellulardomäne des Notch-Rezeptors (NICD) ins Zytosol entlässt. Die γ -Sekretase-Spaltung entlässt die NICD mit unterschiedlichen N-terminalständigen Aminosäuren ins Zytosol (NICD-V, NICD-S, NICD-L). Die biologische Funktion der Spaltprodukte mit unterschiedlichen N-terminalen Aminosäuren ist bisher unklar. In Abwesenheit der NICD ist der CSL-Komplex mit Korepressoren (Co-R) assoziiert, die eine Transkription von Zielgenen reprimieren (off). Im Nucleus bewirkt die Bindung der NICD an den CSL-Transkriptionskomplex ein Ablösen der Korepressoren. Der nukleare Aktivator Mastermind (MAM) bindet an den NICD-CSL-Komplex, was eine Rekrutierung von Koaktivatoren (Co-A) ermöglicht und die Transkription der Notch-Zielgene aktiviert (on). (Modifiziert und übernommen aus Kopan und Ilagan 2009)

Bisher ist nicht bekannt, ob zusätzlich eine Bidirektionalität des Notch-Signalweges existiert, indem auch Signale in den Liganden-exprimierenden Zellen ausgelöst werden.

4.3 Die Komponenten des Notch-Signalweges

Speziesübergreifend sind mehrere Notch-Rezeptoren bisher beschrieben und charakterisiert worden. Bei invertebraten Organismen, wie *C. elegans* sind zwei Notch-ähnliche Rezeptorproteine (LIN-12 und GLP-1) bzw. bei *Drosophila melanogaster* ein Notch Rezeptor Protein beschrieben. In Vertebraten sind 4 unterschiedliche Notch-Rezeptoren bekannt (Notch1- Notch4). (Artavanis-Tsakonas et al. 1995; Uyttendaele et al. 1996; Lardelli et al. 1995), (Greenwald 1994).

Die Anzahl der Liganden variiert ebenfalls in den unterschiedlichen Organismen. In *Drosophila* sind Delta und Serrate und bei *C. elegans* Lag-2, APX-1, ARG-1 sowie DSL-1 bekannt. In Vertebraten sind Delta-like 1 und Delta-like 4, sowie Jagged 1 und Jagged 2 charakterisiert worden (Übersicht siehe Abb. 3) (Dunwoodie et al. 1997; Bettenhausen et al. 1995; Shutter et al. 2000; Jen et al. 1997). Bei Vertebraten wird Delta-like 3 noch als Ligand des Notch-Rezeptors aufgeführt, dieser bindet jedoch nicht an den Notch-Rezeptor und erfüllt daher keine echte Ligandenfunktion (Geffers et al. 2007).

Eine wichtige regulatorische Funktion für den Notch-Signalweg besitzen ADAM-Proteine und der γ -Sekretasekomplex. Diese prozessieren sowohl den Notch-Rezeptor als auch die Notch-Liganden im juxtamembranen Bereich bzw. in der Transmembrandomäne und ermöglichen dadurch die Freisetzung der NICD und der intrazellulären Domänen der Liganden ins Zytosol

Im folgenden Abschnitt werden die wesentlichen Mitglieder des Notch-Signalweges beschrieben.

4.3.1 Die Notch-Rezeptoren

Der *Drosophila* Notch-Rezeptor ist ein Typ-1 transmembranständiges Protein mit einer molekularen Masse von 300 kDa, das in der extrazellulären Domäne Motive für die Bindung des Liganden und in der intrazellulären Domäne Motive für die Signaltransduktion besitzt.

Charakteristischerweise besitzen alle Notch-Rezeptoren in der extrazellulären Domäne eine große Anzahl von EGFR (*epidermal growth factor repeats*)-Motiven. Der Notch-Rezeptor aus *Drosophila* besitzt 36, und die Notch-Rezeptoren aus der Maus zwischen 29 bis 36 EGFRs (siehe Abb. 2), die wichtige Eigenschaften für die Liganden-Interaktion besitzen und zur Struktur des Proteins beitragen. Die EGFRs 11 und 12 sind bei der *trans*-Interaktion und die EGFRs 24-29 bei der *cis*-Interaktion des Notch-Rezeptors mit einem Liganden beteiligt (de Celis, J F und Bray 2000). Zur Proteinstruktur von Notch trägt die Fähigkeit einiger EGFRs bei, Kalzium zu binden. Die Kalziumbindung dieser EGFRs erhöht zusätzlich die Affinität des Notch-Rezeptors zu den Liganden (Cordle et al. 2008; Raya et al. 2004). Viele der EGFRs werden durch zwei verschiedene Formen der O-Glykosylierung (O-Fukose und/oder O-Glukose) modifiziert (siehe Abb. 1 und Abb. 2) (Haines und Irvine 2003; Visan et al. 2006; Vodovar und Schweisguth 2008; Stanley 2007; Rampal et al. 2007). Die O-Fukosyltransferase O-FUT (in *Drosophila*)/ POFUT 1 (in Säugetieren) fukosyliert verschiedene EGFRs. Dies ist Voraussetzung für eine weitere Modifikation durch die β -1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase FRINGE (Okajima und Irvine 2002). FRINGE fügt an die O-Fukose β -N-Acetylglukosamin an und kann in *Drosophila* und in *Drosophila*-S2 Zellen die Bindung des Liganden Delta an den Notch-Rezeptor verstärken und die Bindung des Liganden Serrate an den Notch Rezeptor inhibieren (Xu et al. 2007). In Vertebraten sind drei verschiedene homologe FRINGE Proteine bekannt, MANIC-FRINGE, LUNATIC-FRINGE und RADICAL-FRINGE (Yang et al. 2005; Nichols et al. 2007; Moloney et al. 2000; Shimizu et al. 2001). Die Glycosyltransferase RUMI, welche erstmals in *Drosophila* beschrieben wurde, fügt O-Glukose an unterschiedliche EGFs an, was sich positiv auf die Ligandenbindung auswirkt (Acar et al. 2008; Rana et al. 2011).

Den EGFRs folgt C-terminal eine NRR-Domäne, die drei Cystein-reiche Lin12 Wiederholungen (Lin12 *repeats*, LNR) und die Heterodimerisationsdomäne (HD) beinhaltet. Die NRR-Domäne übernimmt eine wichtige Funktion, indem sie eine ligandenbindungsunabhängige Prozessierung des Notch-Rezeptors durch ein ADAM-Protein verhindert. Die meisten Notch-Rezeptoren werden, wie bereits beschrieben, durch eine Furin-ähnliche Konvertase in der HD-Domäne gespalten (S1-Spaltung), die das Notch-Protein in zwei Fragmente teilt. Beide Fragmente, NECD (Notch extracellular domain) und NTMIC (Notch transmembrane and intracellular domain), bilden einen heterodimeres Notch-Protein, dass durch eine nicht-kovalente Interaktion der N- und C-terminalen Hälften der HD-Domäne verbunden ist (siehe Abb. 2).

Die für die Signaltransduktion verantwortliche NICD besitzt N-terminal ein RAM (*Regulation of Amino Acid Metabolism*)-Motiv, das der NICD ermöglicht mit Proteinen im Kern (z. B. RBPjk) zu interagieren (Lubman et al. 2007). In der NICD befinden sich mehrere Kernlokalisierungssequenzen (NLS) die den aktiven Transport der NICD in den Kern gewährleisten. Den NLS folgt eine divergente Transaktivator-domäne (TAD). Am C-Terminus der NICD befindet sich eine konservierte PEST-Domäne (proline/glutamic acid⁷/serine/threonine-rich motif), die Degron-Motive beinhaltet und für die Stabilität der NICD wichtige Bedeutung besitzt.

Exprimiert wird der Notch1-Rezeptor während der embryonalen Entwicklung von Vertebraten in allen drei Keimblättern (Mesoderm, Endoderm und Ekoderm). Notch1-defiziente Embryonen sterben am Tag E10 (Swiatek et al. 1994; Conlon et al. 1995)

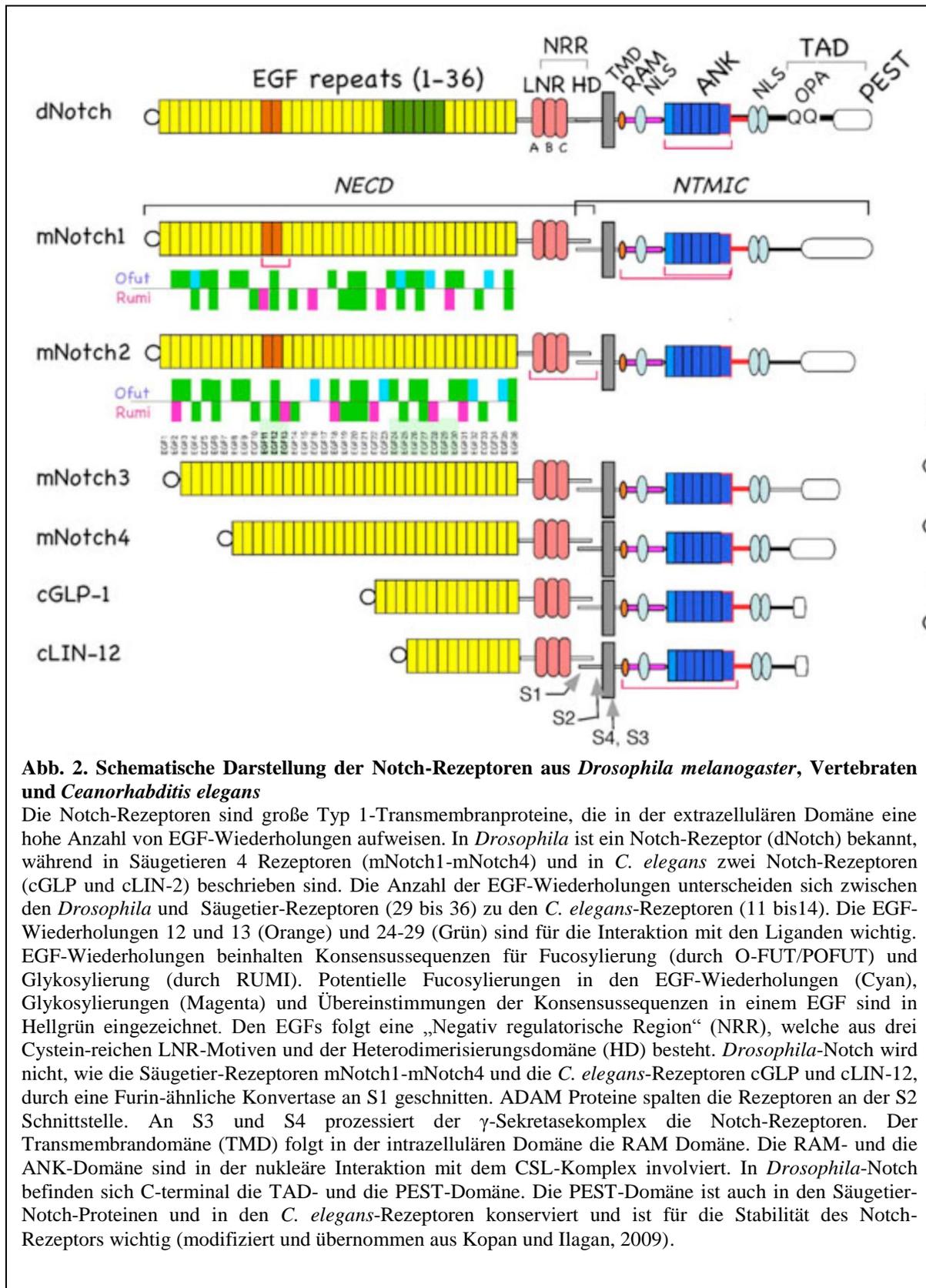


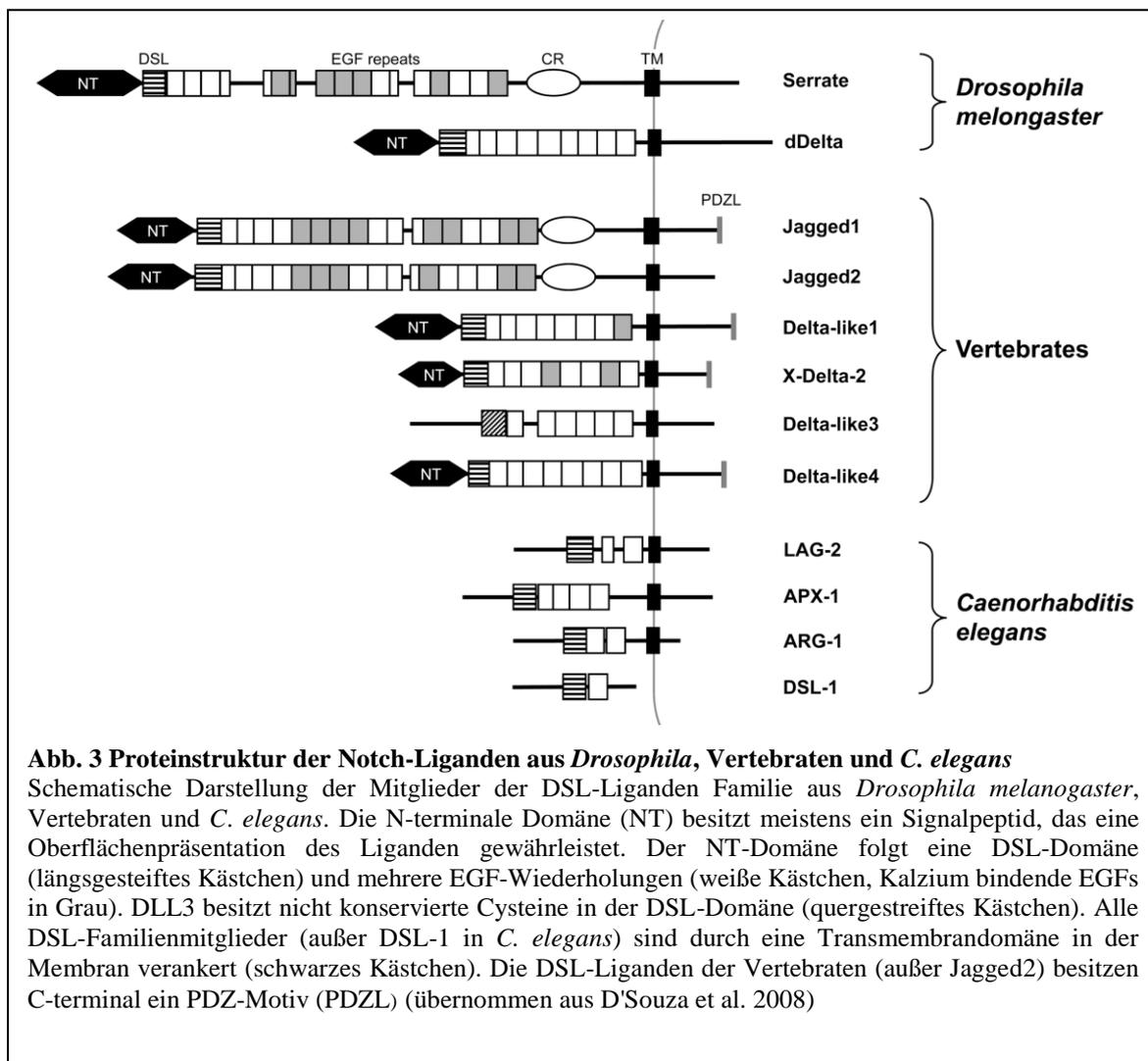
Abb. 2. Schematische Darstellung der Notch-Rezeptoren aus *Drosophila melanogaster*, Vertebraten und *Ceanorhabditis elegans*

Die Notch-Rezeptoren sind große Typ 1-Transmembranproteine, die in der extrazellulären Domäne eine hohe Anzahl von EGF-Wiederholungen aufweisen. In *Drosophila* ist ein Notch-Rezeptor (dNotch) bekannt, während in Säugetieren 4 Rezeptoren (mNotch1-mNotch4) und in *C. elegans* zwei Notch-Rezeptoren (cGLP und cLIN-2) beschrieben sind. Die Anzahl der EGF-Wiederholungen unterscheiden sich zwischen den *Drosophila* und Säugetier-Rezeptoren (29 bis 36) zu den *C. elegans*-Rezeptoren (11 bis 14). Die EGF-Wiederholungen 12 und 13 (Orange) und 24-29 (Grün) sind für die Interaktion mit den Liganden wichtig. EGF-Wiederholungen beinhalten Konsensussequenzen für Fucosylierung (durch O-FUT/POFUT) und Glykosylierung (durch RUMI). Potentielle Fucosylierungen in den EGF-Wiederholungen (Cyan), Glykosylierungen (Magenta) und Übereinstimmungen der Konsensussequenzen in einem EGF sind in Hellgrün eingezeichnet. Den EGFs folgt eine „Negativ regulatorische Region“ (NRR), welche aus drei Cystein-reichen LNR-Motiven und der Heterodimerisierungsdomäne (HD) besteht. *Drosophila*-Notch wird nicht, wie die Säugetier-Rezeptoren mNotch1-mNotch4 und die *C. elegans*-Rezeptoren cGLP und cLIN-12, durch eine Furin-ähnliche Konvertase an S1 geschnitten. ADAM Proteine spalten die Rezeptoren an der S2 Schnittstelle. An S3 und S4 prozessiert der γ -Sekretasekomplex die Notch-Rezeptoren. Der Transmembrandomäne (TMD) folgt in der intrazellulären Domäne die RAM Domäne. Die RAM- und die ANK-Domäne sind in der nukleäre Interaktion mit dem CSL-Komplex involviert. In *Drosophila*-Notch befinden sich C-terminal die TAD- und die PEST-Domäne. Die PEST-Domäne ist auch in den Säugetier-Notch-Proteinen und in den *C. elegans*-Rezeptoren konserviert und ist für die Stabilität des Notch-Rezeptors wichtig (modifiziert und übernommen aus Kopan und Ilagan, 2009).

4.3.2 Die Notch-Liganden

In der extrazellulären Domäne besitzen die Notch-Liganden eine DSL-Domäne und eine unterschiedliche Anzahl von EGF-ähnlichen Wiederholungen (siehe Abb. 3). Für die Bindung an den Notch-Rezeptor sind die DSL-Domäne und die ersten beiden EGF-ähnlichen Wiederholungen essentiell (Shimizu et al. 1999; Parks et al. 2006; Geffers et al. 2007). In *in vitro* Experimenten konnte allerdings gezeigt werden, dass die DSL-Domäne die minimale Einheit darstellt um an die EGFs 11 und 12 des Notch Rezeptors zu binden (Henderson et al. 1994; Muskavitch 1994; Lieber et al. 1993; Fitzgerald und Greenwald 1995; Shimizu et al. 1999).

In Vertebraten wurden die Notch-Liganden anhand der Ähnlichkeit zu den *Drosophila* Notch-Liganden in zwei Gruppen unterteilt. Es gibt dDelta-ähnliche- (Delta-like 1, Delta-like 3, Delta-like 4 und X-Delta-2) und zwei Serrate-ähnliche Notch-Liganden (Jagged 1 und Jagged 2) (Dunwoodie et al. 1997; Bettenhausen et al. 1995; Shutter et al. 2000; Jen et al. 1997). Die Serrate-ähnlichen Liganden weisen eine höhere Anzahl an EGF-ähnlichen Wiederholungen auf wie die dDelta-ähnlichen Liganden. In Jagged 1 und Jagged 2 wurden zusätzliche cysteinreiche Regionen charakterisiert, die eine partielle Homologie mit dem „von Willebrand Faktor“ (VWFC) zeigen. Allerdings fehlen Jagged 1 und Jagged 2 die terminale Sequenz (CCX8C), die sonst in allen anderen VWFC Domänen gefunden wurden (D'Souza et al. 2008). In den intrazellulären Domänen der unterschiedlichen Notch-Liganden sind nur wenige konservierte Sequenzen vorhanden und nicht alle Liganden-ICDs besitzen C-terminal ein PDZ (Post-synaptic density-95/Discs large/ Zonula occludentes-1)-Bindemotiv (Pintar et al. 2007). Die Notch-Liganden, mit Ausnahme von DLL3 und Jagged 2, besitzen verschiedene PDZ-Bindemotive und können mit unterschiedlichen Proteinen interagieren. Das Jagged 1-Protein ist in der Lage mit dem Ras-bindenden Protein Afadin (AF6) zu interagieren (Ascano 2002; Hock et al. 1998) und die DLL1- und DLL4-Liganden interagieren mit DLG1, dem humanem Homolog des *Drosophila melanogaster* Discs Large Proteins (Six 2004). Andere Studien zeigten, dass das DLL1 PDZ-Bindungsmotiv wichtig für Interaktionen mit Mitgliedern der MAGI-Familie (*Membrane-associated Kinases with inverted domain arrangement*) und der MAGUK-Familie (*Membrane-associated guanylate kinase*) ist (Wright 2004; Pfister et al. 2003).



4.3.3 Die ADAM-Proteine

Die Proteine der ADAM (a disintegrin and metalloprotease)-Familie vermitteln eine proteolytische Spaltung in der Ektodomäne diverser Typ I und Typ II Transmembranproteine. Zur Familie der ADAM-Proteine zählen 40, zum Teil hoch konservierte, Mitglieder, die einen charakteristischen Aufbau zeigen (Quelle: http://people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMs.html). Ein Großteil der Mitglieder der ADAM-Proteinfamilie ist im Golgi-Apparat lokalisiert und nur ein kleiner Anteil auf der Zelloberfläche (Lammich et al. 1999; Schlöndorff et al. 2000; Gutwein 2002).

Als die katalytisch aktive Subdomäne der ADAM-Proteine wurde die Metalloprotease-Domäne identifiziert. Sie ist für die Proteaseaktivität hauptverantwortlich und spaltet die Substrate in deren Ektodomäne.

Beim Notch-Rezeptor und bei den Notch-Liganden ist eine ADAM vermittelte proteolytische Spaltung die Voraussetzung für die anschließende γ -Sekretasespaltung. Aus Studien an Fibroblasten ist bekannt, dass mehrere ADAM-Proteasen (ADAM9, ADAM10, ADAM 12 und ADAM17) die Spaltung des murinen Notch-Liganden DLL1 in der Ektodomäne, nahe der Membran, durchführen (Dyczynska et al. 2006).

Während bei ADAM17-defizienten Mäusen kein Notch-Phänotyp beobachtet werden konnte, zeigte sich dieser Phänotyp bei ADAM10-defizienten Mausembryonen (Hartmann 2002). Dies spricht für eine essentielle Aufgabe von ADAM10 im Notch-Signalweg während der murinen Entwicklung. Es wird angenommen, dass in Vertebraten in unterschiedlichen Zelltypen/ Geweben eine unterschiedliche Anzahl von verschiedenen ADAM-Proteinen exprimiert werden, die bei Verlust eines ADAM-Proteins (z.B. durch Mutation) dessen proteolytischen Aufgaben kompensieren können (Zolkiewska 2008; Brou et al. 2000; Mumm et al. 2000; Lieber et al. 2002; Hartmann 2002; Dyczynska et al. 2006).

4.3.4 Der γ -Sekretasekomplex

Der multimere, intramembranär lokalisierte γ -Sekretasekomplex spaltet Transmembranproteine in deren Transmembrandomäne (Selkoe und Kopan 2003). Der γ -Sekretasekomplex setzt sich aus den vier folgenden integralen Membranproteinen zusammen: Presenilin (PS), Nicastrin (NCT), *anterior pharynx-defective 1* (APH-1) und *presenilin enhancer 2* (PEN-2) (Takasugi et al. 2003; Edbauer et al. 2003; Kimberly et al. 2003).

Presenilin, die katalytische Untereinheit des Komplexes, unterliegt einer autoproteolytischen Spaltung, die zur Reifung des Proteins dient. Es existieren zwei homologe Proteine des Presenilins (PS-1 und PS-2) mit redundanter proteolytischer Funktion. NCT besitzt eine große, vielfach glykosylierte extrazelluläre Domäne, die wichtig für die Stabilisation des Komplexes und der Substratbindung ist (Shah et al. 2005; Yu et al. 2000). Es konnte jedoch für Notch gezeigt werden, dass das NCT Protein nicht entscheidend, für die Notch-Substraterkennung und die Notch-Prozessierung ist (Zhao et al. 2010). PEN-2 ist essentiell für die Endoproteolyse des PS-Gesamtproteins in zwei katalytische aktive Fragmente (PS-NTF

und PS-CTF) (Ahn et al. 2010; Prokop 2004). Die biochemische Funktion des hydrophoben APH-1 Proteins ist noch weitgehend unbekannt. In Säugetieren existieren zwei oder drei *Aph-1* Gene (*Aph-1a* und *Aph-1b*, in Maus zusätzlich *Aph-1c*) und *Aph-1a* kann durch alternatives *splicen* in zwei Isoformen auftreten (APH1aS für APH-1a short und APH-1aL für APH-1a long). Es wird hypothetisiert, dass die sechs möglichen unterschiedlichen γ -Sekretasekomplexvarianten (PS-1 mit APH1aS, APH-1aL oder APH-1b bzw. PS-2 mit APH1aS APH-1aL oder APH-1b) unterschiedliche Substrate erkennen, prozessieren und in unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen auftreten können (Tomita und Iwatsubo 2013; Wakabayashi und Strooper 2008; Shirotani et al. 2007). So werden z. B. Cadherine durch einen γ -Sekretasekomplex prozessiert, in dem PS-1 involviert ist und APP (*Amyloid precursor protein*) sowie der Notch-Rezeptor durch γ -Sekretasekomplexe mit PS-1 oder PS-2 (Steiner 1999).

Die Substrate des γ -Sekretasekomplexes weisen keine erkennbare Konsensussequenzen auf, so dass andere Charakteristika verantwortlich für eine Prozessierung der Substrate durch den γ -Sekretasekomplex ausschlaggebend sind (Li et al. 2009).

Folgende Voraussetzungen müssen die Substrate des γ -Sekretasekomplexes erfüllen:

- Das Substrat muss ein Transmembranprotein sein;
- Es muss eine kurze Ekdodomäne aufweisen, meistens durch vorherige Prozessierung durch eine α -Sekretase (meistens durch ein ADAM-Protein);
- Die Transmembrandomäne und die zytosolische Domäne des Substrates müssen zugänglich für die Bindung des γ -Sekretasekomplexes sein (Hemming et al. 2008)
- Und wahrscheinlich müssen bestimmte Aminosäuren in direkter Umgebung der Spaltstelle vorhanden sein, die sich auf helikale Strukturen der Transmembrandomäne des Substrates destabilisierend auswirken (Beel und Sanders 2008).

Der γ -Sekretasekomplex prozessiert eine Vielzahl von Substraten und wird in Kopan und Ilagan 2004 als „Proteasom der Membran“ tituiert und diskutiert. In der Tat weisen das zytosolische Proteasom und der membranständige γ -Sekretasekomplex Gemeinsamkeiten auf. Beide unterliegen einer proteolytischen Reifung, um in ihre aktive Form transformiert zu werden. Die cytosolische Schleife zwischen den Transmembrandomänen TM6 und TM7 des Presenilins wird zur Komplexaktivierung ebenfalls gespalten. Des Weiteren unterliegen das Proteasom und der γ -Sekretasekomplex

einem genau festgelegten, schrittweisen Proteinaufbau. Durch Ubiquitylierung von Proteasom-Substraten werden zu degradierende Proteine markiert. Ein ähnlichen Vorgang zur Markierung von Substraten des γ -Sekretasekomplex ist allerdings nicht bekannt.

4.4 Das Delta-like 1 Protein (DLL1)

Das murine Delta-like 1 (DLL1) Protein ist ein Homolog des Delta aus *Drosophila melanogaster* und besteht aus 722 Aminosäuren (Bettenhausen et al. 1995).

Die extrazelluläre Domäne von DLL1 setzt sich aus 545 Aminosäuren, die Transmembrandomäne aus 23 Aminosäuren und die intrazelluläre Domäne aus 154 Aminosäuren zusammen. Am N-Terminus besitzt das DLL1-Protein ein kurzes hydrophobes Signalpeptid, das eine Oberflächenpräsentation gewährleistet. Ebenfalls sind in der extrazellulären Domäne eine DSL-Domäne und acht cysteinreiche EGF-ähnliche Wiederholungen lokalisiert. Jede EGF-ähnlichen Wiederholung besteht aus ca. 30-40 Aminosäuren. In den EGFs sind 6 charakteristische Cysteine vorhanden, die drei Disulfidbrücken ausbilden und somit zur Struktur und Stabilität des DLL1-Proteins beitragen (Campbell und Bork 1993). Die EGF-ähnlichen Wiederholungen 4 und 7 zeigen Konsensussequenzen für eine Kalziumbindung. Diese tragen zur Stabilität gegenüber proteolytischen Spaltungen bei. Zusätzlich beinhalten die EGF-Wiederholungen Konsensussequenzen für Modifizierungen von O-Fucose-Glykane und N-Glykane (Haltiwanger und Lowe 2004; Xia 2004). Die Transmembrandomäne besteht aus 23 Aminosäuren und verankert das DLL1 Protein in der Zellmembran. In der intrazellulären Domäne von DLL1 (DICD) sind Konsensussequenzen für Phosphorylierung und Ubiquitylierung identifiziert worden (Heuss et al. 2008, unveröffentlichte Daten von Eike Braune).

Durch die E3-Ligasen Mind bomb bzw. Neuralized werden in der DICD Lysine mit Ubiquitin markiert, was zu einer Endozytose des DLL1-Proteins führt (Koo et al. 2005; Lai et al. 2001). Diese konstitutive Endozytose, von der Zelloberfläche ins Innere der Zelle und das anschließende Recycling zurück zur Zelloberfläche, fördert die Bindung des Liganden an den Notch-Rezeptor (Heuss et al. 2008).

Des Weiteren sind in der ICD potentielle NLS vorhanden und C-terminal eine PDZ Domäne. In Abschnitt 4.6 wird expliziert auf die intrazelluläre Domäne von DLL1 eingegangen.

4.5 Die Prozessierung von DLL1

Wie bereits kurz erwähnt, unterliegt der Notch-Ligand DLL1 zwei proteolytischen Spaltungen die unabhängig von der Bindung zum Notch-Rezeptor geschehen. Die erste Spaltung erfolgt durch eine ADAM-Protease (A Disintegrin and Metalloprotease) in der Ektodomäne nahe der Transmembrandomäne (Dyczynska et al. 2006; Zolkiewska 2008). Diese spaltet das DLL1 Protein zwischen dem Histidin⁵³⁵ und dem Methionin⁵³⁶ (Six et al. 2003). Für DLL1 ist bekannt, dass ADAM9, ADAM10, ADAM12 und ADAM17 an der Spaltung beteiligt sind und bei Fehlen eines ADAM-Proteins die anderen ADAM-Proteine die Aufgabe der fehlenden Protease kompensieren können (Dyczynska et al. 2006). Die ADAM-vermittelte Spaltung hinterlässt ein Fragment (TMICD, beinhaltet Transmembran- und die intrazelluläre Domäne) welches vom γ -Sekretasekomplex erkannt und gespalten wird (Six et al., 2003, LaVoie and Selkoe, 2003, Ikeuchi und Sisodia 2003). Die γ -Sekretase-Spaltung ist die Grundlage für die Freisetzung der intrazellulären Domäne von DLL1 (DICD) ins Zytosol, welche anschließend die Möglichkeit erhält in den Nukleus zu translokalisieren (Six et al. 2003; LaVoie 2003; Jung et al. 2011; Hiratochi et al. 2007; Ikeuchi 2003; Kiyota und Kinoshita 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die DICD an der transkriptionellen Aktivierung und Hochregulierung von Genen beteiligt ist (LaVoie 2003; Hiratochi et al. 2007; Kolev et al. 2005).

4.6 Die intrazelluläre Domäne von DLL1 (DICD)

In der intrazellulären Domäne von DLL1 (DICD) sind verschiedenen Aminosäuren und Subdomänen identifiziert worden, die für mögliche Funktionen oder Interaktionen mit anderen Proteinen wichtig sind. So befinden sich in der DICD 16 bis 17 Lysine, die potentielle Ziele für eine Ubiquitylierung durch die E3-Ubiquitinligasen Mind Bomb und Neuralized sind. Ein Lysin ist ein bekannter Polymorphismus in der DICD-Aminosäuresequenz (Glutamat (E) oder Lysin (U)) (siehe Abb. 4, Quelle www.uniprot.org). Die Ubiquitylierung der Lysine in der DICD ist wichtig für die Oberflächenpräsentation in bestimmten Bereichen der Zellmembran (Heuss et al. 2008). Das wildtyp DLL1 lokalisiert bevorzugt in Mikrodomänen (*lipid rafts*) auf der Zellmembran, während eine ubiquitylierungs defiziente DLL1-Variante in den *lipid rafts* nicht nachweisbar war (Heuss et al. 2008; Zhang et al. 2011). Ein Austausch aller Lysine in der DICD durch Arginin zeigte

außerdem, dass das Recycling von DLL1, die *trans*-Endozytose der ECD des Notch-Rezeptors und die *trans*-zelluläre Notch Aktivität verändert sind. Zusätzlich scheint das Lysin⁶¹³ wichtig für die *cis*- und *trans*-zelluläre Interaktion von DLL1 mit dem Notch-Rezeptor und damit der Notch Aktivität zu sein (Zhang et al. 2011).

Massenspektrometrische Analysen der DICD ergaben drei Aminosäuren, an denen Phosphatgruppen reversibel gebunden werden. Welche biologische Relevanz die Phosphorylierung der ICD von DLL1 an Threonin⁶³⁸, Serin⁶⁹³ und Serin⁶⁹⁶ besitzt ist noch unklar. Eine DLL1-phosphorylierungs-defiziente Variante verursachte in der embryonalen Entwicklung der Maus keinen erkennbaren Phänotyp. Ein lösliches DICD Fragment wurde erst phosphoryliert, wenn N-terminal ein Myristoylierungssignal fusioniert wurde. Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne durch eine bisher unbekannte Kinase nahe der Zellmembran geschieht (Braune et al., 2014).

Die DICD-Aminosäuresequenz weist Bereiche auf, in denen mehrere positiv-geladene Aminosäuren auftreten, die als potentielle NLS fungieren könnten. In der humanen DICD konnten zwei Bereiche verifiziert werden, die als NLS fungieren (Kolev et al. 2005). Ein Vergleich zwischen der humanen und der murinen DICD zeigt, dass sich diese Bereiche nur um jeweils eine Aminosäure unterscheiden (siehe Abb. 23). Eine Kernlokalisierung der murinen DICD sowie Interaktionen mit Kernproteinen konnte in verschiedenen *in vitro*-kultivierten Zelltypen nachgewiesen werden und weist auf einen möglichen Einfluss der DICD auf transkriptioneller Ebene hin (Six et al. 2003; LaVoie 2003; Jung et al. 2011; Hiratochi et al. 2007; Ikeuchi 2003; Kiyota und Kinoshita 2004). Am C-terminalen Ende besitzt die DICD ein PDZ-Bindemotiv, das die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt (siehe Abb. 4, ATEV).

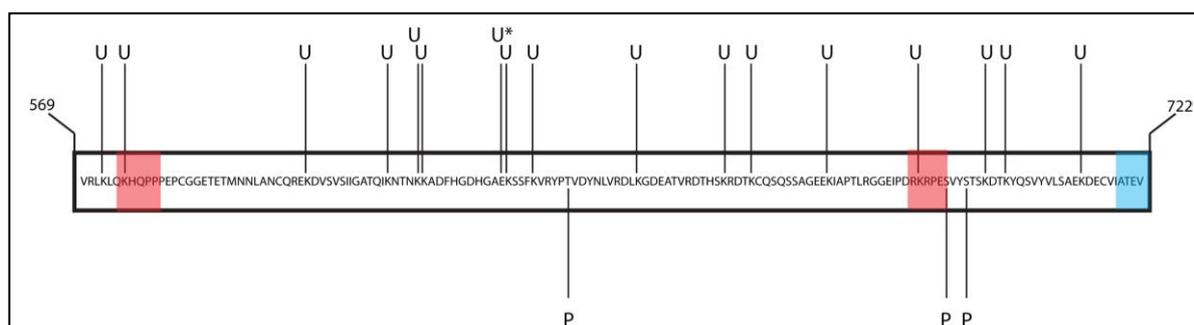


Abb. 4: Schematische Darstellung der intrazellulären Domäne von DLL1

In der schematischen Darstellung der intrazellulären Domäne von DLL1 sind die konservierten Lysine, die potentiell ubiquitinyliert werden (U) und die Aminosäuren, die phosphoryliert werden (P), markiert. U* ist ein bekannter Polymorphismus (Glutamat (E) oder Lysin (K)). Mit Rot sind die potentiellen NLS und in Blau das PDZ-Bindemotiv hinterlegt.

4.7 Hinweise für einen bidirektionalen reversen Notch-Signalweg

Die proteolytische Prozessierung der Notch-Liganden ist Voraussetzung für die Freisetzung der intrazellulären Domäne ins Zytosol. In *in vivo*-Analysen konnten Spaltprodukte von endogenem Jagged1 in Ratten nachgewiesen werden (LaVoie 2003). In neuronalen Stammzellen, die aus E10,5 Mausembryonen isoliert wurden, konnten ebenfalls Spaltprodukte des endogenen DLL1 gezeigt werden, die der intrazellulären Domäne entsprechen (Hiratochi et al. 2007). Dies zeigt, dass die DSL-Proteine in verschiedenen Vertebraten den gleichen proteolytischen Prozessen unterliegen wie der Notch-Rezeptor. Eine Kernlokalisierung von freier, überexprimierter DICD von DLL1 wurde bereits in mehreren *in vitro*-Studien gezeigt (Six et al. 2003; Bland 2003; Liebler et al. 2012a; Kolev et al. 2005). Die Bedeutung der DICD Kernlokalisierung für eine potentielle Funktion und damit verbunden, für einen potentiellen bidirektionalen, reversen Notch-Signalweg ist bislang nicht eindeutig geklärt.

In DICD-Überexpressionsstudien ist beschrieben, dass die intrazelluläre Domäne von DLL1 auf verschiedene zellbiologische Prozesse regulatorisch einwirkt, indem es u. a. durch physische Interaktion mit dem NICD-RBPj κ -Transkriptionskomplex eine Transkription von Notch-Zielgenen unterdrückt (Jung et al. 2011). Ähnliche Auswirkung auf den Notch-Signalweg hat auch eine Überexpression der intrazellulären Domäne von Jagged 1, die ebenfalls mit der NICD eine physische Interaktion eingeht und dadurch die Bindung von NICD mit RBPj κ verhindert. Dies führt letztlich zu einer beschleunigten proteasomalen Degradation der NICD (Kim et al. 2011).

Die Überexpression von humanem DLL1 in HUVEC und NIH3T3 Zellen wirkte sich drastisch auf die Proliferation der Zellen aus, indem eine Hochregulierung des p21-Proteins (auch CDK 1) nachgewiesen werden konnte. Dieses führte zu einer Reduzierung der Proliferationsrate von 50-80% (Kolev et al. 2005; Liebler et al. 2012b). Das p21-Protein ist ein Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen, die wichtig für die Regulation des Zellzyklus sind. Eine Stimulation der Differenzierung von isolierten neuronalen Stammzellen, sowie die Induzierung einer neuronalen Differenzierung in P19-Teratokarzinomazellen wurde durch die Überexpression der murinen DICD beobachtet. Die murine DICD scheint auch den TGF- β Signalweg zu beeinflussen, indem sie mit Transkriptionsfaktoren der SMAD-Familie interagiert (Hiratochi et al. 2007; Bordonaro et al. 2011).

Inwiefern die intrazellulären Domänen der Notch-Liganden eine stimulierende Signalwirkung auf die Differenzierung von Stammzellen sowie eine antagonistische oder regulierende

Wirkung auf den Notch Signalweg unter physiologischen Bedingungen während der Mausentwicklung ausübt, ist bisher unklar.

4.8 Der bidirektionale Eph-Ephrine-Signaltransduktionsweg

Der Eph-Ephrin-Signalweg basiert, ebenso wie der Notch-Delta-Signalweg, auf einer Interaktion zwischen einem Rezeptor (Eph, Ephrinrezeptor) und einem Liganden (Ephrine), die zur Signaltransduktion zwischen benachbarten Zellen erforderlich ist. Die Eph-Rezeptor-Tyrosinkinasen und die Ephrin-Liganden (*Eph receptor interactin proteins*) bilden die Größte Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie (Bartley et al. 1994; Hirai et al. 1987). Eph und Ephrine sind in vielen unterschiedlichen Zelltypen exprimiert und übernehmen ein große Bandbreite von unterschiedlichen Funktionen in der embryonalen Entwicklung und in adulten Organismen. Sie steuern auf zellulärer Ebene die Zell-Substrat Adhäsion, die Zellproliferation, die Zellmorphologie, die Zellbewegungen und die Zytoskelettdynamik (Himanen et al. 2007; Egea und Klein 2007; Pasquale 2005). Es existieren zwei Unterschiedliche Eph-Rezeptor Subklassen (EphA und EphB). Die Bezeichnung erklärt sich aufgrund der Affinität zu den EphrinA Liganden, die durch einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Zellmembran verankerten sind, und den EphrinB-Liganden, die die Membran durchspannen. Ein hervorstechendes Merkmal der EphB-Klasse ist die Möglichkeit einer reversen Signaltransduktion. Hierbei wird durch die Rezeptor-Liganden-Interaktion nicht nur eine Signalkaskade in der EphB-Rezeptor exprimierenden Zellen ausgelöst, sondern ebenso eine Signalkaskade in der Liganden exprimierenden Zelle (Pasquale 2005). Der Signalweg findet nach Bindung der Liganden an die Rezeptoren statt, indem diese Bindungen die Stabilität der EphB-Rezeptoren erhöht, die daraufhin Heterodimere bilden. Die Bildung von heterodimeren Molekülaggagaten führt letztendlich zu einer Autophosphorylierung durch die zytoplasmatische Tyrosinkinase-Domäne der Eph-Rezeptoren. Die Phosphorylierung der Eph-Rezeptoren bewirkt, dass die Tyrosinkinaseaktivität aktiviert wird, wodurch eine Signalkaskade initiiert wird (Kullander und Klein 2002; Palmer und Klein 2003). Der reverse „rückwärts“-gerichtete Signalweg der EphrinB-Liganden ist ebenfalls phosphorylierungsabhängig. Der charakteristische intrazelluläre Bereich der EphrinB-Liganden wird an fünf konservierten Tyrosinresten phosphoryliert (Brückner et al. 1997). Da der EphrinB-Ligand zwar Proteinbinde-Domänen (PDZ-Domäne und SH2-Domäne), aber

keine intrinsische Kinasedomäne der intrazellulären Domäne aufweist, wird die Phosphorylierung durch Src-Familien-Kinasen (SFK) vermittelt. Daraufhin interagieren zytoplasmatische Proteine über die Proteinbindestellen mit der phosphorylierten ICD der Ephrine. Diese Interaktionen lösen eine Reihe von Signalkaskaden in der Ligandenexprimierenden Zelle aus (Kullander und Klein 2002; Lu et al. 2001; Torres et al. 1998; Lee et al. 2008; Essmann et al. 2008).

Der EphB-EphrinB Signalweg zeigt, dass die Bindung eines Liganden an den Rezeptor nicht nur eine vorwärtsgerichtete Signaltransduktion in der Rezeptor-exprimierenden Zelle auslöst, sondern auch eine rückwärtsgerichtete Signalgebung in der ligandenexprimierende Zelle auslösen kann.

5 Zielsetzung der Arbeit

Der Notch-Signalweg ist bisher als unidirektional beschrieben. Die Signalweiterleitung erfolgt von der signalgebenden Zelle (exprimiert den Liganden) auf die signalempfangende Zelle (exprimiert den Notch-Rezeptor). Der Notch-Ligand DLL1 unterliegt derselben proteolytischen Kaskade wie der Notch-Rezeptor. Diese proteolytischen Spaltungen bewirken, dass die intrazelluläre Domäne von DLL1 (D1CD) ins Zytosol entlassen wird. In verschiedenen *in vitro*-Untersuchungen konnte die D1CD im Zellkern nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich in den *in vitro*-Untersuchungen, dass die Überexpression der D1CD Auswirkungen auf die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung und Einfluss auf den Notch-Signalweg ausübt. Diese Beobachtungen zeigen, dass die D1CD signalgebende Wirkung auf transkriptioneller Ebene besitzen könnte und deuten auf eine Bidirektionalität des Notch-Signalweges hin.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der D1CD auf eine mögliche Signalgebung untersucht werden. Hierfür wurden drei ES-Zelllinien generiert, die unterschiedliche D1CD-Varianten stabil exprimierten. Diesen Zellen sollten in *in vitro*-Analysen verwendet werden, um mögliche Auswirkungen auf Zellproliferation und Zelldifferenzierung zu untersuchen. Ebenfalls sollten die transgenen ES-Zellen für die Herstellung transgener Mäuse verwendet werden, um damit einen Einfluss der Expression der verschiedenen D1CD-Varianten *in vivo* zu untersuchen. Ein möglicher Einfluss der Überexpression könnte sich in Notch-Delta-abhängigen Prozessen, wie der Somitogenese, der Myogenese oder der Neurogenese in der Embryonalentwicklung der Maus widerspiegeln.

Als potentielle Auswirkung der D1CD-Überexpression könnte man einen inhibitorischen Einfluss auf den Notch-Signalweg erwarten, wie es bereits in Zellkulturexperimenten beschrieben wurde. Prozesse der murinen embryonalen Entwicklung, wie sie oben bereits genannt wurden, würden stark beeinflusst sein und könnten neue Erkenntnisse über die Funktion der D1CD liefern.

6 Material und Methoden

6.1 Materialien

6.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen/ Herstellern bezogen:

AppliChem GmbH (Darmstadt)
Merck KGaA (Darmstadt)
Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Promega GmbH (Mannheim)
Quiagen GmbH (Hilden)

Falls Chemikalien von anderen Firmen/ Herstellern verwendet wurde, wurde dies explizit angegeben.

6.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen/ Herstellern bezogen:

Amersham Bioscience (Freiburg)
Eppendorf (Köln)
Greiner (Solingen)
Millipore (Schwalbach)
Sarstedt (Nümbrecht)
Whatman (Dassel)
Macherey-Nagel (Düren)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Leica GmbH (Hamburg)

Falls Verbrauchsmaterialien von anderen Firmen/ Herstellern verwendet wurden, wurde dies explizit angegeben.

6.1.3 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme, Polymerasen, RNasen und Ligasen wurden von folgenden Firmen/ Herstellern verwendet:

- Invitrogen (Karlsruhe)
- MBI Fermentas (St. Leon-Roth)
- New England Biolabs (Frankfurt am Main)
- Stratagene (Heidelberg)
- Roche (Mannheim)

Falls Enzyme von anderen Firmen/ Herstellern verwendet wurden, wurde dies explizit angegeben.

6.1.4 Gensynthesen

Gensynthesen wurden von folgenden Herstellern bezogen

- Genescript (Piscataway, USA)
- GeneArt/ Invitrogen (Darmstadt)

6.1.5 Primer

Die Primer wurden von folgenden Firmen /Herstellern bezogen:

- Sigma-Aldrich GmbH (München)
- Eurofins MWG Operon (Köln)

Die erhaltenen Primer wurden in TE-Puffer oder destilliertem Wasser aufgenommen und mit einer Endkonzentration von 10 pmol in den verschiedenen PCR-Systemen verwendet.

6.1.5.1 Primerliste

Primer, die für die Klonierung von Expressionskonstrukten Verwendung fanden:

Name	Sequenz
TM-Austausch_Mfe-Site.Rev	GAG CTC CAA TTG GCA GTT GGC CAG GTT GTT
TM-Austausch.Fwd	ATGTAATTAAGAGGTACCCCTGAGCCA
Dll1 ICD (HPRT).Fwd	GATCGCTAGCGATCCACCATGGATTACAAGGATGACG ACGATAAGGTCCGGCTGAAGCTA
Dll1 ICD (HPRT).Rev	GATCCATATGTCACACCTCAGTCGCTATAACACACTCA TCCTTTTC
CAG (CMV) Promoter Rev	GGCTATGAACTAATGACCCCG
CAG Fwd 1	GCCTCGGGGCTGTCCGCGG
FICD Rev 1	CATGGTTTCTGTCTCTCCCCACAGGG
Dll1 ICD (HPRT).Fwd	CCCGATCCATATGTCACACCTCAGTCGCTATAACACAC TC
Dll1 ICD (HPRT).Rev	TGCGTCCGGCTGAAGCTACAGAAACACGCGCCTGAAC CCTGTGGGGGAGAG
Lex OP Fwd	AAAGGATCCTATCCATATCTAATCTTACCTCGA
Lex OP Rev	TTTTCCATGGGCATTATCATCCCCTCGAC
Sv40LexA Fwd 1	GATCGAATTCATGGCACCCAAGAAGAAGAGGAAGATG AAAGCGTTAACGGCCAGGCAACA
Sv40 LexA Rev 1	GATCGAATTCTCAAGCGTAGTCTGGAACGTCGTATGGG TACCACCGTACTCGTCAATTCCA
SV40NLS DICD.fwd1	GATCGCTAGCGATCCACCATGGCACCCAAGAAGAAGA GGAAGGTCCGGCTGAAGCTACAG

6.1.6 Plasmide

In dieser Arbeit fanden folgende kommerziell erhältliche bakterielle Klonierungs- und Expressionsplasmide Verwendung:

Plasmidname	Firma
pBluescriptII KS (+/-)	Amersham
pCRII-Topo [®]	Invitrogen
pIRESpuro3	Clontech
pGL4.27	Promega

6.1.7 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden für diese Arbeit verwendet:

<i>Escherichia coli</i> -Stämme	Firma
XL1-Blue	Stratagene
TOP10	Invitrogen

6.1.8 Bakterien-Nährmedien

Medium	Zusammensetzung	Konzentration
LB-Medium (Luria-Bertani)	Bacto-Trypton	10g/l
	Hefe-Extrakt	5g/l
	Natriumchlorid	10g/l
LB-Agarplatten	LB-Medium + Agar	15g/l

Dem LB-Medium oder den LB-Platten wurde bei Bedarf Antibiotika wie folgt zugesetzt:

Ampizilin 100µg/ml
Kanamycin 25µg/ml

Zur Blau-Weiß Selektion von Bakterien, wurde auf den LB-Platten zusätzlich

IPTG (1mM) und X-Gal (50µg/ml) plattiert.

6.1.9 Säugerzellen

In dieser Arbeit fanden folgende Säugerzellen Verwendung:

Zellen	Ursprung/ Herkunft
CHO-Zellen	<u>C</u> hinese <u>h</u> amster <u>o</u> vary cells (aus <i>Cricetulus griseus</i>) (Labor AG Gossler)
CHO DLL1 Flag	CHO Zellen, die stabil DLL1 exprimieren (Generiert von Dr. Insa Geffers)
CHO DΔECD	CHO Zellen, die stabil DΔECD exprimieren (Generiert von Eike Braune)
CHO DICD	CHO-Zellen, die stabil DICD exprimieren
CHO fDICD	CHO-Zellen, die stabil DICD mit n-terminalen Flag-Tag exprimieren
CHO-LexOP	CHO-Zellen mit integriertem LexOP-Luciferase-Reportergen
E14tg2a	Murine embryonale Stammzellen (besitzen ~35 kb Deletion (von Dr. Karin Schuster-Gossler etabliert))
E14tg2a <i>Hprt</i> ^{DICD/Y}	E14tg2a mit DICD in den Hprt-Lokus rekombiniert
E14tg2a <i>Hprt</i> ^{fDICD/Y}	E14tg2a mit fDICD in den Hprt-Lokus rekombiniert
E14tg2a <i>Hprt</i> ^{DΔECD/Y}	E14tg2a mit DΔECD in den Hprt-Lokus rekombiniert
E14tg2a <i>Hprt</i> ^{DICD/Y} rekomb.	E14tg2a mit DICD in den Hprt-Lokus rekombiniert; exprimieren DICD
E14tg2a <i>Hprt</i> ^{fDICD/Y} rekomb.	E14tg2a mit fDICD in den Hprt-Lokus rekombiniert; exprimieren fDICD
E14tg2a <i>Hprt</i> ^{DΔECD/Y} rekomb.	E14tg2a mit DΔECD in den Hprt-Lokus rekombiniert; exprimieren DΔECD

6.1.10 Primäre Antikörper

Folgende primäre Antikörper fanden in dieser Arbeit Verwendung:

Antikörper	Epitop	Wirt	Firma	Anwendung / Verdünnung
α-DICD 2A5	Peptid: RGGEIPDRKRVYSTSKD	Ratte monoklonal	E. Krämmer GSF, München	Western Blot 1:50 Immunfluoreszenz 1:200
α-DICD AK	Peptid: RKRPEsvYSTS	Kaninchen polyklonal	Biogenes	Western Blot 1:500
anti-Flag- POD (M2)	Peptid: DYKDDDDK	Maus monoklonal	GE Healthcare	Western Blot 1:10000
anti-HA- POD	Peptid: YPYDVDPDYA	Maus monoklonal	GE Healthcare	Western Blot 1:10000

6.1.11 Sekundäre Antikörper

Folgende sekundäre Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Antikörper	Wirt	Firma	Anwendung / Verdünnung
anti-Ratte- POD	Schaf	Amersham	Western Blot 1:10000
Anti- Kaninchen- POD	Schaf	Amersham	Western Blot 1:10000
Anti-Ratte Alexa- Fluor® 555	Ziege	Invitrogen	Immunfluoreszenz 1:2000

6.1.12 Sonden für *in situ*-Hybridisierung

Folgende *in situ*-Sonden wurden für die Ganzpräparat *in situ* (WISH) verwendet

Name	Plasmid	Linearisierungsenzym	Polymerase	Referenz	Plasmidnummer AG Gossler
DICD	pCRII- TOPO®	-	T7	Diese Arbeit	# 3098
Uncx 4.1	pSV-Sport1	Sal I	T7	Dr. A. Kispert	# 734
Myogenin	pBluescript	Not I	T7	Dr. H.-H. Arnold	# 666
Neurogenin	-	Xba I	T7	Dr. M. Goulding, Dr. K. Schuster- Gossler	# 2226
Hey1	pCS2+	Bgl II	T7	Dr. M. Gessler	# 334

6.1.13 Datenbanken und Computerprogramme

Auf folgende Datenbanken wurde in dieser Arbeit zugegriffen:

Name	Internetadresse
National Center of Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Mouse Genome Informatics (MGI)	http://informatics.jax.org

Folgende Computerprogramme wurden in dieser Arbeit zur Hilfe genommen

Verwendung	Name	Firma
Textverarbeitung	Word 2007	Microsoft
Bildverarbeitung	Photoshop CS4 Extended Version 11.0	Adobe
	Illustrator CS4 Version 14.0.0	Adobe
Literaturverwaltung	Citavi 4 Version 4.1.0.3	Swiss Academic Software
Bilderstellung	Inverses Konfokal Mikroskop	Leica
	FIJIFILM Photograb-300Z	FUJI PhotoFilm Co., Ltd.
Sequenzauswertung	MacVector™ 7.2	Accelerys Inc.
Internetrecherche	Firefox Version 22.0	Mozilla
	Safari Version 2.0.4	Apple Computer, Inc.
Statistische Analysen	Prism software	GraphPad

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Präparative Plasmidisolierung

Die Plasmidpräparation wurde mit dem DNA-Aufreinigungs-Kit GeneElute HP Plasmid Minikit von Sigma nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

6.2.2 Transformation von DNA in Bakterien

Für die Transformation von DNA in Bakterien wurden 50 µl kompetente, salzfreie *E. coli*-Zellen und 1 µl (~ 300 ng) Vektor-DNA vorsichtig in einer 2mm Glasküvette (GenePulser, Biorad) vermischt und anschließend in einem Biorad Micro Pulser elektroporiert. Direkt nach der Elektroporation wurde 200 µl antibiotikafreies LB-Medium auf die Zellen gegeben und dieser Ansatz für 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurden 10-100 µl des Transformationsansatzes auf eine mit entsprechendem Selektionsantibiotikum versetzte LB-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.2.3 Transfektion von DNA in Säugerzellen

Um DNA in Form geschlossener Vektoren in CHO-Zellen zu transfizieren wurde PerfectinTM Transfection Reagent (Gelantis, San Diego) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Transfektion wurde mit OptiMEM® (Life Technologies GmbH) durchgeführt und nicht mit dem normalen CHO-Medium. Nach 4 Stunden wurde das OptiMEM® durch normales CHO-Medium ersetzt.

6.2.4 Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau von DNA wurden ausschließlich Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs verwendet.

Ein typischer Ansatz für eine Restriktionsanalyse bestand aus:

- 1 µl 10 x Puffer (abhängig von den verwendeten Restriktionsenzymen)
- 1 µl BSA (fakultativ, ebenfalls enzymspezifisch)

- Bis zu 1 μl Restriktionsenzym
- 7 μl DNA

Da jedes Restriktionsenzym einen pufferabhängigen Aktivitätsgrad besitzt, war bei Doppelverdauen darauf zu achten, dass der Puffer mit dem höchsten Aktivitätsgrad beider Restriktionsenzyme verwendet wurde. Die verschiedenen Werte für den Wirkungsgrad der Enzyme wurden aus dem aktuellsten Katalog der Firma „New England Biolabs“ entnommen. Der Ansatz wurde vereinigt und für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Elektrophorese im Agarosegel.

6.2.5 Dephosphorylierung

Eine Dephosphorylierung der verdauten DNA erfolgte mit der rAPid Alkaline Phosphatase von der Firma Roche und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

6.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration mittels photometrischer Bestimmung

Für die Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Photometrie wurden 3 μl der Probe mit 57 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ vermischt und bei einer Wellenlänge von 260 nm die Absorption gemessen. Als Referenz/ Nullwert dienten 60 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$.

6.2.7 Ligation

Für die Ligation wurden die einzelnen Ligationskomponenten in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Als Ligase wurde die T4-Ligase mit dem entsprechenden Puffersystem der Firma Fermentas verwendet.

Typischer Ansatz für eine Ligation:

- 5 µl Ligationspuffer,
- 1 µl Vektor-DNA, (ca. 200 ng)
- 3 µl Insert-DNA (ca. 600 ng)
- 1 µl Ligase

6.2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von Agarosegelen ihrer Größe nach entsprechend getrennt. In dieser Arbeit wurden 0,7%- bis 2%ige Agarosegele verwendet. Hierfür wurde 0,7 - 2 g Agarose mit 100 ml 1 x TAE-Puffer im Mikrowellenherd erhitzt, nach kurzer anschließender Abkühlung wurde die Agarose-Lösung mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 8 µg/ml) versetzt und in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gegossen.

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit Auftragspuffer im Verhältnis 1/10 versetzt und anschließend in die einzelnen Taschen des Agarosegels hinein pipettiert. Als Standard diente ein DNA-Ladder-Mix (Fermentas). Die Auftrennung wurde unter einer konstanten Spannung 80 bis 130 V (abhängig von der Gelkammer) durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

Bezeichnung	Zusammensetzung
TAE-Puffer	40mM Tris-Acetat 1mM EDTA
Auftragspuffer (5x)	50% Glycerin 0,25 5 (w/v) Orange G In TAE-Puffer

6.2.9 Gelelution von DNA aus Agarosegelen

Um mit der geschnittenen DNA weiter arbeiten zu können, musste die DNA aus dem Agarosegel eluiert werden. Hierzu wurde die gewünschte DNA-Bande aus dem Agarosegel

mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die Elution erfolgte mit dem Kit Nucleospin® Extract II von Macherey und Nagel nach Angaben des Herstellers

6.2.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Methode der Polymerasekettenreaktion wird verwendet, um einen DNA-Abschnitt zu vervielfältigen (Saiki et al. 1988). In Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene PCR-Systeme verwendet, die im Folgenden erläutert werden.

6.2.10.1 Taq-Polymerase

Für die Amplifikation von DNA-Strängen wurde die Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) mit einem im Labor etablierten Puffersystem verwendet.

In dieser Arbeit wurde folgendes Pipettierschema für die Amplifikation von DNA-Strängen verwendet.

PCR-Ansatz für 50 µl

5 µl	10 x PCR-Puffer
1 µl	Nukleotide (dNTPs; Endkonzentration jeweils 200 µM)
1 µl	<i>sense</i> -Primer
1 µl	<i>antisense</i> -Primer
1 µl	DNA-Template
2, 5µl	DMSO (Dimethylsulfoxid)
37, 5 µl	H ₂ O

Synthesezyklus:

- | | | | |
|----|----------|--------|---------------------|
| 1. | T = 94°C | 2 min | |
| 2. | T = 94°C | 45 s | (Denaturierung) |
| 3. | T = 54°C | 45 s | (Primer-anealing) |
| 4. | T = 72°C | 40 s | (Elongation) |
| 5. | T = 72°C | 10 min | (Finale Elongation) |
- } 35 Wiederholungen

Die Anzahl der Wiederholungen des Syntheszyklus sowie die Annealing-Temperatur der Primer waren je nach PCR spezifiziert und konnten von dem oben gezeigten Syntheszyklus abweichen.

Verwendete Lösungen :

Bezeichnung	Zusammensetzung
10 x PCR Puffer	500mM KCl 100mM Tris pH 8,8 0,1% Triton X-100

6.2.10.2 Expand High Fidelity Kit

Für die Typisierung der ES-Zellen, in denen die unterschiedlichen DICD-Varianten elektroporiert wurden, wurde das Expand High Fidelity Kit von Boehringer verwendet. Dieses Kit besitzt zwei unterschiedliche Polymerasen, die Taq- und Pfu-Polymerase. Die Pfu-Polymerase ist thermostabiler als die Taq-Polymerase und besitzt eine *proofreading*-Aktivität. Mit diesem Kit war es möglich, große PCR-Amplifikate (für Typisierung von elektroporierten ES-Zellen) zu typisieren.

PCR-Ansatz für 50µl

5 µL	Puffer + 15mM MgCl ₂
1 µl	dNTPs
2 µl	sense-Primer
2 µl	antisense-Primer
2 µl	DNA-Template
0,75 µl	Enzym-Mix
37,25 µl	Wasser

Syntheszyklus für Typisierungs PCR:

- | | | | |
|-------------|-------|-------------------|---------------------|
| 1. T = 94°C | 2 min | | } 35 Wiederholungen |
| 2. T = 94°C | 45 s | (Denaturierung) | |
| 3. T = 54°C | 45 s | (Primer-anealing) | |

4. T = 72°C 4 min (Elongation)
5. T = 72°C 10 min (Finale Elongation)

6.2.11 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real Time PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR. Mit dieser Methode ist es möglich, die relative Expression bestimmter Gene quantitativ zu erfassen. Bei der verwendeten qRT-PCR wurde die Intensität eines fluoreszierenden Farbstoffes (SYBR-Green), der in die DNA interkaliert, nach jedem Zyklus gemessen. Die Verdoppelung der DNA zeigte sich in einer Korrelation der gemessenen Fluoreszenzintensität des Farbstoffes, die Rückschlüsse auf die relative Expression von Genen gibt.

6.2.11.1 RNA Präparation aus embryonalen Stammzellen (E14tg2) und murinen Embryonen

Zur Analyse der relativen Expression von Genen mittels der quantitativen Real time PCR war es zuvor notwendig, die RNA aus den E14tg2a Zellen oder aus den Embryonen zu isolieren.

Die E14tg2a Zellen und Embryonen wurde nach dem Ablösen von der Zellkulturplatte bzw. der Isolation aus dem Muttertier vereinzelt in 100 µl RNAlater (Ambion) überführt. Zur RNA-Isolierung wurde der RNAlater durch 100 µl TriReagent (Invitrogen) ersetzt und die E14tg2a Zellen oder Embryonen (E9.5) durch Auf- und Ab-Bewegungen mit einer Pipette vorsichtig homogenisiert. Im Anschluss wurde den E14tg2a Zellen oder Embryonen 20 µl Chloroform hinzu pipettiert und kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubation von 10-15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Homogenisate von den E14tg2a Zellen oder den Embryonen 15 Minuten bei 4°C bei 13000 rpm zentrifugiert.

Für die anschließende RNA-Isolierung wurde die obere wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 50 µl Isopropanol hinzugegeben. Einer Inkubation von 15 min bei RT folgte eine Zentrifugation von 15 min bei 4°C und 13000rpm. Nach der Zentrifugation konnte der Überstand verworfen werden und das sich durch die Zentrifugation gebildete Pellet wurde mit 180 µl 75% EtOH gewaschen. Ein weiterer Zentrifugationsschritt folgte bei 4°C bei 13000 rpm für 5min. Der Überstand wurde nach Zentrifugation wieder verworfen und

das Pellet bei Raumtemperatur bei offenem 1,5 ml Reaktionsgefäß getrocknet. Nach Trocknung (10-15 Minuten) wurde das Pellet der E14tg2a Zellen in 9 µl DEPC-Wasser vorsichtig resuspendiert. Aufgrund der wesentlich größeren Menge an erhaltener RNA bei RNA Isolierung aus Embryonen, wurden das erhaltene Pellet in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen und resuspendiert.

6.2.11.2 cDNA-Synthese der isolierten RNA von E14tg2a Zellen und Embryonen

Für die Bestimmung der relativen Expression von Genen durch qRT-PCR musste die isolierte RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Für die cDNA Synthese wurde das Kit „ThermoScript RT-PCR System“ der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Transkription in cDNA fand pro Ansatz die gesamte RNA von einem 24 well der differenzierten E14tg2a-Zellen Verwendung. Bei den Embryonen wurde ¼ der gesamten RNA verwendet.

Als Kontrolle, ob die cDNA-Synthese erfolgreich verlief, wurde die cDNA anschließend auf das Vorhandensein des *Hprt*-Gens typisiert.

Hierfür fanden folgende Primer Verwendung:

3`HPRT: GCTGGTGAAAAGGACCTCT

5`HPRT: CACAGGACTAGAACACCTGC

Synthesezyklus für HPRT PCR:

- | | | | | |
|----|----------|-------|---------------------|---------------------|
| 1. | T = 94°C | 3 min | | |
| 2. | T = 94°C | 30 s | (Denaturierung) | } 40 Wiederholungen |
| 3. | T = 55°C | 30 s | (Primer-anealing) | |
| 4. | T = 72°C | 30 s | (Elongation) | |
| 5. | T = 72°C | 7 min | (Finale Elongation) | |

6.2.11.3 Ermittlung der relativen Expression von Genen durch qRT-PCR

Die Aggregate und Embryonen, die positiv auf die cDNA des *Hprt*-Gens untersucht wurden, konnten für die qRT-PCR eingesetzt werden.

Der Ansatz der qRT-PCR setzte sich wie folgt zusammen (25 µl):

Bidest H ₂ O	14.925 µl
10 x Platinum Taq-Puffer	2,5 µl
10 mM dNTP	0,5 µl
25 mM MgCl ₂	1,5 µl
10 pmol/µl Primer Forward	0,6 µl
10 pmol/µl Primer Reverse	0,6 µl
50 x ROX (Referenzfarbstoff)	0,25 µl
SYBR-Green Verdünnung	2 µl
5 U/µl Platinum Taq	0,125µl
cDNA	2 µl

Die SYBP-Green Stocklösung (1:10000 in DMSO) musste vor dem Einsatz erst 1:100 in DMSO und anschließend 1:100 in TE-Puffer verdünnt werden. Die Embryo-cDNA wurde für die qRT-PCR vorher nochmals 1:8 verdünnt.

In der qRT-PCR fanden folgende Primer Verwendung:

qRT-Primer Name	Sequenz
b-Actin Intron 4 Fwd1	CTCTTTTCCAGCCTTCCTTCTT
b-Actin Intron 4 Rev 1	GAGGTCTTTACGGATGTCAACG
NF Intron 1 F1	CGCCACAACCACGACCTCAG
NF Intron B1	TCCCCGAAGTTCATTTTCCAAC

Isl 1 Intron 5 F1	GCAAAGCGACATAGATCAGCCTG
Isl 1 Intron 5 B1	TTAGAGCCTGGTCCTCCTTCTGAAA
Hes 5 Intron 1 F2	TGGCGGTGGAGATGCTCAG
Hes 5 Intron 1 B1	GCTGCTGTTGATGCGGTCC
Hey 2 Intron 4 F1	CTCCAGGCTACAGGGGGTAAAG
Hey 2 Intron 4 B2	CAAGCACTCTCGGAATCCAATG

Die qRT-PCR-Messungen wurden als Doppelbestimmung am 7500 Fast Real-Time System (Applied Biosystems) durchgeführt und mit der 7500 Fast System SDS-Software (Applied Biosystems) analysiert. Es fanden nur Messungen Verwendung, in denen die errechnete Standardabweichung einen Wert von ≤ 0.3 in der Doppelbestimmung aufwiesen.

Die Auswertung der erhaltenen ct-Werte erfolgte nach der $\Delta\Delta$ -ct-Methode (Livak und Schmittgen 2001).

6.2.12 Aufbereitung der DNA für Elektroporation in E14tg2a-Zellen

Für die Elektroporation der DNA in E14tg2a Zellen mussten mindestens 20-25 μg linearisierte DNA verwendet werden. Zur Linearisierung der DNA wurde etwas mehr, nämlich 30-35 μg , DNA mit 80-100 U des Restriktionsenzym Sal I-HF (NEB) in einem 100 μl Ansatz über Nacht bei 37°C verdaut. Am nächsten Tag erfolgte eine Kontrolle der Linearisierung indem 2 μl des Übernachtsverdau auf ein 0,7% Agarosegel aufgetragen wurde. Wenn noch erkannt wurde, dass die DNA nicht vollständig verdaut bzw. linearisiert vorlag, wurden für 2-3 Stunden nochmals 50 U des Sal I-HF-Enzyms in den Ansatz gegeben und anschließend noch einmal auf einem 0,7% Agarosegel überprüft. Bei vollständiger Linearisierung wurde die DNA gefällt. Für die DNA-Fällung wurde dem Ansatz 1/10 des Gesamtansatzes Natriumacetat und die 2,5-fache Menge des Gesamtansatzes Ethanol zugemengt und leicht geschwenkt. Die Fällung erfolgte bei 15 min bei -20°C. Anschließend

wurde die gefällte DNA 15 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert und mit 200 µl 75% Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde entfernt und die getrocknete gefällte DNA wurde in 100µl Elektroporations-PBS (EP-PBS) aufgenommen und bei 65°C für 15 min erhitzt. Zur Abschätzung der DNA Konzentration wurde 1µl der gefällten DNA in EP-PBS auf ein 0,7% Agarosegel aufgetragen. Als Vergleich diente ein λDNA/ EcoRI + HindIII-Marker dessen DNA-Konzentration bekannt war. Die gefällte DNA konnte bis zur Verwendung für mehrere Tage bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

6.3 Proteinbiochemische Methoden

6.3.1 Proteinisolierung aus Säugerzellen

Für Expressionsanalyse von Proteinen wurden die Säugerzellen zuvor lysiert. Hierfür wurde von den Zellen das Medium abgesaugt und diese einmal mit kalten PBS gewaschen. Im Anschluss wurde auf die Zellen 2 x Sample-Buffer (SB-Puffer) gegeben. Die Menge des SB-Puffers war abhängig von der Menge der kultivierten Zellen. Nach fünf Minuten wurden die lysierten Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur vollständigen Zelllyse wurden die Zellen im Anschluss mit Ultraschall auf Eis sonifiziert. Im Anschluss konnten die Proteinlysate mittels SDS-Gelelektrophorese ihrer Größe nach getrennt werden und durch Western Blot mit anschließender Antikörperdetektion detektiert werden.

Bezeichnung	Zusammensetzung (für 100ml)
2x Sample Buffer (SB-Puffer)	25 ml 4x Tris Cl/SDS, pH 6,8 20 ml Glycin 4 g SDS 2 ml β-Mercaptoethanol mit H ₂ O bis 100 ml auffüllen

6.3.2 Proteinauftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden durch eine SDS-Gelelektrophorese ihrer Größe nach getrennt.

Die Elektrophorese erfolgte in 12-15 %igen SDS-Gelen.

Zusammensetzung der einzelnen Komponenten für ein 15%-Acrylamidgel:

Trenngel:	7,5 ml	30 % Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid
	3,75 ml	4 x Tris/Cl / SDS pH 8,8
	3,75 ml	H ₂ O
	0,05 ml μ l	10 % (w/v) APS
	0,01 ml	TEMED

Sammelgel:	0,65 ml	40 % Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid
	1,25 ml	4 x Tris / SDS pH 6,8
	3,05 ml	H ₂ O
	0,025 ml	10 % (w/v) APS
	0,005 ml	TEMED

Alle Bestandteile des SDS-Gels wurden in ein Becherglas gegeben, wobei APS und TEMED erst kurz vor dem Gießen dazu kamen, da diese Komponenten die Polymerisation des Gels einleiten. Zuerst wurde das Trenngel bis etwa 2/3 der Laufstrecke zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel aufgeschichtet. In dem Sammelgel wurden mit Hilfe eines Kammes Taschen ausgespart, in die nach der Polymerisation die zu trennenden Proteingemische gefüllt werden konnten. Das fertige Gel wurde vertikal in eine Elektrophoreseapparatur eingespannt, die danach mit 1 x SDS-Laufpuffer befüllt wurde.

Die Denaturierung der Proteinproben erfolgte durch die Zugabe von SDS-Auftragspuffer zu den Proteinproben und anschließendem 3 minütigem Kochen. Die einzelnen Taschen wurden mit den Proteinproben befüllt und bei einer konstanten Stromspannung von 100 mV so lange laufen gelassen, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Verwendeter Puffer:

Bezeichnung	Zusammensetzung
10 x SDS-PAGE-Laufpuffer	1 M Tris 1 M Glycin 1 % SDS (w/v)

6.3.3 Western Blot

Bei der Western Blot Methode werden Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Membran transferiert. Zur Vorbereitung wurden das SDS-Gel sowie 2 Whatmanpapiere (8 x 6 cm) und zwei Schwämme in Western Blot-Transferpuffer für 3-4 Minuten äquilibriert. Die PVDF-Membran musste vor der Verwendung 1-2 Minuten mit 100% EtOH äquilibriert werden. Anschließend wurde die Membran mit H₂O einmal gewaschen und konnte verwendet werden. Für die Wet-Tank-Western Blot Methode wurden die Whatmanpapiere, die Schwämme, das SDS-Gel und die Membran wie folgt übereinander geschichtet:

Schwamm
 Whatmanpapier
 PVDF-Membran
 SDS-Gel
 Whatmanpapier
 Schwamm

Die übereinandergeschichteten Bestandteile wurde in eine Kassette eingespannt und die Wet-Tank-Western-Blot-Kammer nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad) zusammengebaut. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran fand bei einer Stromstärke von 100 mA über einen Zeitraum von 1-1,5 Stunden statt. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau-Rot angefärbt oder für eine Proteindetektion durch Antikörper in 5% Blockpuffer (siehe 6.3.5) überführt.

Verwendeter Puffer:

Bezeichnung	Zusammensetzung
Western Blot-Transferpuffer	25 mM Tris 20 mM Glycin

6.3.4 Proteinfärbung durch Ponceau-Rot

Die Färbung mit Ponceau-Rot diente nur als kurze Kontrolle, ob der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgreich verlaufen war. Hierfür wurde die Membran einige Minuten lang in der Ponceau-Lösung (0,1% (w/v) Ponceau, 5% Essigsäure) geschwenkt. Anschließend erfolgte eine vorsichtige Spülung mit H_2O_{bidest} , so dass nur noch die rotgefärbten Proteinbanden sichtbar waren.

6.3.5 Antikörperinkubation

Die PVDF-Membran, auf der sich die mittels Western Blot transferierten Proteine befanden, wurde zunächst für 30 Minuten in 50 ml 5%-Blockpuffer inkubiert. Nach dem Abgießen des Blockpuffers wurde 10 ml Inkubationspuffer, der die spezifischen primären Antikörper enthielt, auf die PVDF-Membran gegeben. Die Inkubation des primären Antikörpers auf der PVDF-Membran erfolgte für eine Stunde bei RT oder üN bei 4°C bei leichtem Schütteln. Nach dem Abgießen des Inkubationspuffers folgten drei Waschschrte für jeweils 5 Minuten mit 10 ml Waschpuffer. 10 ml des Inkubationspuffers mit dem sekundären Antikörper, der spezifisch gegen den primären Antikörper gerichtet war, wurden in 1:5000- bis 1:10000-Verdünnungen auf die PVDF-Membran gegeben und unter Schütteln 30 Minuten bis 1 Stunde inkubiert. Im Anschluss wurden wieder für jeweils 5 Minuten drei Waschschrte mit jeweils 10 ml Waschpuffer vollzogen. Nach Beendigung der Waschschrte erfolgte die Visualisierung mit Hilfe der „Enhanced Chemilumineszenz“ ECL-Reagenzien der Firma Amersham. Hierzu wurden die beiden ECL-Lösungen „1“ und „2“ zu gleichen Teilen vermischt und auf die PVDF-Membran gegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 1 Minute konnte die PVDF-Membran für eine entsprechende Zeit mit einem Film (Hyperfilm™ ECL, Amersham) exponiert werden.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCL 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,3
5% Blockpuffer	PBS 5% Milchpulver
Inkubationspuffer	PBS 5% Milchpulver mit primären Antikörper oder sekundären Antikörper
Waschpuffer	PBS 0,05% Tween

6.4 Zellbiologische Methoden

6.4.1 Kultivierung von Säugerzellen

6.4.1.1 Kultivierung von CHO-Zellen

Die Kultivierung der CHO-Zellen erfolgte auf beschichteten Zellkulturschalen in CHO-Medium. Ein Mediumwechsel erfolgte nach ein bis zwei Tagen, abhängig davon wie viele Zellen auf der Zellkulturschale kultiviert wurden. Bei einer Konfluenz der Zelldichte auf der Zellkulturschale von 80-95% wurden die Zellen zur weiteren Vermehrung auf mehrere Zellkulturschalen aufgeteilt oder bei -80°C für eine längere Lagerung eingefroren. Für beide Verwendungen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin behandelt, um die Zellen von der Zellkulturschale zu lösen. Für die Vermehrung der Zellen wurden die CHO-Zellen in frischem Medium aufgenommen und resuspendiert. Im Anschluss konnten die Zellen auf die gewünschte Anzahl an Zellkulturplatten ausgesät werden. Um die CHO-Zellen für einen längeren Zeitraum zu lagern wurden die gelösten CHO-Zellen im frischen Zellmedium aufgenommen, resuspendiert und in einem 15 ml Reaktionsgefäß

überführt. Das Medium wurde abgenommen und ersetzt durch ein Einfriermedium. Die CHO-Zellen konnten dann in Einfriergefäß überführt und bei -80°C gelagert werden.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration	Menge
CHO-Medium	DMEM/ F12	1:1	
	FCS	10%	
	Glutamaxx	2 mM	
	Penicillin	10 U/ml	
	Streptomycin	100 $\mu\text{g/ml}$	
Einfriermedium	CHO-Medium		800 μl
	DMSO		100 μl
	FCS		100 μl

6.4.1.2 Immunfluoreszenzfärbungen von transient- und stabil exprimierenden CHO Zellen

Die subzelluläre Lokalisierung von DLL1 und verschiedenen DLL1-Konstrukten wurde durch Immunfluoreszenz sowohl an transient exprimierenden CHO-Zellen als auch an stabil exprimierenden CHO-Zellen durchgeführt. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die transient exprimierenden CHO-Zellen auf gelantinierte Deckgläser ausgesät. Die stabil exprimierenden CHO-Zellen wurden zur Kultivierung auf Zellkulturschalen gegeben oder direkt auf gelantinierten Deckgläsern ausgesät. Für die Immunfluoreszenz wurden exprimierenden CHO-Zellen mit kaltem PBS gewaschen und 10 min mit eiskaltem Methanol fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte ein Blockschritt mit Blockpuffer um freie Bindungstellen in den CHO-Zellen abzublocken. Nach 30 minütigem Blocken ersetzte der Inkubationspuffer mit dem ersten Antikörper dem Blockpuffer. Der Inkubation des ersten Antikörpers für 1 Stunde folgten drei Waschschrte mit PBS. Der zweite Antikörper, der mit Alexa 555®-Fluorochrom gekoppelt war, wurde für 45 Minuten im Dunkeln auf den Zellen inkubiert. Im Anschluss erfolgten wieder drei Waschschrte. Zur Visualisierung des Zellkerns durch DAPI wurde die DAPI-Lösung für 10 Minuten auf den Zellen belassen. Die Zellen wurden anschließend drei Mal mit PBS und ein Mal mit $\text{H}_2\text{O}^{\text{dd}}$ gewaschen. Die Deckgläser mit den fixierten und mit Antikörpern inkubierten CHO-Zellen wurden mit „Prolong

Antifade“ (Invitrogen) auf einem Objektträger eingedeckelt und über Nacht im Dunkeln bei RT ausgehärtet.

Die Aufnahmen der Immunfluoreszenz entstanden an einem konfokalen Lasermikroskop der Firma Leica mit einem 63/1,4 x Öl-Objektiv. Für die Bildaufnahme wurde die „Leica confocal software“ verwendet und die Zusammenstellung der Bilder erfolgte unter Zuhilfenahme von Adobe Illustrator CS4.

Verwendete Puffer:

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCL 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,3
Blockpuffer	PBS 5% Ziegenserum
Inkubationspuffer	PBS 2,5% Ziegenserum 1:50 primärer Antikörper αDICD 2A5 Oder 1:2000 sekundärer Antikörper α-rat Alexa Fluor® 555 aus Ziege
DAPI-Lösung	PBS 1 µg/ml DAPI

6.4.2 Kultivierung der E14tg2a-Zellen zur Herstellung von transgenen Mäusen

Die E14tg2a-Zellen wurden auf Fütterzellen (Feeder cells) bei 37°C und 5% CO₂ auf einer 60mm Kulturschale kultiviert. Dem Medium zur Kultivierung der E14tg2a Zellen wurde LIF (leukämischer inhibierender Faktor) beigesetzt, wodurch eine spontane Differenzierung der E14tg2a-Zellen unterdrückt wurde. Das Medium wurde täglich gewechselt und die Zellen zur Vervielfältigung für die folgende Elektroporation 1:5 auf 60mm Platten aufgeteilt. Hierzu

wurden die E14tg2a-Zellen mit Trypsin von der Platte gelöst, anschließend in frischem ES-Zellmedium resuspendiert und auf 60mm Platten ausplattiert. Für die Elektroporation waren fünf, fast konfluente, Zellplatten erforderlich (siehe 6.5).

Eine langfristige Lagerung der E14tg2a-Zellen erfolgte bei -150°C. Hierfür wurden die Zellen anfangs durch Trypsin von der Zellkulturschale gelöst und in 5 ml frischem ES-Zellmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1000g für 3 min zentrifugiert. Der Mediumüberstand konnte durch Absaugen entfernt werden und wurde durch ES-Gefriermedium ersetzt. Das Pellet wurde im ES-Gefriermedium resuspendiert und in Einfriergefäße überführt. Anschließend wurden die ES-Zellen in einem Gefriercontainer bei -80°C zwischengelagert und am nächsten Tag zur langfristigen Lagerung in einer -150°C-Gefriertruhe eingelagert.

Zusammensetzung von ES-Zellmedium und ES-Gefriermedium siehe 6.4.2.1

6.4.2.1 Kultivierung von E14tg2a-Zellen für *in vitro* Untersuchungen

Die E14tg2a-Zellen, die in *in vitro* Experimenten verwendet werden sollten, wurden ebenso wie die E14tg2a-Zellen, die für die Generierung von transgenen Mäusen vorgesehen waren, anfangs auf Fütterzellen kultiviert. Für *in vitro* Experimente mussten die E14tg2a-Zellen von den Fütterzellen getrennt werden. Hierfür wurden die E14tg2a-Zellen zusammen mit den Fütterzellen trypsinisiert und anschließend in neuem ES-Zellmedium resuspendiert. Nach einem Zeitraum von 20 Minuten im Inkubator, in der sich die meisten Fütterzellen am Boden absetzen sollte, wurde der E14tg2a-Überstand auf eine neue gelatinisierte Zellkulturschale gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dieser Vorgang musste drei Mal wiederholt werden, um die Anzahl der Fütterzellen stark zu dezimieren. Für die Kultivierung der E14tg2a Zellen wurde jeden Tag das Medium gewechselt. Zur Vermehrung der E14tg2a-Zellen wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70-80% mit PBS gewaschen und durch Trypsin Behandlung von den gelatinisierten Zellkulturschalen gelöst. Die gelösten E14tg2a-Zellen konnten anschließend mit frischem ES-Zellmedium resuspendiert und auf neue gelatinisierte Zellkulturschalen ausgesät werden. Zur langfristigen Lagerung wurden die E14tg2a-Zellen, wie bereits beschrieben, von der gelatinisierten Zellkulturschale gelöst, mit frischem ES-Zellmedium resuspendiert, abzentrifugiert (3min bei 1000g) und vereinigt. Die Überstand des

ES-Zellmediums wurde abgesaugt und durch ES-Zelleinfriermedium ersetzt. Anschließend konnten die E14tg2a-Zellen in Einfriergefäße überführt und bei -80°C gelagert werden.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration	Menge
ES-Zellmedium	DMEM	1:1	
	FCS	15%	
	Glutamax	2 mM	
	Penicillin	10000 U/ml	
	Streptomycin	100 $\mu\text{g/ml}$	
	Sodumpyruvat	1 mM	
	nicht-essentielle Aminosäuren	0,1 mM	
	β -Mercaptoethanol	100 μM	
	LIF		
	ES-Gefriermedium	ES-Zellmedium	
	DMSO		100 μl
	FCS		100 μl

6.4.3 Aggregation und neuronale Differenzierung von E14tg2a-Zellen

Um eine mögliche neuronale Differenzierung, verursacht durch die Überexpression der verschiedenen DICD-Varianten in ES-Zellen zu untersuchen, war es notwendig, die Zellen zuvor zu aggregieren. Hierfür wurden die ES-Zellen auf gelatinisierten Platten aufgetaut und über Nacht bei 37°C im Inkubator inkubiert. Wenn die Zellen eine Konfluenz von ca. 80-90% auf der gelatinisierten Zellkulturplatte erreichten, wurden die ES-Zellen trypsinisiert und ausgezählt. Die ausgezählten E14tg2a-Zellen wurden zu einen Tropfen am Deckel einer 96-Well-Platten auspipettiert (200000 pro Tropfen) und zur Aggregation vier Tage in ES-Zellmedium mit LIF bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die ES-Zellen in ES-Zellmedium ohne LIF für vier weitere Tage inkubiert, um daraufhin auf gelatinisierte 24 well-Zellkulturplatten ausplattiert zu werden. Als Positivkontrolle wurden zu diesem Zeitpunkt bei E14tg2a-Zellen zusätzlich 10 nM Retinolsäure gegeben um eine neuronale

Differenzierung einzuleiten (Bain et al. 1995). Pro 24 well wurden zehn Aggregate zur Differenzierung ausgesät. Zur Differenzierung der ES-Zellen war es notwendig, die Zellen weiterhin in LIF-freiem ES-Zellmedium zu inkubieren. Nach acht Tagen konnten die ES-Zell-Aggregate von der Platte gelöst werden. Hierfür wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um anschließend durch Trypsin von der Platte gelöst zu werden. Die abgelösten ES-Zellen wurden zentrifugiert (3 min bei 1000g) und für die qRT-PCR in 100 µl TriReagent (Invitrogen) aufgenommen. Im Anschluss wurden die ES-Zellaggregate durch mehrmaliges Auf und Ab pipettieren homogenisiert. Bis zur weiteren Verwendung konnten die Zellen mehrere Wochen bei -80°C gelagert werden.

6.4.4 Proliferationsmessung von transgenen E14tg2a-Zellen

Um die Proliferation bei den verschiedenen DLL1-ICD stabil exprimierenden ES-Zellen zu untersuchen, wurden 200000 ES-Zellen auf 60mm Zellkulturschale ausplattiert und die Gesamtzellzahl nach 24, 48 und 72 Stunden ermittelt. Hierfür wurden die attachierten E14tg2a-Zellen anfangs mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin von der gelantinierten Platte gelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zusätzlich wurde 1 ml ES-Zellmedium zu den E14tg2a-Zellen gegeben und immer wieder leicht geschwenkt bis die Zellen in einem Hemazytometer (Neubauer) ausgezählt wurden. Um nur lebende Zellen zu zählen, wurden 40 µl der ES-Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau für 5 min angefärbt. Tote Zellen zeigten sich, indem sie den Farbstoff aufnahmen, blau. Die Proliferationsanalyse wurde in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt und war Grundlage für die Berechnung der Verdopplungszeit der transgen exprimierenden E14tg2a-Zellen zu den nicht exprimierenden transgenen E14tg2a-Zellen. Die Verdopplungszeit wurde aus der nicht-linearen Regression der Ergebnisse der Auszählung errechnet. Dies erfolgte mit dem Statistikprogramm Prism (GraphPad).

6.4.5 Stabilisierung von Proteinen durch Proteasom-Inhibition

Für Immunfluoreszenzen und Western Blot Analysen wurde zum Teil das Proteasom inhibiert. Die Inhibition des Proteasoms erfolgte durch die Zugabe eines Proteasom Inhibitors, der den Abbau von Proteinen oder deren Prozessierungsfragmente verhinderte. In dieser

Arbeit fand der Proteasom Inhibitor MG132 der Firma Sigma-Aldrich Verwendung. Hierfür wurden 25 μM von MG132 ins Zellkulturmedium gegeben und vermischt. Anschließend wurde dieses Medium auf Proteinexprimierende Säugerzellen gegeben und diese für 4-8 Stunden kultiviert. Die in dem Inhibitionsmedium kultivierten Zellen fanden anschließend in Immunfluoreszenzen oder Western Blot Analysen Verwendung.

6.4.6 Inhibition der γ -Sekretase

Für die Analyse der Spaltungen des DLL1-Proteins wurde in einigen Versuchen die γ -Sekretase inhibiert. Zur Inhibition der γ -Sekretase wurde der Inhibitor „Secretase Inhibitor IX“ der Firma Calbiochem verwendet. Für die Analyse der Spaltung von DLL1 war es zuvor erforderlich, die Proteine zu stabilisieren (siehe 6.4.5). Hierzu wurden zuerst die Säugerzellen für 4 Stunden mit MG132-haltigem Zellkulturmedium (Konzentration 25 μM) kultiviert. Nach der Inkubation mit MG132-Zellkulturmedium wurde ein Zellkulturmedium mit 25 μM MG132 und 10 μM des „Secretase Inhibitors IX“ für 4 weitere Stunden auf die Säugerzellen gegeben. Anschließend konnten die Säugerzellen für Western Blot Analysen verwendet werden

6.5 Elektroporation von E14tg2a-Zellen

Die Methode der Elektroporation wurde verwendet, um die linear vorliegende DNA in die E14tg2a-Zellen einzubringen. Für die Elektroporation von DNA in die E14tg2a-Zellen wurden fünf konfluent bewachsenen 60mm Platten benötigt. Diese wurden mit Trypsin von der Platte gelöst, anschließend in ES-Zellmedium resuspendiert für 20 min zurück in den Inkubator gestellt. In dieser Zeit setzten sich die meisten Fütterzellen wieder am Boden ab. Der Überstand der fünf 60 mm Platten, welcher die E14tg2a-Zellen beinhaltet, wurde in einem 50ml Reaktionsgefäß vereinigt und bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert. Das erhaltene E14tg2a-Zell-Pellet wurde in 30 ml PBS vorsichtig gewaschen und nochmals bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 700 μl EP-PBS resuspendiert und zusammen mit 20 μg der linearisierten DNA in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm) gegeben. Die Elektroporation wurde mit dem Gene Pulser der Firma BioRad durchgeführt. Bei einer Spannung von 0,24 kV und einer elektrischen Kapazität von 500 μF erfolgte die

Elektroporation. Anschließend wurden die E14tg2a-Zellen für 10 min auf Eis gestellt. Die elektroporierten Zellen wurden in 10ml EP-Medium resuspendiert und auf 10 gelatinisierten 90 mm Schalen aufgeteilt. Die Aufteilung auf mehrere Schalen sollte die Ausbildung von einzelnen Zellklonen begünstigen.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration	Zusammensetzung
ES-Zellmedium	DMEM	1:1	400 ml
	FCS	15%	75 ml
	Glutamaxx	2 mM	5 ml
	Penicillin	10000 U/ml	5 ml
	Streptomycin	100 µg/ml	5 ml
	Sodiumpyrovat	1 mM	5 ml
	nicht-essenzielle		
	Aminosäuren	0,1 mM	5 ml
	β-Mercaptoethanol	100 µM	500 µl
	LIF		25 µl
EP-Medium	DMEM	1:1	400 ml
	FCS	10%	45 ml
	Glutamaxx	2 mM	5 ml
	Penicillin	10000 U/ml	5 ml
	Streptomycin	100 µg/ml	5 ml
	Sodiumpyrovat	1 mM	5 ml
	nicht-essenzielle		
	Aminosäuren	0,1 mM	5 ml
	β-Mercaptoethanol	100 µM	500 µl

6.6 Selektion von *Hprt*-positiven E14tg2a-Zellen

Nach der Elektroporation wurden die E14tg2a-Zellen in EP-Medium für zwei Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurde das EP-Medium durch EP-Medium mit Selektionsdroge HAT (HAT supplement (100 x lyophilized)), 10mM na-Hypoxantin, 40µM

Aminopterin und 1,6 mM Thymin) ersetzt. Die E14tg2a-Zellen wurden für 14-21 Tage dem Selektionsdruck ausgesetzt. Das EP-Medium mit Selektionsdroge wurde abhängig vom Grad der sterbenden und überlebenden Zellen gewechselt (anfangs täglich, im späteren Verlauf alle 2-4 Tage). Resistente E14tg2a-Zellklone konnten nach 14-21 Tage isoliert werden und wurden in 96er Zellkulturplatten überführt. Zur Typisierung mussten die E14tg2a-Zellklone zuvor expandiert werden. Zur Expansion wurden die E14tg2a-Zellklone, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit, von 96er - bis zur 24er Zellkulturschale expandiert. Nach ein bis zwei Tagen wurde die 24er Zellkulturschale dupliziert. Eine 24er Zellkulturschale mit E14tg2a Zellklonen diente der Analyse der korrekten Rekombination in den *Hprt*-Lokus. Diese wurde durch eine Long-Range-PCR am 5'-Ende durchgeführt. Die Primerkonstellation sollte den korrekten Einbau der transgenen DNA in den *Hprt*-Lokus verifizieren.

Typisierungsprimer	Sequenz
HPRT 5' Typi	TGAGTGGGGGGGTTGATAATCTTGG
CAG. rev	GGCTATGAACTAATGACCCCG

6.7 Embryologische Methoden

6.7.1 Herstellung von chimären Mäusen

Für die Herstellung von chimären Mäusen wurden die unterschiedlichen transgenen Zelllinien einige Tage vor der Injektion kultiviert. Die Injektion der Zelllinien erfolgte in Embryonen im Morula-Stadium. Besonderer Dank gilt hier Dr. Karin Schuster-Gossler, die diese Arbeiten übernahm.

6.7.2 Isolation von Mausembryonen

Die Isolation von Embryonen aus den Uteri der Muttertiere erfolgte mit Hilfe einer feinen Pinzette (Dymont Nr. 5) und wurde unter dem Stereomikroskop durchgeführt. Die Uteri wurden aus dem Muttertier in kaltes PBS überführt und die Embryonen einzeln aus dem Uterus freipräpariert. Zur Genotypisierung der unterschiedlichen transgenen Embryonen wurde separat der Dottersack jedes Embryos aufbewahrt und genotypisiert (siehe 6.7.4) Für

die Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung (WISH) wurden die Embryonen über Nacht in 4% PFA fixiert (siehe 6.7.6) und am nächsten Tag dehydriert. Zur Expressionsanalyse der unterschiedlichen transgenen Proteine wurden ein transgener oder Wildtyp Embryo in 50 µl 2x SB-Puffer überführt und durch Auf und Ab pipettieren homogenisiert. In Anschluss wurde das Homogenisat sonifiziert und stand für Western Blot Analysen zur Verfügung oder wurde bei -80°C weggefroren.

6.7.3 DNA-Präparation aus Dottersäcken und Schwanzbiopsien

Für die Genotypisierung von Jungtieren oder adulten Mäusen wurde ein etwas 5 mm langes endständiges Schwanzstück entfernt und über Nacht in 500 µl 1 x PCR Puffer und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 55°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die verdauten Schwanzstücke eine Stunde bei 85°C inkubiert. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt (2 min bei max.) um nicht verdaute Bestandteile (z.B. Haare) von der DNA-Lösung zu trennen. Anschließend konnte die Genotypisierung starten.

Zur Genotypisierung von Embryonen wurde, während der Isolierung der Embryonen aus dem Uterus, der Dottersack jedes Embryos einzeln in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Im 1,5ml Reaktionsgefäß war bereits 300µl 1 x PCR Puffer vorgelegt. Den Dottersäcken wurde 3µl Proteinase K zugegeben und über Nacht erfolgte der Verdau der Dottersäcke bei 55°C. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurde der Ansatz eine Stunde bei 85°C inaktiviert. Die Dottersäcke konnte anschließend auf ihrem Genotyp typisiert werden.

6.7.4 Genotypisierung von transgenen Mäusen

Die Typisierung der Embryonen, Jungtiere und der adulten transgenen Mäuse erfolgte durch eine PCR. Hierfür wurde auf das Transgen (DICD, fDICD oder DΔECD), auf den wildtyp *Hprt*-Lokus und auf das Geschlecht typisiert. Die Detektion des Transgens erfolgte mit den Primern *CRN4F* und *FDICD*. Der wildtyp *Hprt*-Lokus wurde mit den Primern *WT Hprt 5del2F* und *WT Hprt 5del2B* detektiert und die Bestimmung des Y-Chromosoms und damit des Geschlechtes erfolgte mit den Primern *YMTFP1* und *YMTRC2*.

Typisierungsprimer	Sequenz
CRN4F	TGCTACCTGTTCATGCCTTCT
FDICD2	CCCACAGGTTTCAGGTGGAGGCTGGTG
WT HPRT 5 del2F	TGGGCATTGGATCTCATTTTA
WT HPRT 5 del2B	GATATCAAGCAGAGCCAGGAAG
YMTFP1	CTGGAGCTCTACAGTGATGA
YMTRC2	CAGTTACCAATCAACACATCAC

Der PCR-Ansatz setzt sich wie in 6.2.10.1 beschrieben zusammen

PCR Programme für die Typisierung der Embryonen

Synthesezyklus zur DICD-Typisierung von Embryonen

- | | | | |
|-------------|-------|---------------------|---------------------|
| 1. T = 94°C | 2 min | | |
| 2. T = 94°C | 30 s | (Denaturierung) | } 35 Wiederholungen |
| 3. T = 53°C | 30 s | (Primer-anealing) | |
| 4. T = 72°C | 40 s | (Elongation) | |
| 5. T = 72°C | 5 min | (Finale Elongation) | |

Synthesezyklus zur HPRT-Typisierung von Embryonen

- | | | | |
|-------------|-------|---------------------|---------------------|
| 1. T = 94°C | 2 min | | |
| 2. T = 94°C | 30 s | (Denaturierung) | } 35 Wiederholungen |
| 3. T = 53°C | 30 s | (Primer-anealing) | |
| 4. T = 72°C | 30s | (Elongation) | |
| 5. T = 72°C | 5 min | (Finale Elongation) | |

Synthesezyklus zur Y-Chromosom-Typisierung von Embryonen

- | | | | |
|-------------|-------|---------------------|---------------------|
| 1. T = 94°C | 2 min | | |
| 2. T = 93°C | 10 s | (Denaturierung) | } 35 Wiederholungen |
| 3. T = 60°C | 30 s | (Primer-anealing) | |
| 4. T = 72°C | 30 s | (Elongation) | |
| 5. T = 72°C | 5 min | (Finale Elongation) | |

6.7.5 Altersbestimmung von Embryonen

Für Myogenin und Neurogenin Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung und die Messung der relativen Expression von Neurogenin und Islet1, sowie *Hes5* und *Hey2* durch qRT-PCR war es wichtig Embryonen des gleichen Entwicklungsstadiums mit einander zu vergleichen. Für die Bestimmung des gleichen Entwicklungsstadiums wurden die Somiten jedes einzelnen Embryos gezählt.

6.7.6 Fixierung von Embryonen

Um die Expression der RNA von bestimmten Genen mittels Ganzpräparat *in situ*-Hybridisierung in Embryonen zu untersuchen, war es notwendig die zuvor isolierten Embryonen zu fixieren. Hierzu wurden die Embryonen direkt nach der Isolation aus dem Uterus in kaltes PBS auf Eis überführt. Anschließend wurde das PBS abgenommen und für Fixierung durch 4%iges Paraformaldehyd (PFA) in PBS ersetzt. Die Embryonen blieben über Nacht bei leichtem schwenken und 4°C in der 4%igen PFA Lösung. Am nächsten Tag wurden die Embryonen schrittweise dehydriert (siehe 6.7.7).

6.7.7 Dehydrierung von Embryonen

Die über Nacht fixierten Embryonen wurden durch eine Methanol-Reihe dehydriert. Hierfür wurden die Embryonen für ca. 5-10 min in unterschiedlichen Methanollösungen (25%, 50%, und 75% MeOH in DEPC-Wasser) inkubiert. Zum Schluss wurden die Embryonen noch in 100% Methanol überführt und konnten so für einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden.

6.7.8 Herstellung von *in situ* Sonden

Für die Herstellung von RNA-Sonden für Ganzpräparat *in situ*-Hybridisierung wurde eine PCR generiert, dessen PCR-Produkt einen Promotor (T7, SP6 oder T3) und die Sequenz, enthielt, die zu analysieren war. Dieses PCR-Produkt diente als Template für die folgende *in*

in vitro Transkription. Für die *in vitro* Transkription fanden Polymerase und Puffer der Firma Roche Verwendung.

Der Transkriptionsansatz (20 µl) setzt sich wie folgt zusammen.

Transkriptionspuffer	2 µl
dNTPs	2 µl
Template	2 µl
RNase-Inhibitor	1 µl
Wasser	11 µl
RNA-Polymerase	2 µl

Der Ansatz wurde für 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 2µl DNase und der Ansatz wurde für weitere 15 min bei 37°C inkubiert.

Zur Fällung der RNA-Sonde wurde der Ansatz bei -80°C über Nacht gelagert. Zur Fällung wurde zusätzlich

tRNA (10µg/µl)	1µl
DEPC-Wasser	100 µl
NH ₄ OAc (ph 7,5)	33 µl
Ethanol	300µl

zugegeben.

Am nächsten Tag wurde die Fällung abzentrifugiert (15 min bei max.) und mit 70% Ethanol gewaschen. Hierzu wurde der Überstand nach der Zentrifugation abgenommen und 500µl Ethanol auf das Pellet gegeben. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (15 min bei max.). Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet enthielt die RNA-Sonde. Das Pellet wurde mit 100 µl 50% Formamid in DEPC-Wasser aufgenommen. Zusätzlich wurde noch 1 µl RNasin (RNase-Inhibitor von Promega) in dem Ansatz gegeben. Die Lagerung erfolgte bis zum Gebrauch der RNA-Sonde bei -80°C.

6.7.8.1 Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung (WISH)

6.7.8.2 WISH: Hybridisierung

Für die *in situ* Hybridisierung wurde die noch in 100% Methanol gelagerten Embryonen für eine Stunde auf Eis mit 6% H₂O₂ in Methanol gebleicht. Anschließend erfolgte die Rehydrierung mit 75%, 50% und 25% Methanol in PBS für jeweils 10 min, drei Waschschrte mit PBT und einem Proteinase K-Verdau (10 µg/µl) für 5-10 min. Die Dauer des Verdauens mit Proteinase K richtete sich nach dem Entwicklungsstadium der Embryonen (E9,5 für 8 min; E10,5 für 10 min). Zwei Waschschrte mit PBT und eine Fixierung der Embryonen in 4%PFA/0,2% Glutaraldehyd folgten. Nach drei weiteren Waschschrten in PBT wurden die Embryonen in verschiedene Hybridisierungspuffer (Hype) überführt und inkubiert (Hype/PBT 1:1 für 10 min bei RT, Hype für 10 min bei RT, Hype für 2-3 Std. bei 65%). Die Hybridisierung mit der RNA-Sonde über Nacht bei 70°C erfolgte in Anschluss. Die RNA-Sonde (25-50 µg/ml RNA-Sonde) wurde hierfür zuvor bei 80°C in Hybridisierungspuffer für 3 min denaturiert.

6.7.8.3 WISH: Entfernung der ungebundenen Sonde

Am darauf folgenden Tag wurden die Embryonen zwei Mal mit Lösung I für 30 min bei 70°C gewaschen. Nach einer Abkühlung auf RT erfolgte eine Waschung mit Lösung I/ Lösung II (im Verhältnis 1:1) für 5 min und drei Waschschrte mit Lösung 2 für 5 min bei RT. Die Entfernung der ungebundenen RNA-Sonde erfolgte in zwei Schritten mit RNase-Lösung für je 15 min bei 37°C, welche 100 µg/ml RNase (RNase A, Sigma) enthielt um die ungebundene RNA zu verdauen. Im Anschluss wurden die Embryonen mit Lösung III zwei mal 1-3 Std. inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation der Embryonen in MABTL bei RT für 5 min. Für die Inkubation mit den DIG alkalische Phosphatase (AP)-Antikörper war er zuvor erforderlich die Embryonen in Blocklösung 60-90 min zu inkubieren. Der AP-Antikörper wurde währenddessen in der Blocklösung preabsorbiert und anschließend auf die Embryonen überführt. Über Nacht bei 4°C und leichtem Schütteln erfolgte die Antikörperbindung an die RNA-Sonde.

6.7.8.4 WISH: Entfernung des ungebundenen Antikörpers

Zur Entfernung der ungebundenen Antikörper wurden die Embryonen drei Mal mit MABTL für 15 min bei 4°C gewaschen. Im Anschluss erfolgten 7-10 Waschschrte mit MABTL für jeweils 1 Std. bei RT und ein längerer Waschschrte über Nacht bei 4°C.

6.7.8.5 WISH: Färbung

Für die Färbung der Embryonen wurden anfangs 3 Waschschrten mit MABTL bei RT und drei Waschschrte mit NTMTL für 15 min bei RT durchgeführt. Anschließend wurde zu den Embryonen ein Substrat gegeben, welches die alkalische Phosphatase in einen blauen Farbstoff umsetzte. In die Färbelösung BM purple (enthielt das Substrat) wurde zusätzlich 0,1% Tween20 und 2 mM Levamisol gegeben und anschließend auf die Embryonen überführt. Die Färbung geschah bei RT für mehrere Stunden bis mehrere Tage und wurde unter dem Mikroskop ständig verfolgt. Nach Abschluss der Färbung wurde die Färbelösung durch drei Waschschrte mit PBT für jeweils 5 min entfernt. Zur langfristigen Lagerung wurden die Embryonen in 4% PFA/ PBS überführt und bei 4°C gelagert.

Für die Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung wurden folgende Lösungen verwendet:

Name	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBT	PBS 0,1% Tween20
4%PFA/ 0,2% Glutaraldehyd	4% PFA/ PBS 0,2% Glutaraldehyd in DEPC-Wasser pH 7,0
20 x SSC	3M NaCl

	0,3 M Natriumcitrat in DEPC Wasser pH 7,0
Hybridisierungspuffer	50% Formamid 5 x SSC 50 µg/ ml Heparin 1% SDS 50 µg/ml tRNA in DEPC-Wasser
Lösung I	50% Formamid 25% SSC (20x) 1% SDS 0,1% Tween20 in DEPC-Wasser
Lösung II	10% NaCl (5M) 1% Tris HCL (1M, pH7,5) 0,1% Tween20
Lösung III	50% Formamid 10% SSC (20x) in DEPC-Wasser
MAB	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5
MABTL	MAB 0,1% Tween
Blockpuffer Stocklösung	Blocking Reagent (Boeringer/Ingelheim) auf 10% in MAB gelöst, Zusatz 0,1% Tween und bei -20°C gelagert
Blocklösung	2% Blockpuffer Stocklösung 20% Schaafserum in MABT
NTMTL	100mM NaCl 50mM MgCl ₂

	<p>0,1% Tween20 100 mM Tris pH 7,5 2 mM Levamisol</p>
Färbelösung	<p>BM purple AP Substrat (Boeringer) 2 mM Levamisol 0,1% Tween20</p>

7 Ergebnisse

7.1 Expression und Prozessierungen von DLL1 in CHO Zellen

7.1.1 Die Prozessierungen von DLL1

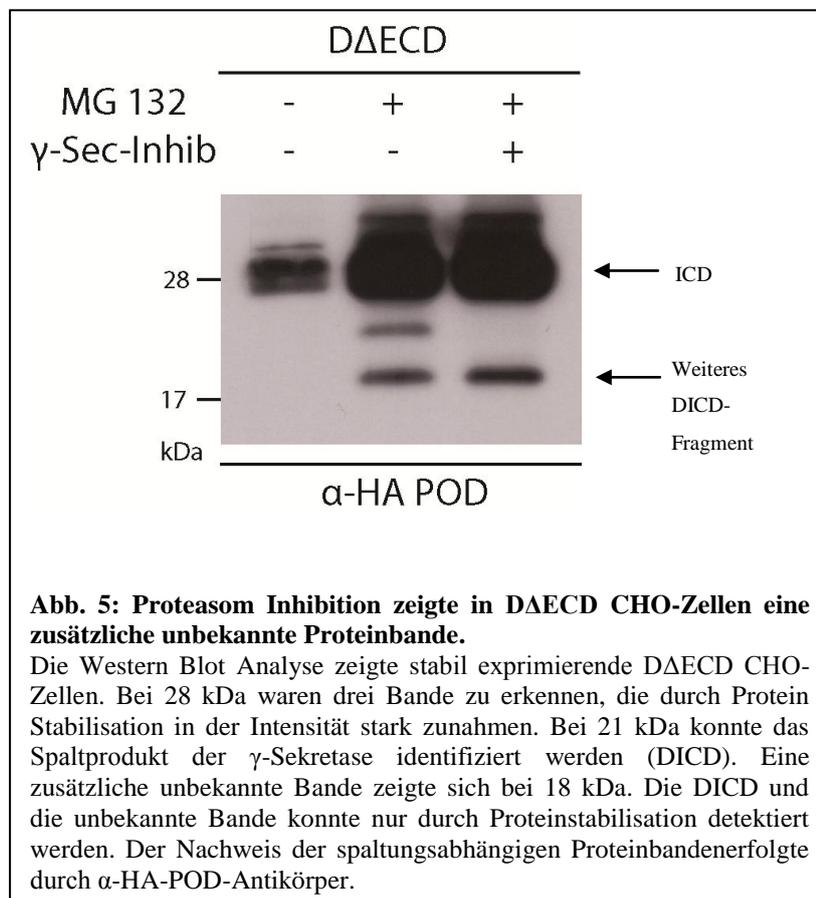
Der murine Notch-Ligand Delta-like 1 (DLL1) unterliegt proteolytischen Spaltungen die unabhängig von der Bindung zum Notch-Rezeptor geschehen. Voran gegangene Analysen deuten daraufhin, dass das DLL1 Protein durch eine ADAM-Protease (A Disintegrin and Metalloprotease) im extrazellulären Bereich nahe der Transmembrandomäne gespalten wird (Dyczynska et al. 2006; Zolkiewska 2008; Six et al. 2003). Diese Spaltung ist Voraussetzung für eine weitere proteolytische Spaltung durch den γ -Sekretasekomplex in der Transmembrandomäne (Six et al. 2003; LaVoie 2003). Nach diesen beiden Spaltungen wird die intrazelluläre Domäne von DLL1 (DlICD) ins Zytosol zu entlassen.

Für die Analyse der Spaltung von DLL1 in CHO-Zellen, wurden CHO Zellen verwendet, die stabil ein DLL1-Deletionskonstrukt (D Δ ECD) exprimierten. In dem D Δ ECD-Konstrukt wurde ein Großteil der extrazellulären Domäne deletiert. Dieses DLL1-Deletionskonstrukt eignete sich für die Analyse der Prozessierung von DLL1, da das D Δ ECD-Protein durch die kurze Ektodomäne ein direktes Ziel für die ADAM-Protease und der nachfolgenden γ -Sekretasespaltung war. N-Terminal besaß das D Δ ECD-Deletionskonstrukt das DLL1-Signalpeptid um eine Zelloberflächenpräsentation zu gewährleisten, gefolgt von den letzten 194 Aminosäuren des wildtyp DLL1 (beinhaltet Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne des DLL1 Proteins). Durch die Deletion ist dieses Konstrukt nicht mehr in der Lage den Notch-Rezeptor zu aktivieren, da diesem Konstrukt die Domänen fehlen, die zur Bindung an den Notch-Rezeptor benötigt werden (DSL-Domäne, EGF 1 und EGF 2).

In den stabilen D Δ ECD überexprimierenden CHO-Zellen wurden die Spaltungsabhängigen Proteinbanden in der Western Blot Analyse mittels des C-terminalen HA-Tags nachgewiesen. In den Western Blot Analysen zeigten sich Proteinbanden auf der Höhe von ca. 28 kDa, 21 kDa und 18 kDa (siehe Abb. 5). Die drei Banden um 28 kDa setzten sich aus dem D Δ ECD Deletionskonstrukt und zwei weiteren unbekanntem Banden zusammen. Durch Stabilisation der Proteine mittels Proteasom-Inhibition, zeigte sich eine starke Zunahme der Intensität der Banden um 28 kDa. Oberhalb der 28 kDa-Banden konnten weitere unbekannte Banden erkannt werden. Durch die Stabilisation der Proteine wurde die γ -Sekretase-abhängige Proteinbande bei 21 kDa identifiziert. Diese Bande war nicht mehr zu detektieren, wenn der

γ -Sekretasekomplex inhibiert wurde (siehe Abb. 5, ICD). Bei dieser Proteinbande musste es sich daher um die intrazelluläre Domäne des DLL1-Proteins handeln. Durch die Identifizierung der γ -Sekretasespaltung muss zuvor das Deletionskonstrukt durch ein ADAM-Protein proteolytisch gespalten worden sein oder das D Δ ECD-Konstrukt wäre durch die relativ kurze Ektodomäne bereits ein direktes Ziel des γ -Sekretasekomplexes.

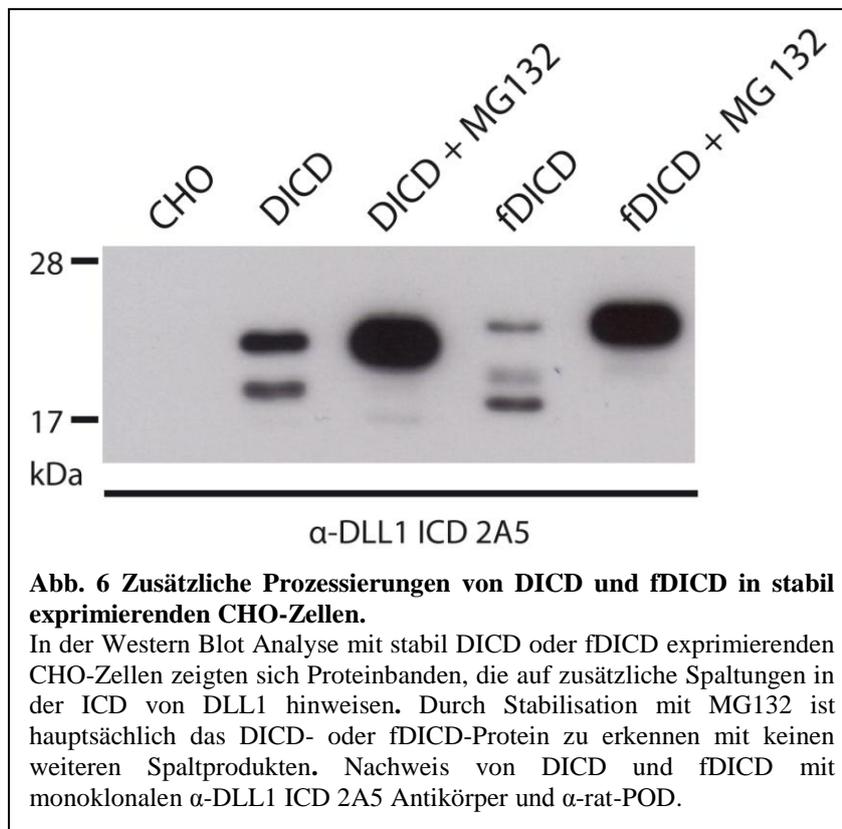
Zusätzlich zeigte sich eine Proteinbande bei 18 kDa, die ebenfalls wie die γ -Sekretasespaltungsabhängige Proteinbande nur bei Proteinstabilisation zu erkennen war. Sie deutet auf eine weitere Prozessierung der intrazellulären Domäne von DLL1 hin, die unabhängig von der γ -Sekretasespaltung war.



Die Ergebnisse aus Abb. 5 deuten auf eine bisher unbekannte zusätzliche Spaltung der intrazellulären Domäne von DLL1 hin. Um dieses Ergebnis der Prozessierung der ICD von DLL1 genauer zu analysieren und zu verifizieren, wurden zwei stabil exprimierende CHO-

Zelllinien hergestellt, die die ICD und die ICD mit fusioniertem N-terminalen Flag-Tag (fDICD) stabil exprimierten.

Die stabil DICD und fDICD überexprimierenden CHO Zellen zeigten mehrere unbekannte Banden in der Western Blot Analyse. Während bei DICD-CHO-Zellen zwei Banden zu erkennen waren, waren bei den fDICD exprimierenden CHO Zellen drei Banden vorhanden. Dies deutet auf eine zusätzliche unbekannte Prozessierung hin (siehe Abb. 6). Durch Proteasominhibition konnte das Signal der jeweils obersten Bande (bei ca. 21 kDa) der DICD und fDICD verstärkt werden. Die anderen Banden verschwanden fast vollständig. Das Verschwinden der zusätzlichen Proteinbanden durch Proteasom Inhibition deutet auf eine proteasomale Degradation der DICD hin. In Western Blot Analysen wurden die Proteinbanden mit einem Antikörper nachgewiesen, der gegen ein C-terminal lokalisiertes Epitop aus der intrazellulären Domäne von DLL1 gerichtet war. Die C-terminale Position des HA-Tags beim Δ EECD-Deletionskonstrukt und die des Epitops, gegen den der monoklonale DLL1 ICD 2A5 gerichtet war, deuten auf eine oder mehrere Spaltungen im N-terminalen Bereich der DICD hin.



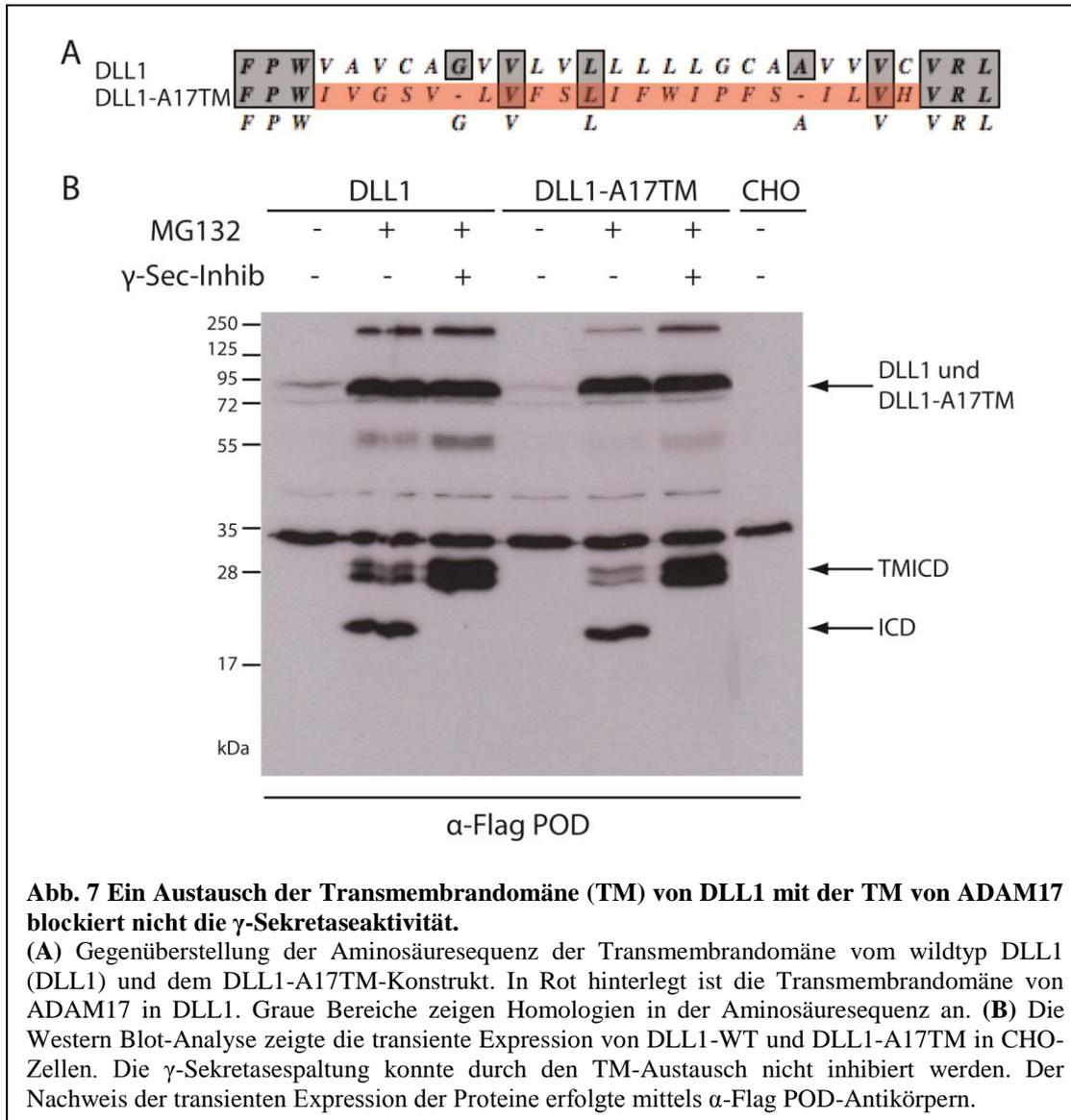
Zusammenfassend ließ sich in Western Blot Analysen zeigen, dass das DLL1-Protein mehrere Prozessierungen in CHO-Zellen durchläuft. Die genauen spaltungsbedingten Proteinbanden des DLL1-Proteins konnten nur durch Inhibition des Proteasoms und dadurch erfolgter Stabilisierung der Proteine gezeigt werden. Die γ -Sekretasespaltung konnte in stabilen D Δ ECD exprimierenden CHO-Zellen eindeutig identifiziert werden. Zusätzlich konnten weitere Banden in stabilen D Δ ECD-, DICD- und fDICD-exprimierenden CHO-Zellen gezeigt werden, die auf unbekannte Prozessierungen der DICD hindeuteten.

7.1.2 Inhibition der γ -Sekretasespaltung durch einen Transmembrandomänenaustausch im DLL1-Protein

Für die Analyse auf eine signalgebende Wirkung der DICD wurden verschiedene DLL1-Varianten generiert. Diese DLL1-Varianten sollten durch Austausch- oder Deletionsmodifikationen in der Aminosäuresequenz die proteolytischen Spaltungen blockieren und damit eine Freisetzung der DICD ins Zytosol verhindern. Die Freisetzung der DICD ins Zytosol ist die Voraussetzung für die Kerntranslokation und damit auch für mögliche signalgebende Wirkung auf transkriptioneller Ebene.

Die Spaltung des γ -Sekretasekomplex ist der proteolytische Schritt, der die intrazelluläre Domäne von DLL1 ins Zytosol entlässt. Um die Spaltung zu inhibieren wurde die Transmembrandomäne von DLL1 durch die Transmembrandomäne des ADAM17-Proteins (DLL1-A17TM) ausgetauscht. Bislang ist nicht bekannt, dass die ADAM17-Metalloprotease ein direktes Ziel der γ -Sekretase ist und durch sie gespalten wird.

In Western Blot Analyse wurde die transiente Expression des DLL1-A17TM mit dem wildtyp DLL1 (DLL1 WT) in CHO-Zellen verglichen. Für den direkten Nachweis der γ -Sekretasespaltung wurde ein Inhibitor für diese eingesetzt. Die Expression beider Konstrukte wurde durch einen C-terminal fusionierten Flag-Tag nachgewiesen.



In der Western Blot Analyse zeigte sich auf Höhe von ca. 35 kDa eine unspezifische Hintergrundbande, die sich auch bei wildtyp CHO-Zellen zeigte und im folgenden zu vernachlässigen war (siehe Abb. 7 B). Ein Vergleich des Bandemusters zwischen dem DLL1-A17TM Protein und dem wildtyp DLL1-Protein zeigte keine Unterschiede. Die Gesamtlängenproteine von DLL1-A17TM und dem wildtyp DLL1 konnten auf einer Höhe von 80 kDa nachgewiesen werden (siehe Abb. 7, DLL1 und DLL1-A17TM).

Die Gesamtlängenproteine von DLL1 und DLL1-A17TM konnten ohne Proteasominhibition in der Western Blot Analyse nur schwach erkannt werden. Die Inhibition des Proteasoms verstärkte jedoch die Signale der Gesamtlängenproteine von DLL1 und DLL1-A17TM. Ebenso wurden, nur bei Inhibition des Proteasoms, DLL1-spaltungsspezifische Banden auf

Höhe von 28 kDa und auf ca. 21 kDa erkannt. Bei der 28 kDa Proteinbande handelte es sich um ein Fragment, das sich aus der Transmembrandomäne und der intrazelluläre Domäne von DLL1 bzw. von DLL1-A17TM zusammensetzt (siehe Abb. 7, TMICD). Die 21 kDa Band ist die intrazelluläre Domäne von DLL1 bzw. DLL1-A17TM (siehe Abb. 7, DICD). Diese Bande verschwand, wenn die Zellen nach der Transfektion zusätzlich mit einem γ -Sekretase-Inhibitor behandeln wurden. Dies bedeutet, dass die 21 kDa Bande das Produkt war, das durch die γ -Sekretase abgespalten wurde. Neben den DLL1-spezifischen Banden zeigten sich bei 250 kDa, 55 kDa und 45 kDa weitere Proteinbanden, die nicht genau zuzuordnen waren. Das Ergebnis der Western Blot Analyse zeigte, dass der Austausch der Transmembrandomäne keine Auswirkung auf die Spaltung von DLL1 durch den γ -Sekretasekomplex hat. Eine Freisetzung der DICD ins Zytosol konnte mit dem Austausch der Transmembrandomäne nicht verhindert werden.

7.1.3 Inhibition der ADAM-Spaltung durch DLL1-Deletionskonstrukte

Ein weiterer Ansatzpunkt ein nicht spaltbares DLL1-Protein zu generieren, war die Blockierung der ADAM-Spaltung. Die ADAM-Protease spaltet das DLL1-Protein in der Extrazellulardomäne zwischen dem Histidin³³⁵ und dem Methionin³³⁶ (Six et al., 2003, siehe Pfeil in Abb. 8A). Für ein potenzielles DLL1-Konstrukt, welches nicht mehr durch eine ADAM-Protease gespalten werden kann, wurden verschiedene Deletionskonstrukte generiert. Es ist bekannt, dass in HEK293-Zellen eine Deletion von 16 Aminosäuren zwischen dem EGF8 und der TM-Domäne von DLL1 eine ADAM-Spaltung inhibiert (Six et al., 2003). Ob diese Deletion in anderen Zelltypen ebenfalls zu einer Inhibition der ADAM-Spaltung führt, wurde in CHO-Zellen untersucht.

Für die Eliminierung der ADAM-Spaltung wurden verschiedene DLL1-Konstrukte mit Deletionen zwischen dem EGF 8 und der TM-Domäne hergestellt. Es wurden zweimal je 15 Aminosäuren (DLL1 15N del. und DLL1 15C del., siehe Abb. 8 A I und II) und einmal 30 Aminosäuren (DLL1 30del. siehe Abb. 8 A III) deletiert. In DLL1 15N del. wurden 15 Aminosäuren in der Nähe von EGF8 deletiert und in DLL1 15C 15 Aminosäuren nahe der Transmembrandomäne. Im Konstrukt DLL1 30del wurden 30 Aminosäuren zwischen EGF8 und der TM deletiert. In diesem Deletionskonstrukt wurde zwei Aminosäuren als Platzhalter

zwischen dem EGF8 und der TM nicht deletiert. Das DLL1 apa-Konstrukt wurde einmal für diese Arbeit selbst generiert und zusätzlich von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alain Israël (Institut Pasteur, Paris) zur Verfügung gestellt.

Alle Deletionskonstrukte wurde in CHO-Zellen transfiziert und auf Expression getestet. In den Western Blot Analysen erfolgte die Detektion der Proteinbanden mit α -Flag-POD Antikörpern. Die Deletionskonstrukte I bis IV (siehe Abb. 8 A), sowie das wildtyp DLL1 (DLL1 WT), besaßen einen C-terminal fusionierten Flag-Tag. Das DLL1 apa-Konstrukt, welches von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alain Israël (DLL1-apa Six) zur Verfügung gestellt wurde, hatte einen, in die ICD integrierten Flag-Tag.

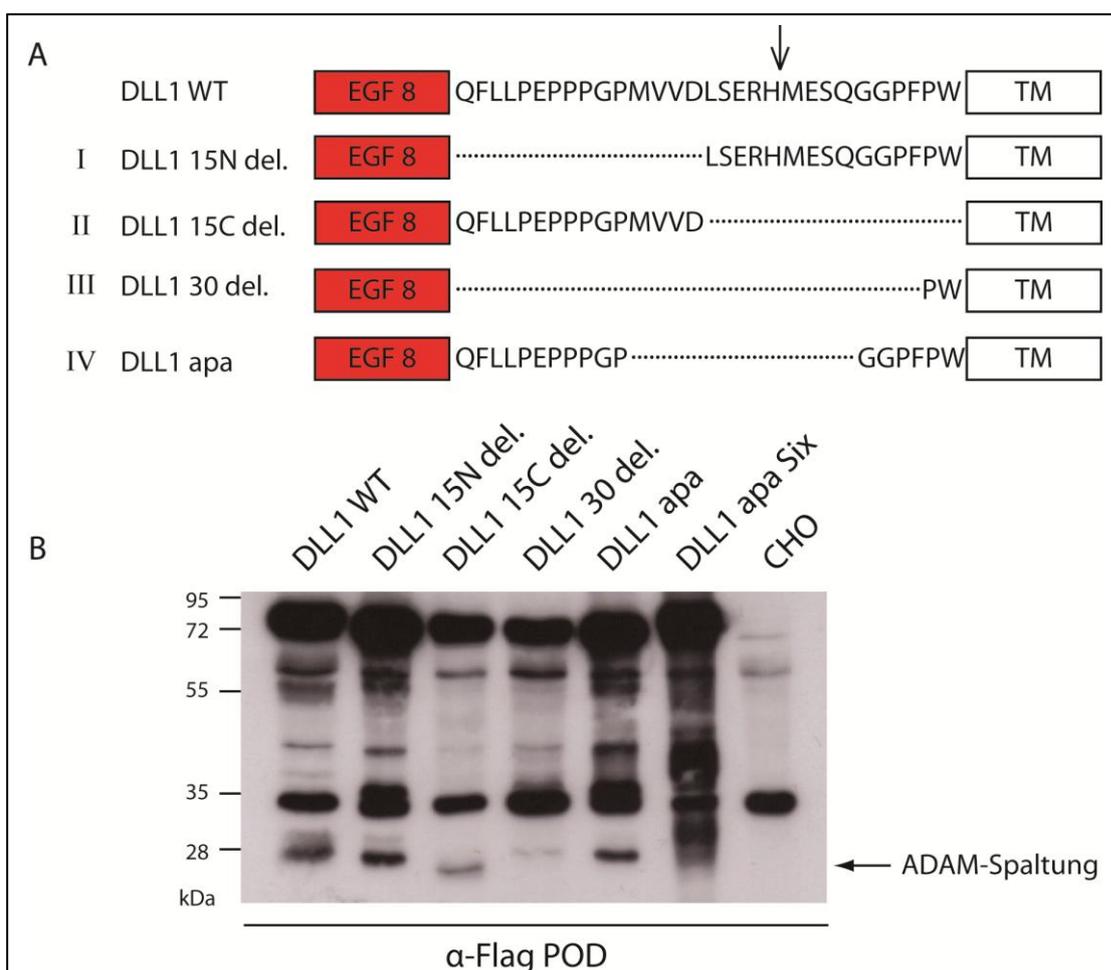


Abb. 8. Verschiedene Deletionen zwischen EGF8 und TM von DLL1 konnten die ADAM-Spaltung nicht inhibieren.

(A) Aminosäuresequenz von DLL1 zwischen EGF8 (Rot) und der Transmembrandomäne (weiß). Der Pfeil zeigt die Spaltstelle der ADAM-Protease an (Six et al, 2003). Die Punkte bezeichnen die fehlenden Aminosäuren in Vergleich zum wildtyp DLL1. (B) Western Blot Analyse der unterschiedlichen Deletionskonstrukte zur Eliminierung der ADAM-Spaltung. Die Deletionskonstrukte und das DLL1-WT zeigten Bande bei 28 kDa, die auf eine mögliche Spaltung durch ein ADAM-Protein hinweisen (Pfeil ADAM-Spaltung). Der Nachweis der transienten Expression der Proteine erfolgte durch α -Flag-POD-Antikörper.

Die transiente Expression der Gesamtlängenproteine von wildtyp DLL1 und den verschiedenen DLL1 Deletionskonstrukte konnte bei 80 kDa nachgewiesen werden (siehe Abb. 8 B). Die Proteinbanden, die auf eine proteolytische Spaltung durch ein ADAM-Protein deuten, wurden bei 28 kDa detektiert. Diese Banden zeigten sich sowohl bei dem wildtyp DLL1 als auch bei den DLL1-Deletionskonstrukten und deuteten darauf hin, dass die unterschiedlichen Deletionen zwischen dem EGF8 und der Transmembrandomäne eine Spaltung durch ein ADAM-Protein nicht verhindern konnten.

Das DLL1 apa Six-Konstrukt (aus Six et al 2003) zeigte eine Bande, die bei ca. 30 kDa zu erkennen war und ließ sich nicht eindeutig als ein Produkt aus der ADAM Spaltung identifizieren. Da jedoch das selbst generierte DLL1 apa-Konstrukt und das erhaltene DLL1 apa Six-Konstrukt auf der gleichen Strategie beruhten, war davon auszugehen, dass die apa-Deletion von 16 Aminosäuren nicht zu dem gewünschten Ziel führte eine spaltungsblockierende DLL1-Variante herzustellen. In der Western Blot Analyse zeigten sich zusätzliche unspezifische Hintergrundbanden bei 35 kDa, 60 kDa und 72 kDa (siehe Abb. 8 B).

Zusammenfassend zeigte sich, dass weder ein Transmembrandomänen Austausch in DLL1, noch verschiedene Deletionsvarianten zwischen dem EGF8 und der Transmembrandomäne von DLL1 die proteolytische Spaltung des DLL1 Proteins blockieren konnten. Somit war es nicht möglich, Effekte, die durch den Verlust der freien ICD von DLL1 entstehen, zu analysieren. Analysen für einen potentiellen reversen Notch-Signalweg konnten im weiteren Verlauf dieser Arbeit nur durch Überexpression der DICD durchgeführt werden.

7.2 Überexpression der DICD zur Analyse einer potentiellen Signalwirkung in *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen

Eine weitere Möglichkeit die biologische Funktion der intrazellulären Domäne von DLL1 zu analysieren, war die Überexpression. Die Überexpression sollte die Frage klären, ob die ICD von DLL1 (DICD) eine DLL1-abhängige Signalwirkung in der Zelle erzeugt.

In einigen Studien ist bereits beschrieben, dass die Überexpression der DICD Auswirkungen auf den Notch-Signalweg hat und durch Immunfluoreszenzen im Nukleus lokalisiert werden konnte. Im Nukleus könnte sie potentiell transkriptionelle Aufgaben übernehmen (Jung et al.

2011; Hiratochi et al. 2007; Liebler et al. 2012b; Kolev et al. 2005). Diese, größtenteils in *in vitro* Experimenten gemachten Beobachtungen, deuten auf eine mögliche Signalgebung, und damit auf eine mögliche Bidirektionalität des Notch-Signalweges hin. Eine Überexpression der DICD in der Maus wurde bisher nicht durchgeführt und ist ein Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit.

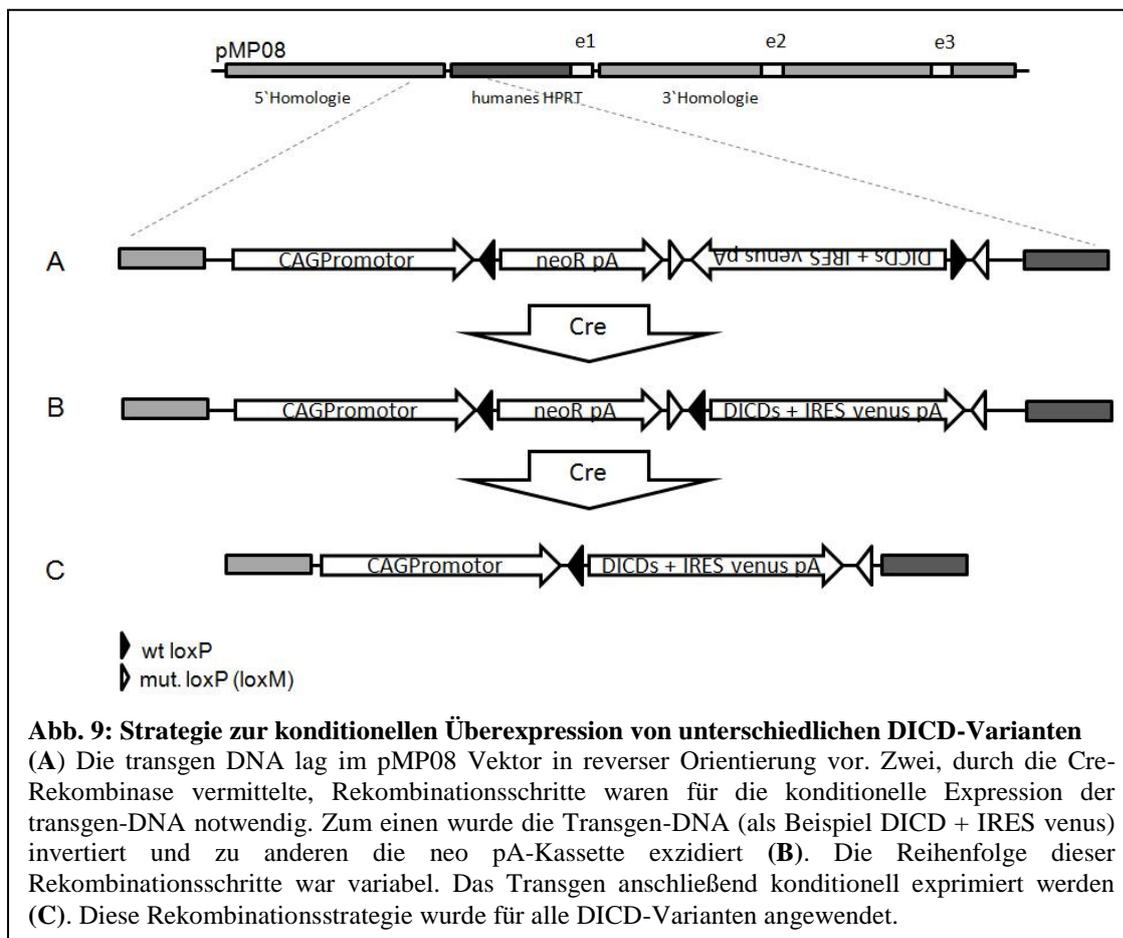
7.3 Überexpressionsstrategie von DICD Varianten in E14tg2a-Zellen und in der Maus

Um eine mögliche Signalwirkung der ICD von DLL1 in ES-Zellen und in transgenen Mäusen zu untersuchen, wurde eine Strategie gewählt, die es ermöglicht die intrazelluläre Domäne von DLL1 konditionell zu überexprimieren.

Für die konditionelle Überexpression der DICD wurde ein Konstrukt verwendet, in dem die Expression unter der Kontrolle eines CAG-Promotors steht (siehe Abb. 9). Der CAG-Promotor lag im Konstrukt stromaufwärts einer Neomycinresistenz-Kassette (neo pA-Kassette), die am 5`-Ende von einer wildtyp loxP-Sequenz (loxP) und am 3`-Ende durch eine mutierte loxP-Sequenz (loxM) flankiert wurde. Stromabwärts der neo pA-Kassette lag die transgene DNA-Sequenz in reverser Orientierung vor, um eine Transkription zu vermeiden. Dem Transgen folgten eine loxP- und eine loxM-Sequenz, die in umgekehrter Orientierung zu denen, der neo pA-Kassette flankierenden, loxP- und loxM-Sequenzen waren (Luche et al. 2007). Diese Orientierung ermöglichte es, durch eine Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination, die neo pA-Kassette herauszuschneiden und die Transgen-Sequenz zu invertieren, um eine Expression des Transgens in Zellkultur (*in vitro*) und in der Maus (*in vivo*) zu ermöglichen. Die Transgen-DNA-Sequenz beinhaltete zusätzlich eine IRES-Venus Sequenz. Die Expression des Venus-Proteins ermöglichte eine schnelle Überprüfung einer erfolgreichen Rekombination durch Visualisierung der Expression des grün fluoreszierenden Proteins. Die induzierbaren Expressionskonstrukte wurden in den pMP08-Vektor kloniert (Alten et al. 2012; Bronson et al. 1996), der zwei Homologiearme des murinen *Hprt*-Lokus besaß, um die Konstrukte durch homologe Rekombination in den *Hprt*-Lokus von E14tg2a-Zellen zu integrieren (siehe Abb. 9). E14tg2a-Zellen sind murine Stammzellen und besitzen eine Deletion von 35 Kilobasen im *Hprt*-Gen (Tsuda et al. 1997; Doetschman et al. 1986; Doetschman et al. 1987), die den endogenen Promotor und das erste Exon mit einschließen.

Diese Deletion verhindert die Expression des HPRT-Enzyms (Thompson et al. 1989). Der *Hprt*-Lokus wurde in dieser Arbeit als Genlokus gewählt, um die Transgene zu integrieren, da es sich um ein „offenes“ Chromatin handelt, dass die stetige Expression des HPRT-Enzyms (und der Transgenen Proteine) garantierte.

Durch die Insertion des pMP08Vektors mittels homologer Rekombination in den *Hprt*-Lokus der E14tg2a-Zellen, wurde die HPRT-Aktivität wieder hergestellt. Dies führt zu einer Resistenz gegenüber Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Selektion (HAT), da HPRT eine Funktion in der Nukleinsäuresynthese einnimmt. Eukaryotischen Zellen sind in der Lage die Synthese von Purinbasen auf zwei unterschiedlichen Wegen zu synthetisieren. Neben der *de novo*-Synthese können aus den Vorläufern Hypoxanthin und Guanin durch den *salvage*-Weg ebenfalls Purinbasen synthetisiert werden, an dem die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) beteiligt ist. Durch die Zugabe von Aminopterin in das Zellkulturmedium wird die *de novo*-Synthese inhibiert und nur Zellen mit intaktem *Hprt*-Gen sind in der Lage über den *salvage*-Weg Purinbasen zu generieren. Da Aminopterin die Tyridinkinase inhibiert, wurde außerdem dem Medium Tymidin zugesetzt.



7.4 Verschiedene DICD-Varianten zur Überexpressionsanalyse in ES-Zellen und in der Maus

Für die *in vitro* und *in vivo* Überexpressionsanalyse wurde anfangs eine DICD-Variante ausgewählt, an deren N-Terminus ein Flag-Tag fusioniert wurde (fDICD). Dieses sollte eine Unterscheidung zwischen dem endogenen DICD-Protein und dem transgenen fDICD-Protein ermöglichen. Dieses fDICD-Konstrukt wurde nach der Strategie, wie sie in Abb. 9 beschrieben ist, in den *Hprt*-Lokus der E14tg2a-Zellen integriert. Diese *Hprt*^{fDICD/Y} E14tg2a-Zellen waren die Grundlage für die Generierung von transgenen fDICD-Mäusen. In Western Blot Analysen mit Proteinlysaten von transgenen *Hprt*^{fDICD/Y} Embryonen konnte das überexprimierende Protein durch einen α -Flag-Tag Antikörper nachgewiesen werden. In wildtyp Embryonen wurde mit unterschiedlichen α -DICD Antikörpern keine Proteinbande erkannt, die auf die endogene ICD von DLL1 hindeutete (siehe Seite 91).

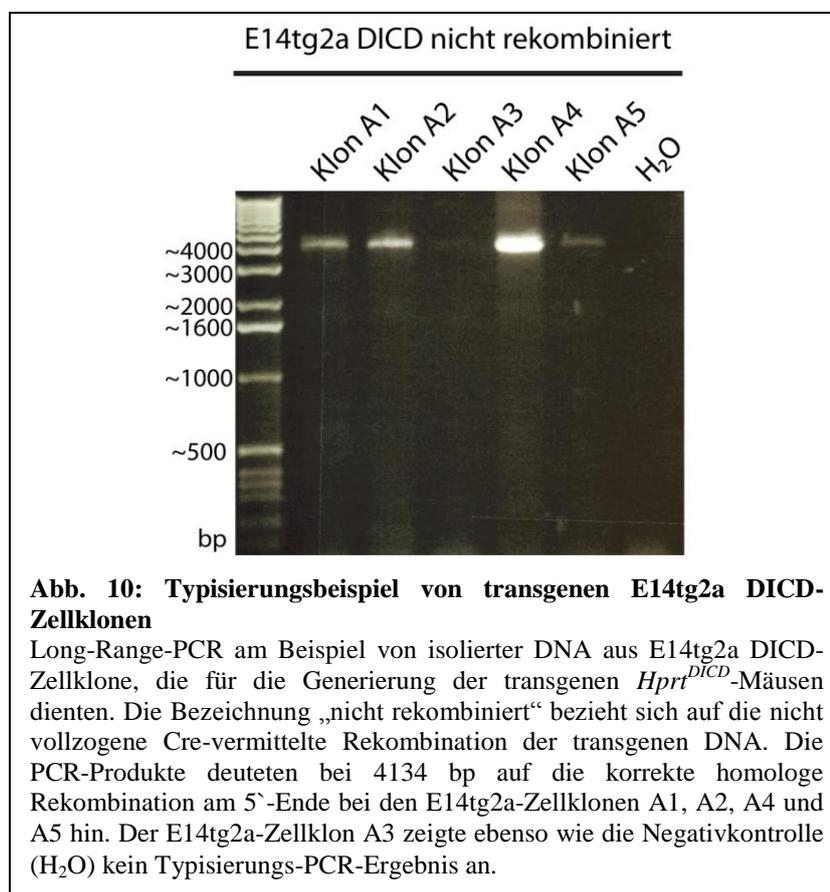
Nachdem die adulten transgenen *Hprt*^{fDICD/Y} Männchen und die *Hprt*^{fDICD/+} Weibchen keinen offensichtlich veränderten Phänotyp zeigten, das transgene fDICD Protein aber durch N-terminal fusionierten α -Flag-Tag und durch verschiedene α -DICD-Antikörpern nachweisbar war (Daten nicht gezeigt), wurden zwei weitere DICD-Konstrukte für die Überexpression generiert. Für den Fall, dass der N-terminale Flag-Tag sich störend auf eine potentielle Signalgebung der DICD auswirkt, wurde die DICD ohne Modifikationen ausgewählt. Um einen eventuellen Einfluss der Spaltung des DLL1-Proteins auf eine Signalgebende Wirkung der DICD zu untersuchen, wurde das bereits beschriebene DLL1 Deletionskonstrukt D Δ ECD (siehe Abb. 5) verwendet. Das D Δ ECD Konstrukt war nicht mehr in der Lage den Notch Rezeptor zu aktivieren, da diesem Konstrukt die für die Bindung an Notch-Rezeptor wichtigen Proteindomänen fehlten. Eine Überaktivierung der Notch-Rezeptoren war somit ausgeschlossen. Das DICD und das D Δ ECD- Konstrukt wurde, wie zuvor das fDICD-Konstrukt, nach der gleichen Strategie in dem pMP08-Vektor kloniert (siehe Abb. 9). Die Herstellung von *Hprt*^{DICD/Y}- und *Hprt*^{D Δ ECD/Y} transgenen E14tg2a ES-Zellen erfolgte ebenfalls nach der gleichen Methode wie bei den *Hprt*^{fDICD/Y} transgenen E14tg2a ES-Zellen. Die *Hprt*^{DICD/Y}-, *Hprt*^{D Δ ECD/Y} und *Hprt*^{fDICD/Y} E14tg2a-Zellen wurden zur Generierung von transgenen Mäusen verwendet. Für *in vitro* Untersuchungen wurden E14tg2a-Zellen verwendet, die bereits die expressionsfähige transgen-DNA besaßen. Hierfür wurde zuvor die Cre-vermittelte Rekombination der Transgen-DNA in SW106-Bakterien durchgeführt (Warming 2005), die durch Induzierung mit L-Arabinose das Cre-Rekombinase-Protein exprimierten. Die expressionsfähige Transgen-DNA wurde anschließend in die E14tg2a-

Zellen elektroporiert und durch homologe Rekombination ebenfalls in den *Hprt*-Locus integriert.

Im folgenden Abschnitt werden die gewonnenen Daten aus *in vitro* und *in vivo* Experimenten der unterschiedlichen E14tg2a-Zelllinien und der transgenen Mäuse miteinander verglichen und parallel dargestellt.

7.5 Induzierte Expression der drei unterschiedlichen DICD-Varianten in E14tg2a ES-Zellen

Für die Generierung der transgenen E14tg2a-Zellen, wurden die unterschiedlichen transgenen-DNA-Varianten durch Elektroporation in die Zellen eingebracht. Die elektroporierten E14tg2a-Zellen wurden anschließend auf HAT-Resistenz selektioniert. Zur Typisierung wurden HAT resistente E14tg2a-Klone mittels einer Longe-Range-PCR über den 5' Homologiearm verifiziert. Die verwendeten Primer, die die korrekte Integration in den *Hprt*-Lokus anzeigen sollten, amplifizierten ein 4134 Basenpaar großes PCR-Produkt (siehe Abb. 10). Als 5'-Primer wurde ein Primer verwendet, der in der endogenen 5'-*Hprt*-Flanke gebunden hat (HPRT 5'-typing) und der 3'-Primer hybridisierte im exogenen CAG-Promotor (CAG-rev).



Für die Generierung von transgenen Mäusen wurden richtig typisierte E14tg2a-Zellen verwendet, die das Transgen in reverser Orientierung im *Hprt*-Lokus integriert hatten (siehe Abb. 9 A)

Für die *in vitro* Untersuchungen wurden die korrekt typisierten HAT-resistenten E14tg2a-Zellen auf die Expression der unterschiedlichen DICD-Varianten untersucht. Durch den singulären Einbau der drei DICD Varianten in den *Hprt*-Lokus war zu erwarten, dass die *Hprt*^{DICD/Y} (DICD rekomb.), *Hprt*^{fDICD /Y} (fDICD rekomb.) und *Hprt*^{DΔECD /Y} (DΔECD rekomb.) E14tg2a-Zellen jeweils die gleiche Menge der transgenen DNA transkribierten.

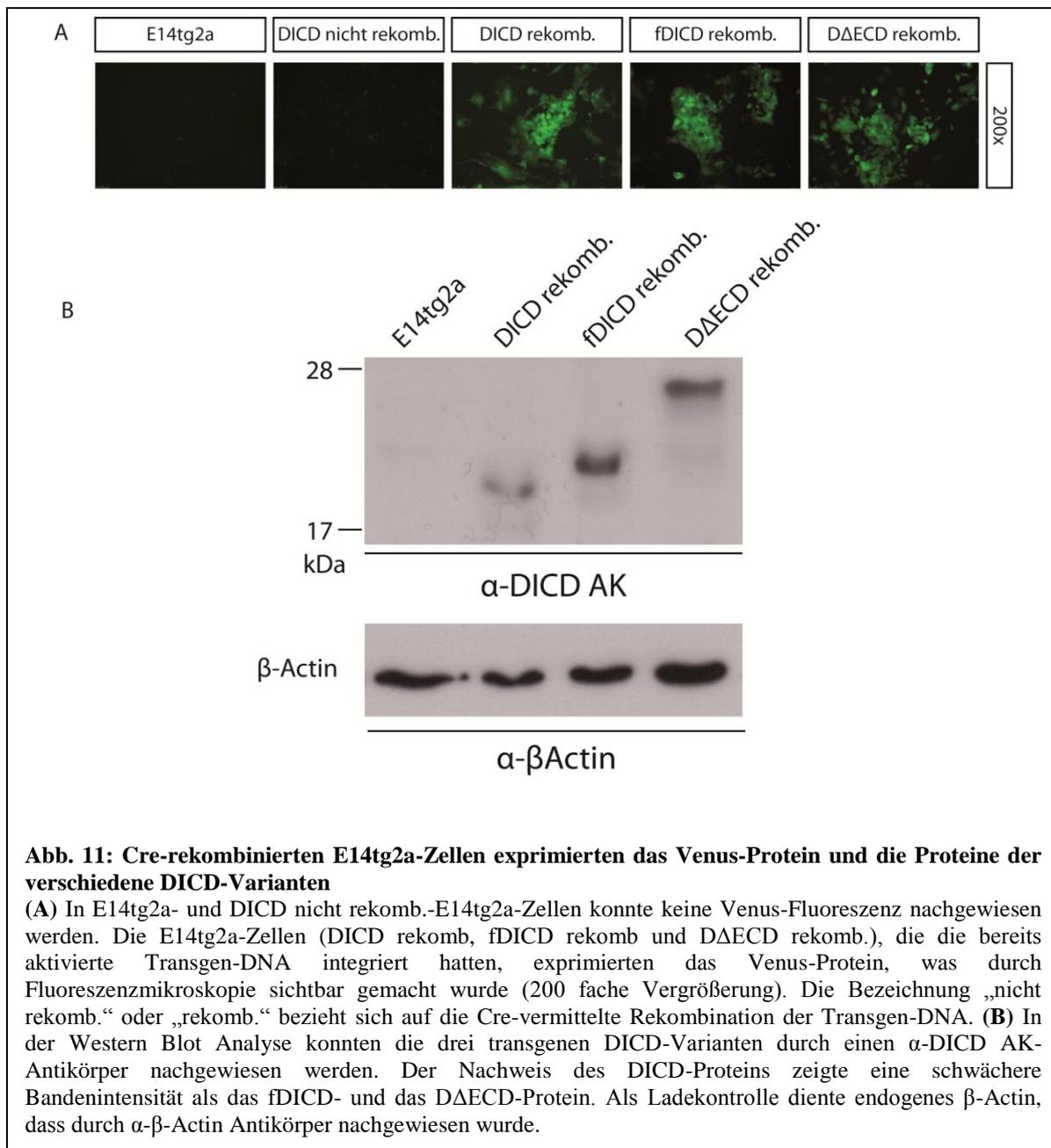


Abb. 11: Cre-rekombinierten E14tg2a-Zellen exprimierten das Venus-Protein und die Proteine der verschiedene DICD-Varianten

(A) In E14tg2a- und DICD nicht rekomb.-E14tg2a-Zellen konnte keine Venus-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die E14tg2a-Zellen (DICD rekomb, fDICD rekomb und DΔECD rekomb.), die die bereits aktivierte Transgen-DNA integriert hatten, exprimierten das Venus-Protein, was durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht wurde (200 fache Vergrößerung). Die Bezeichnung „nicht rekomb.“ oder „rekomb.“ bezieht sich auf die Cre-vermittelte Rekombination der Transgen-DNA. (B) In der Western Blot Analyse konnten die drei transgenen DICD-Varianten durch einen α-DICD AK-Antikörper nachgewiesen werden. Der Nachweis des DICD-Proteins zeigte eine schwächere Bandenintensität als das fDICD- und das DΔECD-Protein. Als Ladekontrolle diente endogenes β-Actin, dass durch α-β-Actin Antikörper nachgewiesen wurde.

Die Fluoreszenzaufnahmen zeigten, dass das Venus-Protein in den transgenen DICD rekomb., fDICD rekomb. und DΔECD rekomb. E14tg2a-Zellen exprimiert wurde (siehe Abb. 11 A). Die E14tg2a- und DICD nicht rekomb.-Zellen zeigten wie erwartet keine Fluoreszenzfärbung an.

In der Western Blot Analyse konnte die Expression der drei DICD Varianten mittels polyklonaler Antikörper (α -DICD AK) nachgewiesen werden (siehe Abb. 11 B). Die Intensität der Proteinbanden hat sich bei den drei DICD-Varianten unterschieden. Die Expression des DICD-Protein schien schwächer zu sein, als die Expression der fDICD- und DΔECD-Proteine. Warum die Intensität der DICD-Bande in der Western Blot Analyse sich geringer zeigte, ist unklar. Als Ladekontrolle diente ein Expressionsnachweis des endogenen β -Actin. Die β -Actin Protein-Banden sind in allen vier untersuchten Proben vergleichbar.

Die E14tg2a-Zellen, die die drei DICD-Varianten exprimierten, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf potentielle Effekte der DICD untersucht.

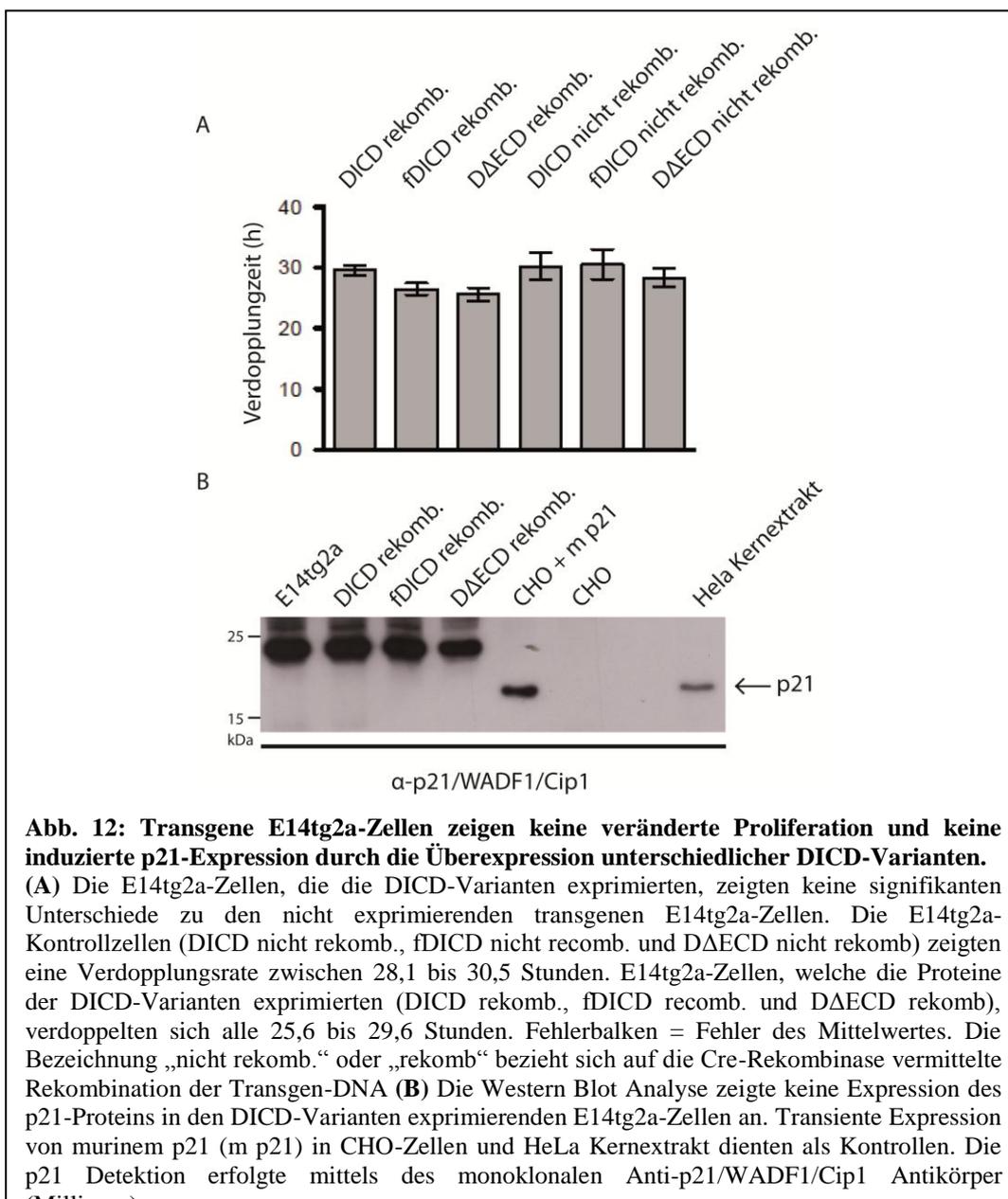
7.6 Proliferationsanalyse in den DICD-Varianten-exprimierenden E14tg2a-Zellen

Die Überexpression der humanen und der murinen ICD von DLL1 in HUVEC-, HEK293- und NIH3T3- Zellen zeigte zellspezifisch eine drastische Reduktion der Proliferationsrate von 50-80%. Dieses wurde durch die Hochregulierung des p21-Proteins (auch Cdk1) hervorgerufen (Kolev et al. 2005; Liebler et al. 2012a). Das p21-Protein ist ein Inhibitor von cyclin-abhängigen Kinasen, die für die Regulation des Zellzyklus essentiell sind.

Um die Proliferation der exprimierenden E14tg2a-Zellen zu untersuchen, wurden 200.000 Zellen ausgesät und die Zellzahl nach 24, 48 und 72 Stunden mit einem Hemazytometer ermittelt. Aus den Ergebnissen der Auszählung wurde anschließend die Verdopplungsrate errechnet. Als Kontrollen dienten hier die E14tg2a-Zellen, welche die nicht Cre-rekombinierte transgene DNA integriert hatten und damit keine transgenen Proteine exprimierten.

Die E14tg2a-Zellen, die die unterschiedlichen DICD-Varianten exprimierten, verdoppelten sich alle 25,6 bis 29,6 Stunden. Die nicht exprimierenden ES-Zellen zeigten eine Verdopplung alle 28,1 bis 30,5 Stunden (siehe Abb. 12A).

Durch eine statistische Auswertung (Prism) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Verdopplungszeit der transgen exprimierenden E14tg2a-Zellen zu den E14tg2a-Kontrollzellen erkannt werden. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Expression der drei DICD-Varianten keine Reduktion bzw. eine Veränderung der Proliferationsrate verursachte. Um die Expression des Zell-Zyklus-Inhibitors p21 in den DICD-Varianten exprimierenden E14tg2a-Zellen zu untersuchen, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Diese zeigten die Expression des murinen- und des humanen p21 Proteins auf Höhe von ca. 21 kDa in den Positivkontrollen an (siehe Abb. 12B). In den transgenen E14tg2a-Zellen und in den E14tg2a-Kontrollzellen konnten nur Hintergrundbanden auf Höhe von 24 kDa und darüber erkannt werden. Eine Expression von endogenen p21 wurde in transgenen E14tg2a jedoch nicht nachgewiesen.



Zusammenfassend zeigte sich, dass die Expression von DICD, fDICD und D Δ ECD in den E14tg2a-Zellen die Proliferation der Zellen nicht beeinflusste. Außerdem wurde die Expression des p21-Proteins durch die Überexpression höchstwahrscheinlich nicht transkriptionell reguliert.

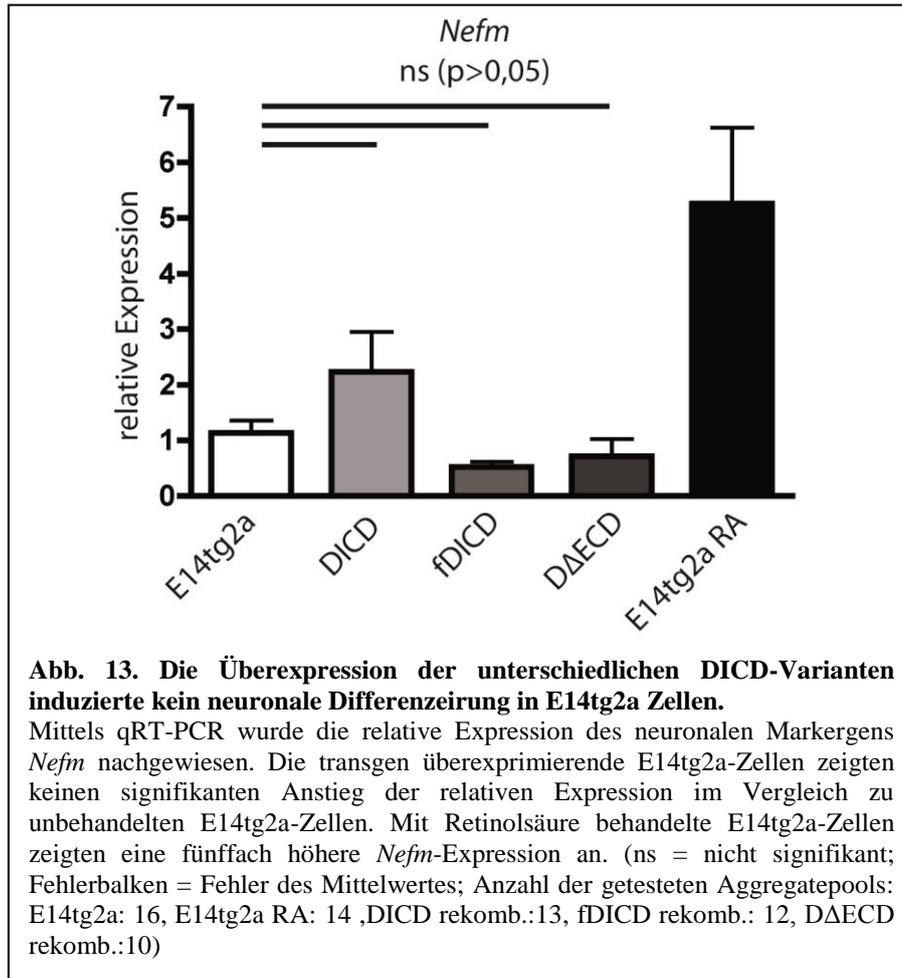
7.7 Neuronale Differenzierung von DICDs überexprimierenden E14tg2a-Zellen

Die P19-Teratokarzinomazellen sind multipotent und haben das Potenzial in unterschiedliche Zellen zu differenzieren. Die Behandlung der P19-Zellen mit Retinolsäure bewirkt eine neuronale Differenzierung der P19-Zellen (McBurney et al. 1982; Jones-Villeneuve et al. 1983; Nye et al. 1994; Gao et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von DICD in P19-Zellen ebenfalls eine neuronale Differenzierung hervorruft (Hiratochi et al. 2007).

P19-Zellen sind den verwendeten ES-Zellen (E14tg2a-Zellen) sehr ähnlich. In ES-Zellen kann ebenso durch Retinolsäurebehandlung eine neuronale Differenzierung induziert werden (Bain et al. 1995). Daher war es von Interesse, ob die Überexpression von unterschiedlichen DICD-Varianten ein erhöhtes Potential zur neuronalen Differenzierung der transgenen E14tg2a-Zellen auslöst. Zu berücksichtigen war, dass ES-Zellen in *in vitro* Untersuchungen auch spontan in unterschiedliche Zelltypen (z. B. Neurone) differenzieren können. Um das Potential der transgen überexprimierenden E14tg2a-Zellen auf neuronale Differenzierung *in vitro* zu testen, wurden die Zellen zu „Embryoid bodies“ aggregiert und in einem Kulturmedium inkubiert, welches keinen Zusatz von LIF enthielt. Damit wurde eine beabsichtigte Differenzierung der E14tg2a-Zellen eingeleitet. Um zu analysieren, ob die Überexpression der drei DICD-Varianten eine neuronale Differenzierung in den transgen exprimierenden E14tg2a-Zellen induziert, wurde die relative Expression des neuronalen Markergens Neurofilament (*Nefm*) mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) bestimmt. Als Positivkontrolle dienten E14tg2a-Zellen, die mit Retinolsäure (RA) behandelt wurden (Bain et al. 1995).

Wie erwartet zeigten die Ergebnisse der qRT-PCR eine erhöhte relative Expression des neuronalen Marker *Nefm* bei E14tg2a-Zellen an, die zuvor mit Retinolsäure behandelt wurden (siehe Abb. 13, E14tg2a RA). Die E14tg2a- RA-Zellen zeigten eine fünffach erhöhte relative

Expression von *Nefm* im Vergleich zu unbehandelten E14tg2a-Kontrollzellen. Die *Hprt*^{fDICD/Y}- (fDICD) und *Hprt*^{DΔECD/Y}-E14tg2a-Zellen (DΔECD) zeigten vergleichbare Werte in der relativen Expression von *Nefm* wie die unbehandelten E14tg2a-Zellen. In *Hprt*^{DICD/Y} E14tg2a-Zellen (DICD) konnte eine leicht erhöhte relative Expression von *Nefm* nachgewiesen werden (siehe Abb. 13). Durch eine statistische Untersuchung konnte jedoch keine Signifikanz in der leicht verstärkten Expressionsrate von *Nefm* in den *Hprt*^{DICD/Y} E14tg2a-Zellen (DICD) zu den E14tg2a-Zellen ermittelt werden ($p > 0,05$).



Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Überexpression der murinen DICD, fDICD und DΔECD keine neuronale Differenzierung in E14tg2a-Zellen induziert.

7.8 Auswirkungen der Überexpression der unterschiedlichen DICD-Varianten in transgenen Mäusen

Die $Hprt^{DICD/Y}$, $Hprt^{fDICD/Y}$ und $Hprt^{DAECD/Y}$ -E14tg2a-Zellen, die die Transgen-DNA der unterschiedlichen DICD-Varianten in reverser Orientierung integriert hatten, wurden zur Herstellung von transgenen Mäusen verwendet. Diese wurden auf Effekte der Überexpression der drei DICD-Varianten während der Embryonalentwicklung untersucht.

Die Funktion der intrazellulären Domäne von DLL1 *in vivo* war bislang noch nicht verstanden. Daher wurde ein konditionelles System für die Überexpression in der Maus verwendet. Die Transgene wurden so konzipiert, dass nur in Anwesenheit der Cre-Rekombinase eine Rekombination von verschiedenen loxP-Rekombinationsstellen erfolgt und die Transgen-Expression dadurch aktiviert wird. Je nach verwendeter Cre-exprimierender Maus-Linie wird so eine zeitlich und räumlich regulierte Aktivierung der Transgene möglich. Zu Beginn wurden zunächst Mäuse generiert, die jeweils eins der verschiedenen konditionell aktivierbaren DICD-Konstrukte im *Hprt*-Lokus trugen. Für die Untersuchung der Effekte durch die Überexpression der intrazellulären Domäne von DLL1 wurden diese Mäuse gekreuzt mit einer Cre-exprimierenden Linie, um die Expression der Transgene zu aktivieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ZP3-Cre-Mauslinie verwendet. Im ZP3-Cre Transgen steht die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des ZP3-Promotors (*zona pellucida 3*), der die Expression der Cre-Rekombinase während der Oogenese steuert (de Vries et al., 2000). Dieses ZP3-Cre-Transgen ermöglicht die Cre-Expression während der Oogenese, sodass in den Nachkommen das konditionell aktivierbare Transgen in allen Zellen des Körpers aktiviert wird und zu einer ubiquitären Überexpression führt. Für die Cre-vermittelte Rekombination wurden transgene Mäuse, die die unterschiedlichen *Hprt*-Transgene in inaktiver Form trugen, mit transgenen ZP3-Cre Mäusen verpaart. Weibliche Nachkommen, die beide Transgene trugen wurden erneut, diesmal mit wildtyp Männchen verpaart. Durch die Expression der Cre-Rekombinase während der Oogenese wird das Konditionelle *Hprt*-Transgen aktiviert und an die Nachkommen weitergegeben. Da beide Transgene unabhängig voneinander vererbt wurden, trugen 25% der Nachkommen das aktivierte Transgen, aber nicht das ZP3-Cre-Transgen.

Durch die Kombination dieser beiden Transgene wurde die ubiquitäre Expression aktiviert. Das aktivierte *Hprt*-Transgen wurde in dieser Form weiter gegeben, sodass im Weiteren Verlauf der Untersuchungen immer Mäuse analysiert wurden, die nur die aktivierte Form der Überexpressionskonstrukte trugen.

Die Lokalisation des *Hprt*-Lokus auf dem X-Chromosom der Maus führt zu einer Besonderheit bei der Überexpression. Durch die zufällige Inaktivierung eines X-Chromosoms kommt es zu einer mosaikartigen Expression der *Hprt*-Transgene bei heterozygoten Weibchen.

Zur Überprüfung, ob die Transgene exprimiert wurden, wurde auf Venus vermittelte Fluoreszenz analysiert. Zusätzlich wurde die Expression der Transgene durch Ganzpräparat *in situ*-Hybridisierung (whole mount in situ hybridisation, WISH) untersucht.

Homozygote Weibchen und hemizygoten Männchen zeigten ein erwartetes stärkeres Venus-Signal in der Fluoreszenzanalyse als heterozygote Weibchen. Die mosaikartige Expression von Venus konnte bei heterozygoten Weibchen erkannt werden und zeigte sich in einem „fleckartigen“ Venus-Signal. Als wildtyp Embryonen wurden männliche Geschwistertiere verwendet, die bei der Verpaarung von hemizygoten Männchen mit heterozygoten Weibchen zu ca. 25% der Gesamtwurfgröße auftraten (siehe

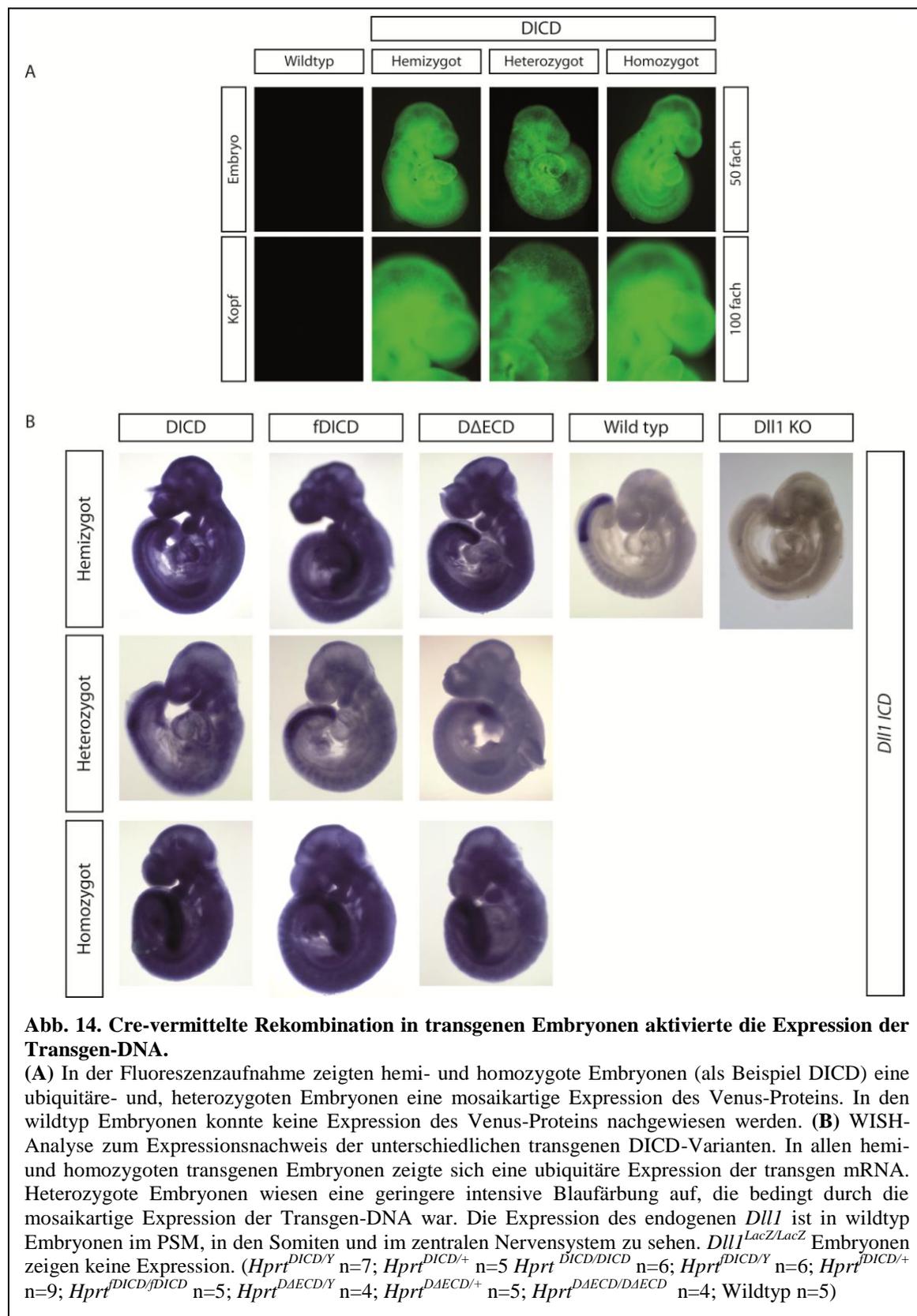
Tab. 1). Diese wildtyp Embryonen zeigten keine Venus Fluoreszenz (siehe Abb. 14 A).

Für die WISH-Analyse wurde eine *in situ*-Sonde generiert, die komplementär zu der mRNA der intrazellulären Domäne von *Dll1* war. Mit dieser RNA-Sonde konnte die Expression der endogenen *Dll1*-mRNA, sowie die mRNA der drei unterschiedlichen DICD-Varianten nachgewiesen werden.

In E9,5 wildtyp Embryonen zeigte sich die Expression der endogenen *Dll1*-RNA im präsomitischen Mesoderm (PSM) (siehe Abb. 14 B). Zusätzlich ist die Expression des endogenen *Dll1*-Gens in den posterioren Hälften von den Somiten und im zentralen Nervensystem zu erkennen (Bettenhausen et al. 1995). Die *Dll1*-defizienten Embryonen (*Dll1*^{LacZ/LacZ}) wiesen keine Expression von *Dll1* auf während die transgenen hemizygoten und homozygoten Embryonen eine ubiquitäre Expression von DICD anzeigten. Dies war an der intensiven ubiquitären Blaufärbung zu erkennen (siehe Abb. 14)

In heterozygoten Weibchen konnte eine weniger intensive Blaufärbung beobachtet werden, die sich durch die mosaikartige Expression der Transgene erklären ließ.

In den transgenen Embryonen war neben der Expression der Transgene noch die Expression des endogenen *Dll1* im PSM zu erkennen. Die DICD-WISH-Analyse an E9.5 alten Embryonen bestätigten zudem die Ergebnisse aus der Venus-Fluoreszenz-Analyse.



Für den Nachweis der unterschiedlichen DICD-Proteine aus den transgenen Embryonen, wurden in der Western Blot Analyse E10.5 homozygote Embryonen verwendet.

In der Western Blot Analyse konnten die Proteine der unterschiedlichen DICD-Varianten auf der erwarteten Höhe nachgewiesen werden (siehe Abb. 15). Für die Western Blot Analyse wurde pro Genotyp eine Proteinmenge eingesetzt, die dem Äquivalent von 1/5 Embryoproteom entsprach. In den Embryolysaten war ein Unterschied in der Proteinbandenintensität zu erkennen. Die Intensität der DICD-Bande war am geringsten, während fDICD und DΔECD eine wesentlich stärkere Bandenintensität aufwiesen. Die Beobachtung korreliert mit der Western Blot Analyse zur Expression der verschiedenen DICD-Varianten in E14tg2a-Zellen (siehe Abb. 11). Das endogene DLL1-Protein konnte in der Western Blot Analyse nicht nachgewiesen werden.

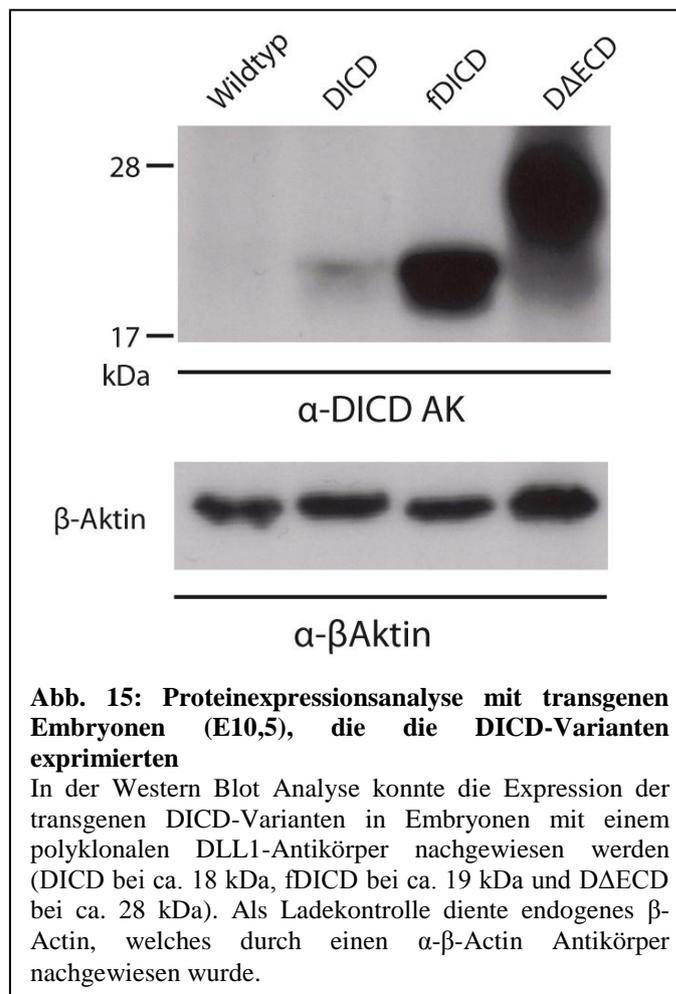


Abb. 15: Proteinexpressionsanalyse mit transgenen Embryonen (E10,5), die die DICD-Varianten exprimierten

In der Western Blot Analyse konnte die Expression der transgenen DICD-Varianten in Embryonen mit einem polyklonalen DLL1-Antikörper nachgewiesen werden (DICD bei ca. 18 kDa, fDICD bei ca. 19 kDa und D Δ ECD bei ca. 28 kDa). Als Ladekontrolle diente endogenes β -Aktin, welches durch einen α - β -Aktin Antikörper nachgewiesen wurde.

Zusammengefasst konnte die Cre-vermittelten Rekombination durch die Venus-Fluoreszenz gezeigt und die Expression der unterschiedlichen DICD-Varianten durch WISH auf transkriptioneller Ebene und durch Western Blot Analyse auf Protein-Ebene eindeutig nachgewiesen werden.

7.9 Analyse der Überexpression der DICD-Varianten auf Signalwege und Prozesse der embryonale Entwicklung der Maus

Die Aktivierung des Notch-Rezeptors durch den DLL1-Liganden ist essentiell für embryonale Entwicklungsprozesse der Maus. DLL1 besitzt eine wichtige Rolle als Notch-Aktivator bei der Muskelentwicklung und Muskeldifferenzierung (Schuster-Gossler et al. 2007b), in der Neurogenese und Neuronendifferenzierung (Ramos et al. 2010; Rocha et al. 2009) und für die Entwicklung der Polarität der Somiten (Hrabě de Angelis, M et al. 1997). In *Dll1*-defizienten Embryonen (*Dll1^{LacZ/LacZ}*) zeigt sich die Bedeutung der Delta-abhängigen Aktivierung des Notch-Rezeptors. Die *Dll1^{LacZ/LacZ}* Embryonen sterben an Tag E11-E14. (Hrabě de Angelis, M et al. 1997).

In allen transgen-exprimierenden Mauslinien zeigten sowohl die adulten hemizygoten Männchen als auch adulte heterozygote- und homozygote Weibchen keine körperlich sichtbaren, anormalen Veränderungen. Die Fertilität der transgenen Tiere war nicht beeinflusst und die Verteilung der Nachkommen entsprach den Erwartungen gemäß der Mendelschen Regeln (siehe Tab. 1)

Genotyp	Homozygot	Hemizygot	Heterozygot	Wildtyp
<i>Hprt^{DICD}</i>	19,7 %	31,8 %	31,8 %	16,7 %
<i>Hprt^{fDICD}</i>	18 %	28 %	30 %	24 %
<i>Hprt^{DAECD}</i>	25,8 %	28,8 %	24,3 %	21,2 %

Tab. 1: Verteilung der Nachkommen entsprach den erwarteten Mendelschen Regeln

Die Nachkommen aus der Verpaarung von heterozygoten Weibchen mit hemizygoten Männchen entsprach der erwarteten Mendelschen Regel von je $\frac{1}{4}$ pro Genotyp. Geringe Unterschiede sind statistisch nicht signifikant. (Anzahl der typisierten Jungtiere *Hprt^{DICD}* n= 66, *Hprt^{fDICD}* n= 50, *Hprt^{DAECD}* n=66)

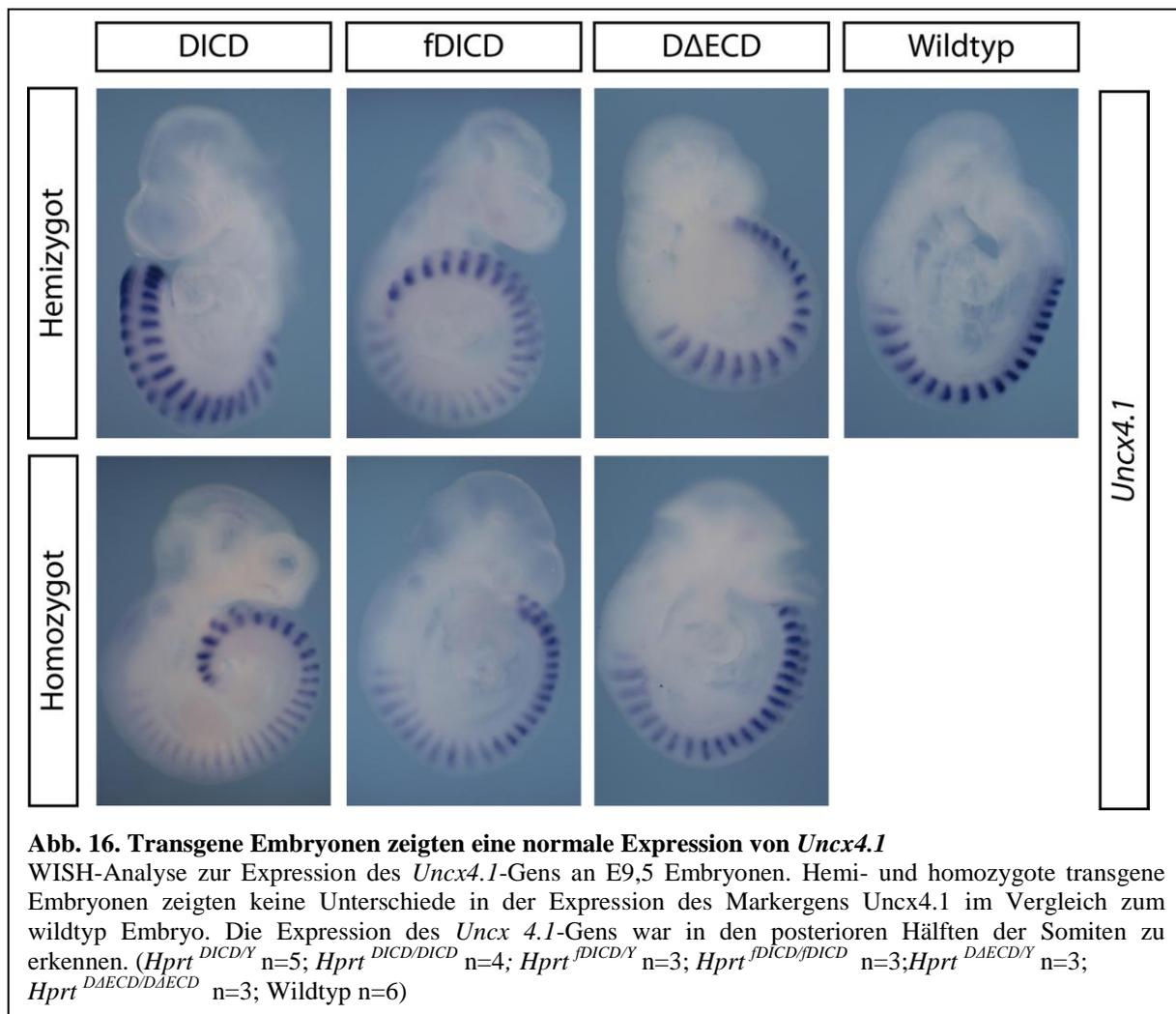
Im Folgenden Abschnitt wurde der Einfluss der Überexpression der DICD auf die Expression wichtiger Markergene für Somitogenese, Myogenese und Neurogenese, sowie den Einfluss auf den Notch-Signalweg, durch die Analyse der Expression von Notch-Zielgenen untersucht. Hierfür wurden hemizygote und homozygote Embryonen verwendet, da diese die transgenen Proteine in jeder Zelle exprimierten.

7.9.1 Einfluss der Transgen Überexpression auf die Somitogenese

Das DLL1-Protein ist bei der Bildung der Somiten ein wichtiger Aktivator des Notch-Rezeptors. Ein Verlust von DLL1 in *DLL^{LacZ/LacZ}* Embryonen bewirkt eine Störung in der Ausbildung der Somitengrenzen und der Somitenpolarität (Hrabě de Angelis, M et al. 1997). Wenn die Überexpression der drei DICD Varianten Einfluss auf die Somitogenese ausübt, sollte sich dies in einer Veränderung des Expressionsmuster von *Uncx4.1* widerspiegeln. Die Expression des Homöoboxgens *Uncx4.1* findet unter anderem im posterioren Bereich jedes Somiten statt (Mansouri et al. 1997) und ist ein Indikator für deren korrekte Polarisierung. Störende Einflüsse auf den Notch-Signalweg bewirken eine Reduzierung oder sogar einen Verlust der *Uncx4.1*-Expression, wohin gegen die Überexpression der NICD ein ektopische Expression von *Uncx4.1* auslöst (Feller et al. 2008).

Die Expression von *Uncx4.1* wurde an E9,5 Embryonen mittels Ganzpräparat *in situ*-Hybridisierung analysiert. Der Vergleich der transgenen hemi- und homozygoten Embryonen mit wildtyp Embryonen zeigte keine Unterschiede im Expressionsmuster von *Uncx4.1*. Die *Uncx4.1*-Signale in allen drei transgenen Mauslinien waren in den posterioren Hälften der Somiten zu erkennen, vergleichbar mit den wildtyp Embryonen (siehe Abb. 16).

Dieses Ergebnis zeigte, dass die Expression von *Uncx4.1*, durch die Überexpression der unterschiedlichen DICD-Varianten nicht gestört wurde. Zusätzlich zeigt dieses Ergebnis, dass die Überexpression der DICD-Varianten keine Auswirkung auf die Notch-Aktivierung während der Somitogenese ausübt und die Polarisierung der Somiten nicht verändert wurde.



7.9.2 Auswirkungen der Überexpression der drei DICD-Varianten auf die Expression des Myogenese-Markergens *Myog*

Der Notch-Signalweg besitzt bei der Muskeldifferenzierung eine wichtige Bedeutung. Notch-Aktivität, hervorgerufen durch den Liganden DLL1, ist notwendig, um Muskelvorläuferzellen aufrecht zu erhalten und eine frühzeitige und exzessive Muskeldifferenzierung zu verhindern. Ein Verlust von *Dll1* führt zur vorzeitigen Muskeldifferenzierung und dadurch letztendlich zu einer stark verringerten Muskelmasse (Schuster-Gossler et al. 2007b; Vasyutina et al. 2007).

Für die Untersuchung, ob die Überexpression der unterschiedlichen DICD-Varianten eine Auswirkung auf die frühe Muskeldifferenzierung ausübt, wurde an E9.5 transgenen und wildtyp Embryonen die Expression des Muskelmarkers Myogenin (*Myog*) durch WISH untersucht. *Myog* ist ein Marker für differenzierende Myoblasten in Somiten (Winter und

Arnold 2000) und eignete sich zur Analyse einer früher eintretenden Muskeldifferenzierung durch die Überexpression. Für eine Vergleichbarkeit der Expression von *Myog* in transgenen- und wildtyp Embryonen wurden Embryonen desselben Alters (E9,5) und mit derselben Somitenanzahl (19-20 Somiten) verwendet.

Die wildtyp Embryo-Kontrolle zeigte ein *Myog*-Signal in den Somiten an. Genauer wird *Myog* im Myotom exprimiert, ein Teil der Somiten aus dem die quergestreifte Muskulatur des Rumpfes und der Extremitäten hervorgeht. Die hemizygoten und die homozygoten DICD-Embryonen zeigten *Myog*-Signale in den Myotomen an, wie sie auch im wildtyp Embryo zu sehen waren. Dies konnte ebenso für die hemi- und homozygoten fDICD und DΔECD exprimierenden transgenen Embryonen beobachtet werden.

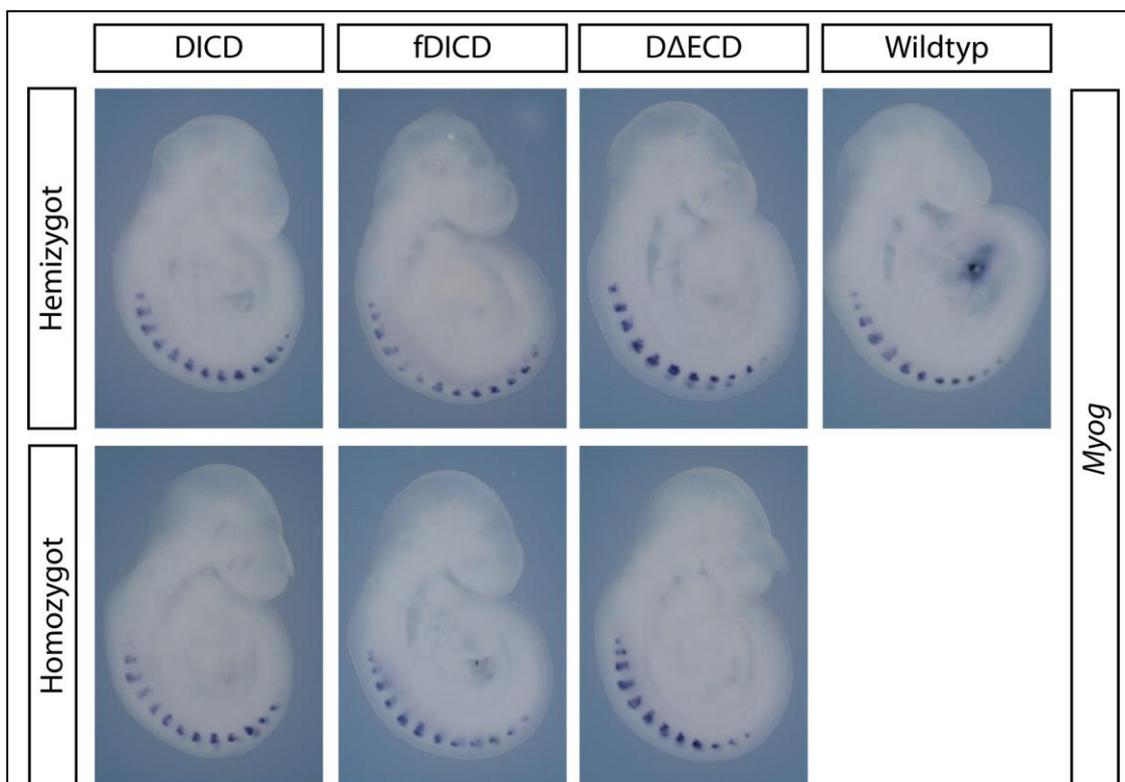


Abb. 17: Transgene Embryonen und wildtyp Embryonen zeigten keine Unterschiede in der Expression des myogenen Markers *Myogenin*

WISH an E9.5 alten Embryonen (19-20 Somiten) zum Nachweis der Expression des Myogenese-Markergens Myogenin bei transgenen Embryonen und wildtyp Embryo. Die Expression des Markergens *Myog* war in den transgenen Embryonen und wildtyp Embryo vergleichbar. (*Hprt*^{DICD/Y} n=8; *Hprt*^{DICD/DICD} n=6; *Hprt*^{fDICD/Y} n=4; *Hprt*^{fDICD/fDICD} n=8; *Hprt*^{DΔECD/Y} n=4; *Hprt*^{DΔECD/DΔECD} n=5; Wildtyp: n=6)

Die Ergebnisse der WISH-Analyse zeigten, dass die Expression von *Myog* in transgenen Embryonen nicht beeinträchtigt und die Differenzierung der Myoblasten normal verlief. Dies

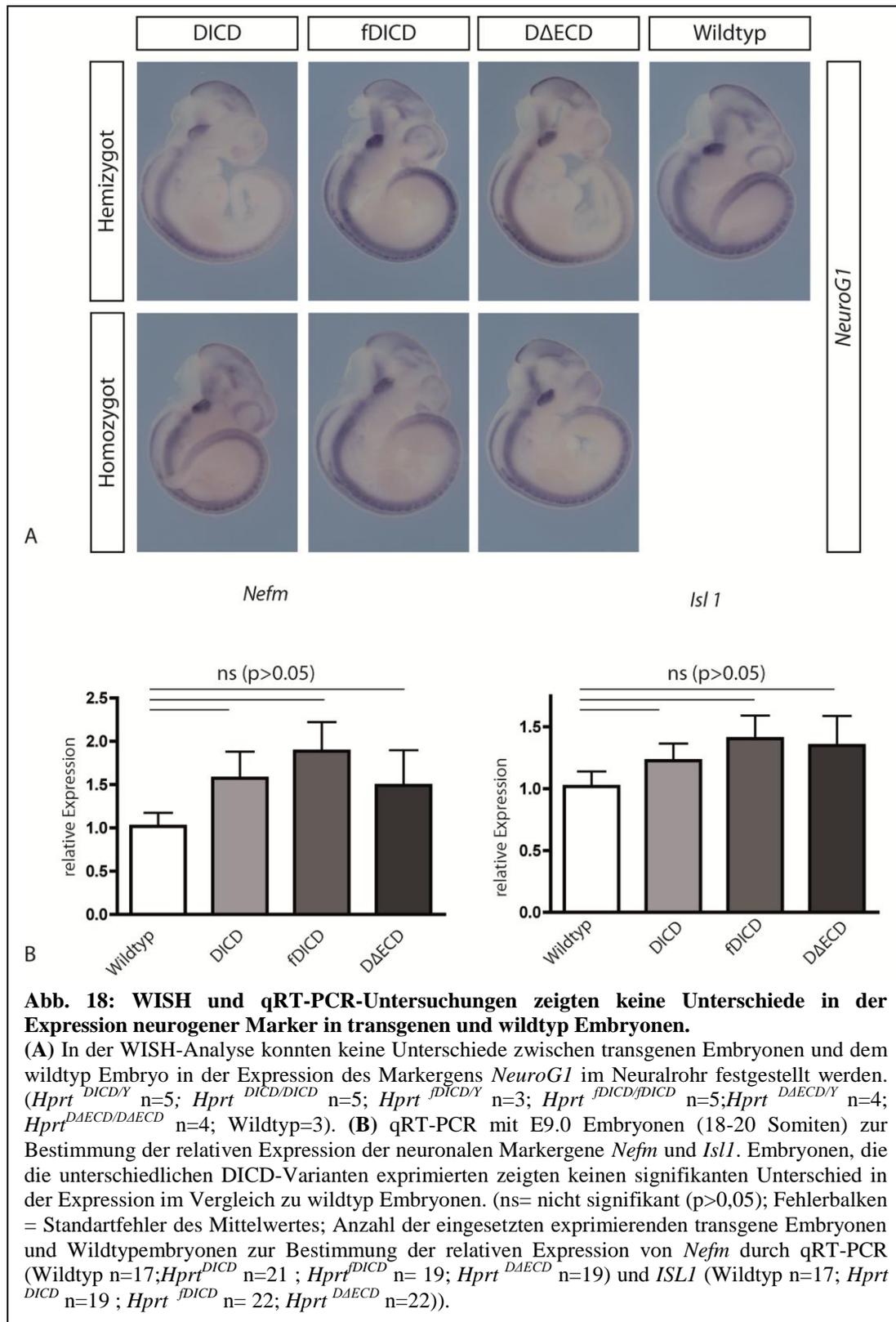
deutete darauf hin, dass die Überexpression der unterschiedlichen DICD-Varianten keine veränderte bzw. eine zeitlich divergente Muskelentwicklung verursachte.

7.9.3 Einfluss der Überexpression der DICD-Varianten auf die Expression von neurogenen Markern

In P19-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der murinen DICD eine neuronale Differenzierung induziert (Hiratochi et al. 2007). In den stabil überexprimierenden transgenen E14tg2a-Zellen hingegen, konnten durch die Überexpression der drei DICD-Varianten keine signifikanten Unterschiede in der Expression des neuronalen Markergens Neurofilament festgestellt werden (siehe Abb. 13). Ob die Überexpression von DICD, fDICD und DΔECD in den transgenen Embryonen eine Auswirkung auf die Expression von neuronalen Markergenen ausübt, wurde durch WISH-Analyse und der Messung der relativen Expression von neuronalen Markergenen mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) untersucht.

In der WISH-Analyse wurde die Expression des bHLH-Transkriptionsfaktors und Notch-Zielgens Neurogenin (*NeuroG1*) analysiert, welches in Vorläuferzellen von sensorischen Neuronen exprimiert wird (Ma et al. 1998). Da die Neurogenese ein zeitlich sehr determinierter Prozess ist, wurden zur Sicherung der Vergleichbarkeit transgene- und wildtyp Embryonen desselben Alters (E10,5, 34-35 Somiten) für die Analyse herangezogen.

In der WISH-Analyse konnte die Expression von *NeuroG1* im Zentralnervensystem, sowie im Drillingsnerv (Nervus trigeminus) im wildtyp Embryo nachgewiesen werden (siehe Abb. 18 A). In den transgenen Embryonen (*Hprt^{DICD}*, *Hprt^{fDICD}*, und *Hprt^{DΔECD}*) konnte ebenfalls die *NeuroG1*-Expression in den gleichen Expressionsdomänen wie beim wildtyp Embryo festgestellt werden. Es wurde kein Unterschied der *NeuroG1* Expression zwischen den transgenen Embryonen und dem wildtyp Embryo festgestellt.



Mittels qRT-PCR sollte die relative Expression der neuronalen Markergene Neurofilament (*Nefm*) und Islet1 (*Isl1*) an E9.0 Embryonen des gleichen Entwicklungsstadiums (18-20

Somiten) analysiert werden. Neurofilament ist ein allgemeiner Marker für Neurone und *Islet1* ist ein spezifischer Marker für sensorische Neurone. Für die qRT-PCR-Methode wurden transgene hemizygoten und homozygoten Embryonen gleichen Genotyps gemeinsam verwendet. Da diese transgenen hemi- und homozygoten Embryonen die transgenen Proteine in jeder Zelle exprimierten, sollten keine Unterschiede zwischen hemizygoten und homozygoten Embryonen desselben Genotyps in der Neurogenese bestehen.

In der qRT-PCR konnte eine geringfügig stärkere relative Expression der neuronalen Marker *Nefm* und *Isl1* in den transgenen Embryonen im Vergleich zum wildtyp Embryonen gemessen werden (siehe Abb. 18 B). Eine statistische Auswertung der Ergebnisse der relativen Expression von *Nefm* und *Isl1* ergab, dass die geringfügig stärkere Expression der beiden Markergene in den transgenen Embryonen nicht signifikant erhöht war ($p > 0.05$). Daher ist eine Veränderung der Expression von *Nefm* und *Isl1* nicht wahrscheinlich.

Durch die Expressionsanalyse der neuronalen Marker *NeuroG1* in WISH und *Nefm* und *Isl1* in qRT-PCR zeigte sich, dass die Überexpression von DICD-, fDICD- und DΔECD die Expression dieser Markergene in Embryonen nicht verändert hat. Die Ergebnisse deuten nicht auf einen Einfluss der intrazellulären Domäne von DLL1 bei der Neurogenese hin und korrelieren mit den erhaltenen Ergebnissen aus der *in vitro* Analyse zur Expression von *Nefm* in transgenen E14tg2a-Zellen (siehe Abb. 13)

7.9.4 Einfluss der Überexpression von DICD, fDICD und DΔECD auf die Expression von Notch-Zielgenen

In vitro Untersuchungen in HEK293-Zellen zeigten, dass die Überexpression der intrazellulären Domäne von DLL1 eine Inhibition der Transkription von Notch-Zielgenen bewirkt. Die DICD bindet an die NICD und stört damit den transkriptionellen NICD-RBP-Jκ-MAM Aktivator-Komplex und agiert als negativer Regulator des Notch-Signalweges (Jung et al. 2011).

Wie bereits gezeigt werden konnte, stört die Überexpression von DICD, fDICD und DΔECD nicht die Somitenbildung, in der der Notch-Signalweg von essenzieller Bedeutung ist. Es war davon auszugehen, dass die Expression von Notch-Zielgenen während der frühen embryonalen Entwicklung der Maus nicht gestört wurde (siehe 7.9.1). Um den Einfluss der Überexpression der drei DICD-Varianten auf den Notch-Signalweg genauer zu analysieren, wurde die Expression von verschiedenen Notch-Zielgenen untersucht.

Die Expression des Notch-Zielgens *Hey1* in E9.5 transgenen und wildtyp Embryonen wurde durch die RNA-Ganzpräparat *in situ*-Hybridisierung untersucht (siehe Abb. 19 A). Im wildtyp Embryo und in den transgenen hemi- und homozygoten Embryonen waren die Expressionsmuster des Notch-Zielgens *Hey1* vergleichbar. Es zeigten sich *Hey1*-Signale im PSM, in den Somiten, im Telencephalon, in den Branchialbogenspalten, in den frühen Ohranlagen und im Atrium des Herzens.

Durch qRT-PCR wurden die relativen Expressionen zwei weiterer Notch-Zielgene, *Hes5* und *Hey2*, in transgenen- und wildtyp Embryonen desselben Alters (E9,5 , 18-20 Somiten) untersucht (siehe Abb. 19 B). Hierfür wurden wieder hemizygoten und homozygoten Embryonen jedes Transgens für gleich erachtet.

Die Auswertung der qRT-PCR-Daten zeigte, dass die relative Expression der Notch-Zielgene *Hes5* und *Hey2* in *Hprt^{fDICD}*-Embryonen verstärkt war. In *Hprt^{DICD}* und *Hprt^{DΔECD}* transgenen Embryonen war die relative Expression von *Hes5* und *Hey2* mit dem wildtyp Embryonen vergleichbar. Die verstärkte Expression von *Hes5* und *Hey2* in *Hprt^{fDICD}*-Embryonen erwies sich als nicht signifikant ($p > 0,05$). Der Unterschied in der relativen Expression der Notch-Zielgene *Hes5* und *Hey2* war höchstwahrscheinlich durch den geringen Unterschied der Entwicklungsstadien (18-20 Somiten) oder durch eine geringe Variabilität der Genexpressionslevel zu erklären.

Zusammenfassend zeigten sich keine Unterschiede in der Expression der Notch-Zielgene *Hey1*, *Hey2* und *Hes5* zwischen transgenen und wildtyp Embryonen. Die Überexpression von DICD, fDICD und DΔECD hat höchstwahrscheinlich keine Auswirkung auf den transkriptionellen Aktivorkomplex NICD-RBPjκ-MAM, wie es in HEK293-Zellen beschrieben wurde (Jung et al. 2011). Es konnte nicht bestätigt werden, dass die DICD die Position als negativer Regulator des Notch-Signalwegs einnimmt. Aus den Beobachtungen der normalen Somiten-Entwicklung und der nicht beeinträchtigten Expression von verschiedenen Notch-Zielgenen, scheint der Notch-Signalweg in den transgenen Embryonen nicht beeinflusst zu sein. Die Überexpressionsanalysen der Embryonen zeigten keine Beweise, die auf eine Bidirektionalität des Notch-Signalweges schließen lassen.

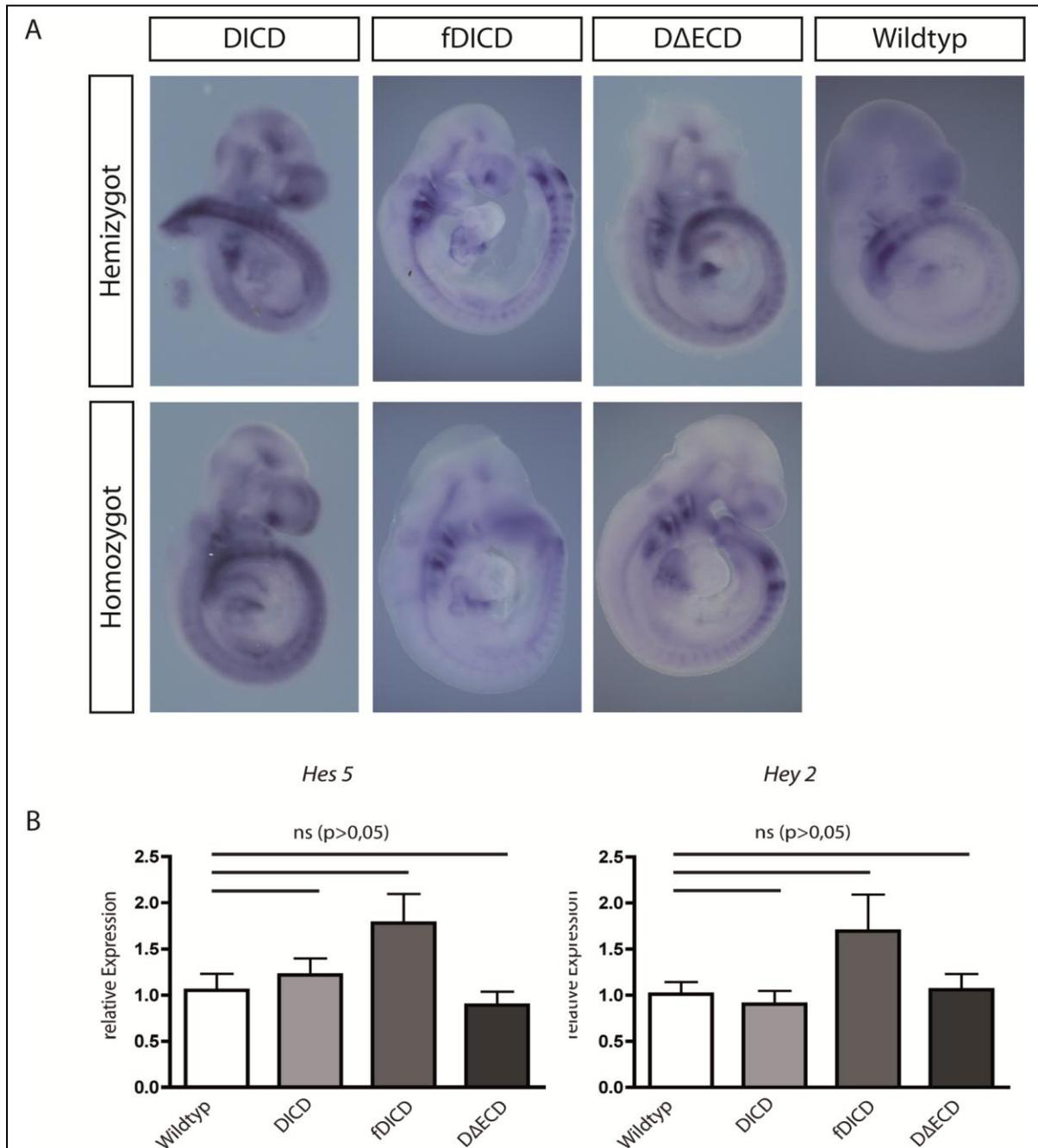


Abb. 19: Die Expression von Notch-Zielgenen ist in transgenen Embryonen im Vergleich zu wildtyp Embryonen nicht verändert

(A) Expressionsanalyse des Notch Zielgens *Hey1* durch WISH-Analyse. Die Expression von *Hey1* war im PSM, in den Somiten, im Telencephalon, in den Branchialbogenspalten, in den frühen Ohranlagen und im Atrium des Herzens zu sehen. Es waren keine Unterschiede zwischen transgenen und dem wildtyp Embryo zu erkennen. ($Hprt^{DICD/Y}$ n=3; $Hprt^{DICD/DICD}$ n=3; $Hprt^{fDICD/Y}$ n=3; $Hprt^{fDICD/fDICD}$ n=3; $Hprt^{DAECD/Y}$ n=4; $Hprt^{DAECD/DAECD}$ n=3; Wildtyp=4). (B) Die relative Expression der Notch-Zielgene *Hes5* und *Hey2* wurde durch qRT-PCR ermittelt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedene DICD-Varianten exprimierenden transgenen Embryonen und den wildtyp Embryonen. ($p > 0,05$); Fehlerbalken = Standardfehler des Mittelwertes; Anzahl der transgenen Embryonen pro Genotyp zur Bestimmung der relativen Expression von *Hes5* (Wildtyp n=17; $Hprt^{DICD}$ n=15; $Hprt^{fDICD}$ n=16; $Hprt^{DAECD}$ n=22) und *Hey2* (Wildtyp n=17; $Hprt^{DICD}$ n=18; $Hprt^{fDICD}$ n=19; $Hprt^{DAECD}$ n=23) durch qRT-PCR

7.9.5 Überexpression von fDICD in $Dll1^{LacZ/LacZ}$ - Embryonen

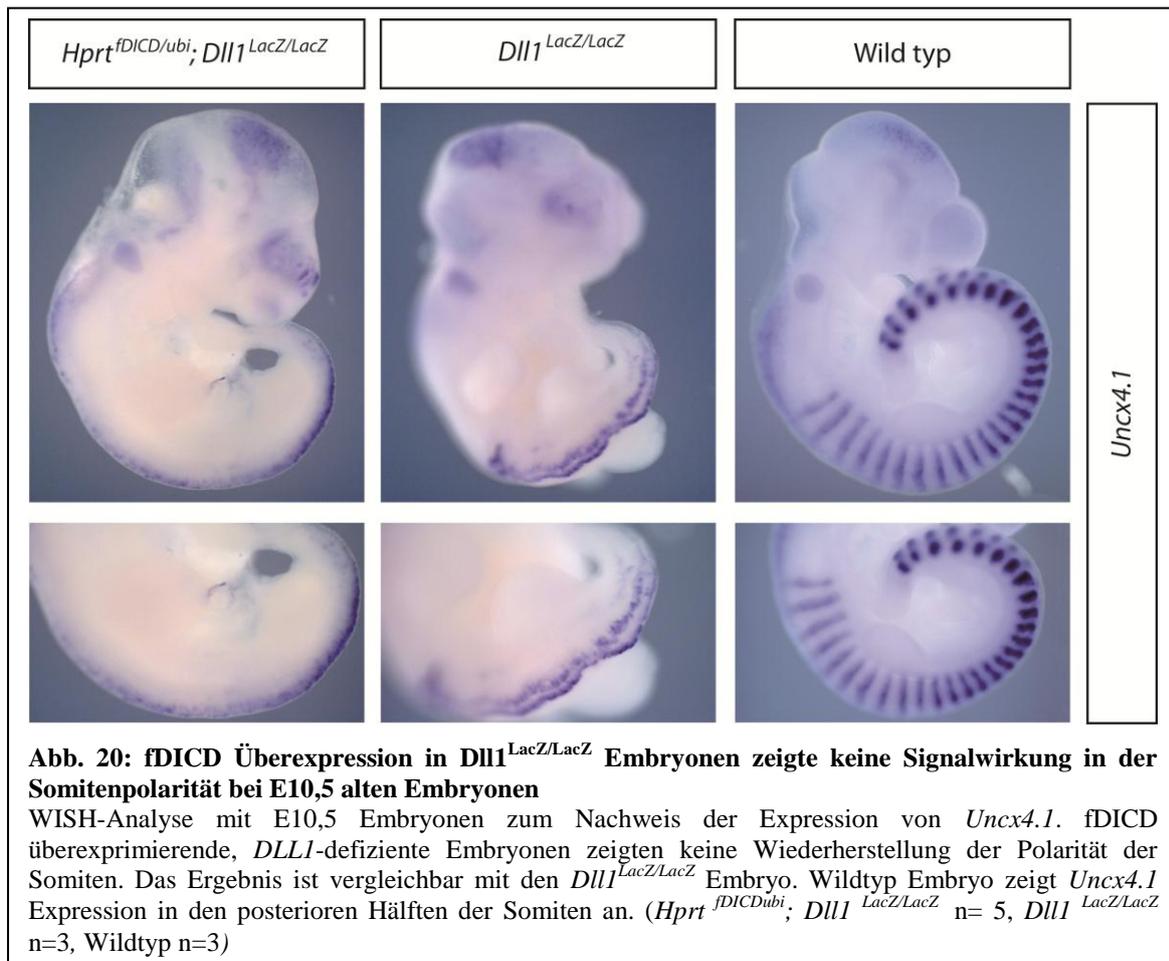
Durch den Verlust von DLL1 geht in $Dll1^{LacZ/LacZ}$ -Embryonen die DLL1-abhängige Notch Aktivierung verloren. Das würde auch für eine mögliche signalgebende Wirkung der DICD gelten. Daher könnte die Wiederherstellung der DICD-Expression über einen DLL1 defizienten Hintergrund zu einer Veränderung oder eventuell zu einer Verbesserung des Phänotyps führen, wenn DLL1 durch die DICD eine Notch unabhängige Signalaktivierung bedingt oder hervorruft.

Für die Untersuchung einer signalgebenden Wirkung der überexprimierten DICD, wurden $Dll1^{LacZ/+}$ -Mäuse mit $Hprt^{fDICD/fDICD}$ Mäusen gekreuzt. Die Nachkommen aus dieser Verpaarung, die die Genotypen $Hprt^{fDICD/+}; Dll1^{LacZ/+}$ oder $Hprt^{fDICD/Y}; Dll1^{LacZ/+}$ besaßen, wurden wiederum miteinander verpaart und die aus dieser Verpaarung erhaltenen Embryonen analysiert. Die Embryonen mit dem Genotyp $Hprt^{fDICD/fDICD}; Dll1^{LacZ/LacZ}$ oder $Hprt^{fDICD/Y}; Dll1^{LacZ/LacZ}$ (zusammengefasst $Hprt^{fDICDubi}; Dll1^{LacZ/LacZ}$) besaßen kein endogenes *DLL1* mehr und sollten durch die Expression des exogenen fDICD-Proteins in jeder Zelle eine potentielle DICD-vermittelte Signalgebung anzeigen.

Für eine Überprüfung der möglichen DICD-Signalgebung wurde an E10,5 $Hprt^{fDICDubi}; Dll1^{LacZ/LacZ}$ Embryonen eine WISH-Analyse durchgeführt. Es sollte die Expression des Somitenmarkergens *Uncx 4.1* nachgewiesen werden. Wenn die DICD eine Signalgebung besäße, könnte dies u. a. in der Bildung der Somiten untersucht werden. Ein Verlust von DLL1 führt in der embryonalen Entwicklung zu einer Verschiebung der Somitenpolarität und zu einer Verschiebung der Somitengrenzen (Hrabě de Angelis, M et al. 1997).

Die WISH-Analyse zeigte eine Expression des *Uncx 4.1*-Gens im wildtyp Embryo in den posterioren Hälften der Somiten (siehe Abb. 20). In den DLL1 defizienten $Dll1^{LacZ/LacZ}$ Embryonen konnte keine Expression von *Uncx 4.1* in den Somiten nachgewiesen werden. In diesen Embryonen ging, durch den Verlust von DLL1, die Somitenpolarität verloren. Die Somiten sind anteriorisiert, daher ist die Expression des Markergens *Uncx 4.1* nicht nachweisbar. In den fDICD überexprimierenden und *Dll1*-defizienten $Hprt^{fDICDubi}; Hprt^{fDICDubi}; Dll1^{LacZ/LacZ}$ -Embryonen konnte ebenfalls die *Uncx 4.1*-Expression nicht nachgewiesen werden, dies ist analog zu den $Dll1^{LacZ/LacZ}$ Embryonen. In der Vergrößerung wird verdeutlicht, dass kein Unterschied zwischen den $Hprt^{fDICDubi}; Dll1^{LacZ/LacZ}$ und den $Dll1^{LacZ/LacZ}$ Embryonen zu erkennen war.

Der vergleichbare Phänotyp von *Hprt^{fDICDubi}; Dll1^{LacZ/LacZ}*- und *Dll1^{LacZ/LacZ}*-Embryonen zeigte, dass die Überexpression der fDICD nicht ausreichend war, um den Phänotyp durch den Verlust von DLL1 zu verändern. Die fDICD-Expression hat keinen Einfluss auf die Somitogenese und die Somitenpolarität. Folglich gibt es keine Hinweise auf eine signalgebende Wirkung der intrazellulären Domäne von DLL1.



7.9.6 Subzelluläre Lokalisation von DLL1 und DICD in transienten und stabil exprimierenden CHO-Zellen

Durch die Überexpressionsanalyse von DICD, fDICD und DΔECD in Embryonen, konnten keine Hinweise auf eine Bidirektionalität oder DICD-abhängige Prozesse nachgewiesen werden. Daher stellt sich die Frage, ob die DICD in den Nukleus transportiert wird und dort zu einer Signalgebung auf transkriptioneller Ebene fähig ist. Wie bereits in verschiedenen Studien gezeigt wurde, konnte die DICD durch Immunfluoreszenz im Kern nachgewiesen werden (Ikeuchi 2003; Bland 2003; Jung et al. 2011; Six et al. 2003; Hiratochi et al. 2007). In diesen Studien wurde eine transiente Überexpression von DLL1 untersucht und nicht die stabile DICD-Expression, so wie sie in den *Hprt^{DICD}*, *Hprt^{fDICD}* und *Hprt^{DΔECD}* transgenen Mäusen vorlag.

In den stabil exprimierenden *Hprt^{DICD}*, *Hprt^{fDICD}* und *Hprt^{DΔECD}* E14tg2a-Zellen sollte die subzelluläre Lokalisation der drei DICD-Varianten gezeigt werden. Durch die singuläre Integration in den *Hprt*-Lokus der E14tg2a-Zellen war die Expressionsrate so niedrig, dass sie zwar durch Western Blot Analyse nachweisbar war (siehe Abb. 11), aber die subzelluläre Lokalisation durch Immunfluoreszenzen nicht erfolgreich verlief (Daten nicht gezeigt). Um einen Vergleich zwischen transienter Expression und stabiler Expression zu erhalten, wurde in CHO-Zellen das DLL1 wildtyp Protein und die intrazelluläre Domäne von DLL1 (DICD) stabil integriert.

Zusätzlich wurde verglichen, ob die Stabilisation des Proteins durch Proteasominhibition Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation hat. In Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass durch Proteasominhibition zusätzliche unbekannte Banden der DICD auftraten (siehe Abb. 6). Die subzelluläre Lokalisation der DICD und dem DLL1 Wildtyp erfolgte mit einem Antikörper, der gegen ein Epitop in der ICD gerichtet war.

In den Immunfluoreszenzaufnahmen konnte, wie erwartet, das DLL1 wildtyp-Protein auf der Oberfläche der CHO-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb 21 A-H). Weitere Signale konnten im Zytosol der Zellen beobachtet werden. Eine MG132-Behandlung verstärkte die zytosolische Lokalisation bei der transienten Expression des wildtyp DLL1-Proteins (siehe Abb 21, E+F). Diese Verstärkung ist wahrscheinlich die vom DLL1 abgespaltene ICD, die nicht mehr durch das Proteasom degradiert wurde. Im Nukleus konnte nur bei transienter Expression mit zusätzlicher MG132-Behandlung wenig DICD detektiert werden. Bei der

stabilen Expression des DLL1 wildtyp-Proteins konnte bei MG132-Behandlung keine DICD im Kern nachgewiesen werden.

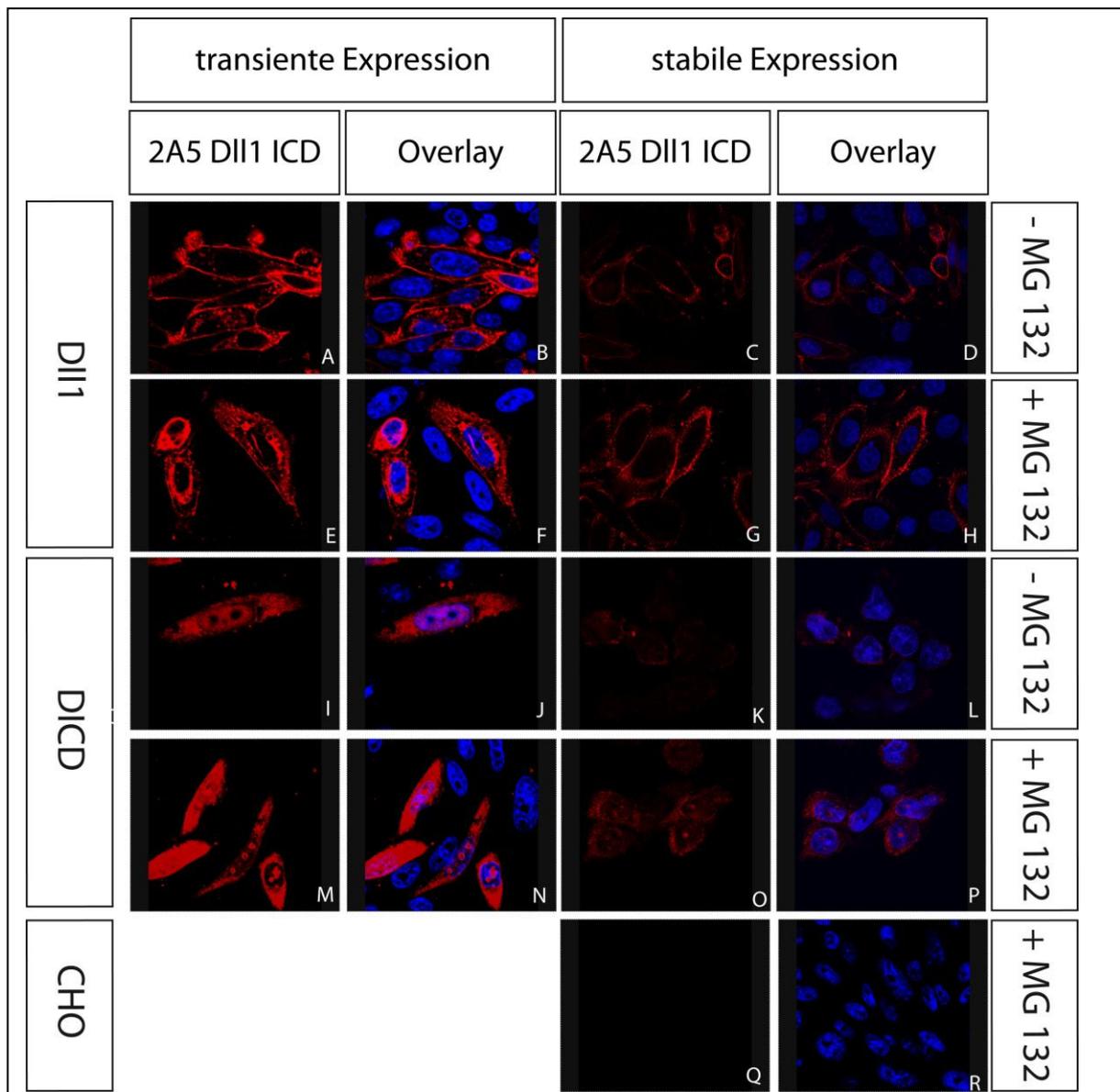


Abb 21: Vergleich zwischen transienter und stabiler Expression des DLL1 wildtyp-Proteins und der DICD in CHO-Zellen

Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von wildtyp DLL1 (DLL1) und der Intrazellulardomäne von DLL1 (DICD). Ein Vergleich zwischen transienter und stabiler Expression in CHO-Zellen der beiden Konstrukte zeigte Kernlokalisierung der DICD bei transienter Expression des DLL1 mit zusätzlicher Proteasominhibition (E+F). Ebenfalls zeigte transiente Expression der DICD mit und ohne Proteasominhibition Kernlokalisationen an (I+J, M+N). In stabil exprimierenden DLL1-CHO-Zellen konnte keine DICD-Signale im Nucleus erkannt werden (C+D, G+H). Bei stabiler DICD-Expression in CHO-Zellen war nur eine Kernlokalisierung zu sehen, wenn das Proteasom inhibiert wurde (O+P). Die CHO-Kontrollzellen zeigten keine DICD-Signale an (Q+R). Die DLL1-Detektionen erfolgten mit α -DICD 2A5 Antikörper + Alexa555TM und der Zellkern wurde durch DAPI visualisiert.

Bei transienter Expression der DICD konnte neben der zytosolischen Lokalisierung eindeutige Kernlokalisierung nachgewiesen werden (I+J). Eine MG132-Behandlung bei den CHO-Zellen, die die DICD transient exprimierten, verstärkte die zytosolische und nukleäre Lokalisation (M+N). Zusätzlich konnte durch die MG132-Behandlung die DICD in bestimmten Bereichen des Nukleus lokalisiert werden, während ohne MG132-Behandlung eine ubiquitäre Kernlokalisierung um die Nukleoli zu erkennen war. In den stabilen DICD exprimierenden Zellen konnten ebenfalls Signale im Nukleus erkannt werden, die auf eine Kernlokalisierung der DICD hindeuteten. Diese Signale im Kern wurden erneut durch Stabilisation des Proteins verstärkt (O+P).

Die Unterschiede zwischen einer transienten Expression von DLL1 und DICD gegenüber der stabilen Expression dieser beiden Proteine wurden in einem Vergleich der unterschiedlichen Expressionsweisen in Immunfluoreszenzaufnahmen deutlich. Bei der stabilen Expression ist eine geringere Expression der Proteine zu beobachten als bei der transienten Expression. Kernlokalisierung, die auf eine mögliche DICD-Signalwirkung auf transkriptioneller Ebene schließen lässt, konnte beim wildtyp DLL1 nur bei transienter Expression mit zusätzlicher Proteasominhibition erkannt werden. In stabilen DICD exprimierenden CHO-Zellen wurde eine Kernlokalisierung beobachtet, die sich allerdings stark von der transienten DICD-Expression unterschied. Während bei der transienten DICD Expression eindeutige Signale im Nukleus erkannt werden konnte, wurden wenige Signale bei der stabilen Expression beobachtet. Die MG132-Behandlung verstärkte den Effekt der Kernlokalisierung in DICD exprimierenden CHO-Zellen.

Eine Bidirektionalität des Notch-Signalwegs ist durch die Immunfluoreszenz nicht auszuschließen, jedoch zeigt die Kernlokalisierung der DICD eine Abhängigkeit zur Expressionsmenge. Je stärker das Expressionslevel der DICD war, umso mehr DICD konnte im Nukleus detektiert werden.

7.9.7 Quantitative Analyse zum aktiven Transport der DICD in den Nukleus

In Immunfluoreszenzen konnte gezeigt werden, dass es eine Differenz der Kernlokalisierung der intrazellulären Domäne von DLL1 in transient und stabil DICD exprimierenden CHO-Zellen gibt. Die transient DICD exprimierenden CHO-Zellen zeigten eine verstärkte Kernlokalisierung der DICD gegenüber den stabilen DICD CHO-Zellen auf (siehe Abb 21). Bei dieser Beobachtung stellte sich die Frage, wie effizient der Kerntransport der intrazellulären Domäne von DLL1 ist. Die bisherigen Erkenntnisse zur potentiellen Funktion der DICD basieren häufig auf einer Lokalisation dieser im Nukleus in transient exprimierenden Zellen (Ikeuchi 2003; Hiratochi et al. 2007; Bland 2003; Jung et al. 2011; Six et al. 2003).

Für einen aktiven Transport in den Zellkern besitzen Proteine NLS-Sequenzen. In der intrazellulären Domäne des humanen DLL1 sind zwei NLS bekannt, die recht nahe am N- und am C-Terminus liegen (Kolev et al. 2005). Eine Gegenüberstellung der humanen DICD (hDICD) mit der murinen DICD (mDICD) zeigte, dass diese NLS sich nur um jeweils eine Aminosäure unterscheiden (siehe Pfeile in Abb. 22). Inwiefern der Unterschied von einer Aminosäure in den NLS-Sequenzen zwischen der humanem und der murinen DICD eine Auswirkung auf die Kernlokalisierung hat, ist bislang unklar.

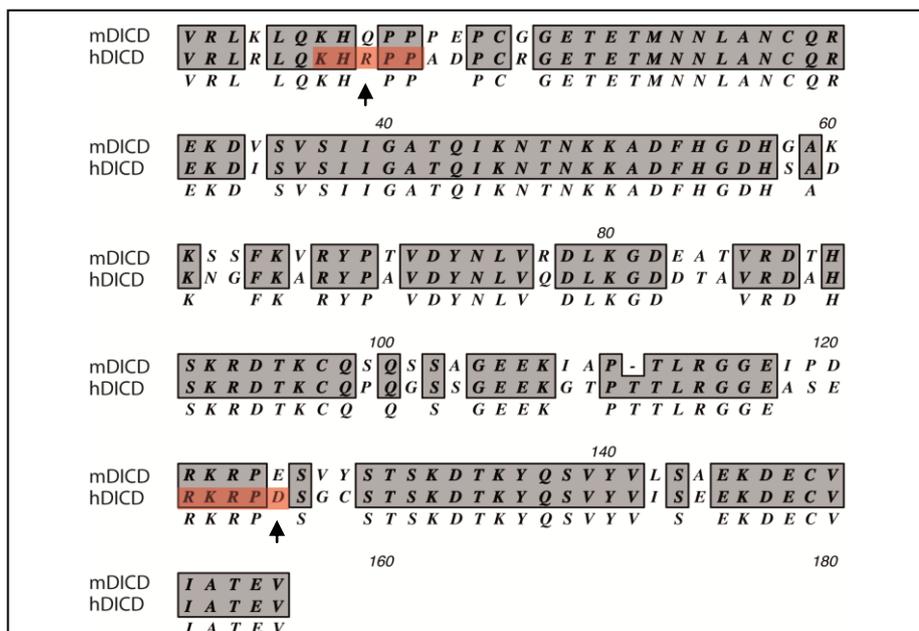


Abb. 22: Vergleich der Aminosäuresequenz von muriner DICD (mDICD) und humaner DICD (hDICD).

Gegenüberstellung der hDICD mit der mDICD. In Rot sind die NLS des hDICD hinterlegt (nach Kolev et al. 2005). Grau hinterlegte Aminosäuren zeigen konservierte Motive zwischen der hDICD und der mDICD an. (Quelle Uniprot)

Um eine quantitative Aussage über die Kernlokalisierung der intrazellulären Domäne von DLL1 zu erhalten, wurde ein Luciferase-Reportersystem verwendet. Hierfür wurde an die ICD von DLL1 die aus Bakterien stammende DNA-Binde-Domäne des LexA-Proteins und die aus dem Herpes Simplex Virus stammende Transaktivator-domäne VP16 am N- oder C-terminalen Ende fusioniert (Horii et al. 1981) (siehe Abb. 23 A II und III). Für die quantitative Aussage, wie effizient die DICD in den Zellkern geschleust wird, wurden CHO-Zellen generiert, die stabil ein Luciferase-Reportergen ins Genom integriert hatten (CHO-LexOP).

Das Reporterelement bestand aus einem Minimalpromotor (TATA-Box) und vier aufeinander folgenden LexOperon-Elementen, die als regulatorische Einheit fungierten und die Expression der Luciferase regulierten. Wenn das DICD-LexAVP16 Fusionskonstrukt in den Zellkern eingeschleust würde, würde die LexA-Domäne an ein LexOP binden und die Expression der Luciferase ermöglichen. Als Positivkontrolle diente ein Konstrukt, das aus dem LexAVP16 mit N-terminal fusionierter NLS-Sequenz des SV40-Proteins (APKKKRRK) bestand (siehe Abb. 23 A I).

Die Ergebnisse zeigten, dass mit der Positivkontrolle SV40LexAVP16 eine starke relative Luciferaseaktivität gemessen werden konnte (siehe Abb. 23 B). Die DICD Konstrukte, an denen N- oder C-terminal LexAVP16 fusioniert wurde, zeigten hingegen keine Luciferaseaktivität an. Die gemessene Luciferaseaktivität war nicht höher als die Hintergrundaktivität (Leervektor pIRESpuro3) (siehe Abb. 23 B). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass das DICD-LexAVP16-Konstrukt (oder LexAVP16-DICD-Konstrukt) keine funktionelle NLS besitzt um aktiv in den Kern transportiert zu werden und dort eine Funktion auf transkriptioneller Ebene aus zu üben.

In den stabilen DICD und fDICD überexprimierenden CHO-Zelllinien zeigten sich im Western Blot mehrere DICD-Proteinfragmente, die auf eine oder mehrere zusätzliche Spaltungen der intrazellulären Domäne hindeuteten (siehe Abb. 6). Diese Spaltungen könnten die Effektivität des Einschleusens und damit der Funktion im Kern unterbinden. Um diesen Verdacht nachzugehen, dass die DICD effektiv gespalten wird, wurde die NLS aus dem SV40-Protein am N- oder C-terminalen Ende und die LexAVP16 Domäne am anderen Terminus der DICD entsprechend fusioniert (siehe Abb. 23 A IV und V). Wenn die DICD weiteren proteolytischen Schritten unterliegt, sollten diese Fusionskonstrukte keine Luciferaseaktivität anzeigen, da eine Spaltung das Konstrukt in mindestens zwei Fragmente spalten würde und somit die NLS und die LexAVP16-Domäne nicht mehr in einem Konstrukt vorlägen. Zusätzlich wurden noch zwei weitere Fusionskonstrukte generiert, die die NLS aus

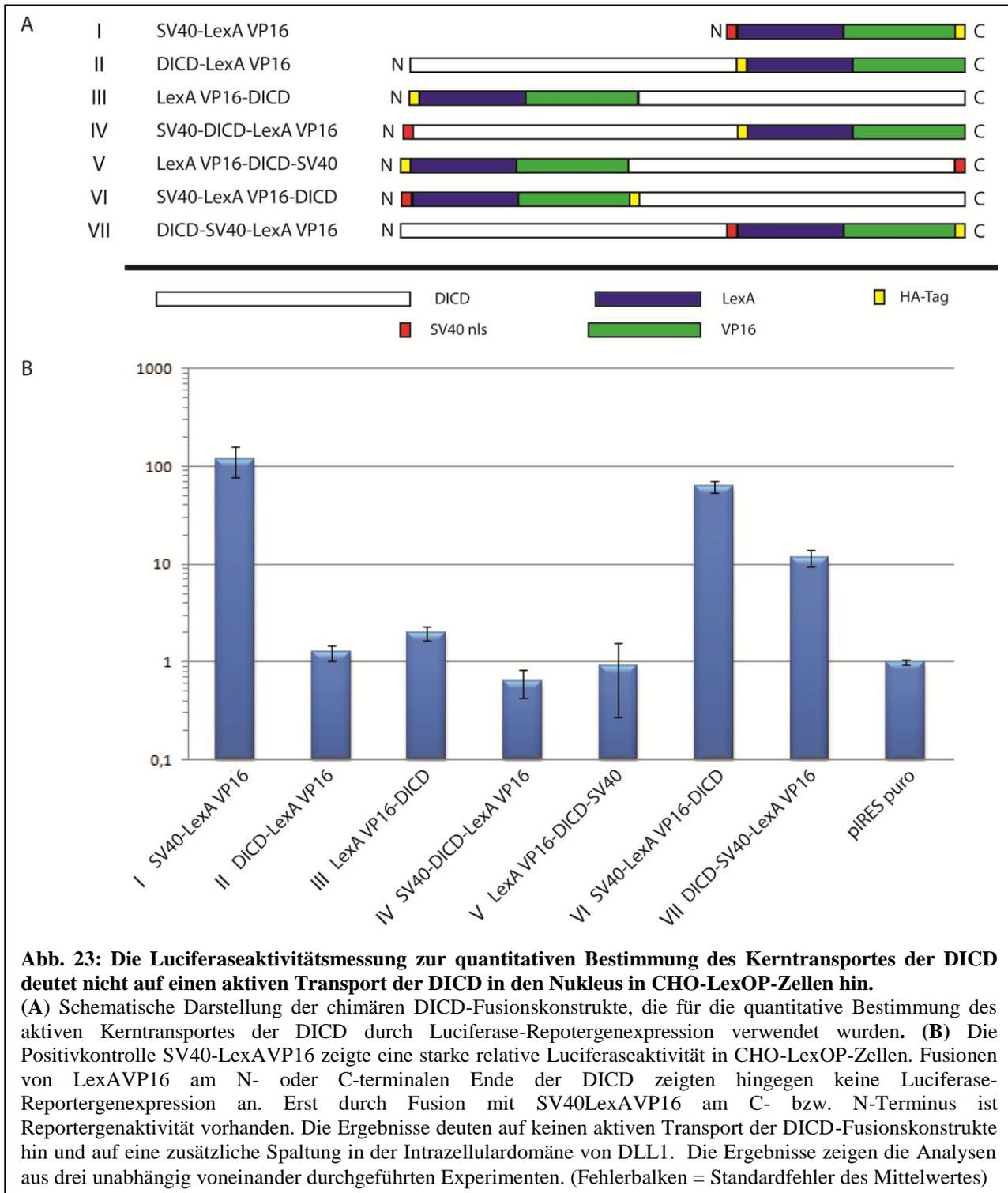
dem SV40-Protein zusammen mit dem LexAVP16 am N-oder C-terminalen Ende der DICD aufwiesen (siehe Abb. 23A VI und VII). Diese Konstrukte sollten auch bei einer proteolytischen Spaltung der DICD Luciferaseaktivität anzeigen

Die Luciferaseaktivität, die mit den Fusionskonstrukten SV40-DICD-LexAVP16 und LexAVP16-DICD-SV40 gemessen wurde, war in den CHO-LexOP Zellen nicht höher als die Hintergrundaktivität (siehe Abb. 23 B IV und V). Mit den Konstrukten SV40-LexAVP16-DICD und DICD-LexAVP16SV40 konnte hingegen eine Luciferaseaktivität gemessen werden (siehe Abb. 23 B VI und VII).

Diese Ergebnisse deuten auf eine oder mehrere zusätzliche Spaltungen der DICD hin, wie sie auch schon in der Western Blot Analyse zu sehen waren (siehe Abb. 6).

Zusammenfassend ließ sich durch das Luciferase-Reportersystem kein Nachweis erbringen, das die DICD im Kern lokalisiert, um eine mögliche transkriptionelle Funktion zu übernehmen. Erst die Fusion mit einer zusätzlichen NLS und LexAVP16 am selben C- oder N-terminalen Ende zeigte eine Luciferaseaktivität, die auf eine Kernlokalisierung deutete. Somit wären die partiellen homologen NLS-Sequenzen, die bei der humanen DICD eine Kernlokalisierung ermöglichen (Kolev et al. 2005), in der murinen DICD nicht als NLS funktionell. Dies spricht gegen einen aktiven Transport der intrazellulären Domäne von DLL1 in den Kern bei CHO-Zellen.

Zusätzlich konnte durch das Reportersystem auf mindestens eine weitere proteolytische Spaltung der DICD hingedeutet werden, die jedoch nicht zu einer Kernlokalisierung eines der potentiellen DICD-Spaltprodukte führte. Inwiefern diese zusätzliche Spaltung(en) eine Funktion der DICD auf Proteinebene beeinflusst, ist unklar.



8 Diskussion

Der Notch-Ligand DLL1 spielt eine wichtige Rolle als Notch-Aktivator bei der Embryonalentwicklung von Vertebraten. In der Literatur sind in den letzten zehn Jahren vermehrt Veröffentlichungen erschienen, die sich mit einer möglichen Signalgebung der intrazellulären Domäne von DLL1 beschäftigen (Dyczynska et al. 2006; Hiratochi et al. 2007; Jung et al. 2011; Kolev et al. 2005; Ikeuchi und Sisodia 2003; Bland 2003). In diesen Studien wurde unter anderem gezeigt, dass die intrazelluläre Domäne von DLL1 (DICD) im Nukleus lokalisiert und Einfluss auf den TGF- β -Signalweg ausübt, indem die DICD mit Transkriptionsfaktoren der Smad-Familie interagiert. Zusätzlich konnten Auswirkungen auf Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Regulation des Notch-Signalwegs durch Überexpression der DICD gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine potentielle signalgebende Wirkung der intrazellulären Domäne von DLL1 unter physiologischen Bedingungen in der Maus untersucht werden.

8.1 Die potentielle Spaltung von DLL1

Das Delta-like1 (DLL1) Protein wird in der Ektodomäne durch ein ADAM-Protein gespalten. Diese Spaltung ist Voraussetzung für die Spaltung in der Transmembrandomäne von DLL1 durch den γ -Sekretasekomplex, wodurch die intrazelluläre Domäne ins Zytosol entlassen wird. Diese Spaltung ist notwendig, damit die ICD eine mögliche signalgebende Wirkung in einem anderen Kompartiment, wie z. B. im Nukleus die Transkription beeinflussend, übernehmen kann. Die genaue Spaltstelle des γ -Sekretasekomplexes in der Transmembrandomäne von DLL1 ist bisher nicht bekannt. Denkbar wären mehrere Spaltstellen, ähnlich wie es für den Notch-Rezeptor beschrieben ist.

Beim Notch-Rezeptor gibt es verschiedene ICD-Versionen, die durch die γ -Sekretasespaltung ins Zytosol entlassen werden. Neben dem bereits bekannten Valin¹⁷⁴⁴ (Schroeter et al. 1998) wurden auch Leucin¹⁷⁴⁶ (L-NICD) und Serin¹⁷⁴⁷ (S-NICD) als N-terminale Aminosäuren der NICD entdeckt. Nach der *N-end rule*, die eine Abhängigkeit der N-terminalen Aminosäure zur Degradationsgeschwindigkeit des Proteins herstellt, würden L-NICD und S-NICD durch das S26-Proteasom schneller als V-NICD degradiert werden (Varshavsky 1996; Tagami et al. 2008; Kopan und Ilagan 2009). Es ist vorstellbar, dass ebenfalls unterschiedliche DICD-

Versionen mit unterschiedlichen N-terminalen Aminosäuren existieren, die mit einer unterschiedlicheren Degradationsgeschwindigkeit durch das Proteasom abgebaut werden. Bisherige Analysen über eine mögliche signalgebende Wirkung der DICD wurde mit einem DLL1-ICD Konstrukt durchgeführt, welches unter physiologischen Bedingungen nicht vorhanden ist. Diese Konstrukte besaßen als Startcodon ein expressionsbedingtes ATG (Methionin), welches in der intrazellulären Domäne N-terminal nicht enthalten ist (Sequenz der DICD siehe Abb. 22). Dies könnte zu einer veränderten Degradationsgeschwindigkeit der intrazellulären Domäne von DLL1 führen.

Für die proteolytische Spaltung des DLL1 Proteins ist eine Interaktion mit dem Notch-Rezeptor nicht notwendig, wie der Western Blot in Abb. 5 es verdeutlicht. Das D Δ ECD Konstrukt ist nicht in der Lage, den Notch-Rezeptor zu aktivieren, da die wichtigen Interaktionsdomänen deletiert wurden. Trotzdem wurde das Deletionskonstrukt durch den γ -Sekretasekomplex und durch eine unbekannte Protease in der DICD gespalten. Hiratoshi et al. konnten zeigen, dass zytosolische, freie Fragmente der DICD durch die Interaktion mit dem Notch-Rezeptor über die Zeit zunehmen. Dies spricht für eine Korrelation der Interaktion von DLL1 mit dem Notch-Rezeptor und der proteolytischen Spaltung (Hiratochi et al. 2007). Die Funktion der interaktionsunabhängigen Spaltung ist unklar. Es ist vorstellbar, dass die Spaltung eine regulierende Funktion besitzt, indem die Spaltung die DLL1-Oberflächenpräsentation einschränkt, um damit eine Überaktivierung von Notch-Rezeptoren zu vermeiden (Zolkiewska 2008; Jin et al. 2011).

Wenn die Abspaltung der intrazellulären Domäne von DLL1 eine regulierende Funktion für eine potentielle DLL1-Signalwirkung einnimmt, müsste eine Verhinderung der Spaltung diese Signalweiterleitung in der DLL1 exprimierenden Zelle unterdrücken. Um diese potentielle DLL1-ICD abhängige Signaltransduktion zu unterdrücken, wurde versucht ein DLL1-Konstrukt zu generieren, das nicht mehr einer proteolytischen Spaltung durch den γ -Sekretasekomplex unterliegt. Für dieses DLL1-Konstrukt wurden zwei unterschiedliche Strategien angewendet. Zum einen sollte durch einen Transmembrandomänenaustausch in DLL1 die γ -Sekretasespaltung inhibiert bzw. blockiert werden. Zum anderen sollten verschiedene Deletionen der Aminosäuresequenz zwischen dem EGF8 und der TM von DLL1 die ADAM-Spaltung inhibieren, da sie die Voraussetzung für die γ -Sekretasespaltung ist.

Für den Transmembrandomänen austausch wurde im DLL1-Protein die TM von DLL1 durch die TM von ADAM17 (DLL1-A17TM) ersetzt. Es war nicht bekannt, dass das ADAM17 Protein ein Substrat des γ -Sekretasekomplexes ist. Wie der Western Blot in Abb. 7 zeigt, wurde die γ -Sekretasespaltung durch den TM-Austausch nicht blockiert. Es konnte die abgespaltene DICD weiterhin nachgewiesen werden. Das würde bedeuten, dass ein TM-Austausch sich nicht für die Inhibition der γ -Sekretasespaltung eignet. Li et al. beschrieben, dass für die Spaltung durch den γ -Sekretasekomplex vier Voraussetzungen gelten müssen, damit ein Substrat des γ -Sekretasekomplex in der Membran gespalten wird (Li et al., 2009, siehe auch 4.3.4). Eine wichtige Voraussetzung war u. a., dass das zu spaltende Protein eine kurze Ektodomäne enthalten müsse. In dem DLL1-A17TM Konstrukt wurde die ADAM-Spaltung nicht inhibiert, was zu einem kurzen ektodermalen Bereich von DLL1-A17TM führte. Dies reichte offensichtlich aus, dass das DLL1-A17TM-Protein durch den γ -Sekretasekomplex gespalten wird. Kopan und Ilagan diskutierten den γ -Sekretasekomplex als ein membranständiges Proteasom (Kopan und Ilagan, Ma Xenia G 2004). Die ca. 80 bekannten γ -Sekretasesubstrate besitzen in der TM-Domäne keine Konsensussequenz, die auf eine Spezifität der Erkennung als Substrat der γ -Sekretase hindeutet.

Eine andere Möglichkeit, die Freisetzung der DICD ins Zytosol zu unterbinden, wurde durch die Inhibition der ADAM-Spaltung verfolgt. Die hierfür hergestellten und getesteten Deletionskonstrukte zeigten aber weiterhin eine Bande bei ca. 26-28 kDa, die auf eine Spaltung durch ein ADAM-Protein schließen lässt (siehe 7.1.3). Ob der γ -Sekretasekomplex diese Konstrukte ebenfalls gespalten hat, wurde nicht untersucht, gilt aber als wahrscheinlich, da die Proteinbanden bei ca. 26-28 kDa auf eine kurze ektodermale Region, ausgelöst durch die ADAM-Spaltung, hindeuten. Damit wäre eine wichtige Voraussetzung erfüllt, damit die anschließende Spaltung durch den γ -Sekretasekomplex stattfinden kann (Voraussetzungen siehe 4.3.4).

Warum das DLL1 apa-Deletionskonstrukt gespalten wurde ist nicht eindeutig geklärt, da es bereits als nicht ADAM-spaltbares DLL1-Deletionsprotein in HEK293-Zellen bekannt war (Six et al. 2003). Diese Beobachtung könnte Zelltypspezifisch sein. Im Hinblick auf das Vorkommen von verschiedenen ADAM-Proteinen in unterschiedlichen Zellen/Geweben ist es vorstellbar, dass dieses Konstrukt in HEK293-Zellen (Six et al. 2003) nicht mehr gespalten wird, in CHO-Zellen hingegen schon (siehe Abb. 8).

Von Jin et al. wurde eine weitere Spaltstelle in der extrazellulären Domäne von DLL1 identifiziert. Die zusätzliche Spaltung wird durch eine weitere Metalloprotease (MT1-MMP) induziert. MT1-MMP wird überwiegend im Knochengewebe und Knochenmark exprimiert. Die MT1-MMP Spaltstelle liegt in der Nähe der ADAM-Spaltstelle und hinterlässt in BMSCs (bone marrow stromal cells) ein ca. 30 kDa großes Fragment. Die Spaltung durch die MT1-MMP Metalloprotease dient als negativer Regulator der Notch Aktivität, indem sie durch die Spaltung von DLL1 die ausgelöste Notch-Aktivität einschränkt (Jin et al. 2011). Dies zeigt, dass die Spaltungen regulierend auf die Notch-Aktivität einwirken und eine Überaktivierung vom Notch-Signalweg eingrenzen.

Mit dem Austausch der TM von DLL1 durch die TM von ADAM17 und den Deletionen zwischen EGF8 und der TM, konnten keine nicht-spaltbaren DLL1-Varianten generiert werden (siehe Abb. 7 und Abb. 8). Eine nicht spaltbare DLL1-Variante wäre für die Untersuchung zur potentiellen Signalgebung der D1CD interessant gewesen. So könnte eine durch die D1CD ausgelöste potentielle DLL1-Signalgebung analysiert werden ohne die kanonische Notch-Aktivität zu beeinträchtigen

Eine Möglichkeit für ein DLL1-Konstrukt, in dem die D1CD keine signalgebende Wirkung mehr erzielen könnte, wäre eine DLL1 ICD-Deletionsvariante (DΔICD) wie sie bei Geffers et al., 2007 beschrieben wurde. Dieses Konstrukt zeigte eine Oberflächenpräsentation, konnte aber den Notch-Rezeptor nicht so effektiv aktivieren wie das wildtyp DLL1 (Geffers et al., 2007). In der DΔICD-Deletionsvariante fehlen die intrazellulären Domäne und damit auch die potentiellen Ubiquitylierungsstellen die von wichtiger Bedeutung für die Endozytose und dem Recycling des DLL1-Proteins sind. Das Recycling des DLL1-Proteins fördert die Liganden-Attraktivität für den Notch-Rezeptor und ermöglicht eine bessere Notch-Aktivierung (Heuss et al. 2008).

Somit hat die intrazelluläre Domäne von DLL1 wichtige Funktionen, die für die Aktivierung des Notch-Rezeptors durch DLL1 unerlässlich sind (Geffers et al. 2007). Das DΔICD-Konstrukt konnte für die Analyse einer signalgebenden Wirkung der D1CD daher nicht verwendet werden. Weitere DLL1-Varianten für einem D1CD Austausch der mit der ICD von anderen Proteinen wären für die Analyse der signalgebenden Wirkung denkbar, jedoch müsste hier vorher gewährleistet sein, dass diese Varianten den Notch-Rezeptor wie das wildtyp DLL1 aktivieren können. Der Austausch der D1CD+TM von DLL1 mit der ICD + TM von DLL3 war nicht in der Lage den Notch-Rezeptor wie das wildtyp DLL1-Protein zu

aktivieren (Geffers et al. 2007). Dies verdeutlicht, dass die intrazelluläre Domäne und die Transmembrandomäne von DLL1 wichtige Aufgaben für die Aktivierung des Notch-Rezeptors besitzen und eine Veränderung der intrazellulären Domäne einen Einfluss auf den kanonischen Notch-Signalweg ausübt.

Für die Untersuchung einer potentiellen Signalwirkung der DICD und damit auf eine mögliche Bidirektionalität des Notch-Signalweges wurde daher eine Überexpressionsanalyse vorgenommen.

8.2 Auswirkungen der Überexpression der DICD-Versionen in E14tg2a-Zellen

In verschiedenen DICD-Überexpressionsstudien konnte ein Zusammenhang der Überexpression von DICD mit unterschiedlichen phänotypischen Veränderungen von Zellen *in vitro* beobachtet werden. So konnte z. B. eine Veränderung der Proliferation von HUVEC und HEK293-Zellen nachgewiesen werden (Kolev et al. 2005; Liebler et al. 2012b).

Für die Analyse, ob die Überexpression von DICD, fDICD und D Δ ECD ebenfalls eine Reduzierung der Proliferationsrate in E14tg2a-Zellen auslöste, wurden die transgenen E14tg2a-Zellen, die je eine DICD-Variante exprimierten mit E14tg2a-Zellen verglichen, die die unrekombinierte, nicht konditionell aktivierte transgene DNA integriert hatten. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten keine gravierenden Unterschiede in der Verdopplungszeit der E14tg2a-Zellen an. Die Verdopplungszeit der exprimierenden E14tg2a-Zellen lag bei 25,6 bis 29,6 Stunden, bei nicht rekombinierten bei 28,1-30,5 Stunden. Dieses Ergebnis zeigte, dass es keine Auswirkung auf die Proliferation von E14tg2a-Zellen hatte, wenn DICD, fDICD oder D Δ ECD stabil im *Hprt*-Lokus überexprimiert wurde (siehe Abb. 12).

Die bekannten Ergebnisse aus Kolev et al. 2005 und Liebler et al. 2012b deuten darauf hin, dass die massive Überexpression der ICDs durch Transduzierung sich möglicherweise negativ auf die Proliferationsrate von HUVEC und HEK293-Zellen auswirkt. Diese Annahme bestätigend, konnten eine verringerte Proliferationsrate ebenfalls bei massiver Überexpression der intrazellulären Domänen von Jagged1, DLL4 und Notch1 nachgewiesen werden (Liebler et al. 2012).

Die singuläre Integration der DICD-Varianten in den *Hprt*-Lokus der E14tg2a Zellen zeigte keine Effekte auf die Proliferation, was höchstwahrscheinlich durch ein geringeres

Expressionslevel zu erklären ist. Dieser Versuchsansatz ist näher an der physiologischen Situation und deutet darauf hin, dass ein unphysiologisch hoher Expressionslevel von unterschiedlichen Proteinen die Zell-Proliferation verringert. Ebenso ist es denkbar, dass dieser Effekt zellspezifisch ist.

Zusätzlich zur Bestimmung der Proliferationsrate (siehe Abb. 12) wurde durch Western Blot Analyse die Expression des p21-Proteins untersucht. Die Expression von p21 bewirkt eine Inhibition von Cyclin-abhängigen Kinasen, was zu einer Verringerung der Proliferationsrate führt (Waga et al. 1994, Brugarolas et al. 1999).

In Western Blot Analysen mit transgenen E14tg2a-Zellen konnten keine Banden erkannt werden, die auf Expression von p21 hindeuteten (siehe Abb. 12). Es ist bekannt, dass in nicht-transgenen ES-Zellen das Expressionslevel von p21 unterhalb der Detektionsgrenze liegt (Stead et al. 2002). In den Positivkontrollen (murines p21 in CHO und HeLa Kernextrakt) konnte ein Nachweis des p21-Proteins vollbracht werden, so dass man davon ausgehen kann, dass die E14tg2a-Kontrollzellen und die transgenen E14tg2a-Zellen, den Zell-Zyklus-Inhibitor p21 nicht exprimierten oder p21 in einem niedrigen Level exprimierten, der nicht durch Western Blot Analyse detektierbar war. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Expression von p21 nicht durch die Überexpression der verschiedenen DICD-Varianten induziert wird und unterstützt die Ergebnisse aus der Zellproliferationsanalyse.

Durch die Überexpression der humanen DICD (hDICD) konnte gezeigt werden, dass diese eine regulierende Funktion bei der Expression von p21 einnimmt. Dies konnte in unterschiedlichen eukaryotischen Zellen (MEF, HUVEC und HEK293) nachgewiesen werden (Kolev et al. 2005; Liebler et al. 2012). Diese Beobachtung würde eine Hypothese eines reversen Notch1-Delta1-Signalweges im Menschen unterstützen, indem hDICD die Verfügbarkeit von p21 reguliert. Jedoch ist in diesem Fall eher davon auszugehen, dass die massive transiente Überexpression der hDICD in den HUVEC und HEK293-Zellen die Expression von p21 beeinflusst.

8.3 Die Überexpression der DICD beeinflusst nicht die embryonale Entwicklung der Maus

Dieser Arbeit voran gingen Studien, die auf eine mögliche signalgebende Wirkung der DICD deuteten (siehe 4.7). Zur Überprüfung, ob die DICD eine Signalwirkung besitzt, wurden drei verschiedene transgene Mauslinien hergestellt. Die transgene cDNA von DICD, fDICD und DΔECD wurden als Einzelkopie in den *Hprt*-Lokus der Maus exprimiert. Die Expression der unterschiedlichen Transgene zeigte in adulten transgenen Mäusen keine offensichtlichen Veränderungen im Phänotyp im Vergleich zu adulten wildtyp Mäusen. Deshalb wurden verschiedene Notch-DLL1-abhängige embryonale Prozesse, wie Somitogenese, Neurogenese und Myogenese, in transgenen Embryonen untersucht.

8.3.1 DICD-Überexpression zeigte keine regulierenden Einflüsse auf den Notch-Signalweg

Es wurde in HEK293-Zellen beobachtet, dass eine transiente Überexpression DICD zusammen mit der Überexpression von NICD, die Interaktion der Bindung der NICD an den RBPj κ -MAM Aktivorkomplex beeinflusst. Die Expression der Notch-Zielgene *Hes1* und *Hes5* wurde durch die sukzessive Erhöhung der Expressionsrate von der DICD stetig niedriger (Jung et al. 2011).

Einen Effekt der Überexpression der unterschiedlichen DICD-Varianten konnte unter physiologischen Bedingungen in der Maus nicht festgestellt werden. Wenn die Überexpression der DICD-Varianten den Notch-Signalweg gestört hätten, wäre dies unter anderem in der Somitogenese zu sehen gewesen. Allerdings ist die Ausbildung der Somiten, der Prozess, der am sensitivsten eine auf eine Modulation der Notch-Wirkung reagiert (Feller et al. 2008).

Ein erster Hinweis, dass die Überexpression der unterschiedlichen DICD-Varianten die Expression von Notch-Zielgenen nicht stark beeinflusste, gaben bereits die adulten transgenen Mäuse. Wenn die Expression der Notch-Zielgene in den transgenen Mäusen massiv gestört gewesen wäre, würden die Mäuse Defekte an der Wirbelsäule, den Rippen oder beim Muskelaufbau zeigen. In den transgenen Mäusen konnten aber marginale Veränderung im Notch-Signalweg nicht ausgeschlossen werden, die nicht in einem offensichtlichen Phänotyp resultieren. Daher wurde durch verschiedene Methoden analysiert, ob geringe Veränderungen in der Expression von Notch-Zielgenen vorhanden waren.

Für eine Analyse der Somitogenese wurde die Expression des *Uncx4.1*-Gens durch WISH nachgewiesen, das unter anderem in der posterioren Hälfte der Somiten exprimiert wird (Mansouri et al. 1997). Ein Verlust von *Dll1* bewirkt, dass die Somiten anteriorisieren und die Expression von *Uncx4.1* nicht mehr nachweisbar ist (Hrabě de Angelis, M et al. 1997). Die Überexpression der unterschiedlichen DICD-Varianten in den transgenen Embryonen bewirkt keine Veränderung in dem Expressionsmuster von *Uncx4.1* im Vergleich zum wildtyp Embryo (Abb. 16).

Um einen direkten Einblick auf die Expression von Notch-Zielgenen zu erhalten, wurden an E9,5 alten Embryonen die Expression des Notch-Zielgens *Hey1* durch WISH nachgewiesen. Hier zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den transgenen Embryonen und der Wildtypkontrolle. Genauere quantitative Ergebnisse über eine mögliche marginale Veränderung der Expression von Notch-Zielgenen sollte die Expression von *Hes5* und *Hey2* durch qRT-PCR liefern. Hier konnte in der relativen Expression von *Hes5* und *Hey2* ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp beobachtet werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Überexpression von DICD, fDICD und DΔECD nicht die Expression von Notch-Zielgenen beeinflusst. Die in Jung et al. 2011 gewonnenen Erkenntnisse aus *in vitro*-Analysen konnten in transgenen Mäusen nicht nachvollzogen werden. In den *in vitro*-Analysen ist es denkbar, dass hier ebenfalls in der massiven transienten Überexpression der DICD der Hauptgrund für die inhibierte Notch-Aktivität lag.

8.3.2 Die Überexpression von DICD beeinflusst nicht die Myogenese

Für die Entwicklung der Muskeln ist der Notch-Delta-Signalweg ein wichtiger Regulator. Die Aktivierung des Notch-Rezeptors durch den Liganden DLL1 ist wichtig für die Aufrechterhaltung von Muskelvörläuferzellen und um eine vorzeitige und exzessive Muskeldifferenzierung zu verhindern. In *Dll1*-Verlust Mutanten zeigen die Embryonen eine stark verringerte Muskelmasse durch eine vorzeitige Muskeldifferenzierung (Schuster-Gossler et al. 2007a; Vasyutina et al. 2007).

Für die Analyse der Myogenese in den transgenen Embryonen wurde die Expression des Transkriptionsfaktor Myogenin (*Myog*) durch Ganzpräparat *in situ*-Hybridisierung untersucht. Die *Myog*-Expression findet in differenzierende Myoblasten statt (Winter und Arnold 2000). Um die Vergleichbarkeit der Expression von *Myog* zu gewährleisten, wurden nur Embryonen in selben Alter und mit derselben Anzahl von Somiten verwendet.

In der WISH-Analyse wurden keine Unterschiede im Expressionsmuster von *Myog* und der Intensität der *Myog*-Signale in den Myotomen der transgenen Embryonen und den wildtyp Embryonen beobachtet. Die Expression von *Myog* in den Myoblasten schien nicht gestört zu sein. Zusätzlich deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass die Expression von hierarchisch höher geordneten Genen, wie *MyoD* oder *Myf5*, nicht verändert wurden.

Ob die Überexpression der DICD-Varianten auf die Expression eines der Transkriptionsfaktoren (*MyoD* oder *Myf5*) Einfluss nimmt, wurde jedoch nicht untersucht. Ein Vergleich des *Myog*-Expressionsmusters in transgenen und wildtyp Embryonen zeigte, dass in transgenen Embryonen die Muskelentwicklung normal verlief. Die adulten transgenen Mäuse zeigten, wie bereits erwähnt, keine offensichtlichen Effekte. Wäre die *Myog*-Expression durch die Überexpression beeinflusst worden, hätte sich dies höchstwahrscheinlich in einem Defekt der Muskulatur bemerkbar gemacht. *Myog*-defiziente Mäuse besitzen keine sekundären Muskelfasern, aber Myoblasten und primäre Muskelfasern. Homozygote *Myog*-defiziente Mäuse überleben die fötale Entwicklung, sterben aber kurz nach der Geburt (Hasty et al. 1993; Nabeshima et al. 1993).

Dass die Expression von Myogenin nicht durch die Überexpression von DICD gestört wurde, zeigt, dass die DICD wahrscheinlich keinen Einfluss auf die frühe Differenzierung von Muskelvorläufern hat und die weitere Muskelentwicklung nicht beeinflusst. Die Defekte in *Dll1* defizienten Embryonen werden durch den Verlust der DLL1-abhängigen Notch-Aktivierung verursacht und nicht durch den Verlust einer potentiellen signalgebenden Wirkung der DICD.

Eine Bidirektionalität des Notch-Signalwegs ist aller Voraussicht nach für die Entwicklung der Muskeln in der Maus nicht erforderlich.

8.3.3 Vergleichbare Expression von neuronalen Markergenen in transgenen Mäusen zu wildtyp Mäusen feststellbar

Zellkulturexperimente wiesen darauf hin, dass die Überexpression der DICD durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der Smad-Familie eine neuronale Differenzierung induziert (Hiratochi et al. 2007).

Daher wurden die transgenen Embryonen auf mögliche Unterschiede bei der Expression von verschiedener neuronalen Markergenen überprüft. Die Bildung von Nervenzellen ist ein strikt

geregelter Prozess, deshalb wurden für Untersuchung der Expression von neuronalen Markergenen transgene und wildtyp Embryonen desselben Alters mit derselben Somitenanzahl verwendet.

Die Ergebnisse aus der WISH-Analyse zur Expression von Neurogenin zeigten an E10,5 alten transgenen und wildtyp Embryonen keine Differenzen im Expressionsmuster. Allerdings konnten geringe Unterschiede in der Expression von Neurogenin durch WISH-Analyse nicht vollkommen ausgeschlossen oder bestätigt werden.

Deshalb wurde die Expression von zwei weiteren neuronalen Markergenen anhand von qRT-PCR untersucht. Für die qRT-PCR Analyse wurden jüngere Embryonen verwendet (18-20 Somiten) die zusätzlich Aufschluss über einen verfrühten oder verspäteten Beginn der Neurogenese geben sollten. In der qRT-PCR wurde die Expression des allgemeinen neuronalen Markers Neurofilament (*Nefn*) sowie eines weiteren Markers Islet1 (*Isl1*), der hauptsächlich in sensorischen Neuronen exprimiert wird, quantitativ bestimmt. In beiden neuronalen Markern wurden keine signifikanten Unterschiede in der relativen Expression zwischen transgenen und wildtyp Embryonen nachgewiesen.

Dies deutet darauf hin, dass die Überexpression der DICD-Versionen auf die Entwicklung von Neuronen keinen Einfluss hat. Diese Beobachtung korreliert mit den *in vivo* Ergebnissen aus Überexpressionsanalysen der intrazellulären Domäne des Xenopus-DLL1 (XDICD). Hier zeigte sich, dass die Überexpression von XDICD in Xenopus-Embryonen keinen Effekt auf die anfängliche Neurogenese hat (Chitnis et al. 1995, Kiyota und Kinoshita 2004).

Die neuronale Differenzierung von P19-Zellen, ausgelöst durch die Überexpression von DICD, könnte zellartspezifisch sein oder ebenfalls ein Überexpressionsartefakt. Bei der Neuronenbildung ist davon auszugehen, dass die Überexpression von DICD-Varianten als Einzelkopietransgen im Mausmodell keinen Effekt auf die Neurogenese hat.

8.3.4 Die Ergebnisse deuten nicht auf einen aktiven Kerntransport der DICD hin

Die Hypothese eines reversen Notch-Signalwegs beruht unter anderem auf der Lokalisation der DICD im Nukleus, wo sie eine potentielle transkriptionelle Aktivität auslösen könnte (siehe 4.7). Durch Immunfluoreszenzen und Zellfraktionierung wurde dies in

unterschiedlichen Zellen, welche die DICD transient exprimierten, beobachtet (Kolev et al. 2005; Hiratochi et al. 2007; Bland 2003; LaVoie 2003b; Ikeuchi 2003; Liebler et al. 2012a). Die subzelluläre Lokalisation der DICD war in den Studien divergent. Zum Teil lokalisierte die DICD ausschließlich im Kern oder es wurden Lokalisationen im Kern und im Zytosol beobachtet.

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene transgene Mäuse generiert, die unterschiedliche DICD-Varianten stabil exprimierten. Die stabile Überexpression zeigte, wie bereits diskutiert, keine Auswirkung auf die Embryogenese der transgenen Mäuse. In Zellkulturexperimenten konnten ebenfalls keine Auswirkungen auf die Zellproliferation oder auf neuronale Differenzierung ermittelt werden. Daher stellte sich die Frage, ob die subzelluläre Lokalisation der DICD in Zellen abhängig vom Expressionslevel ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden CHO-Zellen verwendet, die das wildtyp DLL1 oder die DICD entweder transient- oder stabil exprimierten.

Das DLL1 wildtyp Protein konnte in DLL1 transient und DLL1 stabil exprimierenden CHO-Zellen auf der Oberfläche lokalisiert werden, während für die transkriptionelle Aktivität notwendige Kernlokalisierung der abgespaltenen DICD nicht beobachtet werden konnte (siehe Abb 21 A-D). Erst bei transienter Überexpression und zusätzlicher Proteasominhibition konnten DICD-Signale im Kern erkannt werden (siehe Abb 21 E+F). Bei den stabil exprimierenden DLL1 CHO-Zellen konnte durch die MG132-Behandlung keine Akkumulierung der DICD im Kern gesehen werden.

Kernlokalisierung der intrazellulären Domäne von DLL1 konnte bei der transienten und ebenfalls bei der stabilen Expression gezeigt werden (siehe Abb. 21). Während bei der transienten DICD-Expression vermehrt DICD-Signale im Kern zu sehen waren, zeigten sich diese bei stabiler Expression nur durch Proteasominhibition. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es einen Zusammenhang der Kernlokalisierung zu der Höhe des Levels freier DICD gibt.

Das DICD-Protein hat eine molekulare Masse von ca. 21 kDa (Quelle: MacVektor). Es ist beschrieben, dass Proteine bis zu einer molekularen Masse von 40 kDa frei zwischen Zytosol und Zellkern diffundieren können (Marfori et al. 2011; Mohr et al. 2009). In den Fluoreszenzaufnahmen ist eine Korrelation der Kernlokalisierung zum Expressionslevel zu erkennen. Dies würde eher für einen passiven, durch Diffusion kleiner Proteine (<40 kDa) hervorgerufenen Transport sprechen als für einen aktiven Transport in den Nukleus

Ein aktiver Transport in den Nukleus konnte anhand der hDICD bereits in HEK293-Zellen gezeigt werden (Kolev et al. 2005). Kolev et al. identifizierten zwei Bereiche in der humanen DICD, die als funktionelle NLS fungierten. Nach Mutation einer der beiden identifizierten NLS konnte weiterhin Kernlokalisierung der DICD beobachtet werden. Erst durch die Mutation beider NLS in der hDICD konnte keine Kernlokalisierung mehr nachgewiesen werden (Kolev et al. 2005). Die Bereiche, die in Kolev et al. als funktionale NLS in der humanen DICD identifiziert wurde, unterscheiden sich um jeweils eine Aminosäure. Die NLS sind in der mDICD nicht vollständig konserviert.

Um die Hypothese des aktiven Kerntransportes zu überprüfen, wurde ein System verwendet, das die Quantifizierung eines möglichen aktiven Kerntransports in lebenden Zellen ermöglicht. Mit dem LexA-LexOperon-System sollte eine Reporterogenaktivität in lebenden Zellen quantitativ gemessen werden. Für den Nachweis von einer Kernlokalisierung der DICD wurde diese mit dem LexA-VP16 fusioniert (siehe Abb. 23A). Die molekulare Masse von DICD-LexAVP16 betrug ca. 46 kDa (Quelle: MacVector). Dadurch sollte theoretisch eine passive Diffusion in den Zellkern verhindert und ein aktiver Transport in den Zellkern nachgewiesen werden können.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten keine Aktivierung des Luciferase-Reporters durch die Fusionskonstrukte von LexA-VP16 am N- oder am C-Terminus von der intrazellulären Domäne von DLL1 (siehe Abb. 23 B). Erst durch die Fusion der DICD mit der NLS aus dem SV-40 und der LexAVP16-Proteindomäne an einem der beiden Termini, konnte eine erhöhte Luciferaseaktivität gemessen werden. Diese Beobachtungen weisen auf keinen aktiven Kerntransport hin. Die beiden möglichen NLS in der mDICD würden somit nicht als funktionelle NLS agieren.

8.4 Die potentielle Funktion der DICD

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Mauslinien generiert, die unterschiedlichen DICD-Varianten exprimierten. Die intrazelluläre Domäne von DLL1 (DICD), die intrazelluläre Domäne von DLL1 mit N-terminalen Flag-Tag (fDICD) und ein membranständiges DLL1-Deletionskonstrukt (D Δ ECD). Die Deletion in D Δ ECD betraf einen Großteil der extrazellulären Domäne. N-terminal war das wildtyp DLL1 Signalpeptid, gefolgt von letzten 193 Aminosäuren des wildtyp Proteins. Dieses Konstrukt unterliegt wahrscheinlich der gleichen proteolytischen Kaskade wie das endogene DLL1. Es ist nicht

genau bekannt, ob dieses Konstrukt ein direktes Ziel des γ -Sekretasekomplexes ist oder ob vorher das Konstrukt durch ein ADAM-Protein gespalten wird. Die DICD- und fDICD-Konstrukt sind artifizieller Natur und kommen unter physiologischen Bedingungen in der Maus nicht vor. Diese beiden Konstrukte besitzen zwar den intrazellulären Bereich des DLL1-Proteins, jedoch ist die N-terminale Aminosäure (Methionin) in der Wildtyp-Variante nicht vorhanden.

In Western Blot Analysen wiesen die unterschiedlichen DICD-Varianten unterschiedliche Proteinstabilitäten auf. Die DICD zeigte die geringste Stabilität der DICD-Varianten (siehe Abb. 11 und Abb. 15). Die Stabilität der fDICD und D Δ ECD-Proteine waren vergleichbar. Diese Beobachtungen konnten in transgenen E14tg2a-Zellen und in transgenen Embryonen nachvollzogen werden.

Die intrazelluläre Domäne von DLL1 besitzt 16-17 Lysine (ein Lysin ist ein bekannter Polymorphismus, siehe Abb. 4), die potentiell ubiquitinyliert werden. Bekannte E3-Ligasen dafür sind Neuralized (*Neur*) und Mind bomb (*Mib*). Für die Ubiquitinylierung von DLL1 scheint MIB-1 entscheidend zu sein. Die anderen, in Säugetieren vorkommenden E3-Ligasen MIB-2, NEUR-1 und NEUR-2 sind für die Ubiquitinylierung entbehrlich (Vollrath et al. 2001).

Durch die Ubiquitinylierung stellt die DICD ein mögliches Ziel für die proteasomalen Degradation dar. Nur durch Inhibition des Proteasoms mit MG132 konnte die DICD als Spaltprodukt von D Δ ECD im Western Blot identifiziert werden (siehe Abb. 5). In stabilen DICD und fDICD exprimierenden CHO-Zellen verschwanden durch Proteasominhibition zusätzliche Proteinbanden in der Western Blot Analyse. Dies zeigt, dass das Proteasom direkten Einfluss auf die DICD einnimmt und würde für eine Degradation der ICD sprechen.

Weitere intrazelluläre Domänen von anderen transmembranständigen Proteinen, die ebenfalls Substrate des γ -Sekretasekomplexes sind, konnten ebenfalls nur durch Proteasom Inhibition nachgewiesen werden. Einige Beispiele dafür sind Syndecan-3, nectin-1 α , DCC (deleted in colorectal carcinoma) und p75 (Schulz 2003; Kim et al. 2002; Taniguchi 2003; Jung 2003). Von diesen Proteinen ist nicht bekannt, dass die ICD eine Signalwirkung auf transkriptioneller- oder Proteinebene erzielt. Die proteolytische Spaltung durch den γ -Sekretasekomplex dient in diesen erwähnten Proteinen einer schnellen Degradation der intrazellulären Domäne. Dies würde auch auf die DICD, anhand der gewonnenen

Erkenntnisse, zutreffen. Die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors wird ebenfalls durch proteasomale Degradation abgebaut, jedoch ist ihr transkriptioneller Einfluss auf wichtige embryonale Prozesse eindeutig nachgewiesen (siehe 4.3.1).

Das in der DICD C-terminal lokalisierte PDZ-Bindemotiv ist in der Lage mit anderen Proteinen zu interagieren. Für die Notch-Aktivierung ist die PDZ-Domäne beim Liganden nicht notwendig (Ascano 2002; Wright 2004; Mizuhara et al. 2005; Six 2004). Ebenso ist die PDZ-Domäne nicht für die Inhibition des Notch-Signalweges durch *cis*-Inhibition nötig (Glittenberg et al. 2006). Sie ist allerdings wichtig für Zell Adhäsion, Zellmigration und onkogener Transformation von Zellen (Wright 2004; Estrach et al. 2007). Für die DLL1-PDZ-Domäne ist bekannt, dass sie mit MAGI-1-Proteinen, Proteine der MAGUK-Familie und DIG1 (humanes Homolog des *Drosophila discs large 1*) (Mizuhara et al. 2005; Six 2004) interagieren kann. Ein Überangebot der DICD und damit auch der PDZ-Domäne, wie sie in den transgenen Mäusen vorlag, verursachte allerdings keinen erkennbaren Effekt auf die murine Embryonalentwicklung. Dies zeigt, dass eine potentielle DLL1-abhängige Signalwirkung auf Proteinebene auszuschließen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deutlich, dass die intrazelluläre Domäne von DLL1 höchstwahrscheinlich keine signalgebende Wirkung in der embryonalen Entwicklung der Maus besitzt. Die Spaltung des DLL1 Proteins und die daraus resultierende Freilassung der intrazellulären Domäne von DLL1 ins Zytosol ist eher Teil des Degradationsprozesses des Gesamtproteins.

8.5 Mögliche weiterführende Untersuchung zur Bidirektionalität des Notch-Signalweges

In dieser Arbeit wurde die intrazellulären Domäne von DLL1 im Hinblick auf eine signalgebende Wirkung analysiert. Auswirkungen auf die Genexpression von untersuchten Markern für wichtige embryonale Entwicklungsprozesse konnten nicht ermittelt werden und deuten lediglich auf die bekannte Unidirektionalität des Notch-Signalweges hin. Durch die, in dieser Arbeit durchgeführten Experimente kann nicht zu 100% ausgeschlossen werden, dass die DICD doch signalgebende Wirkung besitzt. Für ein finales Experiment zur Funktion der DICD ist eine nicht-spaltbare DICD-Variante unabdingbar. Notwendig für dieses Konstrukt wäre, dass es den Notch-Rezeptor wie das wildtyp DLL1 aktivieren kann.

Wichtige Voraussetzung für ein nicht-spaltbares DLL1 Konstrukt wäre eine Variante, in der nur die γ -Sekretasespaltung inhibiert würde, weil eine Inhibition der ADAM-Spaltung ein noch spaltbares DLL1-Proteinfragment auf der Zelloberfläche zurücklassen würde. Dieses würde vermehrt auf der Oberfläche vorliegen und dadurch eventuell eine Überaktivierung der Notch-Rezeptoren auslösen. Ein erfolgreich getestetes nicht-spaltbares DLL1-Konstrukt könnte im murinen endogenen *Dll1*-Lokus integriert werden und auf mögliche Auswirkungen (z. B. auf transkriptioneller Ebene) in der Maus untersucht werden. Des Weiteren könnte ein nicht-spaltbares DLL1-Konstrukt ohne PDZ-Bindemotiv generiert werden, um mögliche Interaktionen mit anderen Proteinen, die eine PDZ-Domäne besitzen, zu analysieren. Falls mögliche Auswirkungen zu detektieren wären, würde ein Rettungs-Experiment mit der DICD im *Hprt*-Lokus Klarheit über mögliche Einflüsse der DICD geben.

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung des kanonischen Notch-Signalweges	18
Abb. 2. Schematische Darstellung der Notch-Rezeptoren aus <i>Drosophila melanogaster</i> , Vertebraten und <i>Ceanorhabditis elegans</i>	22
Abb. 3 Proteinstruktur der Notch-Liganden aus <i>Drosophila</i> , Vertebraten und <i>C. elegans</i>	24
Abb. 4: Schematische Darstellung der intrazellulären Domäne von DLL1	29
Abb. 5: Proteasom Inhibition zeigte in DΔECD CHO-Zellen eine zusätzliche unbekannte Proteinbande.	73
Abb. 6 Zusätzliche Prozessierungen von DICD und fDICD in stabil exprimierenden CHO- Zellen.	74
Abb. 7 Ein Austausch der Transmembrandomäne (TM) von DLL1 mit der TM von ADAM17 blockiert nicht die γ -Sekretaseaktivität.	76
Abb. 8. Verschiedene Deletionen zwischen EGF8 und TM von DLL1 konnten die ADAM- Spaltung nicht inhibieren.	78
Abb. 9: Strategie zur konditionellen Überexpression von unterschiedlichen DICD-Varianten	81
Abb. 10: Typisierungsbeispiel von transgenen E14tg2a DICD-Zellklonen	83
Abb. 11: Cre-rekombinierten E14tg2a-Zellen exprimierten das Venus-Protein und die Proteine der verschiedene DICD-Varianten	84
Abb. 12: Transgene E14tg2a-Zellen zeigen keine veränderte Proliferation und keine induzierte p21-Expression durch die Überexpression unterschiedlicher DICD-Varianten.	86
Abb. 13. Die Überexpression der unterschiedlichen DICD-Varianten induzierte kein neuronale Differenzierung in E14tg2a Zellen.	88
Abb. 14. Cre-vermittelte Rekombination in transgenen Embryonen aktivierte die Expression der Transgen-DNA.	91
Abb. 15: Proteinexpressionsanalyse mit transgenen Embryonen (E10,5), die die DICD- Varianten exprimierten	92
Abb. 16. Transgene Embryonen zeigten eine normale Expression von <i>Uncx4.1</i>	95
Abb. 17: Transgene Embryonen und wildtyp Embryonen zeigten keine Unterschiede in der Expression des myogenen Markers <i>Myogenin</i>	96
Abb. 18: WISH und qRT-PCR-Untersuchungen zeigten keine Unterschiede in der Expression neurogener Marker in transgenen und wildtyp Embryonen.	98
Abb. 19: Die Expression von Notch-Zielgenen ist in transgenen Embryonen in Vergleich zu wildtyp Embryonen nicht verändert	102
Abb. 20: fDICD Überexpression in <i>Dll1^{LacZ/LacZ}</i> Embryonen zeigte keine Signalwirkung in der Somitenpolarität bei E10,5 alten Embryonen	104
Abb 21: Vergleich zwischen transienter und stabiler Expression des DLL1 wildtyp-Proteins und der DICD in CHO-Zellen	106
Abb. 22: Vergleich der Aminosäuresequenz von muriner DICD (mDICD) und humaner DICD (hDICD).	108
Abb. 23: Die Luciferaseaktivitätsmessung zur quantitativen Bestimmung des Kerntransportes der DICD deutet nicht auf einen aktiven Transport der DICD in den Nukleus in CHO-LexOP- Zellen hin.	111

10 Literaturverzeichnis

- Acar, Melih; Jafar-Nejad, Hamed; Takeuchi, Hideyuki; Rajan, Akhila; Ibrani, Dafina; Rana, Nadia A. et al. (2008): Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. In: *Cell* 132 (2), S. 247–258. DOI: 10.1016/j.cell.2007.12.016.
- Ahn, K.; Shelton, C. C.; Tian, Y.; Zhang, X.; Gilchrist, M. L.; Sisodia, S. S.; Li, Y.-M. (2010): From the Cover: Activation and intrinsic -secretase activity of presenilin 1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (50), S. 21435–21440. DOI: 10.1073/pnas.1013246107.
- Alten, Leonie; Schuster-Gossler, Karin; Eichenlaub, Michael P.; Wittbrodt, Beate; Wittbrodt, Joachim; Gossler, Achim (2012): A novel mammal-specific three partite enhancer element regulates node and notochord-specific Noto expression. In: *PLoS ONE* 7 (10), S. e47785. DOI: 10.1371/journal.pone.0047785.
- Artavanis-Tsakonas, S.; Matsuno, K.; Fortini, M. (1995): Notch signaling. In: *Science* 268 (5208), S. 225–232. DOI: 10.1126/science.7716513.
- Artavanis-Tsakonas, S.; Rand, M. D.; Lake, R. J. (1999): Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. In: *Science* 284 (5415), S. 770–776.
- Ascano, J. M. (2002): The C-terminal PDZ-Ligand of JAGGED1 Is Essential for Cellular Transformation. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (10), S. 8771–8779. DOI: 10.1074/jbc.M211427200.
- Bain, G.; Kitchens, D.; Yao, M.; Huettner, J. E.; Gottlieb, D. I. (1995): Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. In: *Dev Biol* 168 (2), S. 342–357. DOI: 10.1006/dbio.1995.1085.
- Baron, Martin (2003): An overview of the Notch signalling pathway. In: *Semin. Cell Dev. Biol.* 14 (2), S. 113–119.
- Bartley, T. D.; Hunt, R. W.; Welcher, A. A.; Boyle, W. J.; Parker, V. P.; Lindberg, R. A. et al. (1994): B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. In: *Nature* 368 (6471), S. 558–560. DOI: 10.1038/368558a0.

- Beel, A. J.; Sanders, C. R. (2008): Substrate specificity of γ -secretase and other intramembrane proteases. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (9), S. 1311–1334. DOI: 10.1007/s00018-008-7462-2.
- Bertagna, Angela; Toptygin, Dima; Brand, Ludwig; Barrick, Doug (2008): The effects of conformational heterogeneity on the binding of the Notch intracellular domain to effector proteins: a case of biologically tuned disorder. In: *Biochem. Soc. Trans.* 36 (Pt 2), S. 157–166. DOI: 10.1042/BST0360157.
- Bettenhausen, B.; Hrabě de Angelis, M; Simon, D.; Guénet, J. L.; Gossler, A. (1995): Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta. In: *Development* 121 (8), S. 2407–2418.
- Bland, C. E. (2003): Notch-induced Proteolysis and Nuclear Localization of the Delta Ligand. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (16), S. 13607–13610. DOI: 10.1074/jbc.C300016200.
- Blaumueller, C. M.; Qi, H.; Zagouras, P.; Artavanis-Tsakonas, S. (1997): Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. In: *Cell* 90 (2), S. 281–291.
- Bordonaro, Michael; Tewari, Shruti; Atamna, Wafa; Lazarova, Darina L. (2011): The Notch ligand Delta-like 1 integrates inputs from TGFbeta/Activin and Wnt pathways. In: *Experimental Cell Research* 317 (10), S. 1368–1381. DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.03.019.
- Brand-Saberi, B.; Christ, B. (2000): Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites. In: *Curr. Top. Dev. Biol.* 48, S. 1–42.
- Brand-Saberi, B.; Wilting, J.; Ebensperger, C.; Christ, B. (1996): The formation of somite compartments in the avian embryo. In: *Int. J. Dev. Biol.* 40 (1), S. 411–420.
- Braun, T.; Arnold, H. H. (1995): Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. In: *EMBO J.* 14 (6), S. 1176–1186.
- Braune EB, Schuster-Gossler K, Lyszkiewicz M, Serth K, Preuße K, Madlung J, Macek B, Krueger A, Gossler A. (2014): S/T phosphorylation of DLL1 is required for full ligand activity in vitro but dispensable for DLL1 function in vivo during embryonic patterning and marginal zone B cell development. In: *Mol Cell Biol.* 2014 Jan. 21

- Bray, Sarah J. (2006): Notch signalling: a simple pathway becomes complex. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (9), S. 678–689. DOI: 10.1038/nrm2009.
- Bronson, S. K.; Plaehn, E. G.; Kluckman, K. D.; Hagaman, J. R.; Maeda, N.; Smithies, O. (1996): Single-copy transgenic mice with chosen-site integration. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (17), S. 9067–9072.
- Brou, Christel; Logeat, Frédérique; Gupta, Neetu; Bessia, Christine; LeBail, Odile; Doedens, John R. et al. (2000): A Novel Proteolytic Cleavage Involved in Notch Signaling. In: *Molecular Cell* 5 (2), S. 207–216. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)80417-7.
- Brückner, K.; Pasquale, E. B.; Klein, R. (1997): Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. In: *Science* 275 (5306), S. 1640–1643.
- Brugarolas, J.; Moberg, K.; Boyd, S. D.; Taya, Y.; Jacks, T.; Lees, J. A. (1999): Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (3), S. 1002–1007.
- Campbell, Iain D.; Bork, Peer (1993): Epidermal growth factor-like modules. In: *Current Opinion in Structural Biology* 3 (3), S. 385–392. DOI: 10.1016/S0959-440X(05)80111-3.
- Chitnis, A.; Henrique, D.; Lewis, J.; Ish-Horowicz, D.; Kintner, C. (1995): Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. In: *Nature* 375 (6534), S. 761–766. DOI: 10.1038/375761a0.
- Conlon, R. A.; Reaume, A. G.; Rossant, J. (1995): Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. In: *Development* 121 (5), S. 1533–1545.
- Cordle, Jemima; Redfieldz, Christina; Stacey, Martin; van der Merwe, P Anton; Willis, Antony C.; Champion, Brian R. et al. (2008): Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity. In: *J. Biol. Chem.* 283 (17), S. 11785–11793. DOI: 10.1074/jbc.M708424200.
- de Celis, J F; Bray, S. J. (2000): The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe. In: *Development* 127 (6), S. 1291–1302.
- de Vries, W.N., L.T. Binns, K.S. Fancher, J. Dean, R. Moore, R. Kemler, and B.B. Knowles. 2000. Expression of Cre recombinase in mouse oocytes: a means to study maternal effect genes. *Genesis*. 26:110–112.

- Doetschman, T.; Gossler, A.; Serfling, E.; Schaffner, W.; Marcu, K.; Stanton, L.; Kemler, R. (1986): Introduction of genes into mouse embryonic stem cells. In: *Prog. Clin. Biol. Res.* 217A, S. 47–50.
- Doetschman, Thomas; Gregg, Ronald G.; Maeda, Nobuyo; Hooper, Martin L.; Melton, David W.; Thompson, Simon; Smithies, Oliver (1987): Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. In: *Nature* 330 (6148), S. 576–578. DOI: 10.1038/330576a0.
- D'Souza, B.; Miyamoto, A.; Weinmaster, G. (2008): The many facets of Notch ligands. In: *Oncogene* 27 (38), S. 5148–5167. DOI: 10.1038/onc.2008.229.
- Dunwoodie, S. L.; Henrique, D.; Harrison, S. M.; Beddington, R. S. (1997): Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. In: *Development* 124 (16), S. 3065–3076.
- Dyczynska, E.; Sun, D.; Yi, H.; Sehara-Fujisawa, A.; Blobel, C. P.; Zolkiewska, A. (2006): Proteolytic Processing of Delta-like 1 by ADAM Proteases. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (1), S. 436–444. DOI: 10.1074/jbc.M605451200.
- Edbauer, Dieter; Winkler, Edith; Regula, Joerg T.; Pesold, Brigitte; Steiner, Harald; Haass, Christian (2003): Reconstitution of gamma-secretase activity. In: *Nat. Cell Biol.* 5 (5), S. 486–488. DOI: 10.1038/ncb960.
- Egea, Joaquim; Klein, Rüdiger (2007): Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. In: *Trends Cell Biol.* 17 (5), S. 230–238. DOI: 10.1016/j.tcb.2007.03.004.
- Essmann, Clara L.; Martinez, Elsa; Geiger, Julia C.; Zimmer, Manuel; Traut, Matthias H.; Stein, Valentin et al. (2008): Serine phosphorylation of ephrinB2 regulates trafficking of synaptic AMPA receptors. In: *Nat. Neurosci.* 11 (9), S. 1035–1043. DOI: 10.1038/nn.2171.
- Estrach, Soline; Legg, James; Watt, Fiona M. (2007): Syntenin mediates Delta1-induced cohesiveness of epidermal stem cells in culture. In: *J. Cell. Sci.* 120 (Pt 16), S. 2944–2952. DOI: 10.1242/jcs.016253.
- Feller, J.; Schneider, A.; Schuster-Gossler, K.; Gossler, A. (2008a): Noncyclic Notch activity in the presomitic mesoderm demonstrates uncoupling of somite compartmentalization and boundary formation. In: *Genes & Development* 22 (16), S. 2166–2171. DOI: 10.1101/gad.480408.

- Feller, Juliane; Schneider, Andre; Schuster-Gossler, Karin; Gossler, Achim (2008b): Noncyclic Notch activity in the presomitic mesoderm demonstrates uncoupling of somite compartmentalization and boundary formation. In: *Genes Dev.* 22 (16), S. 2166–2171. DOI: 10.1101/gad.480408.
- Fisher, A.; Caudy, M. (1998): The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. In: *Bioessays* 20 (4), S. 298–306. DOI: 10.1002/(SICI)1521-1878(199804)20:4<298::AID-BIES6>3.0.CO;2-M.
- Fitzgerald, K.; Greenwald, I. (1995): Interchangeability of *Caenorhabditis elegans* DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo. In: *Development* 121 (12), S. 4275–4282.
- Friedmann, David R.; Wilson, Jeffrey J.; Kovall, Rhett A. (2008): RAM-induced allostery facilitates assembly of a notch pathway active transcription complex. In: *J. Biol. Chem.* 283 (21), S. 14781–14791. DOI: 10.1074/jbc.M709501200.
- Fryer, Christy J.; White, J. Brandon; Jones, Katherine A. (2004): Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. In: *Mol. Cell* 16 (4), S. 509–520. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.10.014.
- Gao, X.; Bian, W.; Yang, J.; Tang, K.; Kitani, H.; Atsumi, T.; Jing, N. (2001): A Role of N-Cadherin in Neuronal Differentiation of Embryonic Carcinoma P19 Cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284 (5), S. 1098–1103. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5089.
- Geffers, Insa; Serth, Katrin; Chapman, Gavin; Jaekel, Robert; Schuster-Gossler, Karin; Cordes, Ralf et al. (2007): Divergent functions and distinct localization of the Notch ligands DLL1 and DLL3 in vivo. In: *J. Cell Biol.* 178 (3), S. 465–476. DOI: 10.1083/jcb.200702009.
- Glittenberg, Marcus; Pitsouli, Chrysoula; Garvey, Clare; Delidakis, Christos; Bray, Sarah (2006): Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis. In: *EMBO J.* 25 (20), S. 4697–4706. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601337.
- Greenwald, I. (1994): Structure/function studies of lin-12/Notch proteins. In: *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4 (4), S. 556–562.
- Greenwald, I. (1998): LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. In: *Genes Dev.* 12 (12), S. 1751–1762.

- Gridley, Thomas (2007): Notch signaling in vascular development and physiology. In: *Development* 134 (15), S. 2709–2718. DOI: 10.1242/dev.004184.
- Gutwein, P. (2002): ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. In: *The FASEB Journal*. DOI: 10.1096/fj.02-0430fje.
- Haines, Nicola; Irvine, Kenneth D. (2003): Glycosylation regulates Notch signalling. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (10), S. 786–797. DOI: 10.1038/nrm1228.
- Haltiwanger, Robert S.; Lowe, John B. (2004): ROLE OF GLYCOSYLATION IN DEVELOPMENT. In: *Annu. Rev. Biochem.* 73 (1), S. 491–537. DOI: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074043.
- Hartmann, D. (2002): The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. In: *Human Molecular Genetics* 11 (21), S. 2615–2624. DOI: 10.1093/hmg/11.21.2615.
- Hasty, P.; Bradley, A.; Morris, J. H.; Edmondson, D. G.; Venuti, J. M.; Olson, E. N.; Klein, W. H. (1993): Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. In: *Nature* 364 (6437), S. 501–506. DOI: 10.1038/364501a0.
- Hemming, Matthew L.; Elias, Joshua E.; Gygi, Steven P.; Selkoe, Dennis J.; Weissman, Jonathan S. (2008): Proteomic Profiling of γ -Secretase Substrates and Mapping of Substrate Requirements. In: *Plos Biol* 6 (10), S. e257. DOI: 10.1371/journal.pbio.0060257.
- Henderson, S. T.; Gao, D.; Lambie, E. J.; Kimble, J. (1994): lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*. In: *Development* 120 (10), S. 2913–2924.
- Heuss, Sara Farrah; Ndiaye-Lobry, Delphine; Six, Emmanuelle M.; Israël, Alain; Logeat, Frédérique (2008): The intracellular region of Notch ligands Dll1 and Dll3 regulates their trafficking and signaling activity. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (32), S. 11212–11217. DOI: 10.1073/pnas.0800695105.
- Himanen, Juha-Pekka; Saha, Nayanendu; Nikolov, Dimitar B. (2007): Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. In: *Curr. Opin. Cell Biol.* 19 (5), S. 534–542. DOI: 10.1016/j.ceb.2007.08.004.
- Hirai, H.; Maru, Y.; Hagiwara, K.; Nishida, J.; Takaku, F. (1987): A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. In: *Science* 238 (4834), S. 1717–1720.

- Hiratochi, M.; Nagase, H.; Kuramochi, Y.; Koh, C.-S.; Ohkawara, T.; Nakayama, K. (2007): The Delta intracellular domain mediates TGF- β /Activin signaling through binding to Smads and has an important bi-directional function in the Notch-Delta signaling pathway. In: *Nucleic Acids Research* 35 (3), S. 912–922. DOI: 10.1093/nar/gkl1128.
- Hock, B.; Böhme, B.; Karn, T.; Yamamoto, T.; Kaibuchi, K.; Holtrich, U. et al. (1998): PDZ-domain-mediated interaction of the Eph-related receptor tyrosine kinase EphB3 and the ras-binding protein AF6 depends on the kinase activity of the receptor. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (17), S. 9779–9784.
- Horii, Toshihiro; Ogawa, Tomoko; Nakatani, Tomoyuki; Hase, Toshiharu; Matsubara, Hiroshi; Ogawa, Hideyuki (1981): Regulation of SOS functions: Purification of E. coli LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. In: *Cell* 27 (3), S. 515–522. DOI: 10.1016/0092-8674(81)90393-7.
- Hrabě de Angelis, M; McIntyre, J.; Gossler, A. (1997): Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue DIII1. In: *Nature* 386 (6626), S. 717–721. DOI: 10.1038/386717a0.
- Ikeuchi, T. (2003): The Notch Ligands, Delta1 and Jagged2, Are Substrates for Presenilin-dependent "gamma -Secretase" Cleavage. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (10), S. 7751–7754. DOI: 10.1074/jbc.C200711200.
- Ikeuchi, Takeshi; Sisodia, Sangram S. (2003): The Notch ligands, Delta1 and Jagged2, are substrates for presenilin-dependent "gamma-secretase" cleavage. In: *J. Biol. Chem.* 278 (10), S. 7751–7754. DOI: 10.1074/jbc.C200711200.
- Jarriault, S.; Brou, C.; Logeat, F.; Schroeter, E. H.; Kopan, R.; Israel, A. (1995): Signalling downstream of activated mammalian Notch. In: *Nature* 377 (6547), S. 355–358. DOI: 10.1038/377355a0.
- Jarriault, S.; Le Bail, O.; Hirsinger, E.; Pourquié, O.; Logeat, F.; Strong, C. F. et al. (1998): Delta-1 activation of notch-1 signaling results in HES-1 transactivation. In: *Mol. Cell. Biol.* 18 (12), S. 7423–7431.
- Jen, W. C.; Wettstein, D.; Turner, D.; Chitnis, A.; Kintner, C. (1997): The Notch ligand, X-Delta-2, mediates segmentation of the paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos. In: *Development* 124 (6), S. 1169–1178.

- Jin, Guoxiang; Zhang, Fengju; Chan, Kui Ming; Xavier Wong, Hoi Leong; Liu, Baohua; Cheah, Kathryn S E et al. (2011): MT1-MMP cleaves Dll1 to negatively regulate Notch signalling to maintain normal B-cell development. In: *EMBO J.* 30 (11), S. 2281–2293. DOI: 10.1038/emboj.2011.136.
- Jones-Villeneuve, E. M.; Rudnicki, M. A.; Harris, J. F.; McBurney, M. W. (1983): Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells. In: *Mol. Cell. Biol.* 3 (12), S. 2271–2279.
- Jung, Jane; Mo, Jung-Soon; Kim, Mi-Yeon; Ann, Eun-Jung; Yoon, Ji-Hye; Park, Hee-Sae (2011): Regulation of Notch1 signaling by Delta-like ligand 1 intracellular domain through physical interaction. In: *Mol. Cells* 32 (2), S. 161–165. DOI: 10.1007/s10059-011-1046-y.
- Jung, K.-M. (2003): Regulated Intramembrane Proteolysis of the p75 Neurotrophin Receptor Modulates Its Association with the TrkA Receptor. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (43), S. 42161–42169. DOI: 10.1074/jbc.M306028200.
- Kim, Doo Yeon; Ingano, Laura A MacKenzie; Kovacs, Dora M. (2002): Nectin-1alpha, an immunoglobulin-like receptor involved in the formation of synapses, is a substrate for presenilin/gamma-secretase-like cleavage. In: *J. Biol. Chem.* 277 (51), S. 49976–49981. DOI: 10.1074/jbc.M210179200.
- Kim, Mi-Yeon; Jung, Jane; Mo, Jung-Soon; Ann, Eun-Jung; Ahn, Ji-Seon; Yoon, Ji-Hye; Park, Hee-Sae (2011): The intracellular domain of Jagged-1 interacts with Notch1 intracellular domain and promotes its degradation through Fbw7 E3 ligase. In: *Experimental Cell Research* 317 (17), S. 2438–2446. DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.07.014.
- Kimberly, W. Taylor; LaVoie, Matthew J.; Ostaszewski, Beth L.; Ye, Wenjuan; Wolfe, Michael S.; Selkoe, Dennis J. (2003): Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (11), S. 6382–6387. DOI: 10.1073/pnas.1037392100.
- Kiyota, Tomomi; Kinoshita, Tsutomu (2004): The intracellular domain of X-Serrate-1 is cleaved and suppresses primary neurogenesis in *Xenopus laevis*. In: *Mech. Dev.* 121 (6), S. 573–585. DOI: 10.1016/j.mod.2004.03.034.
- Kolev, Vihren; Kacer, Doreen; Trifonova, Radiana; Small, Deena; Duarte, Maria; Soldi, Raffaella et al. (2005): The intracellular domain of Notch ligand Delta1 induces cell growth arrest. In: *FEBS Letters* 579 (25), S. 5798–5802. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.09.042.

- Koo, Bon-Kyoung; Lim, Hyoung-Soo; Song, Ran; Yoon, Mi-Jeong; Yoon, Ki-Jun; Moon, Jin-Sook et al. (2005): Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch. In: *Development* 132 (15), S. 3459–3470. DOI: 10.1242/dev.01922.
- Kopan, R.; Nye, J. S.; 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. In: *Development* 120 (9), S. 2385–2396.
- Kopan, R.; Schroeter, E. H.; Weintraub, H.; Nye, J. S. (1996): Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (4), S. 1683–1688.
- Kopan, Raphael (2002): Notch: a membrane-bound transcription factor. In: *J. Cell. Sci.* 115 (Pt 6), S. 1095–1097.
- Kopan, Raphael; Ilagan, Ma. Xenia G. (2009): The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. In: *Cell* 137 (2), S. 216–233. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.045.
- Kopan, Raphael; Ilagan, Ma Xenia G (2004): Gamma-secretase: proteasome of the membrane? In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (6), S. 499–504. DOI: 10.1038/nrm1406.
- Kullander, Klas; Klein, Rüdiger (2002): Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (7), S. 475–486. DOI: 10.1038/nrm856.
- Kuroda, K.; Tani, S.; Tamura, K.; Minoguchi, S.; Kurooka, H.; Honjo, T. (1999): Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. In: *J. Biol. Chem.* 274 (11), S. 7238–7244.
- Lai, E. C.; Deblandre, G. A.; Kintner, C.; Rubin, G. M. (2001): Drosophila neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of delta. In: *Dev. Cell* 1 (6), S. 783–794.
- Lai, Eric C. (2002): Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. In: *EMBO Rep.* 3 (9), S. 840–845. DOI: 10.1093/embo-reports/kvf170.
- Lammich, S.; Kojro, E.; Postina, R.; Gilbert, S.; Pfeiffer, R.; Jasionowski, M. et al. (1999): Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (7), S. 3922–3927.

- Lardelli, M.; Williams, R.; Lendahl, U. (1995): Notch-related genes in animal development. In: *Int. J. Dev. Biol.* 39 (5), S. 769–780.
- LaVoie, M. J. (2003): The Notch Ligands, Jagged and Delta, Are Sequentially Processed by γ -Secretase and Presenilin/ γ -Secretase and Release Signaling Fragments. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (36), S. 34427–34437. DOI: 10.1074/jbc.M302659200.
- Lee, Hyun-Shik; Nishanian, Tagvor G.; Mood, Kathleen; Bong, Yong-Sik; Daar, Ira O. (2008): EphrinB1 controls cell-cell junctions through the Par polarity complex. In: *Nat. Cell Biol.* 10 (8), S. 979–986. DOI: 10.1038/ncb1758.
- Lewandoski, M.; Wassarman, K. M.; Martin, G. R. (1997): Zp3-cre, a transgenic mouse line for the activation or inactivation of loxP-flanked target genes specifically in the female germ line. In: *Curr. Biol.* 7 (2), S. 148–151.
- Li, Huilin; Wolfe, Michael S.; Selkoe, Dennis J. (2009): Toward Structural Elucidation of the γ -Secretase Complex. In: *Structure* 17 (3), S. 326–334. DOI: 10.1016/j.str.2009.01.007.
- Lieber, T.; Kidd, S.; Alcamo, E.; Corbin, V.; Young, M. W. (1993): Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. In: *Genes Dev.* 7 (10), S. 1949–1965.
- Lieber, Toby; Kidd, Simon; Young, Michael W. (2002): kuzbanian-mediated cleavage of Drosophila Notch. In: *Genes Dev.* 16 (2), S. 209–221. DOI: 10.1101/gad.942302.
- Liebler, Sven S.; Feldner, Anja; Adam, M. Gordian; Korff, Thomas; Augustin, Hellmut G.; Fischer, Andreas (2012a): No evidence for a functional role of bi-directional Notch signaling during angiogenesis. In: *PLoS ONE* 7 (12), S. e53074. DOI: 10.1371/journal.pone.0053074.
- Liebler, Sven S.; Feldner, Anja; Adam, M. Gordian; Korff, Thomas; Augustin, Hellmut G.; Fischer, Andreas; Vooijs, Marc (2012b): No Evidence for a Functional Role of Bi-Directional Notch Signaling during Angiogenesis. In: *PLoS ONE* 7 (12), S. e53074. DOI: 10.1371/journal.pone.0053074.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. In: *Methods* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

- Logeat, F.; Bessia, C.; Brou, C.; LeBail, O.; Jarriault, S.; Seidah, N. G.; Israël, A. (1998): The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (14), S. 8108–8112.
- Louvi, Angeliki; Artavanis-Tsakonas, Spyros (2012): Notch and disease: a growing field. In: *Semin. Cell Dev. Biol.* 23 (4), S. 473–480. DOI: 10.1016/j.semcd.2012.02.005.
- Lu, Q.; Sun, E. E.; Klein, R. S.; Flanagan, J. G. (2001): Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. In: *Cell* 105 (1), S. 69–79.
- Lubman, Olga Y.; Ilagan, Ma Xenia G; Kopan, Raphael; Barrick, Doug (2007): Quantitative dissection of the Notch:CSL interaction: insights into the Notch-mediated transcriptional switch. In: *J. Mol. Biol.* 365 (3), S. 577–589. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.09.071.
- Luche, Hervé; Weber, Odile; Nageswara Rao, Tata; Blum, Carmen; Fehling, Hans Jörg (2007): Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in "knock-in" Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. In: *Eur. J. Immunol.* 37 (1), S. 43–53. DOI: 10.1002/eji.200636745.
- Ma, Qiufu; Chen, Zhoufeng; Barrantes, Iván del Barco; Luis de la Pompa, José; Anderson, David J. (1998): neurogenin1 Is Essential for the Determination of Neuronal Precursors for Proximal Cranial Sensory Ganglia. In: *Neuron* 20 (3), S. 469–482. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80988-5.
- Mansouri, A.; Yokota, Y.; Wehr, R.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Gruss, P. (1997): Paired-related murine homeobox gene expressed in the developing sclerotome, kidney, and nervous system. In: *Dev. Dyn.* 210 (1), S. 53–65. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0177(199709)210:1<53::AID-AJA6>3.0.CO;2-0.
- Marfori, Mary; Mynott, Andrew; Ellis, Jonathan J.; Mehdi, Ahmed M.; Saunders, Neil F.W.; Curmi, Paul M. et al. (2011): Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813 (9), S. 1562–1577. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.10.013.
- McBurney, M. W.; Jones-Villeneuve, E. M.; Edwards, M. K.; Anderson, P. J. (1982): Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. In: *Nature* 299 (5879), S. 165–167.

- Mizuhara, Eri; Nakatani, Tomoya; Minaki, Yasuko; Sakamoto, Yoshimasa; Ono, Yuichi; Takai, Yoshimi (2005): MAGI1 recruits Dll1 to cadherin-based adherens junctions and stabilizes it on the cell surface. In: *J. Biol. Chem.* 280 (28), S. 26499–26507. DOI: 10.1074/jbc.M500375200.
- Mohr, Dagmar; Frey, Steffen; Fischer, Torsten; Güttler, Thomas; Görlich, Dirk (2009): Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes. In: *EMBO J.* 28 (17), S. 2541–2553. DOI: 10.1038/emboj.2009.200.
- Moloney, D. J.; Shair, L. H.; Lu, F. M.; Xia, J.; Locke, R.; Matta, K. L.; Haltiwanger, R. S. (2000): Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. In: *J. Biol. Chem.* 275 (13), S. 9604–9611.
- Mumm, Jeffrey S.; Schroeter, Eric H.; Saxena, Meera T.; Griesemer, Adam; Tian, Xiaolin; Pan, D.J et al. (2000): A Ligand-Induced Extracellular Cleavage Regulates γ -Secretase-like Proteolytic Activation of Notch1. In: *Molecular Cell* 5 (2), S. 197–206. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)80416-5.
- Muskavitch, M. A. (1994): Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice. In: *Dev. Biol.* 166 (2), S. 415–430. DOI: 10.1006/dbio.1994.1326.
- Nabeshima, Y.; Hanaoka, K.; Hayasaka, M.; Esumi, E.; Li, S.; Nonaka, I. (1993): Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. In: *Nature* 364 (6437), S. 532–535. DOI: 10.1038/364532a0.
- Nam, Yunsun; Sliz, Piotr; Song, Luyan; Aster, Jon C.; Blacklow, Stephen C. (2006): Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. In: *Cell* 124 (5), S. 973–983. DOI: 10.1016/j.cell.2005.12.037.
- Nichols, James T.; Miyamoto, Alison; Weinmaster, Gerry (2007): Notch signaling--constantly on the move. In: *Traffic* 8 (8), S. 959–969. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2007.00592.x.
- Nye, J. S.; Kopan, R.; Axel, R. (1994): An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. In: *Development* 120 (9), S. 2421–2430.
- Oka, C.; Nakano, T.; Wakeham, A.; de la Pompa, J L; Mori, C.; Sakai, T. et al. (1995): Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. In: *Development* 121 (10), S. 3291–3301.

- Okajima, Tetsuya; Irvine, Kenneth D. (2002): Regulation of notch signaling by o-linked fucose. In: *Cell* 111 (6), S. 893–904.
- Palmer, Amparo; Klein, Rudiger (2003): Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. In: *Genes Dev.* 17 (12), S. 1429–1450. DOI: 10.1101/gad.1093703.
- Parks, Annette L.; Stout, Jane R.; Shepard, Scott B.; Klueg, Kristin M.; Dos Santos, Ana A; Parody, Todd R. et al. (2006): Structure-function analysis of delta trafficking, receptor binding and signaling in *Drosophila*. In: *Genetics* 174 (4), S. 1947–1961. DOI: 10.1534/genetics.106.061630.
- Pasquale, Elena B. (2005): Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (6), S. 462–475. DOI: 10.1038/nrm1662.
- Patapoutian, A.; Yoon, J. K.; Miner, J. H.; Wang, S.; Stark, K.; Wold, B. (1995): Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. In: *Development* 121 (10), S. 3347–3358.
- Petcherski, A. G.; Kimble, J. (2000): LAG-3 is a putative transcriptional activator in the *C. elegans* Notch pathway. In: *Nature* 405 (6784), S. 364–368. DOI: 10.1038/35012645.
- Pfister, Sabine; Przemeck, Gerhard K H; Gerber, Josef-Karl; Beckers, Johannes; Adamski, Jerzy; Hrabé de Angelis, Martin (2003): Interaction of the MAGUK family member Acvrinpl and the cytoplasmic domain of the Notch ligand Delta1. In: *J. Mol. Biol.* 333 (2), S. 229–235.
- Pintar, Alessandro; Biasio, Alfredo de; Popovic, Matija; Ivanova, Neli; Pongor, Sándor (2007): The intracellular region of Notch ligands: does the tail make the difference? In: *Biol. Direct* 2, S. 19. DOI: 10.1186/1745-6150-2-19.
- Prokop, S. (2004): Requirement of PEN-2 for Stabilization of the Presenilin N-/C-terminal Fragment Heterodimer within the -Secretase Complex. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (22), S. 23255–23261. DOI: 10.1074/jbc.M401789200.
- Ramos, Catarina; Rocha, Susana; Gaspar, Claudia; Henrique, Domingos (2010): Two Notch ligands, Dll1 and Jag1, are differently restricted in their range of action to control neurogenesis in the mammalian spinal cord. In: *PLoS ONE* 5 (11), S. e15515. DOI: 10.1371/journal.pone.0015515.

Rampal, Raajit; Luther, Kelvin B.; Haltiwanger, Robert S. (2007): Notch signaling in normal and disease States: possible therapies related to glycosylation. In: *Curr. Mol. Med.* 7 (4), S. 427–445.

Rana, Nadia A.; Nita-Lazar, Aleksandra; Takeuchi, Hideyuki; Kakuda, Shinako; Luther, Kelvin B.; Haltiwanger, Robert S. (2011): O-glucose trisaccharide is present at high but variable stoichiometry at multiple sites on mouse Notch1. In: *J. Biol. Chem.* 286 (36), S. 31623–31637. DOI: 10.1074/jbc.M111.268243.

Raya, Angel; Kawakami, Yasuhiko; Rodríguez-Esteban, Concepción; Ibañes, Marta; Rasskin-Gutman, Diego; Rodríguez-León, Joaquín et al. (2004): Notch activity acts as a sensor for extracellular calcium during vertebrate left-right determination. In: *Nature* 427 (6970), S. 121–128. DOI: 10.1038/nature02190.

Rocha, Susana Ferreira; Lopes, Susana Santos; Gossler, Achim; Henrique, Domingos (2009): Dll1 and Dll4 function sequentially in the retina and pV2 domain of the spinal cord to regulate neurogenesis and create cell diversity. In: *Dev. Biol.* 328 (1), S. 54–65. DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.01.011.

Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T. et al. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In: *Science* 239 (4839), S. 487–491.

Schlöndorff, J.; Becherer, J. D.; Blobel, C. P. (2000): Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). In: *Biochem. J.* 347 Pt 1, S. 131–138.

Schroeter, E. H.; Kisslinger, J. A.; Kopan, R. (1998): Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. In: *Nature* 393 (6683), S. 382–386. DOI: 10.1038/30756.

Schulz, J. G. (2003): Syndecan 3 Intramembrane Proteolysis Is Presenilin/ -Secretase-dependent and Modulates Cytosolic Signaling. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (49), S. 48651–48657. DOI: 10.1074/jbc.M308424200.

Schuster-Gossler, Karin; Cordes, Ralf; Gossler, Achim (2007a): Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2), S. 537–542. DOI: 10.1073/pnas.0608281104.

- Schuster-Gossler, Karin; Cordes, Ralf; Gossler, Achim (2007b): Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2), S. 537–542. DOI: 10.1073/pnas.0608281104.
- Selkoe, Dennis; Kopan, Raphael (2003): Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. In: *Annu. Rev. Neurosci.* 26, S. 565–597. DOI: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131334.
- Shah, Sanjiv; Lee, Sheu-Fen; Tabuchi, Katsuhiko; Hao, Yi-Heng; Yu, Cong; LaPlant, Quincey et al. (2005): Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. In: *Cell* 122 (3), S. 435–447. DOI: 10.1016/j.cell.2005.05.022.
- Shawber, C.; Nofziger, D.; Hsieh, J. J.; Lindsell, C.; Bögler, O.; Hayward, D.; Weinmaster, G. (1996): Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. In: *Development* 122 (12), S. 3765–3773.
- Shimizu, K.; Chiba, S.; Kumano, K.; Hosoya, N.; Takahashi, T.; Kanda, Y. et al. (1999): Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods. In: *J. Biol. Chem.* 274 (46), S. 32961–32969.
- Shimizu, K.; Chiba, S.; Saito, T.; Kumano, K.; Takahashi, T.; Hirai, H. (2001): Manic fringe and lunatic fringe modify different sites of the Notch2 extracellular region, resulting in different signaling modulation. In: *J. Biol. Chem.* 276 (28), S. 25753–25758. DOI: 10.1074/jbc.M103473200.
- Shirotani, Keiro; Tomioka, Masanori; Kremmer, Elisabeth; Haass, Christian; Steiner, Harald (2007): Pathological activity of familial Alzheimer's disease-associated mutant presenilin can be executed by six different γ -secretase complexes. In: *Neurobiology of Disease* 27 (1), S. 102–107. DOI: 10.1016/j.nbd.2007.04.011.
- Shutter, J. R.; Scully, S.; Fan, W.; Richards, W. G.; Kitajewski, J.; DeBlandre, G. A. et al. (2000): Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. In: *Genes Dev.* 14 (11), S. 1313–1318.
- Simpson, P. (1997): Notch signaling in development. In: *Perspect Dev Neurobiol* 4 (4), S. 297–304.

- Six, E. M. (2004): The Notch Ligand Delta1 Recruits Dlg1 at Cell-Cell Contacts and Regulates Cell Migration. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (53), S. 55818–55826. DOI: 10.1074/jbc.M408022200.
- Six, Emmanuelle; Ndiaye, Delphine; Laabi, Yacine; Brou, Christel; Gupta-Rossi, Neetu; Israel, Alain; Logeat, Frederique (2003): The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (13), S. 7638–7643. DOI: 10.1073/pnas.1230693100.
- Stanley, Pamela (2007): Regulation of Notch signaling by glycosylation. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17 (5), S. 530–535. DOI: 10.1016/j.sbi.2007.09.007.
- Stead, Elaine; White, Josephine; Faast, Renate; Conn, Simon; Goldstone, Sherilyn; Rathjen, Joy et al. (2002): Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. In: *Oncogene* 21 (54), S. 8320–8333. DOI: 10.1038/sj.onc.1206015.
- Steiner, H. (1999): A Loss of Function Mutation of Presenilin-2 Interferes with Amyloid beta -Peptide Production and Notch Signaling. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (40), S. 28669–28673. DOI: 10.1074/jbc.274.40.28669.
- Swiatek, P. J.; Lindsell, C. E.; del Amo, F. F.; Weinmaster, G.; Gridley, T. (1994): Notch1 is essential for postimplantation development in mice. In: *Genes & Development* 8 (6), S. 707–719. DOI: 10.1101/gad.8.6.707.
- Tagami, Shinji; Okochi, Masayasu; Yanagida, Kanta; Ikuta, Akiko; Fukumori, Akio; Matsumoto, Naohiko et al. (2008): Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1. In: *Mol. Cell. Biol.* 28 (1), S. 165–176. DOI: 10.1128/MCB.00863-07.
- Takasugi, Nobumasa; Tomita, Taisuke; Hayashi, Ikuo; Tsuruoka, Makiko; Niimura, Manabu; Takahashi, Yasuko et al. (2003): The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. In: *Nature* 422 (6930), S. 438–441. DOI: 10.1038/nature01506.
- Taniguchi, Y. (2003): Presenilin-dependent γ -Secretase Processing of Deleted in Colorectal Cancer (DCC). In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (33), S. 30425–30428. DOI: 10.1074/jbc.C300239200.
- Thompson, S.; Clarke, A. R.; Pow, A. M.; Hooper, M. L.; Melton, D. W. (1989): Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. In: *Cell* 56 (2), S. 313–321.

Tiedemann, H.; Asashima, M.; Grunz, H.; Knöchel, W. (1998): Neural induction in embryos. In: *Dev. Growth Differ.* 40 (4), S. 363–376.

Tomita, Taisuke; Iwatsubo, Takeshi (2013): Structural biology of presenilins and signal peptide peptidases. In: *J. Biol. Chem.* 288 (21), S. 14673–14680. DOI: 10.1074/jbc.R113.463281.

Torres, R.; Firestein, B. L.; Dong, H.; Staudinger, J.; Olson, E. N.; Huganir, R. L. et al. (1998): PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. In: *Neuron* 21 (6), S. 1453–1463.

Tsuda, H.; Maynard-Currie, C. E.; Reid, L. H.; Yoshida, T.; Edamura, K.; Maeda, N. et al. (1997): Inactivation of the mouse HPRT locus by a 203-bp retroposon insertion and a 55-kb gene-targeted deletion: establishment of new HPRT-deficient mouse embryonic stem cell lines. In: *Genomics* 42 (3), S. 413–421. DOI: 10.1006/geno.1997.4771.

Uyttendaele, H.; Marazzi, G.; Wu, G.; Yan, Q.; Sassoon, D.; Kitajewski, J. (1996): Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. In: *Development* 122 (7), S. 2251–2259.

Varshavsky, A. (1996): The N-end rule: functions, mysteries, uses. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (22), S. 12142–12149.

Vasyutina, Elena; Lenhard, Diana C.; Birchmeier, Carmen (2007): Notch function in myogenesis. In: *Cell Cycle* 6 (12), S. 1451–1454.

Visan, Ioana; Yuan, Julie S.; Tan, Joanne B.; Cretegnny, Kira; Guidos, Cynthia J. (2006): Regulation of intrathymic T-cell development by Lunatic Fringe- Notch1 interactions. In: *Immunol. Rev.* 209, S. 76–94. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2006.00360.x.

Vodovar, Nicolas; Schweisguth, François (2008): Functions of O-fucosyltransferase in Notch trafficking and signaling: towards the end of a controversy? In: *J. Biol.* 7 (2), S. 7. DOI: 10.1186/jbiol68.

Vollrath, B.; Pudney, J.; Asa, S.; Leder, P.; Fitzgerald, K. (2001): Isolation of a murine homologue of the *Drosophila* neuralized gene, a gene required for axonemal integrity in spermatozoa and terminal maturation of the mammary gland. In: *Mol. Cell. Biol.* 21 (21), S. 7481–7494. DOI: 10.1128/MCB.21.21.7481-7494.2001.

- Waga, S.; Hannon, G. J.; Beach, D.; Stillman, B. (1994): The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. In: *Nature* 369 (6481), S. 574–578. DOI: 10.1038/369574a0.
- Wakabayashi, Tomoko; Strooper, Bart de (2008): Presenilins: members of the gamma-secretase quartets, but part-time soloists too. In: *Physiology (Bethesda)* 23, S. 194–204. DOI: 10.1152/physiol.00009.2008.
- Warming, S. (2005): Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. In: *Nucleic Acids Research* 33 (4), S. e36. DOI: 10.1093/nar/gni035.
- Weintraub, H.; Davis, R.; Tapscott, S.; Thayer, M.; Krause, M.; Benezra, R. et al. (1991): The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. In: *Science* 251 (4995), S. 761–766.
- Wilson, Jeffrey J.; Kovall, Rhett A. (2006): Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. In: *Cell* 124 (5), S. 985–996. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.035.
- Wilson-Rawls, J.; Molkentin, J. D.; Black, B. L.; Olson, E. N. (1999): Activated notch inhibits myogenic activity of the MADS-Box transcription factor myocyte enhancer factor 2C. In: *Mol. Cell. Biol.* 19 (4), S. 2853–2862.
- Winter, B.; Arnold, H. H. (2000): Activated raf kinase inhibits muscle cell differentiation through a MEF2-dependent mechanism. In: *J. Cell. Sci.* 113 Pt 23, S. 4211–4220.
- Wolfe, M. S. (2004): Intramembrane Proteolysis: Theme and Variations. In: *Science* 305 (5687), S. 1119–1123. DOI: 10.1126/science.1096187.
- Wright, G. J. (2004): Delta proteins and MAGI proteins: an interaction of Notch ligands with intracellular scaffolding molecules and its significance for zebrafish development. In: *Development* 131 (22), S. 5659–5669. DOI: 10.1242/dev.01417.
- Xia, L. (2004): Surface fucosylation of human cord blood cells augments binding to P-selectin and E-selectin and enhances engraftment in bone marrow. In: *Blood* 104 (10), S. 3091–3096. DOI: 10.1182/blood-2004-02-0650.
- Xu, Aiguo; Haines, Nicola; Dlugosz, Malgosia; Rana, Nadia A.; Takeuchi, Hideyuki; Haltiwanger, Robert S.; Irvine, Kenneth D. (2007): In vitro reconstitution of the modulation

of Drosophila Notch-ligand binding by Fringe. In: *J. Biol. Chem.* 282 (48), S. 35153–35162. DOI: 10.1074/jbc.M707040200.

Yang, Liang-Tung; Nichols, James T.; Yao, Christine; Manilay, Jennifer O.; Robey, Ellen A.; Weinmaster, Gerry (2005): Fringe glycosyltransferases differentially modulate Notch1 proteolysis induced by Delta1 and Jagged1. In: *Mol. Biol. Cell* 16 (2), S. 927–942. DOI: 10.1091/mbc.E04-07-0614.

Yoon, Keejung; Gaiano, Nicholas (2005): Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. In: *Nat. Neurosci.* 8 (6), S. 709–715. DOI: 10.1038/nn1475.

Yu, G.; Nishimura, M.; Arawaka, S.; Levitan, D.; Zhang, L.; Tandon, A. et al. (2000): Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. In: *Nature* 407 (6800), S. 48–54. DOI: 10.1038/35024009.

Zhang, Liguo; Widau, Ryan C.; Herring, B. Paul; Gallagher, Patricia J. (2011): Delta-like 1-Lysine613 regulates notch signaling. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813 (12), S. 2036–2043. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.08.019.

Zhang, W.; Behringer, R. R.; Olson, E. N. (1995): Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. In: *Genes Dev.* 9 (11), S. 1388–1399.

Zhao, G.; Liu, Z.; Ilagan, Ma. X. G.; Kopan, R. (2010): -Secretase Composed of PS1/Pen2/Aph1a Can Cleave Notch and Amyloid Precursor Protein in the Absence of Nicastrin. In: *Journal of Neuroscience* 30 (5), S. 1648–1656. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3826-09.2010.

Zolkiewska, A. (2008): ADAM proteases: ligand processing and modulation of the Notch pathway. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (13), S. 2056–2068. DOI: 10.1007/s00018-008-7586-4.

11 Wissenschaftliche Veröffentlichung

Redeker, C., Schuster-Gossler, K., Kremmer, E., Gossler, A. (2013): Normal development in mice over-expressing the intracellular domain of DLL1 argues against reverse signaling by DLL1 in vivo

PLoS ONE 8 (10), DOI: 10.1371/journal.pone.0079050.

12 Danksagung

Mein Dank gilt als erstes Prof. Dr. Achim Gossler für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit in seinem Labor anzufertigen. Des Weiteren möchte ich mich bei ihm bedanken für die ständige Bereitschaft wissenschaftliche Fragestellungen zu beantworten und Ergebnisse und Problemlösungen rund um das Thema DICD zu diskutieren.

Ich möchte Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn danken für die freundliche Übernahme des Korreferats meiner Doktorarbeit.

Ein großer Dank gilt auch Dr. Karin Schuster-Gossler für die Einarbeitung in die ES-Zellkultur und die Generierung der transgenen Mäuse. Anatoli Heiser danke ich für die Unterstützung im Umgang mit den transgenen Mäusen.

Bei Dr. Rainer Niedenthal bedanke ich mich für die Übergabe der LexOperon-Sequenz und bei der Arbeitsgruppe von Prof. Alain Israël für die Verwendung des DLL1-apa Konstrukts.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Instituts für Molekularbiologie bedanken, die ich während der letzten fünf Jahre kennen und schätzen gelernt habe.

Besonderen Dank gilt Dr. Leonie Alten, Dr. Anja Beckers und Dr. Michaela Mai für die Diskussionen und Fachgespräche sowie für die Unterstützung bei der Einarbeitung in neue Methoden. Außerdem gilt der Dank Eike Braune für die DLL1-fachkundigen Gespräche.

Meiner Freundin Birgit gilt ein großer Dank, die mich während dieser Zeit unterstützt und motiviert hat sowie zahlreiche Stunden am Wochenende ohne mich verbringen musste.

Meiner Familie möchte ich auch großen Dank aussprechen, dafür, dass sie mich immer wieder motiviert und unterstützt haben.

13 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Redeker
Vorname: Christian
Anschrift: Im Dorffeld 34
30966 Hemmingen
Geburtsdatum: 09.09.1981
Geburtsort: Herford
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1988-1992: Grundschule Schnathorst
1992-2001: Gesamtschule Hüllhorst
Abschluss: Abitur

Wehrdienst

Sep. 2001 – Aug. 2002 Wehrdienst, Sportfördergruppe Warendorf

Studium

Okt. 2002- Sep. 2003 Betriebswirtschaft, Universität Osnabrück
Okt. 2003- Okt. 2006 Biologie der Zellen, Universität Osnabrück
Abschluss: Bachelor of Science
Okt. 2006 – Okt. 2008 Biologie der Zellen, Universität Osnabrück
Abschluss: Master of Science
Jan. 2009 – Feb. 2014 Promotionsstudium Biologie,
Gottfried Leibniz Universität Hannover
Doktorarbeit im Institut für Molekularbiologie
an der Medizinischen Hochschule Hannover

14 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Christian Redeker, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und alle verwendeten Quellen, Hilfsmittel und zur Hilfeleistung herangezogenen Personen ordnungsgemäß und vollständig angegeben habe.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Dissertation nicht als Masterarbeit oder einer gleichwertigen Prüfungsarbeit zuvor verwendet wurde.

Ort und Datum

Christian Redeker