

**Bedeutung von O-Fucosylierung und
EGF-Sequenzwiederholungen für die
Funktion des Notch-Liganden DLL1**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades der
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Julia Müller

Geboren am 24.08.1978 in Trier

2008

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in der Zeit von Januar 2004 bis Oktober 2008 am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule in Hannover unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Achim Gossler angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Korreferent: Prof. Dr. Achim Gossler

Tag der Promotion: 20.11.2008

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit selbstständig durchgeführt und verfasst habe. Die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie die zu Hilfeleistungen herangezogenen Personen und Institutionen habe ich vollständig in der Arbeit angegeben. Des Weiteren erkläre ich, dass diese Arbeit nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, den 06. Oktober 2008

(Julia Müller)

Meinen Eltern

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Achim Gossler für die engagierte Betreuung und ständige Bereitschaft, Fragen zu beantworten, Probleme zu lösen und Ergebnisse zu diskutieren.

Prof. Dr. Walter Müller möchte ich sehr herzlich für die bereitwillige Übernahme der Begutachtung meiner Doktorarbeit danken.

Mein Dank gebührt weiterhin allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Molekularbiologie für die angenehme und anregende Arbeitsatmosphäre. Allen, die mich mit Ihrer Hilfsbereitschaft, ihrem Einfallsreichtum und ihrer netten Gesellschaft unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle besonders danken! Im Einzelnen danke ich Insa Geffers für die Bereitstellung einiger stabiler Zelllinien, ihrer moralischen Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während unserer gemeinsamen Zeit im Institut. Dr. Karin Schuster-Gossler danke ich für Ihre Hilfe mit den Mäusen und die Zusammenarbeit im EGF-Projekt.

Bei Jens Mittag möchte ich mich ganz herzlich für das Korrekturlesen und seine kompetente Hilfe bei allen technischen Fragen bedanken, für seine stete Unterstützung aus Schweden und seinen unermüdlichen Optimismus.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Freunden, die mich während der Doktorarbeit von nah und fern begleitet haben, für ihre Unterstützung, Motivierung, ihr Verständnis und die schöne gemeinsame Zeit in Hannover und der Eifel!

An dieser Stelle bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Oma für Ihre uneingeschränkte Unterstützung, Anteilnahme und liebevolle Fürsorge, durch die das alles erst möglich wurde.

Zusammenfassung

Der evolutionär stark konservierte Notch-Signalweg vermittelt die Kommunikation zwischen benachbarten Zellen und ist ein zentraler Regulator der Embryonalentwicklung. Die Interaktion des Notch-Rezeptors mit membranständigen Liganden führt zur Spaltung des Rezeptors innerhalb der Transmembrandomäne und zur Freisetzung seiner intrazellulären Domäne, die in den Zellkern transloziert und dort als transkriptioneller Koaktivator die Expression von Zielgenen induziert. Für die Bindung der Liganden an den Rezeptor sind neben der DSL-Domäne die EGF-ähnlichen Motive in der extrazellulären Domäne von entscheidender Bedeutung. Es wird vermutet, dass wie auch für den Notch-Rezeptor selber, die O-Fucosylierung dieser extrazellulären Domäne eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielt.

In dieser Arbeit wurde durch *in vitro* Mutationsstudien für einen der Liganden, DLL1, die Erforderlichkeit der strukturellen Integrität der EGF-Motive 1- 3 innerhalb der extrazellulären Domäne für die Aktivität des Liganden gezeigt. Die Inhibition der Bildung von zwei konservierten Disulfidbrücken innerhalb dieser EGF-Motive durch einen Aminosäureaustausch führte zum Verlust der NOTCH1-Aktivierung und zusätzlich bei der Mutation des EGF-Motivs 1 zu einer intrazellulären Akkumulation der Proteinmutante. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die von den konservierten Disulfidbrücken abhängige Proteinstruktur oder -stabilität für die DLL1-Aktivität essentiell ist. Dieselben Mutationen in den EGF-Motiven 4-8 von DLL1 ließen keine wesentlichen Änderungen für die Lokalisierung und NOTCH1-Aktivierung *in vitro* erkennen.

In einem weiteren Teil dieser Studie wurde DLL1 als *in vitro* Substrat für die O-Fucosylierung nachgewiesen. Nach Mutation aller fünf Konsensussequenzen in der extrazellulären Domäne wurde die Proteinvariante intrazellulär in Kolokalisierung mit dem ER-Protein Calreticulin nachgewiesen und zeigte keine Aktivierung von NOTCH1. Durch Kombination der Mutationen in den generierten Proteinvarianten konnten keine Konsensussequenzen der O-Fucosylierung für die Funktion von DLL1 eindeutig ausgeschlossen werden. Die Daten zeigen aber, dass die EGF-Motive 4 und 7 eine besondere Stellung einnehmen, der Verlust der Fucosylierung an diesen Positionen jedoch durch weitere Mutationen kompensiert werden kann.

Weiterhin wurde für DLL1 in Abwesenheit von POFUT1 *in vitro* und *in vivo* eine intrazelluläre Anreicherung in vesikulären Strukturen gezeigt. Endogenes DLL1 wird zusätzlich in Pofut1^{-/-} PSM Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert. Diese Beobachtung legte nahe, dass der O-Fucosylierung von DLL1 durch POFUT1 eine entscheidende Bedeutung für die Funktion des Liganden im Notch-Signalweg zukommt.

Schlagworte: Notch-Signalweg, EGF-ähnliche Domäne, O-Fucosylierung

Abstract

The highly conserved Notch signaling pathway plays a key role in growth control and cell fate determination through direct cell to cell contacts in metazoa. The Notch receptor and its ligands are cell surface transmembrane glycoproteins with epidermal growth factor (EGF)-like repeats in their extracellular domains. The DSL domain unique to Notch ligands and the EGF-like repeats of DLL1 are indispensable for binding and activating the Notch receptor. NOTCH and its ligands can be modified by O-linked fucosylation which is essential for the active Notch signaling pathway.

Aiming at understanding the relevance of each EGF-like repeat in the extracellular domain of DLL1 it was demonstrated in this study that the structural integrity of the EGF repeats 1-3 is indispensable for DLL1 function. The disruption of disulfide bonds in these EGF-like repeats by mutating conserved cysteines was sufficient to impair DLL1 function *in vitro*. While mutation of EGF-like repeat 1 abolished cell surface presentation, DLL1 with disrupted EGF-like repeats 2 and 3, respectively were localized to the membrane but showed no transactivating potential. Both observations suggest a direct requirement of the disulfide bond dependent protein structure and stability for DLL1 function. Disruption of the EGF-like repeats 4-8 in DLL1 does not diminish the capability of the mutant proteins for activating Notch *in vitro*.

In addition, in this study the role of O-fucosylation for DLL1 was analyzed. It was demonstrated that DLL1 is a substrate for fucosylation. The loss of five predicted fucosylation consensus sites within the extracellular domain by replacing relevant acceptor amino acids using site directed mutagenesis resulted in a protein variant which accumulates intracellularly, was not able to activate NOTCH1 and incorporate H³-Fucose after metabolic labeling suggesting that fucosylation is necessary for proper DLL1 function. Combination of the mutations in the consensus sites did not exclude one particular fucosylation site significant for the DLL1 function. However, analyses revealed distinct roles for the sites in EGF-like repeat 4 and 7. Moreover, to investigate the importance of the fucosylation for DLL1 its subcellular localisation was analyzed *in vitro* in immortalized embryonic fibroblasts derived from E9.5 *Pofut1*^{-/-} embryos. It was demonstrated that DLL1 was predominantly located intracellularly in a punctate and vesicular distribution suggesting that the loss of fucosylation may result in trafficking or folding problems for DLL1. Subcellular localisation studies *in vivo* in the presomitic mesoderm of *Pofut1*^{-/-} mouse embryos revealed an additional cell surface localisation for DLL1. Collectively, the *in vitro* and *in vivo* results suggest an important influence of the O-fucosylation for DLL1 by POFUT1 and its role in the Notch signaling pathway in the mouse.

Keywords: Notch signaling, EGF-like repeat, O-fucosylation

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 Der Notch-Signalweg	3
1.2 Die Biochemie des kanonischen Notch-Signalwegs	4
1.3 Die Komponenten des Notch-Signalweges	8
1.3.1 Die Notch-Rezeptoren.....	8
1.3.2 Die DSL-Liganden	10
1.4 Delta-like 1 (Dll1) in der Maus.....	12
1.4.1 Die Genfunktion von Dll1	12
1.4.2 Das Protein DLL1	14
1.5 Die Regulation des Notch-Signalwegs	15
1.6 Durch fehlerhafte Notch-Signalgebung ausgelöste Krankheitsbilder	20
1.7 Die Glykosylierung als Regulator des Notch-Signalwegs	22
2. Zielsetzung	32
3. Material und Methoden	34
3.1 Materialien.....	34
3.1.1 Chemikalien.....	34
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	34
3.1.3 Enzyme	34
3.1.4 Primer und Oligonukleotide.....	34
3.1.5 Klonierungsvektoren und verwendete Plasmide	36
3.1.6 Nährmedien	37
3.1.7 Bakterienstämme, Zelllinien, Labortiere.....	38
3.1.8 Antikörper.....	40
3.1.9 Datenbanken.....	42
3.1.10 Computerprogramme	43
3.2 Methoden	44
3.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	44
3.2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	50
3.2.4 Zellbiologische Methoden	56
3.2.5 Embryologische Methoden	59
4 Ergebnisse	61
4.1 Analyse von DLL1-Proteinvarianten nach Mutation von Cysteinresten in den EGF-ähnlichen Domänen.....	61

4.1.1 Analyse der subzellulären Lokalisation der DLL1 EGF Mutanten.....	62
4.1.2 Analyse der Zelloberflächenpräsentation der DLL1 EGF Mutanten mit Hilfe einer Oberflächenbiotinylierung	65
4.1.3 Analyse der Notch1-Aktivierung der DLL1 EGF Proteinmutanten.....	66
4.2 Untersuchung der Rolle der O-Fucosylierung für den Notch-Liganden DLL1	70
4.2.1 <i>In vitro</i> Analysen.....	70
4.3 Ausschalten (Knock Out) der Pofut1 Expression in DLL1 exprimierenden Zellen mit Hilfe von RNA-Interferenz.....	89
4.3.1 Herstellung von stabilen Zelllinien für die Expression der Pofut1 siRNA-Konstrukte	89
4.3.2 Analyse der subzellulären Lokalisierung, Notch1-Aktivierung und Fucosylierung von DLL1 in CHO-Zellen nach Reduzierung von POFUT1 durch RNA-Interferenz.....	93
4.4 Untersuchung des Einflusses der N-Glykosylierung auf DLL1	97
4.4.1 Analyse von zellulären Eigenschaften von DLL1 nach Mutagenese der Konsensussequenz für die N-Glykosylierung in EGF-Motiv 7.....	97
4.5 Analyse der subzellulären Lokalisierung von endogenem DLL1 in Abwesenheit von POFUT1.....	104
4.5.1 Analyse der subzellulären Lokalisierung von endogenem DLL1 in Zellen des präsomitischen Mesoderms von Pofut1 ^{+/+} und Pofut1 ^{-/-} Embryonen.....	104
4.5.2 <i>In vitro</i> Analyse der subzellulären Lokalisierung von DLL1 in Primärzellen aus Pofut1 ^{-/-} Embryonen.....	113
5. Diskussion	118
5.1 Die Rolle der Integrität der konservierten Disulfidbrücken der EGF-ähnlichen Domänen von DLL1 <i>in vitro</i> für den Notch-Signalweg.....	118
5.1.2 Die Analysen der Mutationen in DLL1 zeigen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> deutliche Unterschiede für die Aktivität von DLL1	120
5.2 Die Rolle der O-Fucosylierung für DLL1	128
5.2.1 Einige Konsensussequenzen für die O-Fucosylierung von DLL1 sind <i>in vitro</i> Substrate für diese Modifikation	128
5.2.2. Eine Reduktion von POFUT1 in CHO-Zellen beeinträchtigt die Aktivierung von NOTCH1 durch DLL1 nicht	134
5.2.3 Die Mutation der Konsensussequenz für die N-Glykosylierung von DLL1 zeigt keinen wesentlichen Einfluß auf die Aktivität von DLL1	136
5.2.4 DLL1 zeigt <i>in vivo</i> bei Inaktivierung von POFUT1 eine abweichende subzelluläre Lokalisierung.....	137
Abkürzungsverzeichnis	145
Literatur	147
Publikationen	166
Lebenslauf	168

1. Einleitung

Die Steuerung der Embryonalentwicklung eines Lebewesens von der befruchteten Eizelle bis zum vollständigen Organismus mit allen dazugehörigen Zelldifferenzierungen, der Morphogenese und Gewebemöostase erfolgt durch wenige biologische Signalwege. Zu den wichtigsten Signalmolekülen mit dazugehörigem Rezeptor gehören dabei die Wingless-homologen Wnt-Proteine mit den *frizzled*-Rezeptoren, die Hedgehog-Proteine, die mit dem Rezeptor *patched* interagieren, die TGF- β -Familie (Transformierender Wachstumsfaktor- β), mit Serin-Threonin-Proteinkinase-assoziierten Rezeptoren, die Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGF) mit Rezeptor-Tyrosinkinasen und der Notch-Signalweg, in dem die Signale von DSL-Liganden auf den Notch-Rezeptor übertragen werden. Diese Signalwege sind zentrale Regulatoren der Embryonalentwicklung, indem sie individuell oder in Kommunikation miteinander auf äußere Signale reagieren und diese in transkriptionelle Aktivierung oder Inhibition umsetzen (Shay und Greenwald, 2002; Wahl et al., 2007; Mumm und Kopan, 2000).

1.1 Der Notch-Signalweg

Der evolutionär konservierte Notch-Signalweg reguliert in höheren Eumetazoen viele Differenzierungsprozesse durch direkten interzellulären Kontakt (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Er spielt eine essentielle Rolle für die zelluläre Differenzierung und laterale Inhibition während der embryonalen Muster- und Organbildung, sowie für Gewebedifferenzierung und -hömöostase in adulten Organismen (Joute et al., 1996; Li et al., 1997). Anders als in vielen parakrinen Signalwegen erfolgt die Signalweiterleitung im Notch-Signalweg über eine juxtakrine Interaktion zwischen einem spezifischen membranständigen Ligand und dem transmembranären Notch-Rezeptor, wobei eine interzelluläre Interaktion zur Signalweiterleitung in *trans* führt (Fehon et al., 1990). Die heterophile Bindung des Liganden an den Notch-Rezeptor führt zur Spaltung des Rezeptors innerhalb des Transmembranabschnitts, worauf die intrazelluläre Notch-Domäne in den Zellkern transloziert und dort als transkriptioneller Koaktivator zusammen mit RBP-Jk die Expression zahlreicher Zielgene aktiviert. Die Signalweiterleitung erfolgt im Notch-Signalweg somit ohne einen zweiten Transmitter nur mit Hilfe der intrazellulären Notch-Domäne (Mumm et al., 2000; Kopan et al., 1996; Jarriault, 1995; Logeat et al., 1998).

Eine der am besten beschriebenen Funktionen von Notch ist die Regulation der

Zelldifferenzierung und Festlegung von Zellschicksalen äquivalenter benachbarter Vorläuferzellen, die sowohl den Notch-Rezeptor als auch den Liganden exprimieren. Durch Verstärkung geringer stochastischer Unterschiede in der Expression des Rezeptors oder Liganden in einer Zelle durch negative oder positive Rückkopplungsmechanismen wird der Notch-Signalweg in den umgebenden Nachbarzellen verstärkt aktiviert, was bewirkt, daß die Nachbarzellen nicht das gleiche Zellschicksal annehmen. Die ursprünglich gleichen Zelltypen differenzieren zu zwei verschiedenen Populationen (Greenwald et al., 1998). Dieser in der Literatur als *laterale Inhibition* bezeichnete Effekt steuert bei der Neurogenese in *Drosophila* die Bildung von Neuroblasten neben Epidermiszellen, und die Bildung der Vorläuferzellen der Haarsensillen, der sogenannten "sensory organ precursor cells" (Chitnis et al., 1995; Muskavitch, 1994; Tiedemann et al., 1998; Simpson, 1997; Fisher und Caudy, 1998). Bei der *lateralen Induktion* sind zwei verschiedene Zelltypen beteiligt, die entweder den Rezeptor oder den Liganden exprimieren. Die Rezeptor-tragende Zelle wird durch den Liganden stimuliert, was eine Zell-Schicksalsentscheidung abhängig vom entsprechenden Liganden auslöst (Lewis et al., 1998; Panin et al., 1997). Durch diese Notch-Funktion entstehen ganze Felder von Zellen mit neuer Identität. Die laterale Induktion führt in *Drosophila* zur Bildung der Flügelränder, in Vertebraten zur Bildung der apikalen ektodermalen Randleiste (AER) als Organisationszentrum (Baron et al., 2002; Louvi et al., 2006; Lowell et al., 2006).

1.2 Die Biochemie des kanonischen Notch-Signalwegs

Das Notch-Gen, das erstmals in *Drosophila* entdeckt wurde, kodiert einen ca. 300 kDa, die Zellmembran einmalig durchspannenden (Typ I) Rezeptor, der als Vorläuferprotein im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert wird. Bevor das Protein die Plasmamembran erreicht, findet im trans-Golgi-Netzwerk an der sogenannten S1 Stelle, ca. 70 AS außerhalb der Transmembrandomäne, eine erste proteolytische Spaltung durch eine Furin-ähnliche Konvertase statt (Logeat et al., 1998; Blaumueller et al., 1997). Die aus dieser Spaltung hervorgehenden zwei Untereinheiten bilden ein Heterodimer, das an der Zelloberfläche präsentiert wird und aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne (NECD) von ca. 180 kDa und einer nicht-kovalent gebundenen C-terminalen Transmembranuntereinheit von ca. 120 kDa zusammengesetzt ist, welche aus der intrazellulären-, einer Transmembrandomäne und einer kurzen extrazellulären Ektodomäne besteht (Blaumueller et al., 1997). Die NECD weist eine unterschiedliche Anzahl

von "Epidermal growth factor-like" (EGF) ähnlichen Tandemwiederholungen auf, innerhalb denen die Ligandenbindungsstellen liegen (Rebay et al., 1991). Neben der Bindung der Liganden reguliert die extrazelluläre Domäne noch die Aktivität des Notch-Rezeptors in Abwesenheit eines Liganden. Die calciumabhängige Bindung der beiden nicht-kovalent interagierenden Untereinheiten sowie drei LIN12/Notch (LNR)-Wiederholungen zwischen den EGF-Motiven und der Transmembrandomäne verhindern eine konstitutive liganden-unabhängige Aktivierung des Rezeptors (Rand et al., 2000; Malecki et al., 2006; Greenwald, 1994; Lyman und Young, 1993; Lieber et al., 1993).

Durch die Bindung des Notch-Rezeptors an einen Liganden der DSL-Familie (Delta/Serrate/Lag2) auf einer benachbarten Zelle, wird der Rezeptor aktiviert. In *Drosophila* sind als Liganden Delta und Serrate beschrieben, in *Caenorhabditis elegans* Lag2, und für Vertebraten fünf Liganden, die basierend auf ihrer Homologie zu Delta und Serrate in zwei Gruppen unterteilt werden: Als Serrate-ähnliche (Serrate-like) Liganden Jagged1 und 2, sowie Delta-ähnliche (Delta-like, Dll) mit Dll1-4, wobei Dll2 bisher nur in *Xenopus* beschrieben worden ist (Bettenhausen et al., 1995; Dunwoodie et al., 1997; Jen et al., 1997; Shutter et al., 2000). Die DSL-Liganden gehören wie der Notch-Rezeptor zu den Typ I-Transmembranproteinen und weisen in ihren extrazellulären Domänen ebenfalls EGF-Motive in unterschiedlicher Anzahl auf. Eine konservierte sogenannte DSL-Domäne in diesem extrazellulären Bereich ist dabei essentiell für die Rezeptorbindung (Fleming, 1998; Ascano et al., 2003; Pfister et al., 2003).

Die Bindung eines Liganden an den Notch-Rezeptor induziert Konformationsänderungen, die eine Schnittstelle für die zweite proteolytische Spaltung (S2) freilegen (Brou et al., 2000; Lieber et al., 2002; Mumm et al., 2000). Erkannt wird diese Spaltstelle durch die Metalloprotease TACE/ADAM17 (*Tumor-necrosis-faktor-alpha converting enzyme*), ein Mitglied der ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*) Familie der Metalloproteasen. Das *Drosophila* Homolog ist *Kuzbanian* (Pan und Rubin, 1997; Sotillos et al., 1997). Die Entfernung der NECD führt zur Bildung des sogenannten *Notch Extracellular Truncation Proteins (NEXT)*, das bestehend aus der intrazellulären Domäne, der Transmembrandomäne und einer aus 12 AS bestehenden restlichen extrazellulären Domäne, das Substrat für eine dritte proteolytische intramembranäre Spaltung darstellt. Die regulierte intramembranäre Proteolyse (RIP) erfolgt durch einen γ -Sekretase-Komplex, der aus den 4 integralen Membranproteinen Presenilin, Nicastrin, APH1 (*anterior*

pharynx defective1) und PEN2 (*Presenilin enhancer2*) besteht und das intrazelluläre cytoplasmatische Notch-Fragment (NICD) freisetzt (Wolfe, 2006).

Die RIP mit Hilfe eines γ -Sekretase/Presenilin-Komplexes spielt auch eine Rolle bei der Entstehung der Alzheimer Erkrankung, genauer bei der Prozessierung des *Amyloid precursor proteins* (APP) zu löslichen Peptiden (Sisodia und St. George-Hyslop, 2002; Fortini, 2001).

Die NICD transloziert aufgrund ihrer Kernlokalisierungssequenzen nach der Abspaltung in den Zellkern, wo sie mit dem DNA-bindenden Transkriptionsfaktor *CSL* (*CBF1* (Mensch), *Suppressor of hairless* (*Drosophila*), *LAG-1* (*C.elegans*), *RBPJ* κ (*Maus*)) interagiert und die Transkription von Zielgenen anschaltet (Chitnis, 2006; Weinmaster, 2000; Chan et al., 1998).

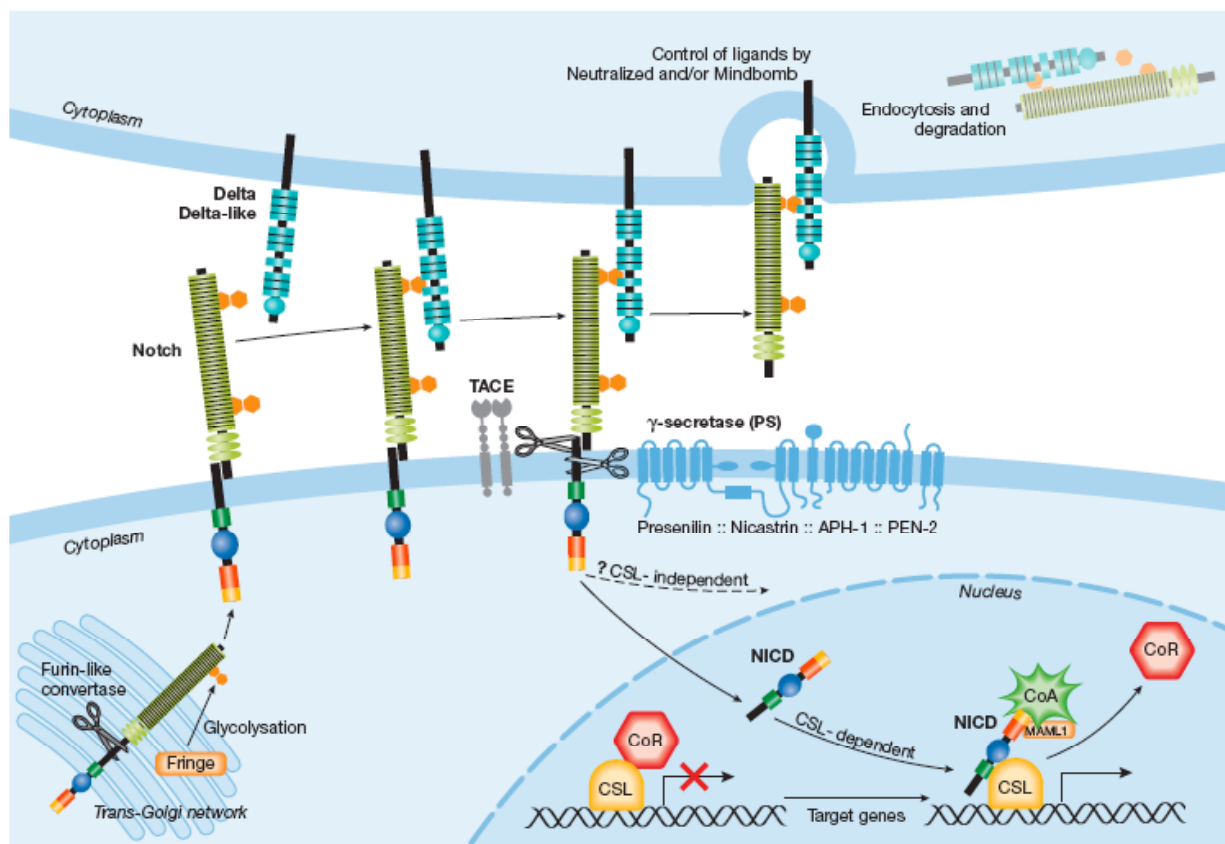


Fig. 1.1: Der Notch-Signalweg (Radtke et al., 2005). Der Notch-Rezeptor wird nach der Synthese im ER auf seinem Weg zur Zelloberfläche im trans Golgi-Netzwerk durch eine Furin-ähnliche Konvertase gespalten und durch die Glycosyltransferase Fringe modifiziert. Das resultierende Heterodimer interagiert an der Zelloberfläche mit einem Liganden der DSL(Delta/Serrat/LAG2)-Familie, worauf zwei proteolytische Spaltungen folgen. Die Metalloprotease TACE spaltet den Rezeptor in der extrazellulären Domäne (NECD), was durch die Trans-Endocytose der NECD in die Nachbarzelle erleichtert wird. Die zweite Spaltung erfolgt in der transmembranären Domäne durch einen γ -Sekretase/Presenilin-Komplex, wobei die intrazelluläre Domäne (NICD) von der Membran freigesetzt wird und aufgrund der Kernlokalisations-Signale in den Kern wandert. Nach Bindung der NICD an den Transkriptionsfaktor

CSL (CBF1 (Mensch), Suppressor of hairless (Drosophila), LAG-1 (C.elegans), RBPJ κ (Maus)), wird durch die Freisetzung eines Ko-Repressor-Komplexes (CoR), und Rekrutierung eines Ko-Aktivator-Komplexes (CoA), der u.a Mastermind-ähnliche (MAML, Mastermind-like)-Proteine enthält, die Transkription von Notch-Zielgenen. induziert.

In der Abwesenheit der NICD ist das CSL Protein mit einem Ko-Repressor-Komplex zur Unterdrückung der Transkription assoziiert, an dem die Korepressoren SMRT (*silencing mediator of retinoic and thyroid receptors*), N-CoR (*nuclear receptor corepressor*), CIR (*CBF1-interacting repressor*) und die Histon-Deacetylase HDAC-1 beteiligt sind (Lai, 2002).

Die Bindung der NICD führt zum Austausch der Ko-Repressoren durch transkriptionelle Ko-Aktivatoren, wie den p300 Histon Acetyltransferase (HAT)-Komplex und als nukleäre Aktivatoren die Mastermind-like Proteine (MAML)/LAG-3/SEL-10 (Jeffries et al., 2002; Nam et al., 2006). Ein weiterer Bestandteil des Ko-Aktivator-Komplexes ist SKIP (*Ski-interacting protein*), das als Adapterprotein zunächst CBF-1 und SMRT im Ko-Repressor Komplex bindet, dann aber dessen Umwandlung zu einem Aktivator durch Interaktion mit NICD unterstützt (Kurooka et al., 2000; Wu et al., 2000; Mumm und Kopan, 2000). Durch die Verdrängung des Ko-Repressor Komplexes stimuliert NICD die Transkription der Zielgene, zu denen die helix-loop-helix (bHLH) transkriptionellen Repressoren des *Enhancer of Split (E(Spl))* Komplexes in *Drosophila* und die *HES (Hairy/Enhancer of Split)* und *HERP (HES-related repressor proteins: Hey, HRT, Hesr, CHF, gridlock)* Genfamilien in Vertebraten sowie *Lunatic fringe (Lfng)* gehören (Maier und Gessler, 2000; Cole et al., 2002; Davis und Turner, 2001). Sonstige Zielgene sind Mediatoren des Zellzyklus wie Cyclin D1 und p21cip1/waf1, Transkriptionsfaktoren der NF κ -B Familie, Ephrin B2, Nodal, cytoplasmatische Modulatoren wie Deltex und Numb (Ronchini und Capobianco, 2001; Rangarajan et al., 2001; Cheng et al., 2001; Krebs et al., 2003; Deftos et al., 2000; Miele, 2006).

Die Inaktivierung des Notch-Signalwegs erfolgt über eine phosphorylierungsabhängige Ubiquitinierung der NICD und anschließende Degradierung durch das Proteasom (Baron, 2003). Neben der Signalweiterleitung über den konservierten kanonischen Notch-Signalweg, über den in den meisten Prozessen die Signalgebung erfolgt, wurde alternativ eine CSL/RBPJ κ unabhängige, über Deltex vermittelte Notch-Signalübertragung beschrieben, wobei die Einzelheiten noch ungeklärt sind (Zecchini et al., 1999; Bush et al., 2001; Shawber et al., 1996; Matsuno et al., 1997).

1.3 Die Komponenten des Notch-Signalwegs

1.3.1 Die Notch-Rezeptoren

Das den Notch-Rezeptor codierende Gen wurde 1917 von Thomas Morgan Hunt entdeckt, der eine Mutation in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* mit dem Auftreten von Kerben (notches) an den Flügelrändern beschrieb. Die Mutation wurde einem teilweisen Verlust (Haploinsuffizienz) eines Gens aus dem "Notch"-Lokus zugeordnet und als neurogen bezeichnet, da homozygote Notch-Mutanten eine Hyperplasie des Nervensystems zu Lasten von epidermalemem Gewebe aufwiesen (Morgan, 1917; Poulsen, 1937). Die Notch-Rezeptor Familie sowie deren Liganden und Regulatoren sind in der Evolution stark konserviert und werden in allen Metazoen gefunden. Zur Familie der Notch-Rezeptoren gehören neben dem Mitglied in *Drosophila* noch vier Notch-Proteine (Notch1-4) in Vertebraten und zwei Notch-ähnliche Proteine (LIN-12 und GLP-1) in *C. elegans* (Artavanis-Tsakonas, 1999). In Vertebraten ist Notch1 aufgrund seiner Beteiligung an zahlreichen Prozessen der Embryonalentwicklung das am besten untersuchte Protein (Weinmaster und Kitner, 2003). Das Gen Notch1 wird in Organen aller drei Keimblätter exprimiert: In der frühen Mausentwicklung u.a. während der Gastrulation im Primitivstreifen, während der Somitogenese im präsomitischen Mesoderm (PSM), in differenzierenden Endothelialzellen und im sich entwickelnden Nervensystem (Lieber et al., 1992).

Notch1-defiziente Mäuse sterben während der Embryonalentwicklung am Tag 9.5 mit Defekten in den Somiten und des vaskulären Systems, was auf eine entscheidende Rolle von Notch1 für die frühe Embryonalentwicklung hinweist. Für einen lebensfähigen murinen Embryo sind sowohl Notch1 als Notch2 notwendig. Die Expressionen der beiden Gene überlappen im PSM und Null-Allele zeigen schwere Defekte in der Somitenanordnung, was die Bedeutung des Notch-Signalwegs für die Somitogenese verdeutlicht (Shimizu et al., 1999; Krebs et al., 2000). Das Ausschalten der Gene Notch3 und Notch4 führt zu keinen anormalen embryonalen Phänotypen (Krebs et al., 2000; Krebs et al., 2003).

In der Proteinstruktur des Notch-Rezeptors (Abb. 1.2) weist die Extrazellulärdomäne 29-36 "Epidermal growth factor (EGF)"-ähnliche Tandem-Wiederholungen, drei Cystein-reiche Lin12/Notch-(LNR)-Wiederholungen und eine Heterodimerisierungsdomäne auf. Die EGF-Motive fördern in Abhängigkeit von Calcium die Homodimerisierung des Rezeptors und sind maßgeblich an der Ligandenbindung beteiligt. In *Drosophila* sind die beiden EGF-Motive 11 und

12 für die Interaktion mit den Liganden als notwendig und hinreichend beschrieben worden (Rebay et al., 1991). Die EGF-Motive sind außerdem Substrate für die Glykosylierung durch Pofut1 und Fringe, die auf diese Weise die Affinität des Rezeptors zu den Liganden regulieren (siehe Abschnitt 1.7). Mit Hilfe der Lin12/Notch-(LNR)-Wiederholungen wird die Heterodimerisierung des Rezeptors ermöglicht und eine Aktivierung in Liganden-Abwesenheit verhindert (Abb. 1.2; Lieber et al., 1993; Fehon et al., 1990; Shaye und Greenwald, 2002).

Die für die Weiterleitung des Signals verantwortliche NICD besitzt in unmittelbarer Nähe zur Transmembrandomäne eine "RBPJK-assozierte-Molekül (RAM)-Domäne, sieben hintereinanderangeordnete Ankyrin-Wiederholungen (ANK), die von zwei Kernlokalisationsignalen (NLS) flankiert werden, eine PEST (Prolin-Glutamat-Serin-Threoninreiche)-Sequenz, und mit Ausnahme von Notch4 eine Transaktivierungsdomäne (TAD). Die RAM-Domäne interagiert zusammen mit den Ankyrin-Wiederholungen im Kern mit dem CSL-Transkriptionsfaktor (Tamura et al., 1995; Kato et al., 1997). Die PEST-Sequenz ist an der Regulation der Halbwertszeit des Proteins beteiligt. Die TAD-Domäne ist für die Rekrutierung transkriptioneller Aktivatoren wie die Mastermind-ähnlichen (MAML) Proteine und den Histon-Acetyltransferase-Komplex (HAT) verantwortlich (Kurooka et al., 1998; Tani et al., 2001; Struhl, 1999).

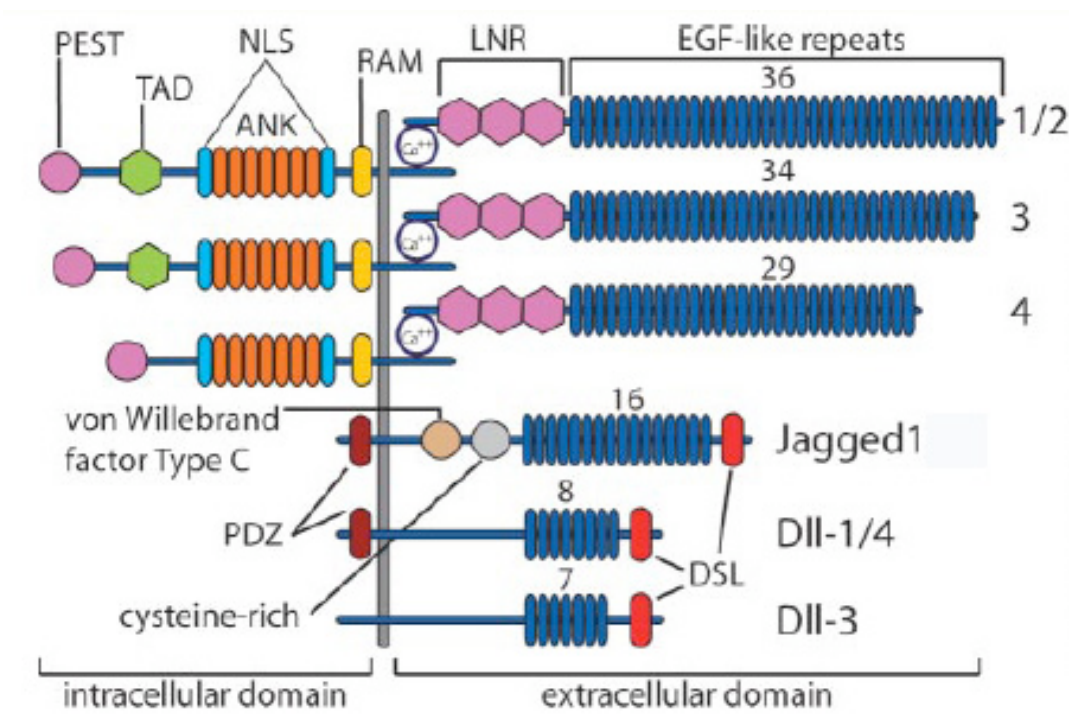


Abb. 1.2: Die Notch-Rezeptoren und DSL-Liganden (Niessen und Karsan, 2007). In Vertebraten finden sich 4 Notch-Rezeptoren (1-4) und 5 Liganden (Jagged1/2, Delta-like (Dll) 1/3/4). Die Rezeptoren liegen als Heterodimere vor. Der N-terminale Bereich des Notch-Rezeptors besitzt ein Signalpeptid, gefolgt von 29-36 "Epidermal Growth Factor (EGF) like Repeats", die als Liganden-Bindedomänen agieren und "LIN12/Notch-Repeats (LNR)", die eine Signalweiterleitung in Abwesenheit eines Liganden verhindern. Der intrazelluläre Teil (NICD) beinhaltet die RAM-Domäne, eine Reihe von "Ankyrin-Repeats" (ANK), die im Kern mit CSL/RBPJ- κ interagieren können; zwei Kernlokalisations-Signale (NLS), eine Transaktivierungsdomäne (TAD) und eine c-terminale PEST-Sequenz, die für die Regulation der Proteinstabilität verantwortlich ist. Die Notch-Liganden sind ebenfalls Typ I Transmembranproteine. Allen Liganden gemeinsam ist die Delta/Serrate/Lag2 (DSL) Domäne und zahlreiche EGF-ähnliche Wiederholungen. Die Jagged Proteine besitzen in ihrem extrazellulären Bereich zusätzlich eine cysteinreiche Domäne sowie eine "von Willebrandt Faktor Typ C"-Domäne. Die intrazellulären Domänen von Jagged1, Dll1 und Dll4 weisen zusätzlich ein PDZ-Motiv auf.

1.3.2 Die DSL-Liganden

Von den fünf in Vertebraten beschriebenen Notch-Liganden werden Dll1, Dll3 und Jagged1 während der Embryonalentwicklung im präsomitischen Mesoderm exprimiert. Bei gezielter Inaktivierung der Dll1- und Dll3-Gene zeigen sich in den Mutanten schwere Defekte in den Somiten, während hingegen Jagged1-defiziente Mäuse keinerlei Defekte in der Somitenentwicklung zeigen. Jagged1 und Dll4 spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des vaskulären Systems, Jagged2 teilweise für die Ausbildung der Extremitäten, der Schädelbasis und des Thymus (Jiang et al., 1998; Krebs et al., 2004; Valsecchi et al., 1997; Xue et al., 1999).

Die Proteinstruktur der Liganden zeigt im extrazellulären Teil eine N-terminale Region für die Rezeptorbindung, ähnlich zum Notch-Rezeptor EGF-ähnliche Wiederholungen (Dll 6-8, Jagged1/2 16) und eine für diese Ligandenfamilie charakteristische DSL Domäne (Delta, Serrate, Lag2) (Abb. 1.2). An der Bindung des Liganden an den EGF-Wiederholungen 11 und 12 des Notch-Rezeptors sind sowohl die EGF-ähnlichen Motive, als auch die DSL Domäne der Liganden beteiligt, wobei die DSL Domäne *in vitro* die wichtigste minimale Einheit für die Bindung darstellt und die EGF-Motive 1 und 2 die Interaktion substantiell stabilisieren (Shimizu et al., 1999; Lieber et al., 1992; Muskavitch, 1994; Fitzgerald und Greenwald, 1995; Henderson et al., 1994). Daneben spielen die EGF-Domänen noch eine wichtige Rolle für die Homodimerisierung und sind ähnlich wie der Notch-Rezeptor Substrate für die Glykosylierung (Panin et al., 2002; Sakamoto et al., 2005).

Jagged1 und 2 enthalten zusätzliche EGF-Wiederholungen sowie eine cysteinreiche Region und eine "von Willebrand Faktor Typ C" Domäne, die eine Rolle für die Liganden-Dimerisierung spielt. Die cysteinreiche Region ist an der Auswahl eines spezifischen Notch-Rezeptors durch die Liganden beteiligt (Fleming, 1998; Luo, 1997; Sakamoto et al., 2005).

Die intrazellulären Bereiche der Liganden sind im Vergleich zu den Notch-Rezeptoren relativ kurz (100-150 AS) und weisen keine einheitliche Struktur auf. Innerhalb des gleichen Ligandentyps sind die Intrazellulärdomänen stark konserviert, während sich die verschiedenen Ligandentypen darin untereinander stark unterscheiden (Pintar et al., 2007).

Ähnlich wie die Notch-Rezeptoren werden auch einige Liganden proteolytisch durch ADAM-Metalloproteasen und den γ -Secretase-Komplex gespalten und die intrazelluläre Domäne (ICD) freigesetzt (Six et al., 2003; LaVoie und Selkoe, 2003). Weiterhin sind für die Liganden Dll1 und Dll2 Kernlokalisierungssignale vorhergesagt, und die ICD von Dll1 ist im Kern und in Interaktion mit nukleären Faktoren nachgewiesen worden (Hiratochi et al., 2007; Ikeuchi und Sisodia, 2003; Six et al., 2003). Durch eine mögliche Beteiligung der ICD der Liganden an der transkriptionellen Aktivierung im Kern ist somit eine bidirektionelle Signalweiterleitung für den Notch-Signalweg möglich. Die genaue Bedeutung und die Notwendigkeit der Funktion der ICD sind noch ungeklärt, und zahlreiche Studien zeigen gegensätzliche Ergebnisse: In Experimenten in *C.elegans* reichen die sekretierten extrazellulären Domänen der Liganden für eine Notch-Aktivierung aus und fungieren wie natürliche Liganden, während in *Drosophila* transmembranäre und lösliche Liganden koexistieren (Chen et al., 2004; Klueg et al., 1998; Qi et al., 1999). Studien mit Liganden, in denen der Verlust der ICD zu dominant-negativen Effekten führt, zeigen, dass die ICD der Liganden eine wichtige Funktion ausüben kann (Sun und Artavanis-Tsakonas, 1996 und 1997; Hukriede et al., 1997).

Dll1, Dll4 und Jagged1 besitzen zusätzlich am C-Terminus ihrer ICD eine PDZ (Post-synaptic density-95/Discs large/Zonula occludentes-1)-Domäne, die Proteine für die Organisation von Zell-Zell-Kontakten enthält. Dll3 und Jagged2 besitzen keine PDZ-Domäne in ihrer ICD. Die Unterschiede zwischen den Liganden zeigen sich auch bei der Interaktion mit verschiedenen Proteinpartnern. Jagged1 interagiert mittels der PDZ-Domäne mit dem Ras-bindenden Protein Afadin (AF6) (Hock et al., 1998; Ascano et al., 2003). Dlg1, das humane Homolog des *Drosophila* Discs Large Protein wurde als Bindungspartner von Dll1 und Dll4 nachgewiesen (Six et al., 2004), wobei Dll1 und Dll4 Dlg1 an Zell-Zell-Kontakten rekrutieren, was die Zellmotilität

reduziert. Andere Studien zeigten Interaktionen zwischen Dll1 und Mitgliedern der Scaffold Protein MAGI-Familie (*Membrane Associated Guanylate Kinases with Inverted domain arrangement*) für die das PDZ-Bindungsmotiv, wie in Deletionsstudien gezeigt, essentiell ist (Wright et al., 2004; Pfister et al., 2003). Die Liganden sind daher in der Lage mittels des PDZ-Motivs unterschiedliche Proteine zu binden. Für die liganden-abhängige Aktivierung des Notch-Signalwegs scheint diese PDZ-Domäne aber nicht essentiell zu sein, da eine Proteinvariante des DeltaD aus Zebrafisch deren PDZ-Motiv nicht mehr bindet als normaler Ligand Notch aktiviert (Wright et al., 2004).

Alle DSL-Liganden, mit Ausnahme von Dll3, sind Aktivatoren des Notch-Signalwegs. Neben dieser positiven Funktion wird auch gezeigt, dass die Liganden die Notch Signalkaskade dominant-negativ inhibieren, wenn sie in *cis* (in derselben Zelle) wie der Notch-Rezeptor exprimiert werden. Der exakte Mechanismus für diese Inhibierung ist allerdings noch ungeklärt (Dunwoodie et al., 1997; de Celis und Bray, 2000).

1.4 Delta-like 1 (Dll1) in der Maus

1.4.1 Die Genfunktion von Dll1

Der Ligand Delta-like (Dll1) als Homolog von Delta aus *Drosophila* wird in der Embryonalentwicklung der Maus in einem komplexen und dynamischen Muster während der Gastrulation und frühen Organogenese in verschiedenen Geweben und Organanlagen exprimiert, u.a. im PSM und im zentralen Nervensystem (Bettenhausen et al., 1995; Jouve et al., 2000). Der entscheidende Einfluß von Dll1 für die Somitogenese wird durch die gezielte Inaktivierung von Dll1 in der Maus deutlich. Somiten sind transiente paarige Strukturen, die sich im Laufe der Embryonalentwicklung aus dem paraxialen Mesoderm, das als mesenchymales Gewebe während der Gastrulation auf beiden Seiten des Neuralrohrs angelegt wurde, am kaudalen Ende des Embryos durch periodische Segmentierung bilden und zu Körper- und Gliedmaßenmuskulatur, Dermis und Teilen der Wirbelsäule (Rippen, Wirbelkörper, Wirbelbögen) differenzieren (Weinmaster und Kintner, 2003). Die periodische Segmentierung des PSM wird dabei durch eine Reihe komplexer Interaktionen von unterschiedlichen Signalen und einem molekularen Oszillator, der so genannten "Segmentierungs-Uhr" reguliert. Der Notch-Signalweg spielt für diese eine zentrale Bedeutung, da für einige seiner Komponenten während der Somitogenese eine

zyklische Expression im PSM nachgewiesen wurde. Mäuse, die heterozygot für das Dll1-Null-Allel sind, zeigen mit unvollständiger Penetranz Fehlbildungen in den Wirbelkörpern, was auf eine Haploinsuffizienz von Dll1 hinweist (Cordes et al., 2004). In homozygoten mutanten Dll1 Embryonen werden schwere Defekte im paraxialen Mesoderm und Hyperplasien im zentralen Nervensystem beobachtet. Eine unvollständige Ausbildung der epithelialen Somiten und deren Somitengrenzen führen zu Fehlbildungen des von den Somiten abgeleiteten Myotoms und Sklerotoms, sowie einem vollständigen Verlust der anterior-posterioren Polarität, der mit Hilfe von Markern für die Somiten-Polarität (*Tbx18*, *Uncx4.1*) bestätigt werden kann. Dll1-defiziente Mäuse sterben ungefähr am Tag E12 der Embryonalentwicklung an hämorrhagischen Blutungen (Hrabe de et al., 1997; Bussen et al., 2004; Morales et al., 2002).

Die früheste Expression von Dll1 in der Maus wird am Tag E7.0 im Primitivstreifen und im paraxialen Mesoderm beschrieben und bleibt bis zum Ende der Somitogenese am Tag E12.5 erhalten (Beckers et al., 2000). In den Somiten ist die Expression von Dll1 auf die kaudalen Hälften und auf die Myotome der differenzierenden Somiten beschränkt (Bettenhausen et al., 1995). Im zentralen Nervensystem wird Dll1 ab Tag E8.0 der Entwicklung in den anterioren Neuralfalten des späteren Mittel- und Vorderhirns exprimiert, wobei sich ab Tag E9.5 die Expression auf das Neuralrohr ausdehnt, später auch in den kraniofazialen Ganglien, in den Neuralleistenzellen, in den Spinalnerven und den Spinalganglien nachgewiesen wird (Bettenhausen et al., 1995; Beckers et al., 1999). Im Nervensystem wird eine laterale Inhibierung in Zellen des Neuroektoderms beobachtet, in dem Zellen mit und ohne Dll1-Expression benachbart sind. Dll1 scheint an dieser Stelle für die Aufrechterhaltung des Zellschicksals der neuroepithelialen Vorläuferzellen und deren kontrollierte Differenzierung in neuronale Vorläufer verantwortlich zu sein (Appel und Eisen, 1998; Campos-Ortega, 1995; Chitnis et al., 1995; Lewis, 1998). Zusätzlich wird in der frühen Entwicklungsphase und während der Organogenese eine Expression von Dll1 im Mesoderm und den Tubuli des Mesonephrons und in verschiedenen Organanlagen, u.a. von Thymus, Niere, Lunge, Pankreas und serösen Drüsen detektiert (Bettenhausen et al., 1995). Eine persistierende Expression für Dll1 ist in den Skelettmuskelzellen und im Nervengewebe und außerdem in einigen Bereichen des sensorischen Epithels (u.a. Retina) nachweisbar (Beckers et al., 1999; Morrison et al., 1999). In adulten Tieren wird Dll1 u.a. im Herz und in der Lunge exprimiert (Bettenhausen et al., 1995; Jouve et al., 2000).

1.4.2 Das Protein DLL1

Die Dll1 cDNA enthält ein 2166 bp langes offenes Leseraster, das ein Transmembranprotein mit 722 AS codiert, welches dem Liganden DELTA (Dl) aus *Drosophila* strukturell sehr ähnlich ist. Die beiden Proteine weisen eine Sequenzidentität von 40% auf, die in einigen Bereichen der DSL-Domäne und EGF-Motive sogar Übereinstimmungen von bis zu 70% zeigt (Bettenhausen et al., 1995). Das Transmembranprotein durchspannt einmal die Membran. Die extrazelluläre Domäne aus 545 AS beginnt mit einem kurzen hydrophoben Signalpeptid, enthält 8 EGF-ähnliche Wiederholungen und eine DSL-Domäne. Die Intrazellulärdomäne von DLL1 enthält viele Lysine, am C-Terminus ein PDZ-Ligandenbindungsmotiv und weist mit anderen Proteinen keine Sequenzhomologien auf. Die an der Interaktion mit dem Notch-Rezeptor beteiligten acht EGF-Motive der extrazellulären Domäne von DLL1 weisen charakteristische Merkmale und Konsensussequenzen für posttranslationelle Modifikationen auf.

Die EGF-Wiederholungen sind kurze ca. 40-50 AS umfassende cystein-reiche Motive, die charakteristisch 6 konservierte Cysteine aufweisen, die spezifisch drei Disulfidbrücken ausbilden und die Proteindomäne auf diese Weise stabilisieren: Cys¹- Cys³, Cys²- Cys⁴ und Cys⁵- Cys⁶ (Campbell et al., 1993; Lu und Stanley, 2006). Die EGF-Domänen 4 und 7 von DLL1 zeigen Konsensussequenzen für die Bindung von Calcium, die für die Stabilität gegenüber proteolytischen Spaltungen wichtig ist. Durch den Austausch von Cystein-Resten innerhalb calciumbindender EGF-Motive wird die Proteinfaltung gestört, die Proteinstabilität und Protein-Interaktionen verändert. Die EGF-Motive von DLL1 weisen spezifische Konsensussequenzen für die Modifizierung durch O-Fucose-Glykane und N-Glykane auf (Haltiwanger und Lowe, 2004; Xia et al., 2004). O-Fucose wird an die Hydroxylgruppen von Serin-(S) und Threonin (T) spezifischer Konsensussequenzen angefügt. Die EGF-Motive 2, 3, 4 und 8 besitzen zwischen dem zweiten und dritten konservierten Cystein die allgemeine Konsensussequenz C²X₃₋₅(S/T)C³ und die EGF-Domäne 7 die sogenannte begrenzte Fucosylierungssequenz C²XXGG(S/T)C³, wobei X für jede beliebige Aminosäure steht (Panin et al., 2002). Das EGF-Motiv 7 von DLL1 beinhaltet zusätzlich eine Konsensussequenz für die N-Glykosylierung, N-X-(S/T), in der die Bindung des Zuckers an den Stickstoff der freien Säureamidgruppe von Asparagin (N) erfolgt.

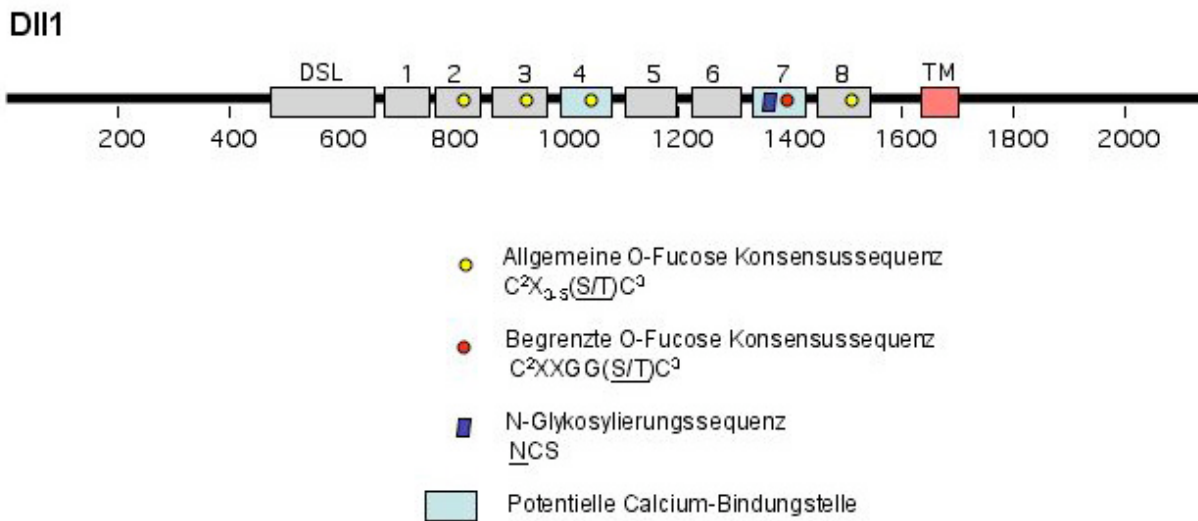


Abb. 1.3: Die Lage der Konsensussequenzen für die O-Fucosylierung und N-Glykosylierung innerhalb der EGF-Motive der extrazellulären Domäne von DLL1 in der Maus. Die EGF-Motive 2, 3, 4 und 8 tragen zwischen dem zweiten und dritten konservierten Cystein (C^2, C^3) die allgemeine Fucosylierungssequenz $C^2X_{3,5}(S/T)C^3$ und die EGF-Domäne 7 sowohl die begrenzte O-Fucosylierungs-Konsensussequenz $C^2XXGG(S/T)C^3$, als auch die N-Glykosylierungssequenz NCS. Für die Bindung von Calcium sind Konsensussequenzen in den EGF-Motiven 4 und 7 nachgewiesen worden. X steht für jede beliebige Aminosäure, C für Cystein, G für Glycin, S für Serin, T für Threonin und N für Asparagin. Die Akzeptoraminosäuren sind jeweils unterstrichen.

1.5 Die Regulation des Notch-Signalwegs

Obwohl der Notch-Signalweg nur wenige Komponenten aufweist, mit denen die Signalweiterleitung erfolgt, ist aufgrund der zentralen Rolle für Musterbildungs- und Differenzierungsprozesse während der Embryonalentwicklung und in adulten Organismen eine komplexe und stringente Regulation notwendig.

Die Aktivität des Signalwegs kann dabei auf unterschiedlichen Ebenen reguliert werden: Unterschiedliche Verfügbarkeiten und Affinitäten des Rezeptors und der Liganden, verschiedene Arten der Interaktionen zwischen diesen, kovalente Modifikationen wie Glykosylierung, Ubiquitinierung und Phosphorylierung und unterschiedliche Transportwege des Rezeptors oder der Liganden mittels Endocytose (Baron et al., 2002; Le Borgne et al., 2005).

Regulation der Aktivität der DSL-Liganden

Kompetitive Effekte durch lösliche Liganden

Lösliche Formen der Liganden Dll1 und Jagged können sowohl als Agonisten wie Antagonisten auf den Notch-Signalweg wirken. *In vitro* muß für die Bindung der Liganden an den Rezeptor eine Multimerisierung der löslichen Liganden stattfinden, deren Bindung dann abhängig vom Grad der Vernetzung aktivierend oder dominant-negativ auf die Notch-Aktivität wirkt. Der genaue Mechanismus, wie die Liganden-Bindung die Aktivierung positiv oder negativ beeinflusst, ist noch ungeklärt. *In vivo* sind beide Wirkungen der löslichen Liganden in *Drosophila* und *C. elegans* beobachtet und als Ursache der Blockierung des Signalwegs eine mögliche Konkurrenz zwischen löslichen und membranständigen Liganden um die Rezeptorbindung diskutiert worden (Shimizu et al., 2002; Hicks et al., 2002; Sun und Artavanis-Tsakonas, 1997; Qi et al., 1999).

Endocytose der Liganden

Die Endocytose der Liganden wirkt als positiver Regulator für den Notch-Signalweg, da diese als "ziehende kraft" auf die Notch-Extrazellulärdomäne (NECD) die Dissoziation des Notch-Heterodimers fördert und zur Entfernung des Liganden von der Zelloberfläche führt. Die Liganden-NECD-Komplexe dissoziieren in endocytotischen Vesikeln und der Ligand kehrt zur Zelloberfläche zurück, während die NECD internalisiert bleibt und abgebaut wird. Die Transendocytose der NECD in die Liganden-exprimierende Zelle induziert eine Konformationsänderung in der juxtamembranen Region des Rezeptors, wodurch die S2-Spaltstelle freigelegt wird. Anhand von *Drosophila shibire* (Dynamin) Mutanten, deren Endocytose inhibiert ist, wird die Notwendigkeit der dynamin-abhängigen Endocytose für den Notch-Signalweg gezeigt (Poodry, 1990; Parks et al., 2000; Seugnet et al., 1997; Chitnis et al., 2006).

Ubiquitinierung

Ubiquitin als konserviertes 76-AS-Polypeptid wird in einem dreistufigen Prozeß kovalent mit dem Proteinsubstrat verbunden, wobei die Ubiquitin-Protein-Ligase (E3 Ligase) das Substrat spezifisch erkennt und den Transfer katalysiert. Ursprünglich als Proteinmarkierung für den

Abbau durch das 26S Proteasom entdeckt, dient es zugleich auch als Signal für die Endocytose, endocytose-abhängige Membranprozesse und die Proteinsortierung in *Multivesicular bodies (MVBs)* (Le Borgne et al., 2005). Mit Hilfe der Ubiquitinierung durch E3 Ligasen wird die Aktivität der Liganden reguliert, in dem sie diese für die Endocytose und den intrazellulären Vesikeltransport markieren. Durch einen noch ungeklärten Mechanismus wird so mittels Ubiquitinierung die Notch-Aktivierung in der Signal-empfangenden Zelle positiv durch die Regulation der Liganden-Endocytose in der Signal-sendenden Zelle beeinflusst. Die Ubiquitinierung induziert außerdem durch die Endocytose des Liganden-NECD-Komplexes eine Konformationsänderung im Rezeptor mit Freilegung der S2-Spaltstelle (siehe Endocytose), sowie eine mögliche Vernetzung der Liganden in Mikrodomänen und deren Prozessierung vor der Oberflächenpräsentation in intrazellulären Vesikeln (Chitnis, 2006; Wang und Struhl, 2005; Parks et al., 2000).

Die E3 Ubiquitin Ligasen *Neuralized (Neu)* und *Mind bomb (Mib/Dmib)* aus *Drosophila*, *Xenopus* und Zebrafisch sind direkte Interaktionspartner der Liganden und regulieren deren Aktivität. Die Inaktivierung der Ligasen führt zu einer Akkumulation inaktiver Liganden auf der Zelloberfläche, was auf eine mögliche Erforderlichkeit der Ligasen für die Liganden-Aktivität und deren Degradation hinweist (Wang und Struhl, 2004; Le Borgne et al., 2005; Pavlopoulos et al., 2001).

Cis-Inhibierung

Cis-Interaktionen zwischen dem Notch-Rezeptor und einem Liganden innerhalb derselben Zelle führen nicht zu einer autokrinen Aktivierung des Rezeptors, sondern bewirken einen dominant negativen Effekt, der auch als zell-autonome Inhibierung bezeichnet wird, da eine Bindung von Liganden benachbarter Zellen an den Rezeptor verhindert wird. Der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt, aber Studien in *Drosophila* geben erste Hinweise, dass die für die Inhibition verantwortliche Rezeptor-Liganden-Interaktion an der Zelloberfläche stattfindet. Die Inhibition wird dabei durch Liganden, deren Endocytose inhibiert wird und Notch auf der Zelloberfläche akkumulieren, verstärkt. Umgekehrt wird sie verringert, wenn die Liganden durch Modifikationen im sekretorischen Transportweg festgehalten werden und nicht die Zelloberfläche erreichen (Glittenberg et al., 2006).

Regulation der Aktivität des Notch-Rezeptors

Modifikation der Rezeptor-Liganden Interaktion mittels Glykosylierung

Die Aktivität des Notch-Rezeptors wird u.a. durch die Modifizierung der extrazellulären Domäne mit O-Fucose-Glykanen reguliert (Panin et al., 1997; Irvine, 1999). Die Übertragung von Fucose an Serin- und Threonin-Reste spezifischer Konsensussequenzen in einigen EGF-Motiven wird durch *Protein-O-Fucosyltransferase 1* (*Pofut1*, Ofut in *Drosophila*) im ER katalysiert. Eine Verlängerung der O-Fucose-Struktur erfolgt durch Anheftung von N-Acetylglycosamin durch die β -1,3,-N-Acetylglycosaminyltransferase *Fringe* (*Lunatic*, *Maniac* und *Radical Fringe* in Vertebraten) im Golgi-Apparat. Durch die Glykosylierung des Notch-Rezeptors wird seine Affinität zu den Liganden verändert. Mit Hilfe der Wirkung von *Lfng* wird so die Notch-Aktivierung durch Liganden der Delta-Familie verstärkt und die der Serrate/Jagged Familie verringert (Bruckner et al., 2000; Hicks et al., 2000; Moloney et al., 2000; Munro und Freeman, 2000; de Celis und Bray, 2000). Die gezielte Inaktivierung von *Pofut1* in Mäusen führt zum Verlust der Notch-Aktivität und verdeutlicht die Notwendigkeit der O-Fucosylierung für den Notch-Signalweg (Shi und Stanley, 2003). Die Bedeutung der Glykosylierung für Notch1 und seine Liganden wird ausführlich in Abschnitt 1.7 beschrieben.

Regulierte Degradation von Notch1

Die durch den Notch-Signalweg induzierte Transkription der Zielgene muß gezielt und dynamisch erfolgen, um eine hohe Sensitivität der Signalweiterleitung zu gewährleisten. Ein schneller Abbau der NICD wird durch die Rekrutierung von negativen Regulatoren durch Proteine des Ko-Aktivator Komplexes erreicht. Als solcher bewirkt *Sel-10* (*Suppressor/Enhancer of lin-12*) eine Phosphorylierungs-abhängige Ubiquitinierung und den anschließenden proteosomalen Abbau der nukleären phosphorylierten NICD (Hubbard et al., 1997; Oberg et al., 2001; Wu et al., 2001).

Regulation der Rezeptoraktivität mittels Ubiquitinierung

Die Aktivität des Notch-Rezeptors wird ebenso wie die Aktivität der Liganden durch Endocytose und Ubiquitinierung beeinflusst. Mit Hilfe mehrerer E3 Ubiquitin Ligasen wird der Notch-Signalweg durch Ubiquitinierung des Rezeptors und Proteasomen-abhängiger Degradation

herunterreguliert. Eine Verstärkung ergibt sich dagegen durch die Inhibition des Abbaus und den Transport des Rezeptors zu intrazellulären Kompartimenten, in denen er mit Elementen der Signaltransduktionsmechanerie (z.B. dem γ -Sekretasekomplex) zusammentrifft (Seugnet et al., 1997).

Die E3 Ubiquitin Ligasen *Su(dx)* (*suppressor of deltex*) und *Itch* aus der Nedd4-Familie binden an den N-terminalen Teil der NICD und induzieren deren Abbau (Qiu et al., 2000; Chastagner et al., 2008). Das cytoplasmatische Protein Numb bewirkt ebenfalls den Abbau von NICD und bindet diese als Adapterprotein neben alpha-Adaptin als Untereinheit des AP2-Komplexes, der an der Rezeptor-vermittelten Endocytose beteiligt ist (Berdnik et al., 2002, Santolini et al., 2000). Numb kann wiederum von Lnx, einer weiteren E3 Ubiquitin Ligase, ubiquitiniert werden, so dass durch den Abbau von Numb die Notch-Signalgebung verstärkt und die negative Regulation aufgehoben wird (Nie et al., 2002). Durch Unterdrückung der Notch-Signaltransduktion beeinflusst Numb asymmetrische Zellteilungen und Zellschicksalsentscheidungen (Lu et al., 1998). In Mäusen kommt es während der Entwicklung des peripheren Nervensystems zu einer asymmetrischen Verteilung von Numb auf die Tochterzellen und zu unterschiedlichen Zellschicksalen, da in Zellen mit Numb durch die Unterdrückung des Signalwegs die neuronale Differenzierung induziert wird (Shen et al., 2002).

Deltex (*Dtx*), als vorwiegend cytoplasmatisch lokalisiertes Protein, wirkt als positiver Regulator verstärkend auf die Notch1-Signalgebung und ist an der Liganden- und CSL-unabhängigen Form des Signalwegs beteiligt (Hori et al., 2004). Eine Überexpression des Proteins führt zur Stabilisierung von Notch1 in intrazellulären Vesikeln und einer Inhibition des Notch-Abbaus antagonistisch zur Wirkung von *Su(dx)* und *Nedd4*. Durch einen gezielten Transport von Notch zu späten Endosomen oder Rab-11 positiven Recycling-Endosomen, kann Notch1 in diesen unabhängig von Liganden- und einem CSL-Komplex funktionieren (Matsuno et al., 1995; Romain et al., 2001). Neben der Rolle als positiver Regulator in *Drosophila* kann Deltex in anderen Spezies die Notch Signalgebung unter bestimmten Umständen auch hemmen (Sestan et al., 1999; Izon et al., 2002).

1.6 Durch fehlerhafte Notch-Signalgebung ausgelöste Krankheitsbilder

Der Notch-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle für die Entwicklung vieler Gewebe und Organe, so dass Mutationen des Rezeptors, der Liganden und/oder eine abnorme Signalgebung im Tiermodell häufig zu starken Störungen oder dem Abbruch der Embryonalentwicklung führen und beim Menschen daher häufig mit der Entstehung von Krankheiten und Krebs verbunden sind (Joutel et al., 1996; Li et al., 1997).

Aufgrund seiner Beteiligung an einer T-Zell Leukämie wurde humanes Notch1 zuerst als translokations-assoziiertes Notch Homolog 1 (TAN-1) beschrieben. Durch eine chromosomale Translokation innerhalb eines Notch1 Introns wird das 3'-Ende von Notch an die J β -Region des T-Zell Rezeptors β (TCR- β) fusioniert, wodurch Transkripte codiert werden, die nur noch die ICD von Notch1 enthalten. Die resultierende verkürzte konstitutiv aktive Variante von NOTCH1 wird in einer Untergruppe von akuter T-Zell lymphoblastischer Leukämie (T- ALL) gefunden (Ellisen et al., 2002). In Mäusen wird eine T-Zell Leukämie durch die provirale Integration von *Moloney murine leukaemia virus (MuLV)* in das Notch1 Gen verursacht, so daß die intrazelluläre Domäne von NOTCH1 unter dem Einfluß eines viralen Promoters überexprimiert wird (Girard et al., 1996). In Mäusen wird außerdem eine Beteiligung von NOTCH1 an epithelialen Tumoren beschrieben (Dievart et al., 1999). Die Integration eines *Mouse mammary tumor virus (MMTV)* in den Locus von Notch1 führt zur Expression der NOTCH-ICD, was die Entwicklung von Brust-Tumoren in diesen Mäusen auszulösen scheint. Neben den Hinweisen auf einen Zusammenhang zwischen der Störung der Notch-Funktion und der Entstehung von Tumoren durch eine konstitutive Aktivierung von Notch, zeigt sich abhängig von der zellulären Situation auch eine mögliche Funktion als Tumor-Suppressor, da Deletionen von Notch1 in der Epidermis zur Entwicklung von Tumoren der Haut führen können (Nicholas et al., 2003).

Durch Mutation im Notch3 Gen wird eine cerebrale autosomal dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie (CADASIL) verursacht, was die häufigste hereditäre Ursache von Schlaganfällen darstellt und auf Fehlbildungen der arteriellen glatten Muskulatur zurückzuführen ist, in der NOTCH3 hauptsächlich exprimiert wird (Joutel und Tournier-Lasserre, 1998). Punktmutationen (Deletion oder Addition) in den cysteinreichen EGF-Abschnitten des Rezeptors verhindern die Ausbildung von Disulfid-Brücken und stören somit die Proteinfaltung (Joutel et al., 1997). In transgenen Mäusen führt durch einen Ick Promotor

bewirkte Überexpression von intrazellulärem NOTCH3 zur Entwicklung von T-Zell Lymphomen (Bellavia et al., 2000). Das autosomal dominant vererbte Alagille Syndrom wird durch Mutationen im extrazellulären Bereich von JAGGED1 verursacht und führt zu Fehlbildungen im Bereich der Leber sowie des Herzens, des Skelettes und der Augen (Li et al., 1997; Oda et al., 1997; Crosnier et al., 2001; Colliton et al., 2001). Daneben wird auch eine “missense“ (nicht synonyme) Mutation von JAGGED1 mit einer vererbaren Form von Taubheit in Verbindung gebracht (Le Caignec et al., 2002). Patienten mit spondylokostaler Dysostose zeigen unterschiedliche Skelettfehlbildungen, u.a Fusionen von Wirbeln und Rippen, hervorgerufen durch Mutationen im Gen des Notch-Liganden Dll3 (Dunwoodie et al., 2002; Sparrow et al., 2002).

1.7 Die Glykosylierung als Regulator des Notch-Signalwegs

Wie bereits unter 1.5 beschrieben sind O-Fucose-Glykane auf den Notch-Rezeptoren wichtige Modifikationen, die entscheidend zur Regulierung des Notch-Signalwegs beitragen.

O-Glykosylierung der EGF-Domänen von Notch und seinen Liganden

O-Glucose und O-Fucose sind erstmals auf EGF-Domänen von Serumglykoproteinen entdeckt worden (Wang et al., 2001). Bei der Expression von NOTCH in Säugerzellen weist die extrazelluläre Domäne Glykosylierungen von N-Glykanen, O-Fucose- und O-Glucose-Glykanen auf, die an spezifischen Konsensussequenzen innerhalb der EGF-Motive angefügt werden und in allen Notch-Rezeptoren zu finden sind (Johansen et al., 1989; Moloney et al., 2000; Panin et al., 2002). Die Rolle der N-Glykane für den Notch-Signalweg ist noch weitgehend ungeklärt. Mutante Mäuse mit einer Defizienz an N-Glykanen weisen keine Defekte für den Signalweg in der Embryonalentwicklung auf (Haltiwanger und Lowe, 2004; Xia et al., 2004). Die Protein-O-Glykosylierung ist eine seltene Modifikation, die nur in EGF-Domänen von wenigen Proteinen, darunter die Blutgerinnungsfaktoren VII und IX, Protein Z, Thrombospondin, Notch und die Delta-like gefunden wird (Shao et al., 2002). Obwohl für diese Proteine eine O-Glykosylierung in Zellextrakten verschiedener Spezies bestätigt ist, sind für die meisten noch keine Glycosyltransferasen identifiziert worden. Der Notch-Rezeptor wird an Serin-Resten zwischen dem ersten und zweiten konservierten Cystein der EGF-Domänen an der Konsensussequenz C¹XSXPC² O-glykosyliert und liegt entweder als Mono- oder Trisaccharid vor. Die Struktur des Trisaccharids von NOTCH1 aus CHO-Zellen ist noch unbestimmt, es wird aber eine Ähnlichkeit mit der aus dem Blutgerinnungsfaktor IX gefundenen, Xylose α 1,3 Xylose α 1,3 Glucose, vermutet (Moloney et al., 2000; Haines und Irvine, 2003; Shao et al., 2002). In einer aktuellen Studie wird erstmals die O-Glykosylierung des Notch1-Rezeptors in *Drosophila* als möglicher Regulator für den Signalweg beschrieben. Eine Null-Mutante der Glycosyltransferase *Rumi* in *Drosophila* S2-Zellen zeigt einen temperaturabhängigen Verlust des Notch-Signalwegs und damit einhergehende Phänotypen: Die Abwesenheit von Rumi bei 25°C führt zum Tod der Fliegen im Larvenstadium, während bei 18°C mildere Defekte zu beobachten sind (Acar et al., 2008). Die vom *Drosophila Rumi* Gen codierte Glycosyltransferase glykosyliert NOTCH1 im ER. Ein Verlust dieser Glykosylierung scheint die Zelloberflächenexpression und die DELTA-

Bindung von NOTCH nicht zu reduzieren, dagegen die Proteinfaltung zu beeinträchtigen, so dass die essentielle Konformationsänderung des Rezeptors nach Ligandenbindung für die Freilegung der proteolytischen Spaltstelle S2 verhindert wird. Bei geringer Temperatur (18°C) wird von einer langsameren Proteinfaltung und als Folge noch von einer teilweisen Aktivierung des Signalwegs ausgegangen, was den mildereren Phänotyp erklärt (Acar et al., 2008).

Für die O-Fucose-Glykane auf dem Notch-Rezeptor und seinen Liganden sind zwei verschiedene Konsensussequenzen bekannt, die zwischen dem zweiten und dritten konservierten Cystein der EGF-Domäne liegen: Die begrenztere $C^2XXGG(S/T)C^3$ und die allgemeinere $C^2X_{3,5}(S/T)C^3$. Beim Sequenzvergleich der extrazellulären Bereiche von 15 Notch-Rezeptoren aus verschiedenen Spezies zeigt sich, daß die O-Fucosylierungsstellen sehr stark konserviert sind. Die Struktur des an NOTCH1 in CHO Zellen gebundenen Tetrasaccharids ist als Sialinsäure- α 2,3-Galaktose- β 1,4-N-Acetylglucosamin- β 1,3-Fucose identifiziert (Moloney et al., 2000; Schiffer et al., 2001; Panin et al., 2002). Zusätzlich sind auch Glykosyltransferasen, die in der Synthese von Glycolipiden involviert sind, für den Notch-Signalweg essentiell, wahrscheinlich als indirekter Effekt der Organisation von NOTCH als Membranglykoprotein (Chen et al., 2007). Die Inaktivierung von Glykosyltransferasen oder anderen Aktivitäten, die für die Synthese der O-Fucose-Glykane notwendig sind, zeigen Notch-Signalweg-Defekte in *Drosophila*, Zebrafisch, Seeigel und Vertebraten (Haines und Irvine, 2003; Appel et al., 2003; Peterson et al., 2005; Lu und Stanley, 2006).

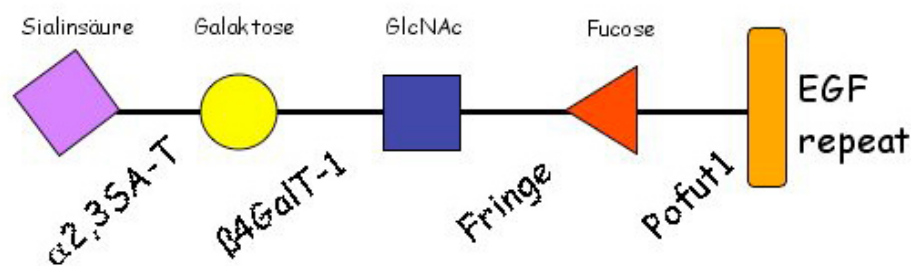


Abb. 1.4: Struktur der O-Fucose-Glykane auf Notch-Rezeptoren und Liganden (angepasst aus Lu und Stanley, 2006). O-Fucose wird durch POFUT1 von UDP-Fucose auf Serin- oder Threonin in spezifischen Konsensussequenzen innerhalb der EGF-Motive der Extrazellulärdomänen von NOTCH und seinen Liganden übertragen. Die EGF-O-Fucose-Glykane werden mittels Fringe verlängert, das den Transfer von N-Acetylglucosamin (GlcNAc) katalysiert. Anschließend erfolgt die Übertragung von Galaktose durch die β 1,4-Galaktosyltransferase (β 4GalT1) und Sialinsäure durch die α 2,3 Sialinsäuretransferase (α 2,3 SAT) zum Tetrasaccharid.

Die O-Fucosylierung durch Pofut1/Ofut1

Die Übertragung der Fucose erfolgt durch das Enzym *Protein O-Fucosyltransferase 1 (POFUT1, OFUT1 in Drosophila)* von GDP-Fucose als Donor auf die Serin-/Threoninreste der Konsensussequenzen. Das als Typ 2 Transmembranprotein identifizierte Enzym besitzt eine hohe Substratspezifität, da nur vollständig und korrekt gefaltete EGF-Domänen und keine synthetischen Peptide als Substrat akzeptiert werden. Sequenzanalysen zeigen, dass nur ein einziges Pofut1 Gen in Vertebraten und nur zwei weitere Homologe in *C. elegans* und *Drosophila* existieren (Wang et al., 1998; Wang et al., 2001).

Die ersten Hinweise zur Bedeutung der O-Fucosylierung für den Notch-Signalweg lieferten Studien in *Drosophila*, in denen die Biosynthese von GDP-Fucose ausgeschaltet oder die Ofut1-Expression durch RNA-Interferenz reduziert wurde, die beide einen Verlust des Notch-Signalwegs zeigen. Die resultierenden Phänotypen weisen schwere Defekte in der Embryonalentwicklung auf, die vergleichbar mit denen in Abwesenheit des Notch-Rezeptors sind. In Vertebraten führt die gezielte Inaktivierung des Pofut1 Gens zu embryonaler Letalität am Tag E9.5 mit schweren Defekten in der Somitogenese, Kardiogenese, Vaskulogenese und Neurogenese (Shi und Stanley, 2003). Das Ausmaß der Phänotypen in Mäusen und *Drosophila* deutet auf eine Schlüsselrolle für POFUT1 in der Regulation hin, da O-Fucose in diesen Spezies für nahezu alle Notch-Signalgebungsprozesse essentiell ist, dagegen eine Verlängerung der O-Fucose-Struktur durch FRINGE nur in bestimmten Zellkontexten benötigt wird (Oka et al., 1995; Donoviel et al., 1999; Shi und Stanley, 2003).

Die Expression von POFUT1/OFUT1 ist sowohl in Vertebraten als auch in *Drosophila* streng reguliert und erfolgt auf transkriptioneller Ebene (Okajima et al., 2002; Shi und Stanley, 2003; Wang et al., 2001). Das Pofut1 Gen wird in Mäusen verstärkt während der Embryonalentwicklung exprimiert. *In situ* Hybridisierungen zeigen eine ubiquitäre Expression in Embryonen am Tag E11.5 der Embryonalentwicklung und in allen adulten Mausgeweben (Shi und Stanley, 2002). Eine Überexpression von OFUT1 in *Drosophila* bewirkt eine Inhibierung der induzierenden Wirkung des Notch-Signalwegs und der lateralen Inhibition, so daß die verstärkte Expression sowohl einen positiven wie auch negativen Effekt auf die Signalgebung hat (Sasamura et al., 2003; Okajima et al., 2003).

Für OFUT1 ist in *Drosophila* neben der Rolle der Glycosyltransferase noch eine glycosyltransferase-unabhängige Aktivität beschrieben worden, die für den Transport zur

Zelloberfläche verantwortlich ist (Abb. 1.6 Modell 1; Okajima et al., 2003). Hierfür sind die Interaktionen von NOTCH und den Liganden in An- und Abwesenheit von OFUT1 in *Drosophila* S2 Zellen mit einer löslichen Form von NOTCH untersucht worden. S2 Zellen zeichnen sich dabei durch eine fehlende Expression von FRINGE und eine geringe endogene OFUT1-Expression aus. Die Bindung von löslichem NOTCH, das mit alkalischer Phosphatase verlinkt ist (N-AP), an DELTA- und SERRATE-exprimierende S2-Zellen kann auf diese Weise analysiert werden (Okajima et al., 2003). In Abwesenheit von OFUT1 bindet N-AP nicht an die Liganden-exprimierenden Zellen und N-AP wird nur gering sekretiert. Eine anschließende Überexpression von OFUT1 in diesen Zellen bewirkt, dass N-AP wieder sekretiert wird und verstärkt Liganden bindet. Den gleichen Effekt auf die Sekretion und Ligandenbindung von N-AP zeigt die Überexpression einer mutanten murinen POFUT1 Proteinvariante, der die Glycosyltransferaseaktivität fehlt (POFUT1 R245A). Daneben ist in diesen Zellen eine direkte Bindung von OFUT1 an NOTCH nach Überexpression der beiden Proteine bestätigt und OFUT1 als essentiell für die stabile NOTCH-Oberflächenexpression beschrieben worden (Okajima et al., 2003 und 2005; Sasamura et al., 2007).

Die Ausschaltung des *Ofut1* Gens in Zellen von *Drosophila* Flügelscheiben durch RNA-Interferenz bewirkt eine intrazelluläre Akkumulation von NOTCH im ER (Okajima et al., 2005; Sasamura et al., 2007). Mit Hilfe einer transgenen Expression von POFUT1 R245A in OFUT1 defizienten Klonen kann die Oberflächenexpression von NOTCH wieder hergestellt werden (Okajima et al., 2005). Andere Studien in *Drosophila* und Vertebraten zeigen trotz Abwesenheit von OFUT1/POFUT1 für NOTCH eine Zelloberflächenexpression (Abb. 1.6 Modell 2). Während NOTCH in Wildtyp-Zellen durch Transcytose zu Adhäsionsverbindungen (Adherens junctions) transportiert wird, akkumuliert NOTCH bei Fehlen von OFUT1/POFUT1 in nicht charakterisierten endocytotischen Kompartimenten. Die exogene Zugabe von OFUT1/POFUT1 reduziert diese Akkumulation, was vermuten lässt, dass sekretiertes OFUT1/POFUT1 an NOTCH auf der Zelloberfläche bindet und die konstitutive Endocytose des Rezeptors reguliert (Sasamura et al., 2007; Sasaki et al., 2007; Stahl et al., 2007).

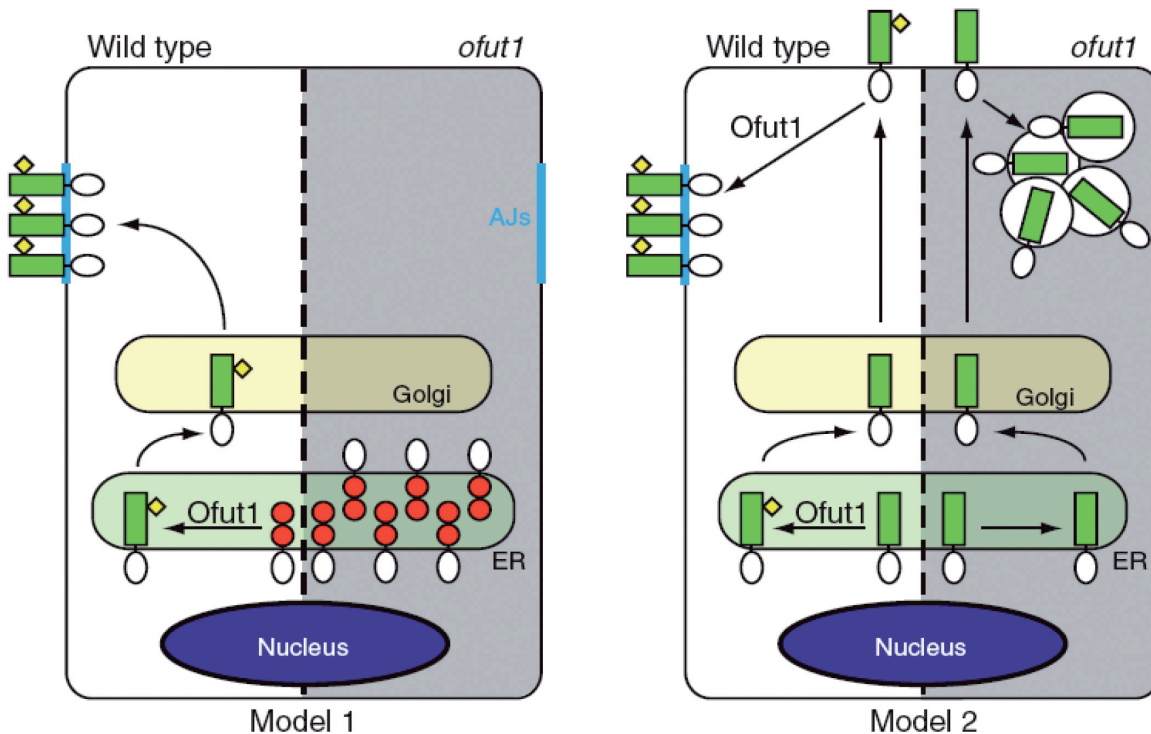


Abb. 1.5: Zwei Modelle für die Rolle von OFUT1/POFUT1 für den Notch-Signalweg (aus Vodovar und Schweiguth, 2008). Jedes Modell ist schematisch in einer Zelle dargestellt, deren linke Hälfte die Wildtyp-Situation zeigt und die rechte die in Abwesenheit von OFUT1 (grau unterlegt). Modell 1: Im ER neu synthetisiertes ungefaltetes NOTCH (mit NECD in rot, NICD in weiß) wird mittels OFUT1 gefaltet (NECD in grün) und O-fucosyliert (gelbe Rhomben). Anschließend wird der Rezeptor über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran und Adhäsionsverbindungen (Adherens junctions, AJs in türkise) transportiert. In der Abwesenheit von OFUT1 akkumuliert NOTCH ungefaltet im ER. Modell 2: O-fucosyliertes NOTCH wird zuerst über den Golgi-Apparat zur apikalen Membran transportiert und anschließend durch einen Transcytose-Mechanismus zu den Adhäsionsverbindungen. In Ofut1-mutanten Zellen wird NOTCH zur Membran transportiert, schnell internalisiert und in uncharakterisierten endocytotischen Kompartimenten akkumuliert.

Fringe verlängert die O-Fucose auf den EGF-Motiven und beeinflusst die Notch-Rezeptor Aktivierung

Fringe ist ursprünglich in einem Screen von *Drosophila*-Mutanten für Gene entdeckt worden, die an der dorsal-ventralen Grenzbildung während der Flügelentwicklung beteiligt sind (Irvine et al., 1994). Als β -1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase katalysiert FRINGE im Golgi-Apparat den zweiten Schritt der Synthese der O-Fucose-Glykane, den Transfer von β -N-Acetylglucosamin (GlcNAc) auf die 3'-Hydroxylgruppe der O-Fucose in den EGF-Motiven (Abb. 1.4; Moloney et al., 2000; Brückner et al., 2000; Munro et al., 2000). Obwohl FRINGE sekretiert werden kann,

wirkt das Enzym intrazellulär noch während der Biosynthese von NOTCH (Panin et al., 1997; Johnstone et al., 1997). FRINGE ist spezifisch für O-Fucose an bestimmten korrekt gefalteten EGF-Motiven als Substrat und UDP-GlcNAc als Donor.

In *Drosophila* und Vertebraten sind sowohl die Notch-Rezeptoren als auch die Liganden Substrate für OFUT1/POFUT1 und FRINGE (Moloney et al., 2000, Brückner et al., 2000; Panin et al., 2002). So wird an den *Drosophila* Liganden DELTA und SERRATE nach Expression in S2 Zellen O-Fucose nachgewiesen, die *in vitro* in Gegenwart von Fringe und UDP-GlcNAc mit GlcNAc verlängert wird. DLL1 (Ratte) und JAGGED1 (human) als Vertebraten-Liganden sind *in vivo* als O-Fucose-Monosaccharide nachgewiesen worden, auf die anschließend GlcNAc durch MANIAC FRINGE übertragen wird (Panin et al., 2002).

Für seine enzymatische Aktivität und als charakteristische Gemeinsamkeit mit anderen Glycosyltransferasen besitzt FRINGE ein hochkonserviertes DXD-Motiv, dessen Mutagenese zum Verlust der enzymatischen Aktivität *in vitro* und zum Verlust der biologischen Aktivität *in vivo* führt. Für die modulierende Wirkung auf den Notch-Signalweg ist die Glycosyltransferase-Aktivität essentiell. Die Effekte von FRINGE wirken zell-autonom im Hinblick auf NOTCH, d.h. FRINGE muß in derselben Zelle wie NOTCH exprimiert sein (Moloney et al., 2000, Brückner et al., 2000; Munro und Freeman, 2000; Chen et al., 2001).

Die Notwendigkeit von FRINGE und seiner regulierenden Wirkung für den Notch-Signalweg ist erstmals in Studien der Flügelentwicklung in *Drosophila* entdeckt worden. FRINGE verstärkt dort die NOTCH-Aktivierung durch DELTA und inhibiert gleichzeitig die NOTCH-Aktivierung durch SERRATE. Eine dorsal-ventrale Grenze kann sich so unter der Wirkung von FRINGE ausbilden, in dem in DELTA-exprimierenden Zellen im ventralen Bereich die NOTCH-Aktivierung durch SERRATE stimuliert, und in direkt benachbarten Zellen im dorsalen Bereich, die FRINGE und SERRATE exprimieren, die Notch-Aktivierung durch SERRATE inhibiert wird (Irvine, 1999; Irvine und Rauskolb, 2001; Panin et al., 1997; Fleming et al., 1997; Klein et al., 1998). Mutationen in Fringe aus *Drosophila* führen zu Defekten in der Entwicklung von verschiedenen Geweben und Organen, u.a. Flügeln, Augen und Beinen (Cho et al., 1996; Dominguez und de Celis, 1998; Papayannopoulos et al., 1998).

In Vertebraten sind drei Fringe-Homologe bekannt: *Lunatic Fringe (Lfng)*, *Maniac Fringe (Mfng)* und *Radical Fringe (Rfng)*, die zum Teil die Mutationen von Fringe in *Drosophila* komplementieren können (Cohen et al., 1997; Johnston et al., 1997). Sie unterscheiden sich in

ihrer *in vitro* Aktivität und zeigen in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Ergebnisse. In zell-basierten Signalaktivierungsassays zeigt eine Überexpression der Fringe Gene aus Vertebraten eine Inhibierung der JAGGED1-induzierten Aktivierung durch LFNG und MFNG und eine Erhöhung von DELTA-induzierter Aktivierung (Moloney et al., 2000; Shimizu et al., 2001; Hicks et al., 2000). Unterschiedliche Effekte auf NOTCH2 sind zwischen LFNG und MFNG beobachtet worden: Einmal kann die Aktivierung von NOTCH2 durch DELTA1 und JAGGED1 verstärkt werden, in einer anderen Studie dagegen inhibiert LFNG die Aktivierung von NOTCH2 induziert durch JAGGED1 und zeigt keinen Effekt auf die DELTA-induzierte Aktivierung. In NH3T3-Zellen verstärkt RFNG nach Überexpression sowohl die DELTA- als auch JAGGED1-induzierte Notch-Signalweiterleitung (Yang et al., 2005). Ähnliche Differenzen zeigen sich bei der Untersuchung des Effekts von FRINGE auf die Liganden-Bindung. Im Allgemeinen entsprechen die Analysenergebnisse über die Bindung von löslicher Delta ECD an NOTCH1 und 2 mittels durchflußcytometrischen Messungen und Immunfluoreszenz-Analysen den zuvor beobachteten Effekten, dagegen wird die Bindung von JAGGED1 durch Überexpression von LFNG, MFNG und RFNG nicht beeinflusst, obwohl eine induzierte Notch-Aktivierung durch die Fringe-Proteine moduliert wird (Rampal et al., 2005; Nichols et al., 2007; Ladi et al., 2005). Im Gegensatz zu der breiten Wirkung von POFUT1/OFUT1 auf nahezu alle Notch-Signalübermittlungen wirkt FRINGE nur bei ausgewählten Notch-Funktionen modulatorisch, was durch die spezifischen Phänotypen nach gezielter Ausschaltung der Gene gezeigt wird. Während in *Drosophila* und Vertebraten eine Pofut1/Ofut1-Inaktivierung durch einen vollständigen Verlust des Notch-Signalweges gekennzeichnet ist, zeigen Mäuse bei Fehlen von Lfng einen milderen Phänotyp. In Vertebraten beschränkt sich die Regulation der Notch-Aktivierung durch Fringe auf die Entwicklung des axialen Skelettes, der Gliedmaßen, Zähne, Neuralleiste, hämatopoetische Zellen und das Vorderhirn (Esteban, 1997; Laufer et al., 1997; Nellenmann et al., 2001; Koch et al., 2001, Evrard et al., 1998). In Vertebraten wird Lfng von den drei Homologen als einziges Gen im PSM exprimiert. Die Expression erfolgt während der Somitogenese in dynamischen Zyklen, die durch Notch-abhängige negative Rückkopplungsmechanismen hervorgerufen werden und essentiell für den molekularen Oszillator, die Segmentierungsuhr sind, die zusammen mit anderen Komponenten des Notch-Signalwegs für die Bildung von Somiten aus dem PSM verantwortlich ist. Eine ubiquitäre Expression von Lfng führt zur Blockierung der Somitogenese und Notch-Aktivierung (Cohen et

al., 1997; Johnston et al., 1997; Barrantes et al., 1999; Cole et al., 2002; Dale et al., 2003; Forsberg et al., 1998). Die gezielte Inaktivierung durch Fringe führt zu fusionierten Somiten. Die Ausschaltung von Rfng hingegen zeigt keinen Phänotyp, eine Inaktivierung des murinen Mfng-Genes ist noch nicht beschrieben (Stanley, 2007).

Unterschiedliche EGF-Motive werden mit unterschiedlicher Effizienz durch LFNG und MFNG verlängert. Auch deren Fähigkeit zur Glykosylierung unterscheidet sich, wie der Vergleich von Profilen verschiedener O-Fucose-Glykane in CHO-Zellen zeigt (Shao et al., 2003; Shimizu et al., 2001). Unter der großen Zahl von potentiellen Fucosylierungsstellen ist die O-Fucose-Konsensussequenz im EGF-Motiv 12 des Notch-Rezeptors, das notwendig und hinreichend für die Bindung des Liganden ist, unter allen Notch-Rezeptoren konserviert und ein Substrat für POFUT1 und FRINGE (Shao et al., 2003; de Celis et al., 1993).

FRINGE reguliert die Notch-Aktivität durch einen direkten Einfluß auf die Rezeptor-Liganden-Bindung, was in Experimenten mit löslichen Formen des Rezeptors und der Liganden gezeigt wird. FRINGE kann die Bindung zwischen einer löslichen Form von NOTCH (oder DELTA) an membrangebundenes DELTA (oder NOTCH), das auf der Oberfläche von Zellen exprimiert wird, verstärken und im Falle von SERRATE als Ligand inhibieren (Samura et al., 2003; Okajima et al., 2003). Fringe-Effekte, die Notch-Signale verringern korrelieren dabei mit einer abnehmenden Liganden-Bindung und verstärkende Effekte mit verstärkter Liganden-Bindung (Hicks et al., 2000, Shimizu et al., 2000, Yang et al., 2005). Dieselbe Modifizierung, die somit zur Stimulierung der Signalweitergabe durch einen Liganden (DELTA) führt, bewirkt gleichzeitig die Inhibition durch den anderen (SERRATE/JAGGED). Diese Tatsache und CHO-Kokultivierungs-Experimente, die zeigen, dass die Aktivität von LFNG und RFNG essentiell, aber nicht hinreichend für die Inhibition der JAGGED1-induzierten Notch-Aktivität ist, lassen auf 2 Mechanismen für diese Effekte schließen und dass Änderungen in der Zuckerstruktur auf direkte oder indirekte Weise die Affinität zu den Liganden verändern (Hicks et al., 2000; Brückner et al., 2000; Shimizu et al., 2001; Chen et al., 2001). Mehrere Modelle für den Mechanismus der Fringe-Funktion sind mit Hilfe verschiedener Studien beschrieben worden: So kann die Verlängerung der O-Fucose-Struktur innerhalb der Notch-EGF-Domänen direkt die Bindungsaffinität des Rezeptors zu den Liganden verändern. Eine Bindung kann aufgrund einer Liganden-Zucker-Interaktion verstärkt werden, während eine andere aufgrund der Blockierung des Liganden durch sterische Behinderung vermindert wird.

Alternativ können die Veränderungen der Zuckerstruktur zu einer Änderung der Interaktionen zwischen NOTCH und Liganden in *cis* (Liganden, die in derselben Zelle koexprimiert werden) führen, wodurch die zell-autonome Inhibierung moduliert wird. Die veränderte Zuckerstruktur hat so einen direkten Effekt auf die Bindung von NOTCH zu den *cis*-Liganden, der einen indirekten Effekt auf die Notch-Aktivierung durch *trans*-Liganden hervorruft. Eine Verlängerung der O-Fucose-Glykane kann auch zu einer Konformationsänderung des Notch-Moleküls selbst führen, ausgelöst durch intramolekulare Veränderungen spezifischer Interaktionen zwischen verschiedenen EGF-Motiven des Rezeptors, und so die Ligandenbindung verändern. Möglich ist auch die Beteiligung eines dritten Moleküls, z. B. Galektin als Galaktose bindendes Protein, das spezifisch die verlängerte O-Fucose erkennt, diese bindet und entweder verstärkend oder abschwächend auf die Notch-Liganden-Interaktion wirkt (Moloney et al., 2000; Chen et al., 2001; Brückner et al., 2000, Haines und Irvine, 2003).

Verlängerung der GlcNAc-Fucose-O-Glykane

In Vertebraten erfolgt die Verlängerung des GlcNAc-Fucose-Dissaccharids in O-Fucose-Glykanen durch die Anheftung von Galaktose durch die β 1,4-Galaktosyltransferase (β 4GalT1), gefolgt von Sialinsäure durch die α 2,3 Sialinsäuretransferase (α 2,3 SiaT) zum Tetrasaccharid (Abb. 1.4; Moloney et al., 2000). Kokultivierungs-Experimente zeigen, dass für die durch Fringe vermittelte Inhibierung der Notch-Aktivierung durch Jagged1 das Trisaccharid mit β 1,4-Galaktose (Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3Fuc) die minimale Einheit für die Regulation darstellt und die Anwesenheit von Sialinsäure nicht notwendig ist, was auch für die β 4GalT1 auf eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Notch-Aktivität schließen lässt (Chen et al., 2001; Lee et al., 2001; Moloney et al., 2000).

Jedoch zeigen Maus-Embryonen mit inaktiver β 4GalT1 keine offensichtlichen Skelett-Defekte. Einige an der Somitogenese beteiligte Notch-Zielgene, wie Hes5 und Mesp2, sind schwächer exprimiert, die Liganden Dll1 und Dll3 zeigen eine veränderte Expression und die meisten Embryonen haben einen zusätzlichen Lendenwirbel. Dieser schwache Phänotyp konnte durch die Existenz von 6 β 4GalT-Genen in der Maus erklärt werden, da diese den Verlust von β 4GalT1 kompensieren könnten. (Chen et al., 2006; Lu und Stanley, 2006).

Obwohl die essentielle Rolle der O-Fucose-Glykane für den Notch-Signalweg bereits beschrieben ist, sind in zukünftigen Studien noch die genauen molekularen Mechanismen der O-Fucosylierung für die Aktivierung des Notch-Rezeptors und seiner Liganden, sowie die Unterschiede in den Effekten und der Regulation zu erforschen.

2. Zielsetzung

Die EGF-Motive der extrazellulären Domäne von DLL1 haben eine entscheidende Bedeutung für die Bindung an den Notch-Rezeptor und dessen Aktivierung. Gleichzeitig sind diese Domänen Substrate für die O-Fucosylierung, deren Rolle im Notch-Signalweg noch weitgehend ungeklärt ist.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß der konservierten Disulfidbindungen in den EGF-ähnlichen Domänen von DLL1 auf die Funktion des Liganden zu untersuchen. Der Beitrag der konservierten Disulfidbrücken innerhalb jedes einzelnen EGF-Motivs sollte mit Hilfe von *in vitro* hergestellten DLL1 Mutanten bestimmt werden, in denen jeweils in einer der acht EGF-Domänen durch Austausch von zwei Cysteinen zu Glycinen die Bildung von 2 Disulfidbrücken verhindert wurde. Mögliche resultierende Veränderungen in DLL1 und die Konsequenzen für die Liganden-Aktivität sollten in Analysen der zellulären Lokalisierung und der NOTCH1-Aktivierung untersucht werden. Diese Experimente sollten Hinweise auf die Notwendigkeit der strukturellen Integrität einzelner Domänen der extrazellulären Domäne von DLL1 für seine Funktion im Notch-Signalweg und auf für die Interaktion mit dem Rezeptor essentielle Liganden-Bereiche liefern.

Daneben sollte die Rolle von DLL1 als Substrat der O-Fucosylierung, sowie die Signifikanz dieser Modifikation für die biologische Aktivität des Liganden im Notch-Signalweg *in vitro* und *in vivo* analysiert werden. Dazu sollte mit Hilfe von generierten DLL1 Mutanten, in denen die spezifischen Konsensussequenzen der O-Fucosylierung innerhalb der extrazellulären Domäne einzeln und in Kombination entfernt wurden, Hinweise auf die Funktion dieser Fucosylierungsstellen gewonnen werden. Für die mutanten DLL1-Proteine sollte die subzelluläre Lokalisierung, die NOTCH1-Aktivierung und eine Rolle als ³H-Fucose-Akzeptor mittels metabolischer Markierung analysiert werden. Zusätzlich sollte die Fucosylierung von DLL1 in Abwesenheit des Enzyms POFUT1 untersucht werden, das den Transfer der O-Fucose auf die Konsensussequenzen katalysiert. DLL1 sollte in CHO-Zellen, in denen die Pofut1-Genexpression mit Hilfe von RNA-Interferenz ausgeschaltet werden sollte, sowie in immortalisierten embryonalen Fibroblasten, die aus E9.5 Pofut1^{+/+} und Pofut1^{-/-} Embryonen generiert werden sollten, auf seine subzelluläre Lokalisierung und NOTCH1-Aktivierung untersucht werden. Ergänzend sollte die Expression von endogenem DLL1 in Zellen des präsomitischen Mesoderms (PSM) von Pofut1^{+/+} und Pofut1^{-/-} E9.5 Embryonen analysiert werden. Durch diese *in vitro*

und *in vivo* Experimente sollten wichtige Hinweise auf die Signifikanz der O-Fucosylierung für DLL1 und seine Funktion im Notch-Signalweg erhalten werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), Calbiochem (Darmstadt), Fluka (UK), Invitrogen (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Taufkirchen).

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Eppendorf (Köln), Greiner (Solingen), Millipore (Schwalbach), Nunc (Wiesbaden), Sarstedt (Nümbrecht) und Whatmann (Dassel) bezogen.

3.1.3 Enzyme

Alle Restriktionsenzyme, Polymerasen und T4-Ligasen wurden, soweit nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen: Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St.Leon-Roth), New England Biolabs GmbH (Schwalbach), Stratagene (Heidelberg) und Roche Diagnostics (Mannheim).

3.1.4 Primer und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma *MWG Biotech GmbH* (Ebersberg) oder *Operon Biotechnologies GmbH* (Köln) bezogen und mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O) auf eine Endkonzentration von 100 µM gebracht.

Primer für die Klonierung der Expressionskonstrukte

Primername	Sequenz 5' → 3'
Dll1-mutEGF2-T/V-for	GTTGTCTCCATGGCGTCTGCCAGCAACCC
Dll1-mutEGF2-T/V-rev	GGGTTGCTGGCAGACGCCATGGAGACAAC
Dll1-mutEGF3-T/V-for	GGAATGGAGCCGTCTGCACCAACACGGGC
Dll1-mutEGF3-T/V-rev	GCCCGTGTGGTGCAGACGGCTCCATTCC
Dll1-mutEGF4-S/A-for	GAACGGAGCGGCCTGCACGGACCTTGAGG
Dll1-mutEGF4-S/A-rev	CCTCAAGGTCCGTGCAGGCCGCTCCGTTC
Dll1-mutEGF7-T/V-for	GCAAATGGGGGCGTCTGCCGGGACAGTGT
Dll1-mutEGF7-T/V-rev	ACACTGTCCCGGCAGACGCCCCCATTTGC
Dll1-mutEGF8-T/V-for	CCATAATGGGGCCGTCTGCCACCAGAGGG
Dll1-mutEGF8-T/V-rev	CCCTCTGGTGGCAGACGGCCCCATTATGG
Dll1-Nglykomut-for	CTACACGGGCAAGCAGTGCAGCGCCCCTG
Dll1-Nglykomut-rev	CAGGGGCGCTGCACTGCTTGCCCGTGTAG

Tabelle 1: Primer für die Klonierung der Expressionskonstrukte

Primer für die Sequenzierung

Primername	Sequenz 5' → 3'
NotIfor3'Dll1	GCGGCCGCACAGACCTCC
NotIrev5'Dll1	GCGGCCGCTACTGTGAAGG
Dll1DSLfor	GACAGAGGGGAGAAGATGTG
EGFclonefor	GCAACAGAAAACCCAGAAAGACTC
Dll1-for für P2	TCCCGGCTTCTATGGCAAGG
Dll1 5`raus rev	GGTAGTGCTTGAGGCATACG

Tabelle 2: Primer für die Sequenzierung

Primer für die Genotypisierung von Mausembryonen

Primername	Sequenz 5' → 3'
Pofut 644	GGGTCACCTTCATGTACAAGTGAGTG
Pofut 645	ACCCACAGGCTGTGCAGTCTTTG
Pofut F1	AATGCCGTGCTGAGAGTAAAGG

Tabelle 3: Primer für Genotypisierungen

Oligonukleotide für siRNA-Expressionskonstrukte

Name	Sequenz 5' → 3'
Oligo1-for Pofut siRNA1	GATCCGTCCTGATAAGAAGACATGTTCAAGAGACATGTCTTCTT ATCAGGACTTTTTTGGAAA
Oligo1-rev Pofut siRNA1	AGCTTTTCCAAAAAAGTCCTGATAAGAAGACATGTCTCTTGAAC ATGTCTTCTTATCAGGACG
Oligo2-for Pofut siRNA2	GATCCGCCTCCTTTCACTAATCTCCTTCAAGAGAGGAGATTAGT GAAAGGAGGTTTTTGGAAA
Oligo2-rev Pofut siRNA2	AGCTTTTCCAAAAAACCTCCTTTCACTAATCTCCTCTCTTGAAGG AGATTAGTGAAAGGAGGCG

Tabelle 4: Oligonukleotide für siRNA Expressionskonstrukte

3.1.5 Klonierungsvektoren und verwendete Plasmide*Klonierungsvektoren*

Plasmide/Vektoren	Herkunft
pTracerCMV	Clontech
pSilencer™ 2.1-U6 puro	Ambion
pSilencer™ 2.1-U6 hygro	Ambion
pBluescriptII KS (+/-)	Stratagene
pCRII-TOPO	Invitrogen
pGemT-Easy	Promega

Tabelle 5: Klonierungsvektoren

Verwendete Plasmide

Plasmide	Herkunft/ enthaltene Elemente
pTracerCMV-Dll1Flag	Von S. Chiba, Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan (Shimizu <i>et al.</i> , 2000b), durch Einfügen von Dll1-Flag in pTracerCMV generiert. Amp. und Zeocin-Kassette. 5' → 3': CMV-Prom. Dll1Flag ORF, IRES-Neomycin-Kassette
pTracerCMV-Dll1 EGF4ex Flag	Ursprungsplasmid: pTracerCMV-Dll1Flag. Durch ortsgerichtete Mutagenese in EGF-Motiv 4 wurden 2 Cysteine zu Glycinen transformiert (Cystein Codons (<u>T</u> GT und <u>T</u> GC), Glycin Codons (<u>G</u> GT und <u>G</u> GC)), von Insa Geffers (AG Gossler)
phRL-TK	Eukaryotischer Expressionsvektor für die Expression von Renilla-Luciferase unter HSV-TK Promotor (Promega)
Rbp ₆ luc	Eukaryotischer Expressionsvektor für die Expression von Firefly-Luciferase als Reporter, in dem und 12 RBPJκ-Bindungsstellen vor einem β-Globin-Promotor liegen (Minoguchi <i>et al.</i> , 1997)

Tabelle 6: Verwendete Plasmide

3.1.6 Nährmedien***Bakterienkultur***

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	1% Bacto- Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl (pH 7.5) Bei Bedarf wurden nach dem Autoklavieren Antibiotika zugesetzt (100 µg/ml Ampizillin, 25 µg/ml Kanamycin).
LB-Agarplatten	LB-Medium mit 1.5% Bacto-Agar Bei Bedarf wurden nach dem Autoklavieren Antibiotika zugesetzt (100 µg/ml Ampizillin; 25 µg/ml Kanamycin; 1 mM IPTG; 50 µg/ml X-Gal).

Tabelle 7: Bakterienmedien

Zellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung
CHO-Medium	DMEM/F12 1:1, 10% FCS, 2 mM Glutamax, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
HeLa-Medium	DMEM, 10% FCS, 2 mM Glutamax, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Pofut-Medium	DMEM, 15% FCS, 2 mM Glutamax, 1 mM Natriumpyruvat, 100 µM Nichtessentielle Aminosäuren, 100 µM β-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Tabelle 8: Zellkulturmedien

Alle verwendeten Zellkulturzusätze wurden von der Firma GibcoBRL (USA) bezogen. Das fetale Kälberserum (FCS) wurde vor Gebrauch 30 min bei 56°C im Wasserbad erhitzt, um Antikörper, Enzymaktivitäten und die Komplementbindungskapazität zu inaktivieren.

3.1.7 Bakterienstämme, Zelllinien, Labortiere**Bakterienstämme**

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

Tabelle 9: *E.coli* -Stämme

Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
CHO	Chinesische Hamsteroarzellen (Labor AG Gossler)
CHO DLL1	Chinesische Hamsteroarzellen, stabil DLL1-Flag exprimierend, von Insa Geffers hergestellt durch Transfektion von pTracerCMV-Dll1Flag und Selektion mit 500 µg/ml G418
CHO DLL1 EGF1-Flag	Chinesische Hamsteroarzellen, stabil DLL1-EGF1-Flag exprimierend, von Insa Geffers hergestellt durch Transfektion von pTracerCMV-Dll1 EGF1ex Flag und Selektion mit 500 µg/ml G418
CHO DLL1 EGF2-Flag	Chinesische Hamsteroarzellen, stabil DLL1-EGF2-Flag exprimierend, von Insa Geffers hergestellt durch Transfektion von pTracerCMV-Dll1 EGF2ex Flag und Selektion mit 500 µg/ml G418
CHO DLL1 EGF3-Flag	Chinesische Hamsteroarzellen, stabil DLL1-EGF3-Flag exprimierend, von Insa Geffers hergestellt durch Transfektion von pTracerCMV-Dll1 EGF3ex Flag und Selektion mit 500 µg/ml G418
CHO DLL1 EGF5-Flag	Chinesische Hamsteroarzellen, stabil DLL1-EGF5-Flag exprimierend, von Insa Geffers hergestellt durch Transfektion von pTracerCMV-Dll1 EGF5ex Flag und Selektion mit 500 µg/ml G418
CHO DLL1 EGF6-Flag	Chinesische Hamsteroarzellen, stabil DLL1-EGF6-Flag exprimierend, von Insa Geffers hergestellt durch Transfektion von pTracerCMV-Dll1 EGF6ex Flag und Selektion mit 500 µg/ml G418
CHO DLL1 EGF7-Flag	Chinesische Hamsteroarzellen, stabil DLL1-EGF7-Flag exprimierend, von Insa Geffers hergestellt durch Transfektion von pTracerCMV-Dll1 EGF7ex Flag und Selektion mit 500 µg/ml G418
CHO DLL1 EGF8-Flag	Chinesische Hamsteroarzellen, stabil DLL1-EGF8-Flag exprimierend, von Insa Geffers hergestellt durch Transfektion von pTracerCMV-Dll1 EGF8ex Flag und Selektion mit 500 µg/ml G418
HeLa	Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Labor AG Gossler)
HeLa N1	Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, stabil NOTCH1 exprimierend (A. Israel, Institute Pasteur, Paris, Frankreich)

Pofut1 +/+	Immortalisierte Fibroblasten aus Pofut1 E9.5 +/+ Embryonen (siehe 3.4.4)
Pofut1 -/-	Immortalisierte Fibroblasten aus Pofut1 E9.5 -/- Embryonen (siehe 3.4.4)

Tabelle 10: Verwendete Zelllinien

Labortiere

Mauslinie	Generiert/bezogen von	Referenz
Pofut1	Pamela Stanley , Departement of Cell Biology, Albert Einstein College of Medicine, New York	Shi und Stanley, 2003

Tabelle 11: Verwendete Mauslinie

3.1.8 Antikörper

Alle Primär- und Sekundärantikörper, die für Western Blot-Analysen (WB), Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen (IF), des präsomitischen Mesoderms als Ganzpräparat (whole mount immunofluorescence (WM-IF)) und Immunpräzipitationen (IP) verwendet wurden, sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

Primärantikörper

Antikörper	Epitop	Wirtspezies	Firma	Anwendung
Anti-Calreticulin	Fuionsprotein, das AS 154-347 von Calreticulin (Maus) umfaßt	Kaninchen, polyklonal	Abcam	IF, 1:100

anti-cleaved Notch1 (Val1744)	Peptid, das nach Spaltung an Val1744 entsteht	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling	WB, 1:1000
anti-Dll1 (H-265)	C-Terminus	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz	WM-IF, 1:100
anti-Dll1 1F9	Extrazelluläres Peptid	Ratte monoklonal	E. Kremmer, GSF München	IF, 1:20 WB :1000 IP 1:50
anti-Dll1 2A5	Intrazelluläres Peptid	Ratte monoklonal	E. Kremmer, GSF München	IF, 1:20 WB :1000 IP 1:50
anti-Dll1 2B3	Extrazelluläres Peptid	Ratte monoklonal	E. Kremmer, GSF München	IF, 1:20 WB :1000 IP 1:50
anti-Flag (M2)	Peptid DYKDDDDK	Maus, monoklonal	Sigma	WB, 1:10000 IF, 1:5000
anti-GM130 (35)	C-Terminus	Maus, monoklonal	BD Biosciences	IF, 1:250 WM-IF, 1:250
anti-pan Cadherin (CH-19)	C-Terminus	Maus, monoklonal	Sigma	WM-IF, 1:250
anti-Pofut	Rekombinantes GST-Fusionsprotein	Maus, polyklonal	Abnova	WB, 1:100
anti-Pofut	--	Maus, polyklonal	Y. Saga	WB, 1:100

Tabelle 12: Verwendete Primärantikörper

Sekundärantikörper

Antikörper	Wirtspezies	Firma	Anwendung
Anti-Maus-POD	Schaf	Amersham	WB, 1:10000
Anti-Ratte-POD	Ziege	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.	WB, 1:10000
Anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488	Esel	Invitrogen	IF, 1:1000 WM-IF, 1:500
Anti-Kaninchen Alexa Fluor® 555	Esel	Invitrogen	IF, 1:1000 WM-IF, 1:500
Anti-Maus Alexa Fluor® 488	Esel	Invitrogen	IF, 1:1000 WM-IF, 1:500
Anti-Maus Alexa Fluor® 555	Esel	Invitrogen	IF, 1:1000 WM-IF, 1:500

Tabelle 13: Verwendete Sekundärantikörper

3.1.9 Datenbanken

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden Datenbanken gearbeitet:

National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
 Ensemble Genome Browser <http://www.ensembl.org>
 Mouse Genome Informatics (MGI) <http://www.informatics.jax.org>
 Expert Protein Analysis System (ExpASy) <http://www.expasy.org/>

3.1.10 Computerprogramme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Computerprogramme benutzt:

Textverarbeitung:	Word v. X 2003 (Microsoft); Reader 6.0 (Adobe)
Bildverarbeitung:	Photoshop 7.0 und CS (Adobe), Illustrator CS (Adobe)
Literaturverwaltung:	EndNote X (Wintertree Software)
Bilderstellung:	LSM 510 Confocal Software (Carl Zeiss Micro Imaging, Inc) FUJIFILM Photograb-300Z (FUJI Photo Film Co, Ltd.); FUJIFILM Image Reader Version 1.8E (FUJI Photo Film Co, Ltd.); Graphic Converter V 4.5 (Lemke Software GmbH)
Sequenzauswertung:	MacVector™ 7.2 (Accelrys Inc.)
Internetrecherche:	Netscape Communicator 7.1 (Netscape Communication Corporation); Safari Version 2.0.4 (Apple Computer, Inc.)

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden, wie die Präzipitation von Nukleinsäuren, die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen, die Transformation elektrisch kompetenter Bakterien, die analytische Präparation von DNA durch alkalische Lyse, die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren sowie die Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten, die im Folgenden nicht weiter beschrieben sind, wurden, nach Ausubel et al. (1994) und Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des “GenElute™ Plasmid Miniprep Kits“ der Firma Sigma nach Herstellerprotokoll aus Bakterien-Übernachtskulturen aufgereinigt. Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte mit TAE als Laufpuffer. Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde unter Verwendung des “Nucleo Spin Extract II Kits“ der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Agowa (Berlin) oder im Institut für Mikrobiologie der MHH unter Verwendung des „Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kits“ und dem Sequenzierungsgerät “ABI Prism 377 DNA Sequencer“ (PE Applied Biosystems) durchgeführt.

Weiterführende Techniken sind im Folgenden beschrieben.

3.2.1.1 Ortsgerichtete Mutagenese mittels PCR

Die ortsgerichtete Mutagenese wurden unter Verwendung des “QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit 2“ (Stratagene) durchgeführt und dabei gemäß den Angaben des Herstellers verfahren. Als Primer wurden die von der Firma MWG-Biotech bezogenen Oligonukleotide (siehe 3.1.4, Tabelle 1) verwendet, als DNA-Matrize diente das Plasmid pTracerCMV-Dll1Flag. Nach der PCR wurde das amplifizierte Plasmid mit dem Restriktionsenzym DpnI für 1 h bei 37°C inkubiert, wobei selektiv das parentale Plasmid zerstört wurde. Das Plasmid wurde in elektrokompetente *E. coli* XL1 blue Zellen (Stratagene) transformiert und auf Ampicillin-haltigen Agarplatten (LB-amp) selektiert. Der Erfolg der Mutagenese wurde mittels Sequenzierung überprüft. Für Varianten mit multiplem Aminosäureaustausch dienten bereits generierte Konstrukte mit Mutationen als neue Matrizen.

3.2.1.2 Klonierung der Expressionskonstrukte

Alle Expressionskonstrukte wurden ausgehend von dem Plasmid pTracerCMV-Dll1Flag (siehe 3.1.5 Tabelle 6) generiert, das neben einem CMV-Promotor noch eine Ampicillin-Resistenz-Kassette für die Selektion in Bakterien, sowie eine Zeocin- und eine IRES-Neomycin-Resistenz-Kassette für die Selektion in Zellkultur aufwies. Für die Generierung der Expressionskonstrukte DLL1 mEGF wurden in dem Plasmid pTracerCMV-Dll1Flag in den Konsensussequenzen für die O-Fucosylierung, die für DLL1 in den EGF-ähnlichen Domänen EGF 2, 3, 4, 7 und 8 nachgewiesen wurden, durch ortsgerichtete Mutagenese jeweils eine Aminosäure ausgetauscht. In den Konsensussequenzen, C₂XXX(S/T)C₃ für die EGF-Motive 2, 3, 4, 8 und C₂XXGG(S/T)C₃ für EGF-Motiv 7, in denen C₂ und C₃ für das jeweilige zweite und dritte konservierte Cystein im EGF-Motiv, X für beliebige Aminosäure und S/T für Serin/Threonin stehen, wurden jeweils die Aminosäuren Threonin zu Valin oder Serin zu Alanin transformiert.

Für das Expressionskonstrukt Dll1 mutN-Glycosite wurde in der Konsensussequenz für die N-Glykosylierung N-X-S/T (Asparagin+beliebige AS außer Prolin und Asparagin+ Serin/Threonin) in dem EGF-Motiv 7 von DLL1 die Aminosäure Asparagin durch Glutamin ausgetauscht. Für jeden Austausch einer Aminosäure wurden in dem sie codierenden Nukleotidtriplett jeweils zwei Basen ausgewechselt

In Tab. 14 sind alle Daten und verwendeten Primer für die Mutagenesen zusammengestellt: Die Konsensussequenzen für die Fucosylierungsstellen zwischen dem 2. und 3. konservierten Cystein (Aminosäuren- und Nukleotidsequenzen) der DLL1 EGF-Motive 2, 3, 4, 7 und 8 sowie die Konsensussequenz für die N-Glykosylierung in EGF7. Die mutierten Aminosäuren und die sie codierenden Nukleotidtripletts sind gekennzeichnet (unterstrichen, fett gedruckt).

EGF-Motiv/ Konstrukt- name	Sequenz zwischen Cys2 und Cys3 (Aminosäuren/Nukleotide)	Mutation (Aminosäure/ Nukleotide)	Verwendete Primer
EGF2/ Dll1mEGF2	C ₂ LHG <u>T</u> C ₃ TGTCTCCATGGC <u>ACCT</u> G	Thr → Val ACC → <u>GTC</u>	Dll1-mutEGF2-T/V- for und -rev
EGF3/ Dll1mEGF3	C ₂ RNGAT <u>T</u> C ₃ TGCAGGAATGGAGCC <u>ACCT</u> G	Thr → Val ACC → <u>GTC</u>	Dll1-mutEGF2-T/V- for und -rev
EGF4/ Dll1mEGF4	C ₂ KNGAS <u>S</u> C ₃ TGCAAGAACGGAGCG <u>AGCT</u> G	Ser → Ala AGC → <u>GCC</u>	Dll1-mutEGF2-T/V- for und -rev
EGF7/ Dll1mEGF7	C ₂ ANGGT <u>T</u> C ₃ TGTGCAAATGGGGGC <u>ACCT</u> G	Thr → Val ACC → <u>GTC</u>	Dll1-mutEGF2-T/V- for und -rev
EGF8/ Dll1mEGF8	C ₂ HNGAT <u>T</u> C ₃ TGCCATAATGGGGCC <u>ACCT</u> G	Thr → Val ACC → <u>GTC</u>	Dll1-mutEGF2-T/V- for und -rev
EGF7/Dll1 mut N- Glycosite	<u>NCS</u> <u>AACTGCAGC</u>	Asn → Gln AAC → CAG	Dll1-N-glyko mut-for und -rev

Tabelle 14: Mutierte Konsensussequenzen für die O-Fucosylierung und N-Glykosylierung in den EGF-Motiven von DLL1. Es sind die Konsensussequenzen, die durch die Mutagenese transformierten Aminosäuren bzw. sie codierende Nukleotidtripletts, (unterstrichen und fettgedruckt) sowie die verwendeten Primer dargestellt.

3.2.1.3 PCR für die Genotypisierung von Mausembryonen

10x PCR-Reaktionspuffer 500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl pH 8.8, 0.1% Triton

Zur Genotypisierung der präparierten Pofut1-Mausembryonen wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR (Saiki et al., 1988)) verwendet und die aus den präparierten Embryonen gewonnene genomische DNA (siehe 3.5.3) eingesetzt.

Es wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

32.5 µl	ddH ₂ O
5 µl	10 x PCR Reaktionspuffer
5 µl	15 mM MgCl ₂
2.5 µl	DMSO
1 µl	Pofut644 (siehe 3.1.1)
1 µl	Pofut645 (siehe 3.1.1)
1 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Taq Polymerase
1 µl	genomische DNA

Die PCR wurde mit folgendem Programm auf Primus 96 PCR-Maschinen (MWG Biotech AG) durchgeführt:

94°C 3 min	1x
94°C 30 sec	} 30 x
60°C 30 sec	
72°C 45 sec	

Das Pofut-Wildtyp-Allel wurde als 700-bp-PCR-Produkt, das Transgen als 300-bp-PCR-Produkt nachgewiesen.

3.2.1.4 Präparation und Analyse von RNA

Aufreinigung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen und E9.5 Embryonen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen und E9.5 Embryonen wurde der RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Zellen wurden auf 100 mm-Ø-Schalen bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert. Danach wurden sie einmal mit PBS gewaschen und mit 350 µl Lysepuffer mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst. Die Embryonen wurden einmal mit PBS gewaschen und in 600 µl Lysepuffer aufgenommen und resuspendiert.

Die weitere Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in 50 µl RNase freiem Wasser von der Säule eluiert und bei -80°C aufbewahrt.

Northern Blot Analyse

RNA-Agarose-Gelelektrophorese

<i>10 x MOPS-Puffer</i>	<i>0.2 M MOPS</i> <i>0,05 M Natrium-Acetat</i> <i>10 mM EDTA, pH 7.0</i>
<i>20 x SSC</i>	<i>3 M NaCl,</i> <i>0,3 M Natrium-Citrat,</i> <i>mit HCl auf pH 7 eingestellt</i>

Die Agarose-Gelelektrophorese von RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in 1%-igen MOPS/Formaldehyd-Gelen durchgeführt. Dabei wurde Agarose in DEPC-H₂O und 1 x MOPS-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde unter leichtem Schwenken Formaldehyd (final 12,3 M) zugegeben, anschließend das Gel gegossen und nach vollständigem Auspolymerisieren mit dem späteren Laufpuffer (1 x MOPS-Puffer mit 2,2 M Formaldehyd) überschichtet. Die RNA-Proben und der verwendete RNA-Längenstandard (peQ GOLD High Range RNA Leiter, peqlab) wurden mit 1 Vol frisch angesetzttem Probenpuffer versetzt (25 µl Formamid (100%), 8,8 µl Formaldehyd (37%), 2,5 µl 10fach-konzentrierter MOPS-Puffer, 1 µl Bromphenolblau (2%), 0,1 µl Ethidiumbromid in H₂O), gründlich durchmischt und nach 10 minütiger Inkubation bei 70°C auf Eis abgekühlt. Pro Spur wurde 20 µg Gesamt-RNA bzw. 50 ng Längenstandard aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 75-100 V für 3-4 h.

Kapillartransfer von RNA auf Nylon-Membran

Die in Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennte Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der Kapillar-Blot-Technik auf ungeladene Nylonmembran (Hybond XL, Amersham) übertragen. Dafür wurde das Agarose-Gel nach Beendigung der Elektrophorese kurz mit DEPC-H₂O gespült und 20 min in 10 x SSC-Puffer äquilibriert. Die Nylon-Membran wurde ca. 1 min mit DEPC-H₂O angefeuchtet und anschließend in 10 x SSC-Puffer getränkt, ebenso drei auf Gelgröße zurechtgeschnittene Whatman-Filterpapiere. Der Transfer erfolgte mit 10 x SSC für 16 bis 18 Stunden. Anschließend wurde die Membran 1 min in 2 x SSC gespült und die RNA nach kurzem Trocknen der Filter

durch Backen für 2 h bei 80°C fixiert. Der RNA-Blot konnte auf diese Weise über mehrere Monate bei -20°C gelagert werden.

Northern Blot Hybridisierung

Die Prähybridisierung des RNA-Blots erfolgte für mindestens 2 h bei 42°C mit 10 ml "Ultrahyb"-Lösung (Ambion) unter Schwenken in einem Hybridisierungssofen. Für die anschließende Hybridisierung mit der ³²P-radioaktiv markierten Sonde (siehe unter 3.2.5), wurde diese durch 10 minütige Inkubation bei 100°C und raschem Abkühlen auf Eis denaturiert und schließlich in Ultrahyb-Puffer eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht unter Schwenken bei 42°C im Hybridisierungssofen. Anschließend wurde der RNA-Blot zunächst bei 42°C zweimal 15 min mit "Low Stringency Wash Northern Max"-Lösung (Ambion) gewaschen, um ungebundene Sonde zu entfernen. Stringentes Waschen erfolgte anschließend für zweimal 15 min bei 42°C mit "High Stringency Wash Northern Max"-Lösung (Ambion). Die Membran wurde kurz auf Filterpapier gelegt, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen und in eine Plastikfolie eingeschweißt. Zur Autoradiographie wurde die Membran in eine Röntgenkassette mit Verstärkerfolie für einige Tage bei -80°C exponiert.

3.2.1.5 Radioaktive Markierung von DNA

Für die Northern Blot Hybridisierung wurden radioaktiv markierte DNA-Sonden mit Hilfe des "Prime-It II Random Primer Labeling Kits" (Stratagene) durch Einbau von α P³²-dCTP hergestellt (Feinberg und Vogelstein 1983). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Nicht eingebaute Nukleotide wurden anschließend durch eine ethanolische Fällung entfernt, das Pellet in 100 μ l DEPC-H₂O aufgenommen und 1 μ l davon in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (LS6000, Beckmann) gemessen. Vor der Zugabe zur Hybridisierungslösung wurde die markierte DNA-Sonde denaturiert.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

<i>Elektrophorese Puffer</i>	<i>25 mM Tris, 200 mM Glycin 0.1% SDS</i>
<i>2x Lämmli-puffer</i>	<i>125 mM Tris/HCl pH 6.8, 20% (w/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 2% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0.4 mM Bromphenolblau</i>

Die Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach der Methode von Lämmli (1970) entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt, wobei das „Mini Protean II System“ für Minigele der Firma Biorad (München) verwendet wurde. Die Trenngele wurden mit 10%iger-Acrylamid-Endkonzentration aus 40% Acrylamid- und 1% Bisacrylamid-Fertiglösung, 1/1000 Volumen TEMED, 1/400 Volumen Ammoniumpersulfatlösung (20% (w/v), 1,5 M Tris/HCl pH 8.7 und 1% (w/v) SDS nach Standardprotokoll (Ausubel et al., 2007) in Mini-Gel-Kammern gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen, und das 4%ige Sammelgel (wie Trenngel mit 30% Acrylamid-/0.8%Bisacrylamid und 1M Tris/HCl, pH 6.8) eingefüllt und ein Kamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit Lämmli-puffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 200 V über 45 min durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein definiertes, vorgefärbtes Proteingemisch (Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus, Fermentas) mitaufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder auf einer Membran immobilisiert oder mit Coomassie-Lösung angefärbt.

3.2.3.2 Western-Blot

<i>Transfer-Puffer:</i>	<i>25 mM Tris, 192 mM Glycin</i>
<i>PBS:</i>	<i>137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4, 1.4 mM KH_2PO_4, pH 7.3</i>
<i>PBST:</i>	<i>PBS, 0.5% Tween-20</i>

Der Transfer der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF Membran erfolgte im Tank-Blot Verfahren in "Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell"-Kammern der Firma Biorad (München). Hierzu wurde das Gel, die PVDF-Membran, die zuvor kurz in Methanol getränkt wurde, Filterpapiere und Schwammtücher für 10 min in Transferpuffer äquilibriert und anschließend nach den Angaben des Herstellers zu einem Gel-Membran-Sandwich in einer Transferkassette zusammengeschichtet, die anschließend in einen horizontalen Puffertank eingehängt wurde. Der Transfer erfolgte für 60 min bei 100 Volt und einer Begrenzung der Stromstärke auf 350 mA/cm².

Nach dem Transfer wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in 5% (w/v) Magermilchpulver/ PBST unter Schwenken für 1h bei RT abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 5% (w/v) Magermilchpulver/PBST unter Schwenken bei 4°C über Nacht. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBST für je 20 min unter Schwenken entfernt. Es folgte eine 60 minütige Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten-Sekundärantikörper in 5% (w/v) Magermilchpulver/PBST. Die Membran wurde anschließend dreimal mit PBST und einmal mit PBS gewaschen. Die Detektion der Peroxidaseaktivität erfolgte mit Hilfe der "Enhanced Chemilumineszenz" (ECL)-Reaktion. Dazu wurde die Membran mit dem ECL-Reagenz (Amersham) nach Angaben des Herstellers inkubiert und anschließend die Membran für eine entsprechende Zeit einem Film (Hyperfilm™ ECL, Amersham) exponiert.

3.2.3.3 Proteinfärbung mit Coomassie-Lösung

Färbe-Lösung: 40% Methanol, 40% einer wässrigen 0.1% (w/v) Coomassie Brilliantblau R250-Lösung, 20% Eisessig (2:2:1)

Entfärbelösung: 5% Methanol, 7.5% Eisessig in H₂O

Zum Anfärben der aufgetrennten Proteine wurden die Gele aus 3.2.3.1 in Coomassie-Färbelösung gegeben und mindestens 1 Stunde unter Schwenken bei RT inkubiert. Durch Schwenken in Entfärbelösung konnte überschüssiger Farbstoff entfernt werden. Das Gel wurde anschließend für 60 min in einer Vakuum-Geltrocknungsanlage auf Whatmann-Filterpapier aufgetrocknet und dokumentiert.

3.2.3.4 Zelloberflächenbiotinylierung

<i>PBS c/m:</i>	<i>137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.3, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂</i>
<i>Quench-Lösung:</i>	<i>50 mM Glycin in DMEM</i>
<i>RIPA-Puffer:</i>	<i>50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, Proteaseinhibitor Complete Mini (Roche)</i>
<i>2x Lämmli-puffer</i>	<i>125 mM Tris/HCl pH 6.8, 20% (w/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 2% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0.4 mM Bromphenolblau</i>

Für die Zelloberflächenbiotinylierung wurden am Vortag der Biotinylierung 3×10^5 Zellen auf 60 mm-Ø-Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden dreimal mit kaltem PSB c/m gewaschen und mit 500 μ l PBS auf Eis gestellt. Anschließend wurde in 10-Minuten Abständen jeweils 10 μ l einer Sulfo-NHS-LC-Biotin Lösung (5 mg/ml in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7, Pierce Chemicals) zugegeben und die Zellen unter Schwenken auf Eis inkubiert. Zum Abstoppen der Biotinylierungsreaktion wurde die Biotin-Lösung abgesaugt, die Zellen einmal mit Quench-Lösung gewaschen und für weitere 30 min mit dieser auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS c/m wurde pro Schale für die Zellyse 400 μ l RIPA-Puffer zugegeben, die Zellen für 10 min auf Eis unter Schwenken inkubiert, mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Mikrozentrifugationsröhrchen überführt und für 3 sec durch Vortexen gemischt. Nach einer weiteren 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden feste Bestandteile mittels Zentrifugation (10 min, 12000 x g) abgetrennt. Die biotinylierten Proteine wurden mit Hilfe von Streptavidin-Agarose (Sigma) über Nacht bei 4°C präzipitiert. Von den für die Präzipitation eingesetzten Proteinlysaten wurden Aliquote abgenommen und mit Lämmli-Puffer versetzt. Die Streptavidin-Agarose-Kügelchen wurden dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen und anschließend mit Lämmli-Puffer gemischt. Für die Detektion der biotinylierten Proteine wurden äquivalente Mengen der Lysate und Präzipitate auf einem Proteingel aufgetrennt und mittels Western Blot Analyse nachgewiesen.

3.2.3.5 Metabolische Zellmarkierungen mit Radioisotopen

<i>PBS:</i>	<i>137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.3</i>
<i>Hungermedium:</i>	<i>Cystein- und Methionfreies DMEM-Medium mit Zusatz von 10% dialysiertem FCS, 2 mM Glutamax, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (alles Gibco)</i>
<i>Modifizierter RIPA-Puffer:</i>	<i>1% NP-40, 1% Triton X-100, Proteaseinhibitor Complete Mini (Roche)</i>
<i>2x Lämmli-puffer</i>	<i>125 mM Tris/HCl pH 6.8, 20% (w/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 2% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0.4 mM Bromphenolblau</i>
<i>IP-Waschpuffer</i>	<i>50 mM Tris/HCl pH 8.5, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.05% NP-40, 1mg/ml Ovalbumin</i>

Metabolische Markierungen von Zellen mit ³H-Fucose

Am Vortag der metabolischen Markierung wurden von den entsprechenden CHO-Zelllinien 5×10^5 Zellen auf 100 mm-Ø Zellkulturschalen ausgesät. Untransfizierte CHO-Zellen wurden als Negativkontrolle, DLL1 stabil exprimierende CHO-Zellen als Positivkontrolle verwendet. Zur Markierung wurde pro Schale 7 ml CHO-Medium mit 20 µCi/ml [³H_{5,6}]-Fucose zugegeben und die Zellen für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Markierung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen und auf Eis gestellt. Für die Zellyse wurde pro Zellkulturschale 700 µl modifizierter RIPA-Puffer zugegeben und die Zellen für 10 min unter gelegentlichem Schwenken auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von den Schalen abgelöst und in Mikrozentrifugationsröhrchen überführt. Nach einer weiteren 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden feste Bestandteile abzentrifugiert (10 min 3.000 x g), die Lysate für die Immunpräzipitation mit dem anti-DLL1, 1F9-Antikörper gemischt und für mindestens 2 h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden Protein G-Sepharose-Kügelchen (GE Healthcare) zugegeben und die markierten Proteine bei 4°C über Nacht unter Rotation präzipitiert.

Die Protein G-Sepharose-Kügelchen wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen und durch Zentrifugation für 30 sec bei 1000 g pelletiert. Für die Auftrennung der Proteine mittels PAGE

wurden die Protein G-Sepharose-Kügelchen in Lämmli-Puffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Nach der Gelelektrophorese wurde die Proteine mit Coomassie-Färbelösung, wie unter 3.3.3 beschrieben, in den Gelen angefärbt und fixiert. Durch Schwenken in Entfärbelösung wurde überschüssiger Farbstoff entfernt. Zur Verstärkung der H³- und S³⁵-Signale wurden die Gele für 30 min mit "NAMP100 Amplify™" Lösung (Amersham) inkubiert, anschließend unter Vakuum getrocknet und für mindestens 2 Wochen "Hyperfilm™ MP" Röntgenfilmen exponiert (Amersham).

Metabolische Markierungen von Zellen mit S³⁵-Methion/Cystein

Für die Markierung wurden 5x10⁵ Zellen auf 100 mm-Ø-Zellkulturschalen ausgesät. Eine Stunde vor Markierungsbeginn wurden die Zellen zweimal mit 15 ml PBS gewaschen, um nichtradioaktives Methionin und Cystein von den Zellen und den Wänden der Petrischale zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit Hungermedium inkubiert, bevor das Medium gegen 7 ml Markierungsmedium (Hungermedium mit 50 µCi/ml S³⁵-Methion/Cystein ausgetauscht wurde. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde nach der Markierung abgesaugt und die Zellen wie bereits oben beschrieben lysiert. Die Immunpräzipitation und weitere Analyse wurde für die S³⁵-Methion/Cystein- und H³-Fucose-markierten Proteinen parallel durchgeführt.

Inhibition der N-Glykosylierung mit Tunicamycin

Die Hemmung des ersten Syntheseschritts der N-Glykosylierung durch Tunicamycin in CHO-Zellen, die die gewünschten DLL1-Proteinvarianten exprimierten, erfolgte durch die Zugabe von 10 µg/ml Tunicamycin (Sigma) zum Zellkulturmedium. Die Zellen wurden parallel, und wie oben beschrieben, mit oder ohne 10 µg/ml Tunicamycin für 24 h metabolisch mit H³-Fucose und S³⁵-Methion/Cystein markiert. Die nachfolgende Zellyse und Immunpräzipitation der Proteine wurde wie bereits oben beschrieben durchgeführt.

3.2.3.6 Immunhistochemische Färbungen von Zellen

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen auf sterilen gelatinisierten Deckgläsern ausgesät. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit kaltem (-20°C) Methanol für 10 min bei 4°C fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch eine 30-minütige Inkubation mit 5% Esel-Serum/PBS abgesättigt. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in 5% Esel-Serum/PBS für 1h bei RT. Zur Entfernung von ungebundenem Primärantikörper wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur für 1h mit dem Alexa® Fluorochrom gekoppelten Sekundärantikörper unter Lichtausschluß inkubiert. Bei Doppelfärbungen wurden die Primärantikörper jeweils zusammen eingesetzt und mit unterschiedlichen Alexa®-Fluorochromen visualisiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS, einmal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gewaschen und die Deckgläser mit "ProLong Antifade" (Invitrogen) auf einen Objektträger eingedeckelt. Die Analyse erfolgte mittels konfokaler Lasermikroskopie mit dem LSM510 Meta (CarlZeiss MicroImaging, Inc), das mit dem invertierten Mikroskop Axiovert 200M verbunden war und einem Plan Apochromat 63x/1.4 Öl-Objektiv für differentiellen Interferenz-Kontrast. Für die Bildaufnahme wurde die LSM510 Software (CarlZeiss MicroImaging, Inc), für die anschließende Bildbearbeitung und -zusammenstellung die Programme Photoshop und Illustrator CS verwendet.

3.2.3.7 Immunhistochemische Färbungen auf Ganzpräparaten

<i>PBS:</i>	<i>137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.3</i>
<i>PBS-TR:</i>	<i>0.1% Triton X-100 in PBS</i>
<i>Blocking-Lösung:</i>	<i>1% BSA in PBS-TR</i>
<i>Antigen-Retrieval-Lösung:</i>	<i>10 mM Natriumcitratpuffer, pH 6</i>

Die Immunfluoreszenz-Ganzpräparat-Färbung für die Analyse der subzellulären Lokalisierung von DLL1 im präsomitischen Mesoderm wurde nach Protokollen von Gavin Chapman (Victor Chang Cardiac Research Institute Darlinghurst, Australien) und Insa Geffers (Geffers et al., 2007) durchgeführt. Embryonen des Embryonalstadiums E9.5 wurden wie oben beschrieben präpariert, in 4% Paraformaldehyd (PFA)/PBS bei 4°C über Nacht fixiert, dreimal in PBS

gewaschen, in einer aufsteigenden Methanolreihe für 15 min bei Raumtemperatur dehydriert (25, 50, 75, 100% Methanol) und in 100% Methanol bei -20°C gelagert.

Für die Färbung wurden die Embryonen rehydriert, dreimal in Antigen-Retrieval-Lösung gewaschen und in dieser für 10 min bei 100°C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Embryonen mit Wasser gewaschen und zur Permeabilisierung für 8 min in 100% kaltem (-20°C) Aceton inkubiert. Nach anschließender Rehydrierung wurden die Embryonen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht bei 4°C mit Blocking-Lösung inkubiert.

Die Primärantikörper wurden in Blocking-Lösung verdünnt, zu den Embryonen gegeben und für 2-3 Tage bei 4°C und gelegentlichem Schwenken inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenem Antikörper wurden die Embryonen sechsmal für 30 min unter Schwenken mit PBS-TR gewaschen, für 2 h bei RT mit Blocking-Lösung und anschließend über Nacht mit den Alexa®Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern, die in Blocking-Lösung verdünnt wurden, inkubiert. Die Embryonen wurden sechsmal für 30 min unter Schwenken mit PBS-TR gewaschen und in einer aufsteigenden Glyzerinreihe geklärt (25%, 50%, 70% Glyzerin). Von den gefärbten Embryonen wurden die posterioren PSM-Bereiche abgetrennt und diese mittels "ProLong Antifade" (Invitrogen) auf einen Objektträger mit einem Deckgläschen eingebettet. Die Analyse erfolgte wie bei der immunhistochemischen Färbung von Zellen mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie.

3.2.4 Zellbiologische Methoden

3.2.4.1 Zellkultur von eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen wurden in entsprechenden Medien in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsinierung nach Standardprotokoll passagiert. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen als Zellsuspension in Einfriermedium (DMEM supplementiert mit 10% FCS und DMSO) in Kryoröhrchen eingefroren. Das Auftauen von kryokonservierten Zellen erfolgte zügig mit Hilfe von vorgewärmtem Zellkulturmedium.

3.2.4.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Zur Transfektion von eukaryotischen Zellen wurde das JetPei-Transfektionsreagenz (Biomol) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden 24h vor der Transfektion ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 50-70% Konfluenz aufwiesen. 2h vor der Transfektion wurde das Zellkulturmedium ausgewechselt.

3.2.4.3 Generierung und Subklonierung von stabilen Zelllinien

Für die Herstellung von CHO-Zelllinien, die bestimmte Proteine stabil überexprimieren sollten, wurden die Zellen mit den entsprechenden Konstrukten mit Hilfe des JetPei-Transfektionsreagenzes (Biomol) transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:150 bis 1:200 auf mehrere Zellkulturschalen aufgeteilt und unter Selektion (500 µg/ml Neomycin (G418), 250 µg/ml Zeocin) für 10-12 Tage kultiviert. Die entstandenen CHO-Zellklone wurden gepickt und zunächst auf einer 96-Loch-Platte, anschließend 24-Loch-Platte expandiert. Nach Duplizieren der Zellklone wurde eine Hälfte der Zellen mit Lämmli-Puffer lysiert, sonifiziert und die Proteinexpression auf einem Western-Blot analysiert. Zellklone, die das gewünschte Protein stabil exprimierten, wurden anschließend weiter expandiert.

CHO-Zellklone, die für das gewünschte Protein eine heterogene stabile Expression zeigten, wurden einer Subklonierung durch limitierte Verdünnung unterzogen. Dazu wurden die Zellen in einer Verdünnung von 0,5 Zellen pro Vertiefung auf einer 96-Loch-Platte ausgesät und unter Selektion kultiviert. Klonale Einzelzellen wurden expandiert und wie oben auf ihre Proteinexpression analysiert.

3.2.4.4 Generierung von Primärzellkulturen aus E9.5 Pofut1-Mausembryonen

Frisch präparierte E9.5 Embryonen wurden in vorgewärmten PBS gewaschen, in vorgewärmtes Pofut-Medium überführt und durch Resuspendieren zerkleinert. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf gelatinisierte 24-Loch-Platten ausgesät und expandiert.

Die Immortalisierung der Primärzellen erfolgte durch Infektion mit transduzierenden Lentiviren in der Arbeitsgruppe von Dagmar Wirth (Institut für Genregulation und Differenzierung; HZI Braunschweig) unter Verwendung von lentiviralen Vektoren, in denen eine autoregulierte SV40

TAg Kassetten transduziert wurde. 24h nach der Infektion wurde Doxycyclin (2 µg/ml) zur Aktivierung der Expressionskassette zugegeben (May et al., 2008; May et al., 2004).

Die Zellen wurden vor der Verwendung für weitere Analysen auf die Abwesenheit von transduzierenden Viren getestet.

3.2.4.5. Notch Transaktivierungsassay

Die NOTCH1-Aktivierung bestimmter DLL1 Proteinvarianten wurde mit Hilfe des “Dual-Luciferase Reporter Assay Systems” (Promega) gemessen. Dazu wurden CHO-Zelllinien, die stabil die DLL1 Proteinvarianten exprimierten, mit HeLa Zellen kokultiviert, die stabil NOTCH1 und transient Renilla-Luciferase als Reporter exprimierten. Bei Interaktion von DLL1 mit NOTCH1 wurde die Expression des Luciferase-Reporters angeschaltet, die als Maß für die NOTCH1-Aktivierung gemessen wurde. Zur internen Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde zusammen mit dem Renilla-Luciferase-Reporterkonstrukt ein zweites Reportergenkonstrukt für die Firefly-Luciferase transfiziert, deren Aktivität zur Normalisierung verwendet wurde.

Für die Kokultivierung wurden entsprechend den Angaben des Herstellers HeLaN1-Zellen transient mit den Reporterkonstrukten für die Firefly-Luciferase (pRBP₆-Luc) und der Renilla-Luciferase (pHRL-TK) als interne Transfektionskontrolle mit Hilfe des JetPei-Transfektionsreagenzes transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden in 6-Loch-Platten in Doppelbestimmungen jeweils 1x10⁶ kotransfizierte HeLaN1-Zellen mit 1x10⁶ DLL1 exprimierenden CHO-Zellen kokultiviert. 24h nach der Kokultivierung wurden die Zellen mit dem “Dual Luciferase Reporter Assay System Kit“ (Promega) nach Herstellerprotokoll aufgearbeitet. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die auf Eis stehenden Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend 250 µl PLB Puffer (Promega) zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in Mikrozentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellmembranen wurden durch einen Gefrier-Auftauzyklus aufgebrochen, die festen Bestandteile mittels Zentrifugation abgetrennt (30s, 10.000x g). 20 µl jedes Zelllysates wurden in eine 96-Loch-Luminometer-Platte pipettiert und im Luminometer durch automatische Injektion mit 30µl LAR II- und 30 µl Stop&Glo-Puffer (Promega) versetzt, wobei unmittelbar nach Quantifizierung der Firefly-Luciferase Aktivität durch Zusatz von Stop&Glo Reagenz das Biolumineszenz-Signal dieser Reaktion abgestoppt und simultan durch das im Stop&Glo Reagenz enthaltene Renilla-Luciferase-Substrat die Renilla Luciferase Biolumineszenz induziert wurde. Die Zugabe der

jeweiligen Mengen LARII- und Stop&Glo-Puffer erfolgte automatisiert über zwei Injektoren des verwendeten Luminometers (Lumat LB 9507; EG&G Berthold, Bad Wildbad).

Alle ermittelten Firefly- und Renilla-Luciferasewerte eines Ansatzes (Doppelmessungen) wurden gemittelt. Anschließend wurde der gemittelte Luciferasewert durch den gemittelten Renillawert geteilt ($RLU = \text{Luc}/\text{Ren}$). Die relativen Luciferaseaktivitäten (RLUs) einer Transfektion bzw. von gleichen Transfektionen wurden wiederum gemittelt und die Standardabweichungen berechnet und in einem Excel-Diagramm vergleichend dargestellt. Die Expression der Proteine in den eingesetzten Zelllinien wurde mit Hilfe einer Western Blot-Analyse überprüft.

3.2.5 Embryologische Methoden

3.2.5.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in dem Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover gehalten. Um Embryonen des Stadiums E9.5 zu erhalten wurden terminierte Verpaarungen angesetzt. Dazu wurden die Weibchen der über Nacht angesetzten Verpaarungen auf die Bildung eines Vaginalpfropf (plug) untersucht. Der Zeitpunkt eines positiven *plugs* wurde als embryonaler Tag 0.5 (E0.5) festgesetzt.

3.2.5.2 Isolation und Präparation der Embryonen

Zur Präparation der Embryonen wurden die trächtigen Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, der Bauchraum eröffnet, die Uteri herauspräpariert und in eiskaltes PBS überführt. Die Embryonen wurden in PBS unter einem Stereomikroskop nach Standardtechnik aus den Uteri präpariert und von allen embryonalen Membranen befreit (Hogan et al., 1994). Der Dottersack wurde zur Bestimmung des Genotyps mittels PCR-Analyse verwendet. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Embryonen in PBS gewaschen, über Nacht in 4% Paraformaldehyd (PFA)/PBS bei 4°C fixiert, 3-mal in PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Methanolreihe für 15 min bei Raumtemperatur dehydriert (25, 50, 75, 100% Methanol). Die Lagerung erfolgte in 100% Methanol bei -20°C.

3.2.5.3 Präparation von genomischer DNA aus embryonalen Dottersäcken

TE-Puffer *10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA*

Proteinase K Puffer *0.1M Tris/HCl pH 8.0, 5mM EDTA, 0.5% SDS, 200
µg/ml Proteinase K*

Bei der Präparation der Embryonen (siehe 3.2.5.2) wurde der Dottersack entnommen und über Nacht mit 200 µl Proteinase K Puffer bei 56°C inkubiert. Die Dottersäcke wurden abzentrifugiert (13.200 rpm, 10 min) und der Überstand mit 450 µl Isopropanol gefällt. Nach Waschen mit 70% Ethanol wurde das Pellet in 100-200 µl TE-Puffer aufgenommen und zur Inaktivierung von DNasen 30 min bei 65°C inkubiert. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei 4°C. Zur Genotypisierung der Embryonen wurde 1 µl der DNA für die Genotypisierungs-PCR eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse von DLL1-Proteinvarianten nach Mutation von Cysteinresten in den EGF-ähnlichen Domänen

Die für die Notch Liganden charakteristischen *Epidermal growth factor* (EGF)-ähnlichen Motive in der extrazellulären Domäne von DLL1 haben eine entscheidende Bedeutung für die Liganden-Rezeptor Interaktion, die dadurch induzierte Aktivierung des Notch Signalwegs und sind gleichzeitig Substrate für O-Fucosylierung und Glykosylierung (Rebay et al., 1991; Sakamoto et al., 2005; Panin et al., 2002). Der Vergleich der EGF-Domänen von DLL1 zeigt 6 konservierte Cysteinreste, die intramolekular 3 Disulfidbrücken ausbilden (Abb. 4.1). Die Bedeutung der einzelnen EGF-Motive für den Notch-Signalweg wird durch *in vivo* Experimente verdeutlicht, in denen Mutationen in den einzelnen EGF-Motiven von DLL1 unterschiedliche Phänotypen ergeben. Ein Austausch zweier konservierter Cysteine gegen Glycine, was die Bildung von 2 Disulfidbrücken verhindert, wirkt sich für die Mutanten der EGF-ähnlichen Domänen 1 und 2 letal aus. Die Embryonen sterben am Tag E12 der Embryonalentwicklung, während hingegen Mäuse mit Mutationen in den EGF-Domänen 5, 6 und 7 lebensfähig sind und milde Skelettphänotypen aufweisen (K. Schuster-Gossler, unpublizierte Daten).

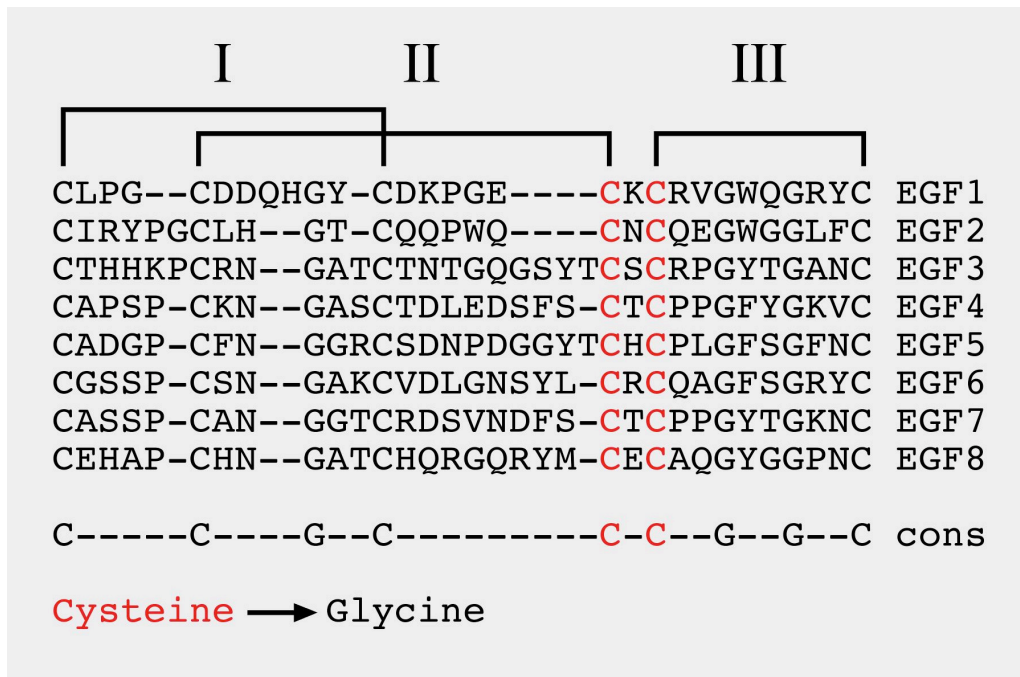


Abbildung 4.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen der EGF-Domänen 1-8 von DLL1. Die 6 konservierten Cystein- (C)- und 3 Glycin (G)-Reste sind jeweils unter dem Sequenzvergleich hervorgehoben (schwarz), darunter die beiden mutierten Cysteine (rot). Die 6 konservierten Cysteinreste von DLL1 bilden 3 intramolekulare Disulfidbrücken aus (I-III), von denen 2 nach Mutation der Cysteinreste nicht mehr gebildet werden.

Um die Rolle der Integrität der einzelnen EGF-ähnlichen Domänen von DLL1 zu untersuchen und um die Frage zu klären, welche Bedeutung der Verlust dieser beiden konservierten Cysteinreste und der durch sie gebildeten Disulfidbrücken in den EGF-Motiven für die zelluläre Rolle des Liganden hat, wurden im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* DLL1 Proteinvarianten mit entsprechenden Aminosäuresubstitutionen analysiert.

4.1.1 Analyse der subzellulären Lokalisation der DLL1 EGF Mutanten

Um die Auswirkungen der Punktmutationen auf die subzelluläre Verteilung von DLL1 zu untersuchen, wurden CHO-Zellen, die diese mutanten DLL1 EGF-Proteinvarianten stabil exprimierten, einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Dazu wurden die unter 3.1.7 aufgeführten hergestellten stabilen CHO Zelllinien für die mutanten Proteine DLL1 EGF1, 3, 5, 6 und 7 einer Subklonierung, die Linien CHO DLL1 EGF2 und 8 einer zweifachen Subklonierung unterzogen, um monoklonale Zellen mit möglichst hoher Proteinexpression zu erhalten. Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen wurden für die einzelnen Linien die Proteinexpressionen bestimmt und Zellklone mit vergleichbarer Expression für die *in vitro* Analysen ausgewählt. Für die Herstellung einer stabil exprimierenden CHO DLL1 EGF4 Zelllinie wurde das unter 3.1.5 aufgeführte Konstrukt pTracerCMV-DII1 EGF4ex Flag in CHO Zellen transfiziert und mit 500 µg/ml Neomycin (G418) auf Zellklone selektiert, die DLL1 EGF4 Flag stabil exprimierten. Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurden die Klone mit der höchsten Proteinexpression bestimmt und anschließend subkloniert (siehe 3.2.4).

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden CHO Zellen, die DLL1wt und die jeweiligen DLL1 EGF Mutanten stabil exprimierten, mit drei Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope der DLL1 Proteine angefärbt. Der anti-Flag-Antikörper war gegen den am C-Terminus platzierten Flag-Tag, der anti-DLL1, 2A5-Antikörper gegen ein Peptid in der intrazellulären Domäne und der Antikörper anti-DLL1, 1F9 gegen ein Peptid gerichtet, das zwischen EGF8 und der Transmembrandomäne von DLL1 liegt. Da alle drei Epitope außerhalb der von den

vorgenommenen Mutationen betroffenen EGF-Motiven lagen, wurde die Detektion durch die Mutagenese nicht beeinträchtigt.

In den stabil DLL1 exprimierenden CHO-Zellen war nach Anfärbung mit den Antikörpern gegen die intra- und extrazelluläre Domäne DLL1-Flag auf der Zelloberfläche lokalisiert (Abb. 4.2, a-c), was aufgrund seiner Transmembrandomäne, des N-terminalen Signalpeptids und seiner Rolle als Notch-Ligand auf der Signal-sendenden Zelle erwartet wurde. Dagegen zeigte DLL1 EGF1 Flag eine intrazelluläre Lokalisierung nach Anfärbung mit allen drei Antikörpern (Abb. 4.2 d-f). Eine verstärkte Proteinexpression wurde dabei um den Kern detektiert. Die DLL1-Proteinvarianten mit Mutationen in den EGF-Motiven 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 zeigten nach den Antikörperfärbungen eine Lokalisierung auf der Zelloberfläche, wie sie vergleichbar beim DLL1wt Protein beobachtet wurde (Abb. 4.2, g-a'). Neben der starken Expression auf der Plasmamembran zeigten einige der mutierten Proteine noch eine schwache Expression im Cytosol, so bei DLL1 EGF2 (Abb. 4.2 g, h), EGF3 (Abb. 4.2 j-l), EGF4 (Abb. 4.2 o), EGF5 (Abb. 4.2 p-r), EGF6 (Abb. 4.2 s, t), EGF7 (Abb. 4.2 w) und EGF8 (y-a'). Beim Vergleich der konfokalen Aufnahmen wurde für DLL1 EGF8 eine geringere Proteinmenge auf der Plasmamembran nachgewiesen (Abb. 4.2 y-a'). Auf Zelloberflächen ohne Zellkontakt wurde nur eine sehr schwache Expression detektiert, während hingegen Plasmamembranen zwischen zwei benachbarten Zellen eine stärkere Expression zeigten (Abb. 4.2 y-a', Pfeile). Im Vergleich zu DLL1 wies von allen EGF-Mutanten nur DLL1 EGF1 ein abweichendes Expressionsmuster auf, das sich durch eine intrazelluläre bzw. perinukleäre Lokalisierung auszeichnete. Die Mutationen in den EGF-Motiven 2 bis 8 schienen keinen wesentlichen Einfluß auf die subzelluläre Lokalisierung zu haben, da eine Expression auf der Zelloberfläche wie beim DLL1wt Protein beobachtet wurde.

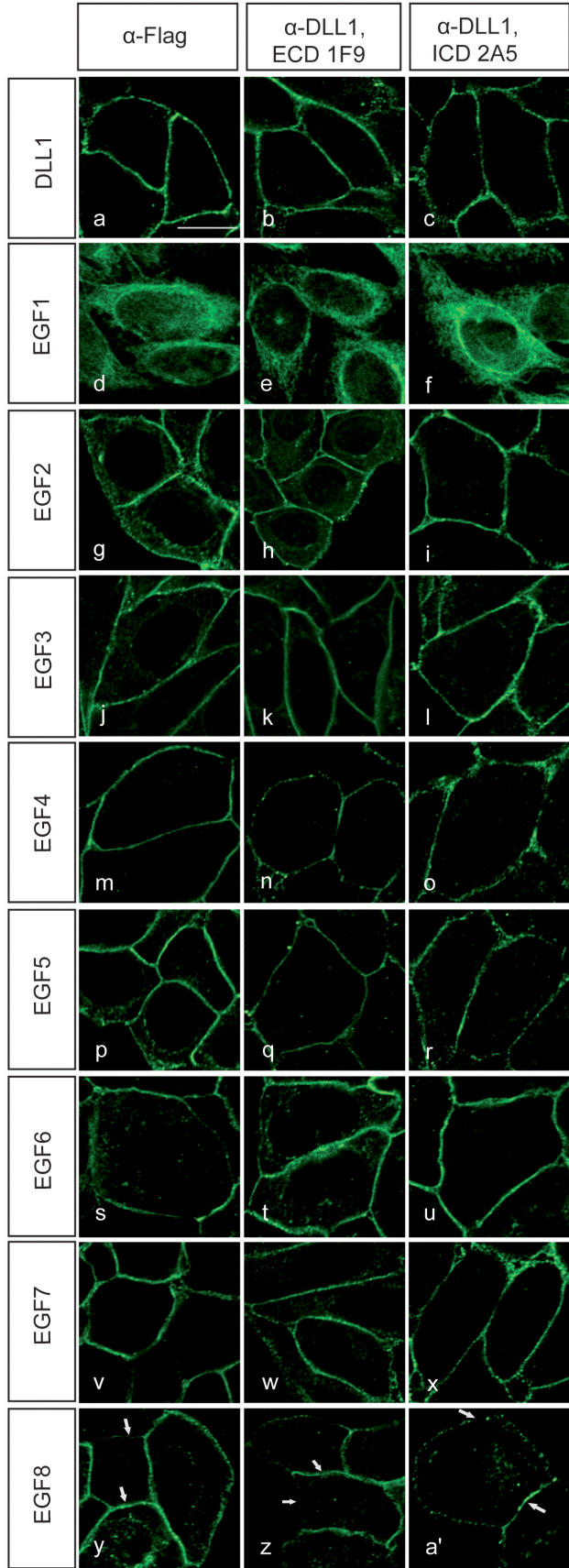


Abb. 4.2: Lokalisationsanalyse von DLL1 und DLL1-EGF-Proteinvarianten. Stabil DLL1 und die mutanten DLL1 Proteinvarianten exprimierende CHO Zellen wurden mit drei Primärantikörpern gegen verschiedene Epitope des DLL1 Proteins und Alexa488®-konjugierten Sekundärantikörpern angefärbt: Mit dem α -Flag Antikörper gegen das C-terminale Flag-Tag (a, d, g, j, m, p, s, v, y); mit α -Dll1,1F9 gegen ein extrazelluläres (b, e, h, k, n, q, t, w, z) und mit α -DLL1, 2A5 gegen ein intrazelluläres Peptid (c, f, i, l, o, r, u, x, a') von DLL1. Die Färbungen zeigten für DLL1 EGF1 eine intrazelluläre Lokalisierung im Vergleich zum DLL1wt Protein. Der Austausch von zwei Cysteinresten durch Glycine in den EGF-Motiven 2-8 von DLL1 führten zu einer Expression auf der Zelloberfläche. Maßstab, 10 μ m.

4.1.2 Analyse der Zelloberflächenpräsentation der DLL1 EGF Mutanten mit Hilfe einer Oberflächenbiotinylierung

Um zu untersuchen, ob DLL1 EGF1 ausschließlich intrazellulär exprimiert wurde und sich die mutierten DLL1 EGF-Proteine in der auf der Zelloberfläche präsentierten Proteinmenge unterschieden, wurde eine Biotinylierung der Zelloberfläche mit anschließender Streptavidin-Immunpräzipitation durchgeführt (siehe 3.2.3.4) und die biotinylierten Proteine mit Hilfe des Flag-Tags auf einem Western Blot nachgewiesen (Abb. 4.3). Dabei zeigte sich, dass nur ein geringer Teil des Proteins DLL1 EGF1 die Zelloberfläche erreichte und mit Biotin markiert wurde. Für die übrigen Proteinmutanten (DLL1 EGF2-EGF8) wurden wie für das DLL1wt Protein eindeutige Zelloberflächenpräsentationen nachgewiesen, wobei die Proteinmengen für DLL1 EGF2 und DLL1 EGF3 schwächer erschienen. Mit Hilfe der Western Blot Analyse der Zelllysate (Input) wurde die Proteinexpression von DLL1 und allen DLL1 EGF Proteinvarianten in den für die Immunpräzipitation eingesetzten Lysaten detektiert.

Zusammen mit der Analyse der subzellulären Lokalisierung konnte auf diese Weise bestätigt werden, dass DLL1 EGF1 die Zelloberfläche nicht erreichte, die übrigen mutanten DLL1-EGF Proteine auf der Oberfläche präsentiert wurden und somit für eine Interaktion mit dem Notch1-Rezeptor zur Verfügung standen.

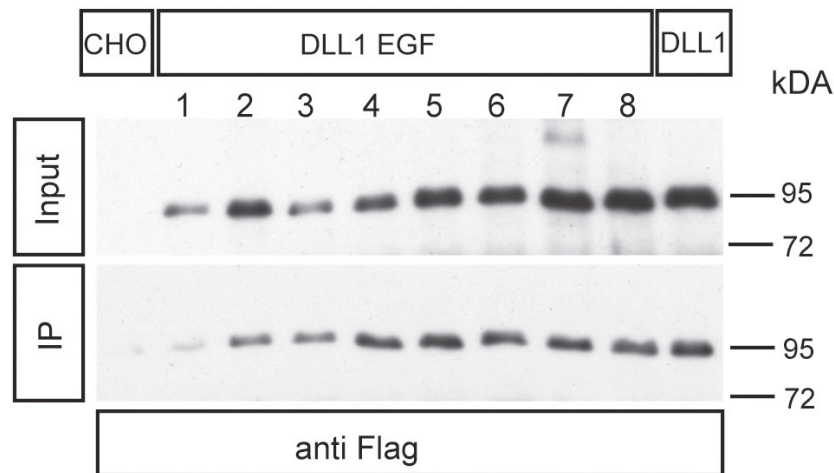


Abb. 4.3: Oberflächenbiotinylierung von DLL1 und den mutanten DLL1-EGF-Proteinvarianten. Die Oberfläche von CHO-Zellen, die DLL1 und die mutanten DLL1-EGF Proteine stabil exprimierten, wurde mit Biotin markiert. Nach Zellyse und Streptavidin-Immünpräzipitation wurden die Zellysate (Input) und die Streptavidin-immünpräzipitierten Proteine nach der Oberlächenbiotinylierung (IP) mit Hilfe des anti-Flag-Antikörpers auf einem Western Blot nachgewiesen. Der Blot zeigte für DLL1 EGF1 eine sehr schwache Expression auf der Zelloberfläche, dagegen für die EGF-Mutanten 2-8 (DLL1 EGF2-EGF8) eine eindeutige Oberflächenpräsentation.

4.1.3 Analyse der NOTCH1-Aktivierung der DLL1 EGF Proteinmutanten

Um zu ermitteln, ob die mutierten DLL1 EGF Proteine in der Lage waren, den Notch-Signalweg zu aktivieren, wurde in einem Luciferase-basierten Transaktivierungsassay für diese die relativen NOTCH1-Aktivierungen im Vergleich zum DLL1wt Protein gemessen.

Für den Assay wurden wie unter 3.2.4.5 beschrieben, NOTCH1 exprimierende HeLaN1 Zellen transient mit einem Reporter-Konstrukt (pRBP₆-Luc) und einem Konstrukt für Renilla-Luciferase (pHRL-TK) als interne Transfektionskontrolle transfiziert. Die HeLaN1 Zellen wurden anschließend für 24 h mit der gleichen Zellzahl DLL1wt und die mutanten DLL1 EGF Proteine exprimierenden CHO Zellen kokultiviert. Eine Interaktion des Notch1-Rezeptors mit dem Liganden DLL1 oder seinen mutanten Proteinvarianten führten im Falle einer Aktivierung des Notch-Signalwegs zur Expression der Luciferase, die zur Quantifizierung der NOTCH-Aktivierung herangezogen wurde.

Als Negativkontrolle wurden untransfizierte CHO-Zellen kokultiviert. DLL1 EGF1 zeigte nach einmaliger Analyse der Aktivierungen, wie aufgrund der fehlenden Zelloberflächenpräsentation

erwartet, keine NOTCH1-Aktivierung und wurde für weitere Wiederholungen des Assays ausgeschlossen (Daten hier nicht gezeigt). Die Messungen zeigten, dass die weiteren DLL1-EGF-Proteinvarianten sehr unterschiedlich in der Lage waren, NOTCH1 zu aktivieren (Abb. 4.4). Die mutanten Proteine DLL1 EGF2 und EGF3 verfügten nur über eine sehr geringe Transaktivierungsfähigkeit (19% und 25% relative Luciferase-Aktivierung). Während in der Lokalisierungsanalyse eine Zelloberflächenexpression für beide Proteinvarianten detektiert wurde (Abb. 4.2), zeigte die Zelloberflächenbiotinylierung für diese verringerte Proteinmengen auf der Oberfläche im Vergleich zum DLL1wt Protein (siehe Abb. 4.3), so dass diese Ergebnisse der Zelloberflächenpräsentation mit den NOTCH1-Aktivierungen korrelierten. Die Proteinvarianten DLL1 EGF4, EGF6, EGF7 und EGF8 wiesen ein zum DLLwt Protein vergleichbares Potential auf, NOTCH1 zu aktivieren (87%, 89%, 92%, 98%). Für DLL1 EGF 5 wurde mit einer Luciferase-Aktivierung von 63% eine im Vergleich zum DLL1 wt Protein um ein Drittel reduzierte Aktivierung gemessen.

Mit Hilfe der Lokalisierungsanalyse und der Zelloberflächenbiotinylierung wurde für alle im Transaktivierungsassay getesteten mutanten Proteine (DLL1 EGF2-EGF8) eine Expression auf der Plasmamembran und somit die Voraussetzung für die Interaktion mit dem Notch-Rezeptor bestätigt. Mit dem Transaktivierungsassay konnte gezeigt werden, welche der auf der Oberfläche präsentierten Proteine in der Lage waren, NOTCH1 zu aktivieren und wie sich die Proteinvarianten untereinander in diesem Vermögen unterschieden, nicht aber die Affinitäten der Proteinvarianten zum Notch-Rezeptor bestimmt werden.

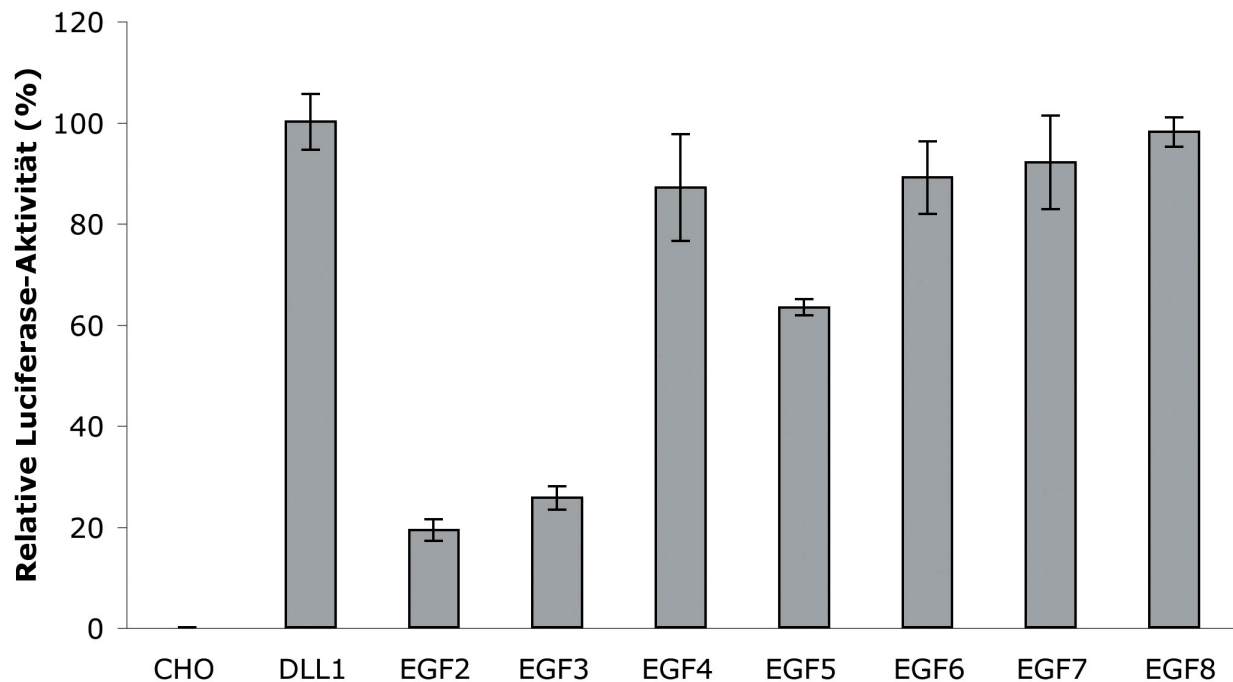


Abb. 4.4: Bestimmung der NOTCH1-Aktivierung der mutanten DLL1 EGF Proteine. Mit Hilfe eines Luciferase-basierten Transaktivierungsassays wurde die Fähigkeit der mutanten Liganden getestet, NOTCH1 zu aktivieren. Dazu wurden für 24h gleiche Zellzahlen von NOTCH1 stabil exprimierenden HeLa-Zellen, in die zuvor ein Luciferase-Reporter (RBP-luc)- und Renilla-Luciferase-Konstrukt (pRL-TK) transient transfiziert worden war, mit CHO-Zellen kokultiviert, die stabil DLL1wt und die mutanten DLL1 EGF Proteinvarianten exprimierten. Die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor führte zur Aktivierung des Notch-Signalwegs und zur Expression der Luciferase als Reporter, die als Maß der Transaktivierung gemessen wurde. Bei vergleichbarer Oberflächenpräsentation (Abb. 4.2) zeigten die einzelnen DLL1 EGF Proteinvarianten sehr unterschiedliche Werte für die relative Luciferase-Aktivierung. DLL1 EGF2 und EGF3 waren demnach nicht oder nur sehr wenig in der Lage, den Notch-Signalweg zu aktivieren (<25%). DLL1 EGF 4, 6, 7 und 8 wiesen im Vergleich zum DLL1wt Protein nur etwas verringerte Transaktivierungsfähigkeiten auf (87-98%). DLL1 EGF5 erreichte nur eine 70%ige Luciferase-Aktivierung verglichen zu DLL1wt. Die relative Luciferase-Aktivität der untransfizierten CHO Zellen (CHO) wurde auf 0% und die des DLL1wt Proteins (DLL1) auf 100% gesetzt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe der Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert, für die ein Konstrukt (pRL-TK) kotransfiziert worden war. In drei unabhängigen Experimenten wurden 6 Kokultivierungen pro EGF Proteinvariante durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Zusammenfassend konnte in diesem ersten Teil der Arbeit gezeigt werden, dass *in vitro* der Austausch zweier konservierter Cysteinreste in der EGF-ähnlichen Domäne EGF1 von DLL1 dazu führte, dass der Ligand nicht mehr an der Zelloberfläche, sondern perinukleär exprimiert wurde. Als Folge der fehlenden Zelloberflächenpräsentation war eine Interaktion mit dem Notch-Rezeptor und eine NOTCH1-Aktivierung nicht mehr möglich.

Für die mutanten Proteine DLL1 EGF2 und EGF3 wurde mit Hilfe einer Lokalisierungsanalyse und Oberflächenbiotinylierung gezeigt, dass die beiden Proteine auf der Zelloberfläche exprimiert wurden, aber im Vergleich zum DLL1 wt Protein eine verringerte Proteinmenge aufwiesen, und nicht mehr oder nur sehr gering in der Lage waren, NOTCH1 zu aktivieren. Die Proteine DLL1 EGF 4, 6, 7 und 8 wurden an der Zelloberfläche präsentiert und wiesen, verglichen mit dem DLL1wt Protein, eine nur schwach verringerte Fähigkeit auf, NOTCH1 zu aktivieren. Die Mutationen in diesen EGF-Motiven schienen demnach *in vitro* keine essentielle Bedeutung für die Funktion von DLL1 zu haben.

4.2 Untersuchung der Rolle der O-Fucosylierung für den Notch-Liganden

DLL1

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass verschiedene EGF-Motive in der extrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors posttranslational durch die *Protein Glycosyltransferase1 (POFUT1)* modifiziert werden, in dem sie die Übertragung von O-Fucose auf Serin- und Threoninreste in spezifischen Konsensussequenzen der EGF-Motive katalysiert (Okajima et al., 2003). Die O-fucosylierten EGF-Motive werden weiter durch die β -1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase *FRINGE* modifiziert, wobei diese Modifikationen insgesamt die Notch-Affinität zu den Liganden reguliert (Moloney et al., 2000; Haines und Irvine, 2003; Hicks et al., 2000). In den EGF-ähnlichen Domänen der Notch-Liganden wurden ebenfalls Konsensussequenzen für eine O-Fucosylierung gefunden, die als Substrat für POFUT1 dienen und weiter durch FRINGE modifiziert werden (Panin et al., 2002; Shao et al., 2002). Hinweise darauf, dass die O-Fucosylierung für eine normale Liganden-Funktion essentiell ist, gaben Studien über Mutationen in den Liganden, in denen die O-Fucosylierung fehlte. So wurde in *Drosophila* ein hypomorphes Allel von Delta gefunden (*sup5*), das eine Mutation in der Fucosylierungsstelle in EGF3 aufweist (Lieber et al., 2002), eine Mutation (“missense mutation“) in der Fucosylierungsstelle in EGF5 von JAGGED1 führt zum *Alagille-Syndrom* (Heritage et al., 2000).

Um herauszufinden, ob die O-Fucosylierung für die biologische Aktivität von DLL1 essentiell ist, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit *in vivo* und *in vitro* untersucht, ob DLL1 mit seinen Fucosylierungsstellen in den EGF-ähnlichen Domänen ein *in vitro* Substrat für POFUT1 ist und wie sich die Aktivität von DLL1 durch einen Verlust der Fucosylierung ändert.

4.2.1 *In vitro* Analysen

Um zu untersuchen, welche der durch die Konsensussequenzen vorhergesagten Fucosylierungsstellen in den EGF-Motiven von DLL1 tatsächlich fucosyliert werden und eine Rolle für DLL1 und seine Funktion im Notch-Signalweg spielen, wurden diese Fucosylierungsstellen mutiert und die resultierenden mutanten DLL1 Proteine *in vitro* auf ihre subzelluläre Lokalisierung, ihre Oberflächenpräsentation und die Fähigkeit, NOTCH1 zu aktivieren, getestet.

4.2.1.1 Analyse der subzellulären Lokalisierung von DLL1 und den mutanten O-Fucosylierungsvarianten DLL1 mEGF

Um zu untersuchen, wie sich der Verlust der O-Fucosylierung nach Mutagenese der Konsensussequenzen auf die subzelluläre Lokalisierung der Proteinvarianten auswirkte, wurden mit den unter 3.2.1.2 generierten Expressionskonstrukten zunächst stabile Zelllinien hergestellt. Dazu wurden die verschiedenen Konstrukte in CHO Zellen transfiziert und mit Hilfe von 500 µg/ml Neomycin und 250 µg/ml Zeocin auf Zellklone selektiert, die die mutanten Proteine stabil exprimierten. Die Proteinexpression wurde auf einem Western Blot mit dem anti-Flag-Antikörper, der gegen das am C-Terminus platzierte Flag-Tag gerichtet war, nachgewiesen. Alle stabilen Zelllinien wurden daraufhin einer Subklonierung unterzogen, die Proteinexpression auf einem Western Blot bestimmt und für die *in vitro* Analysen von allen Zelllinien Klone mit einer vergleichbaren Expression ausgewählt (siehe 3.2.4.3).

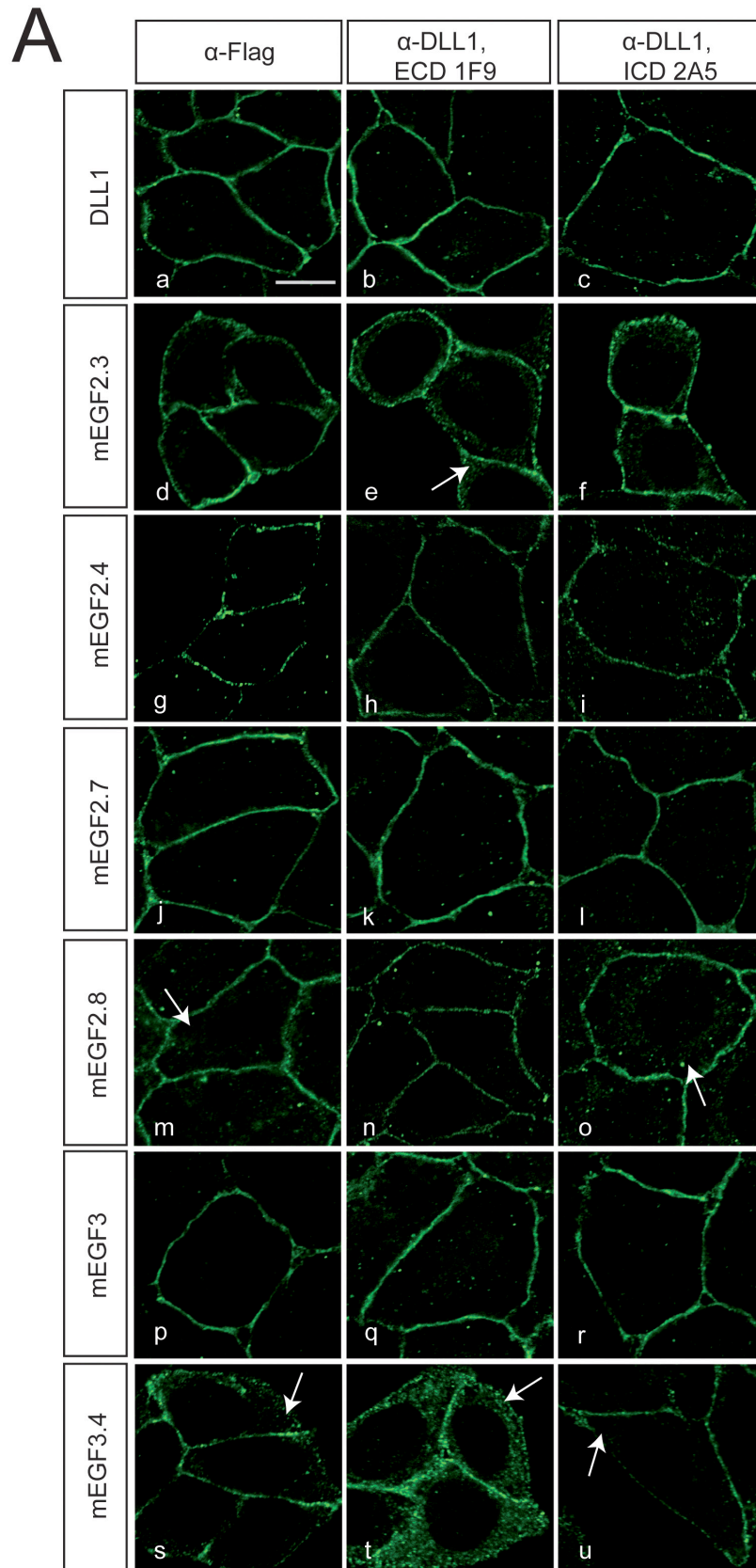
Mit den Expressionskonstrukten Dll1 mEGF2, mEGF4, mEGF8 und mEGF7, 8 konnte keine stabilen Zelllinien hergestellt werden. Durch Sequenzierung wurden Mutationen, außer der generierten, die zu einem Translationsabbruch geführt hätten, ausgeschlossen. Da sowohl 24 h als auch 48 h nach transienter Transfektion in CHO Zellen kein Expressionssignal auf einem Western Blot mit Antikörpern gegen die intrazelluläre und extrazelluläre Domäne von DLL1 sowie gegen den Flag-Tag detektiert wurden, konnten diese Konstrukte nicht für die *in vitro* Analysen verwendet werden. Von den Proteinvarianten, in denen jeweils nur ein EGF-Motiv in seiner Fucosylierungssequenz mutiert wurde, waren nur DLL1mEGF3 und DLL1mEGF7 exprimierbar. Alle weiteren exprimierten Konstrukte enthielten Kombinationen von zwei oder mehreren Mutationen.

Die stabilen Zellen der DLL1-Fucosylierungsmutanten wurden mit drei Primärantikörpern gegen unterschiedliche Epitope des DLL1 Proteins und Alexa®488-konjugierten Sekundärantikörpern angefärbt (siehe 3.3.6). Die konfokalen Aufnahmen zeigten für die Immunfluoreszenzfärbungen des DLL1wt Proteins eine Lokalisierung auf der Zelloberfläche, wie sie für den Liganden des Notch-Rezeptors erwartet und im Folgenden als Positivkontrolle verwendet wurde. Die 13 DLL1-Fucosylierungsmutanten (DLL1 mEGFs) zeigten nach der Färbung unterschiedliche Lokalisierungsmuster (Abb. 4.5 A und B). Die mutanten Proteine DLL1 mEGF 2.3, mEGF 2.4, mEGF 2.7, mEGF 2.8, mEGF 3, mEGF 3.4, mEGF 3.8, mEGF 4.8 und mEGF 2.3.4. wurden nach Überexpression in den CHO-Zellen mit allen drei Antikörpern auf der Zelloberfläche

detektiert (Abb. 4.5 A a-u, B d-f, j-l, p-r). Verglichen mit der Färbung des DLL1wt Proteins zeigten einige dieser Proteinvarianten neben der starken Oberflächenfärbung eine zusätzliche schwächere intrazelluläre Färbung, so z.B. DLL1 mEGF 2.3 (Abb. 4.5 A e), mEGF 2.8 (Abb. 4.5 A m, o) mEGF 3.4 (Abb. 4.5 A s-u) und DLL1 mEGF 4.8 (Abb. 4.5 B l). Während diese schwächere cytoplasmatische Färbung für DLL1 mEGF 2.3 mit allen drei Antikörpern beobachtet wurde (A d-f), war sie für DLL1 mEGF 2.8 mit den Antikörpern gegen die intrazellulären Epitope, anti-Flag und anti-DLL1, 2A5, deutlicher zu erkennen (A m-o), für DLL1 mEGF 3.4 umgekehrt mit dem Antikörper gegen die extrazelluläre DLL1-Domäne (A s-u). Die Aufnahmen zeigten für die Proteinvariante DLL1 mEGF 4.8 (B j-l) mit dem anti-Flag- und anti-DLL1, 1F9-Antikörpern eine gleichmäßige Expression auf der Zelloberfläche von Zellen, die von Nachbarzellen umgeben waren (B j, k). Die mit dem anti-DLL1, 2A5-Antikörper nachgewiesene Lokalisierung erschien auf nicht an Nachbarzellen grenzende Zelloberflächen schwach und an Plasmamembranen von direkt aufeinandertreffenden Zellen verstärkt (B l, Pfeile). Ein zum DLL1wt Protein abweichendes Expressionsmuster zeigten die Immunfluoreszenzfärbungen der mutanten Proteine DLL1 mEGF 3.7, mEGF 4.7, mEGF 7 und mEGF 2.3.4.7.8, die überwiegend intrazellulär lokalisiert waren (Abb. 4.5 B a-c, g-i, m-o, s-u). Dabei schien die Expression im Cytoplasma der Zellen nicht homogen, sondern perinukleär konzentriert (B i, o und s, Pfeile) und an der Plasmamembran sehr gering, da diese nur sehr schwach angefärbt (B m, s, Pfeile) oder sogar zwischen zwei aneinandergrenzenden Zellen nicht mehr zu erkennen war (B t, u, Pfeile).

Die Analyse der subzellulären Lokalisierung zeigte, dass die Mutagenese der Fucosylierungsstelle in EGF7, in den EGF-Motiven 3 und 7, sowie 4 und 7 und der vollständige Verlust der Fucosylierung durch Mutagenese aller Fucosylierungssequenzen dazu führte, dass die mutanten DLL1-Proteine die Zelloberfläche nicht mehr oder in geringer Menge erreichten und somit für eine Interaktion mit dem Notch-Rezeptor nicht mehr oder nur eingeschränkt zur Verfügung standen.

Da die Mutationen in den Fucosylierungsstellen, für deren zugehörige Proteine eine zum DLL1wt Protein veränderte Zelllokalisierung beobachtet wurde, einzeln oder in Kombination mit einer anderen Mutation zu verschiedenen und nicht konsistenten Ergebnissen führten, war es nicht möglich, eine einzelne Fucosylierungsstelle zu identifizieren, deren Verlust durch Mutagenese für die Veränderungen in der Lokalisierung verantwortlich war.



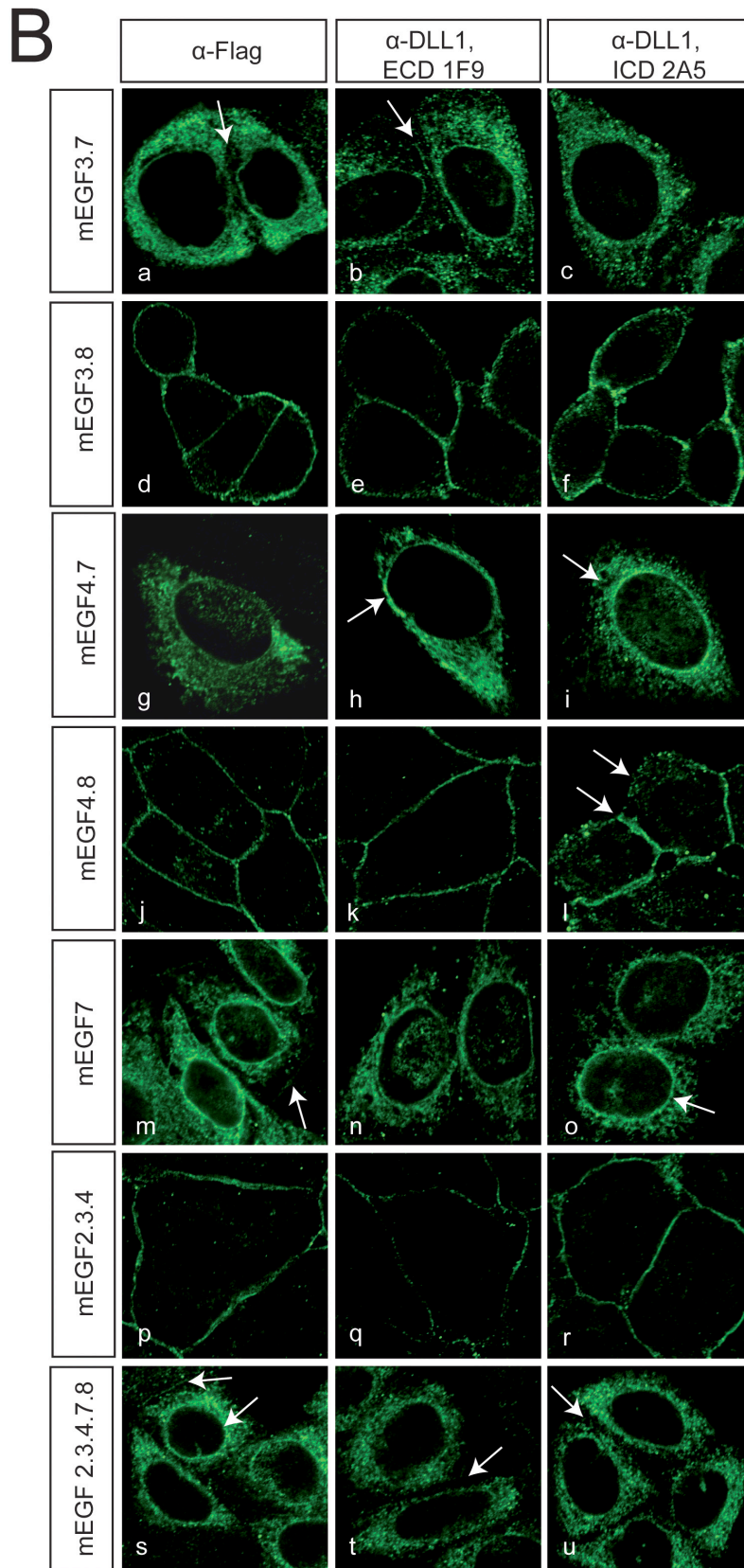


Abb. 4.5: Analyse der subzellulären Lokalisierung von DLL1 und den DLL1 mEGF-Fucosylierungsmutanten. CHO Zellklone, die stabil DLL1 und die mutanten DLL1 Proteinvarianten (DLL1 mEGFs) exprimierten, wurden mit drei Primärantikörpern gegen verschiedene Epitope des DLL1 Proteins und Alexa488®-konjugierten Sekundärantikörpern angefärbt. Eine zum DLL1 wt Protein vergleichbare Zelloberflächenexpression zeigten die mutanten Proteine DLL1 mEGF 2.3, DLL1 mEGF 2.4, DLL1 mEGF 2.7, DLL1 mEGF 2.8, DLL1 mEGF 3, DLL1 mEGF 3.4, DLL1 mEGF 3.8, DLL1 mEGF 4.8 und DLL1 mEGF 2.3.4 (Abb. 4.5 A a-u, B d-f, j-l, p-r). Dagegen wurde für die Proteinvarianten DLL1 mEGF 3.7, DLL1 mEGF 4.7, DLL1 mEGF 7 und DLL1 mEGF 2.3.4.7.8 eine überwiegend intrazelluläre Lokalisierung beobachtet, die perinukleär stärker erschien als in der Nähe der Plasmamembran. Maßstab, 10 µm.

4.2.1.2 Analyse der intrazellulären Lokalisierung von DLL1 und den mutanten O-Fucosylierungsvarianten DLL1 mEGF

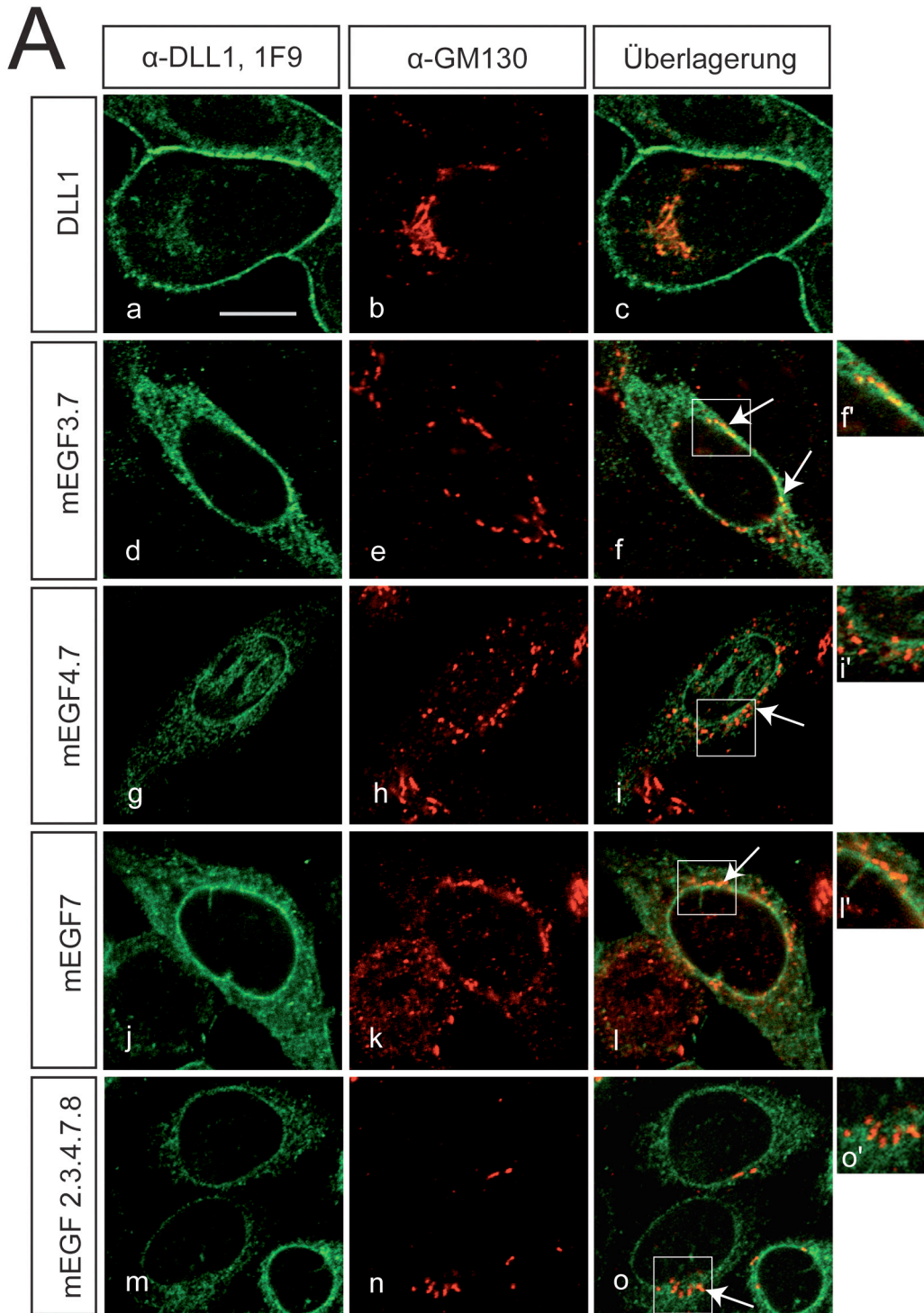
Um die unter 4.2.1.1 ermittelte intrazelluläre Lokalisierung der Proteinvarianten DLL1 mEGF3.7, DLL1 mEGF4.7, DLL1 mEGF7 und DLL1 mEGF2.3.4.7.8 in den perinukleären Regionen genauer zu untersuchen, wurden Kolokalisierungsstudien mit Organellenmarkern durchgeführt. Aufgrund der Konzentration der Proteine um den Kern wurde ein Marker für das Endoplasmatische Reticulum (ER), Calreticulin, und für das Cis-Golgi-Netzwerk, GM130, ausgewählt. GM130, ein Mitglied der Golgin-Familie ist ein cytoplasmatisches Protein, das an die Membran des Cis-Golgi-Netzwerkes und des ER-Golgi-Intermediat-Kompartiments (ERGIC) bindet. Calreticulin liegt im Lumen des ER vor und fungiert zusammen mit Calnexin während der Faltung von Glykoproteinen als Chaperon. Calreticulin wurde auch auf der Oberfläche, im Cytosol und im Zellkern vieler Zellarten gefunden (Arosa et al., 1999).

Für die Antikörperfärbung wurden die CHO-Zellklone, die diese Proteinvarianten stabil exprimierten mit dem anti-DLL1, 1F9-Antikörper, jeweils einem dieser Marker, sowie Alexa®488- und Alexa®555 konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt (Abb. 4.6 A und B). Das als Positivkontrolle verwendete DLL1wt Protein wurde wie erwartet mit Hilfe des anti-Dll1-Antikörpers ausschließlich auf der Zelloberfläche detektiert und zeigte weder eine Kolokalisierung mit dem Cis-Golgi-Protein GM130, noch eine mit dem ER-Protein Calreticulin (Abb. 4.6 A a-c, B a-c). Die mutanten Proteine DLL1 mEGF3.7, DLL1 mEGF4.7 und DLL1 mEGF7 und DLL1 mEGF2.3.4.7.8 wiesen, wie bereits unter 4.2.1.1 beschrieben, eine intrazelluläre Expression auf, die zum Teil als ringförmige Struktur um den Zellkern konzentriert erschien (A g, j, m).

Die Doppelfärbungen mit dem Golgi-Protein GM130 zeigten für das mutante Protein DLL1 mEGF3.7 teilweise eine Kolokalisierung in unmittelbarer Kernnähe, wobei diese Überlagerung der Färbungen wegen der schon geringen Expression von GM130 nur an wenigen Stellen deutlich erkennbar war (A f, f', Pfeile). Für die Proteinvarianten DLL1 mEGF4.7, DLL1 mEGF7 und DLL1 mEGF2.3.4.7.8 lagen die Färbungen des anti-DLL1- und GM130-Antikörpers sehr dicht beieinander, die Überlagerung konnte aber keine Kolokalisierungen bestätigen (A g-o).

Die Lokalisierungsanalyse mit dem anti-DLL1- und Calreticulin-Antikörper zeigten für die Proteinvarianten DLL1 mEGF3.7, DLL1 mEGF4.7 und DLL1 mEGF2.3.4.7.8 eine teilweise Kolokalisierung (Abb. 4.4 B d-i, m-o), für das Protein DLL1 mEGF7 aber keine überlappende Expression (B d-f).

Da die intrazelluläre Expression der Proteine nicht flächig, sondern vielmehr in vesikulären Strukturen nachgewiesen wurde und somit die Überlagerungen nur punktuell entstanden, war die Auswertung der Kolokalisierungsanalysen erschwert. Um zu überprüfen, ob die Proteine noch in geringen Mengen die Zelloberfläche der CHO-Zellen erreichten, wurden diese in einem weiteren Experiment mit anti-PanCadherin-Antikörpern als Oberflächenmarker angefärbt, die getesteten Antikörper zeigten allerdings keine spezifische Detektion. Um die intrazelluläre Lokalisierung noch detaillierter aufzuklären, wären noch weitere Doppelfärbungen nötig, so z. Bsp. mit Markern für die frühen, mittleren und späten Endosomen Rab1, Rab6 und Rab11.



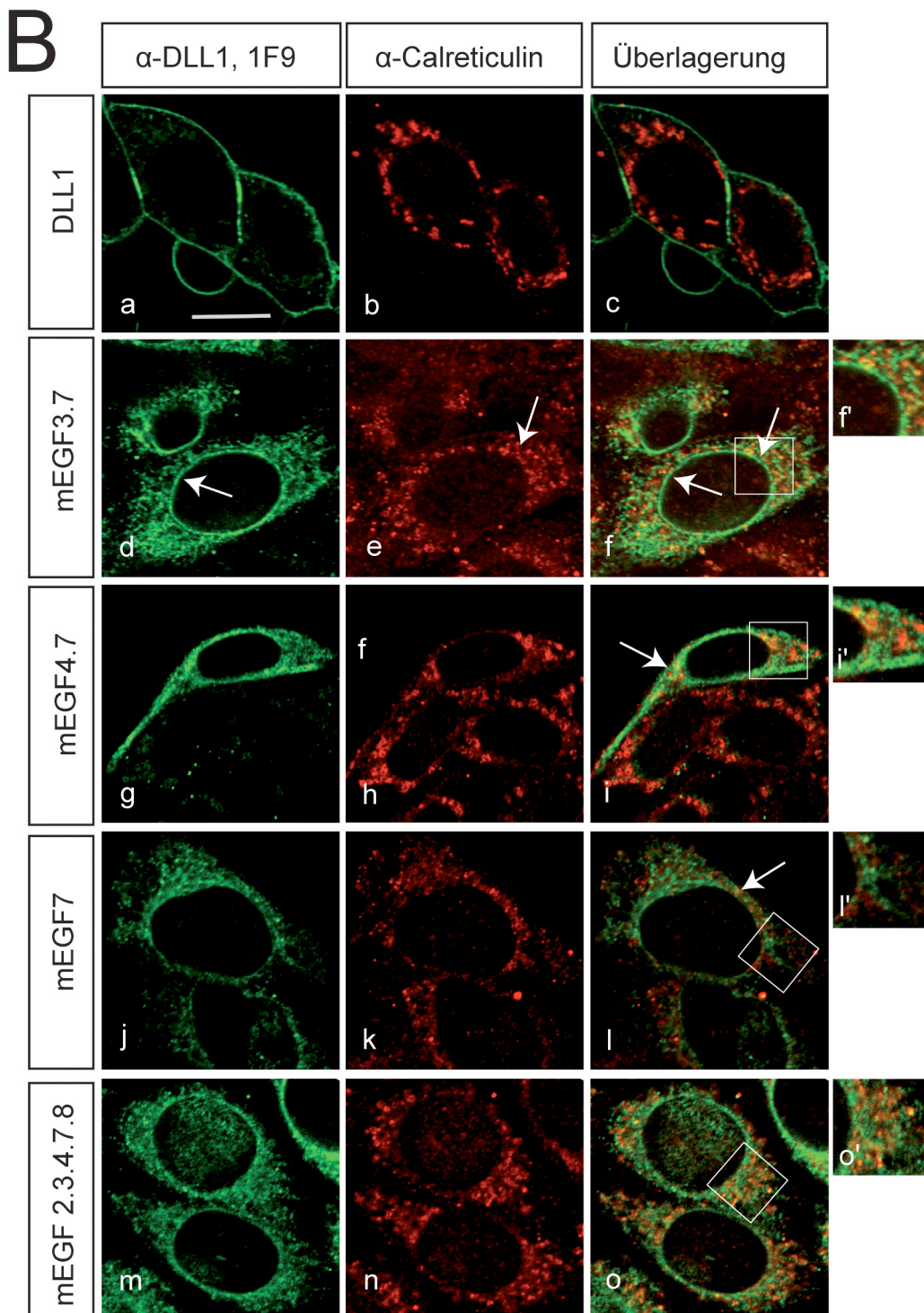


Abb. 4.6: Analyse der intrazellulären Lokalisierung der mutanten Proteinvarianten **DLL1 mEGF3.7**, **DLL1 mEGF4.7**, **DLL1 mEGF7** und **DLL1 mEGF2.3.4.7.8**. Die CHO-Zellklone, die diese Proteinvarianten stabil exprimierten, wurden in Doppelfärbungen auf eine Kolo­kalisierung mit dem cis-Golgi-Protein GM130 (A) und dem ER-Protein Calreticulin (B) analysiert. Die CHO-Zellen wurden mit dem anti-DLL1, 1F9 Antikörper und einem Marker für den cis-Golgi-Apparat, GM130 (A), oder für das

Endoplasmatisches Reticulum (ER), Calreticulin (B), sowie Alexa®488- und Alexa®555 konjugierten Sekundärantikörpern angefärbt. Das mutante Protein DLL1 mEGF3.7 zeigte eine teilweise Kolokalisierung mit GM130 (A d-f'), während hingegen die Proteine DLL1 mEGF4.7, DLL1 mEGF7 und DLL1 mEGF2.3.4.7.8 keine Kolokalisierung aufwiesen (A g-o'). Die Doppelfärbungen mit dem anti-DLL1- und Calreticulin-Antikörper zeigten für die Proteinvarianten DLL1 mEGF3.7, DLL1 mEGF4.7 und DLL1 mEGF2.3.4.7.8 teilweise eine Kolokalisierung (Abb.4.4 B d-i, m-o), für das Protein DLL1 mEGF7 aber keine überlappende Expression (B d-f). Maßstab, 10 µm.

Zusammenfassend zeigten die Analysen der subzellulären Lokalisierung der mutanten DLL1 mEGF-Proteine, dass die Varianten DLL1 mEGF 2.3, DLL1 mEGF 2.4, DLL1 mEGF 2.7, DLL1 mEGF 2.8, DLL1 mEGF 3, DLL1 mEGF 3.4, DLL1 mEGF 3.8, DLL1 mEGF 4.8 und DLL1 mEGF 2.3.4 auf der Zelloberfläche nachgewiesen wurden und dort vergleichbar zum DLL1wt Protein für eine Interaktion mit dem Notch-Rezeptor zur Verfügung stehen konnten (siehe Tabelle 15 I., II., III., IV., V., VI., VIII., X., XIII.). Die Varianten DLL1 mEGF3.7, DLL1 mEGF4.7, DLL1 mEGF7 und DLL1 mEGF2.3.4.7.8 dagegen wiesen eine intrazelluläre Lokalisierung auf. Bei weiteren Analysen mit den ER- und cis-Golgi-Markern Calreticulin und GM130 wurde für DLL1 mEGF3.7 eine teilweise Überlagerung der Expression mit beiden Markern gefunden und für die Proteine DLL1 mEGF3.7, DLL1 mEGF4.7 und DLL1 mEGF2.3.4.7.8 eine Kolokalisierung mit dem ER-Protein Calreticulin (siehe Tabelle 15 VII., IX., XII., XIII.).

4.2.1.3 Analyse der Oberflächenpräsentation der DLL1 mEGF Mutanten mit Hilfe einer Zelloberflächenbiotinylierung

Um zu untersuchen, ob sich die Proteinvarianten DLL1 mEGF, in denen die Fucosylierungsstellen der EGF-Motive 2, 3, 4, 7 und 8 ausgeschaltet wurden, in ihrer Zelloberflächenpräsentation in der Weise unterschieden, wie es die Analyse der subzellulären Lokalisierung gezeigt hatte, wurde eine Biotinylierung der Zelloberfläche mit anschließender Streptavidin-Immunpräzipitation durchgeführt (siehe 3.2.3.4) und die biotinylierten Proteine mit Hilfe des Flag-Tags auf einem Western Blot nachgewiesen (Abb. 4.7).

Die mutanten Proteine, für die in der Immunfluoreszenzfärbung eine intrazelluläre Lokalisierung gezeigt wurde, DLL1 mEGF3.7, DLL1 mEGF4.7, DLL1 mEGF7 und DLL1 mEGF2.3.4.7.8 konnten auf der Zelloberfläche nicht detektiert werden. Dagegen wurde für die Proteinvarianten

DLL1 mEGF 2.3, DLL1 mEGF 2.4, DLL1 mEGF 2.7, DLL1 mEGF 2.8, DLL1 mEGF 3, DLL1 mEGF 3.4, DLL1 mEGF 3.8, DLL1 mEGF 4.8 und DLL1 und mEGF2.3.4, die in der Lokalisationsanalyse auf der Zelloberfläche exprimiert wurden, die Zelloberflächenpräsentation durch die Biotinylierung bestätigt (Abb. 4.7 IP). Die Proteinexpression für DLL1 und alle Proteinvarianten in den für die Immunpräzipitation eingesetzten Lysaten wurde mit Hilfe des anti-Flag-Antikörpers auf einem Western Blot nachgewiesen (Abb. 4.7 Input).

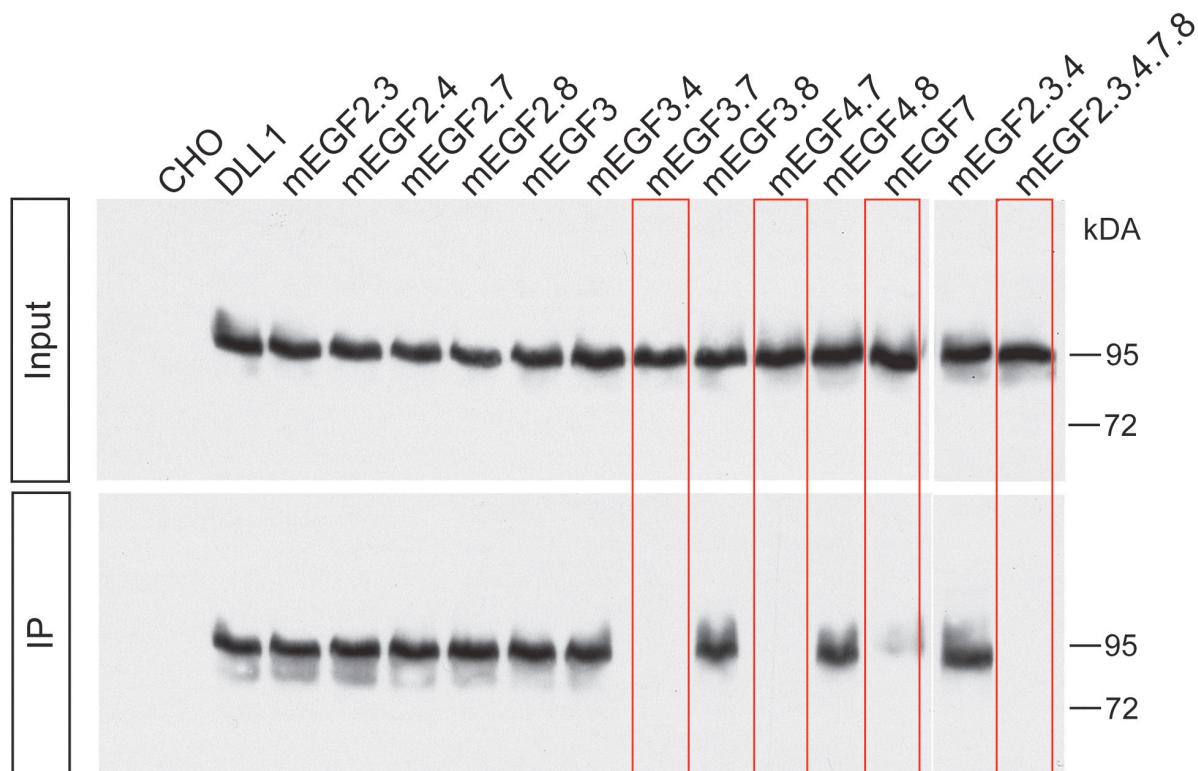


Abb. 4.7: Analyse der Oberflächenbiotinylierung von DLL1 und DLL1 mEGF Proteinvarianten, in denen die Fucosylierungsstellen der EGF-Motive 2, 3, 4, 7 und 8 ausgeschaltet wurden. CHO-Zellen, die stabil DLL1 und die mutanten DLL1 mEGF Proteine exprimierten, wurden mit Biotin inkubiert. Nach Zelllyse und Streptavidin-Immunpräzipitation wurden die biotinmarkierten Proteine (IP) zusammen mit den Expressionskontrollen der Zelllysate (Input) mit Hilfe des anti-Flag-Antikörpers auf dem Western Blot nachgewiesen. Der Blot zeigte, dass die mutanten Proteine DLL1 mEGF3.7, DLL1 mEGF4.7, DLL1 mEGF7 und DLL1 mEGF2.3.4.7.8 nicht auf der Zelloberfläche präsentiert wurden. Die Proteinvarianten DLL1 mEGF 2.3, DLL1 mEGF 2.4, DLL1 mEGF 2.7, DLL1 mEGF 2.8, DLL1 mEGF 3, DLL1 mEGF 3.4, DLL1 mEGF 3.8, DLL1 mEGF 4.8 und DLL1 mEGF 2.3.4 erreichten dagegen wie das DLL1wt Protein die Zelloberfläche und wurden mit Biotin markiert. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte CHO Zellen verwendet.

4.2.1.4 Analyse der NOTCH1-Aktivierung der DLL1 mEGF Proteinmutanten

Um zu untersuchen, ob die mutierten DLL1 mEGF Proteine in der Lage waren, NOTCH1 zu aktivieren, wurden in einem Luciferase-basierten Transaktivierungsassay für diese Proteine die relativen NOTCH1-Aktivierungen im Vergleich zum DLL1wt Protein gemessen. Der Assay wurde wie unter 3.2.4.5 und 4.1.3 beschrieben durchgeführt.

Die mutanten Proteine DLL1 mEGF2.3, DLL1 mEGF2.4, DLL1 mEGF2.7, DLL1 mEGF2.8, DLL1 mEGF3, DLL1 mEGF3.4, DLL1 mEGF3.8, DLL1 mEGF4.8 und DLL1 mEGF2.3.4, deren Zelloberflächenpräsentation durch Biotinylierung und Analyse der subzellulären Lokalisierung bestätigt worden war, zeigten unterschiedliche Werte für die NOTCH1-Aktivierung (Abb. 4.8 und Tabelle 15): Mit Ausnahme der Proteine DLL1 mEGF3.4 und mEGF4.8 wurden für diese Proteine relative Luciferase-Aktivierungen von 90-120% und damit zum DLL1wt Protein vergleichbare Werte gemessen. Für einige der Kandidaten (DLL1 mEGF2.7, mEGF3, mEGF3.8 und DLL1 mEGF2.3.4) wurden sogar Aktivierungen ermittelt, deren Werte über dem des DLL1wt Proteins mit 100% Luciferase-Aktivierung lagen. Unterschiede in der Klonalität der verschiedenen CHO-Zelllinien konnten ein Grund für diese Werte sein. Die mutanten Proteine DLL1 mEGF3.4 und DLL1 mEGF3.8 zeigten eine Aktivierung von 80 bzw. 84% verglichen mit der des DLL1wt Proteins und damit nur eine schwache Verringerung der NOTCH1-Aktivierung.

Die mutanten Proteinvarianten DLL1 mEGF4.7, DLL1 mEGF7 und DLL1 mEGF2.3.4.7.8, für die mit Hilfe der Biotinylierung und Lokalisierungsanalyse eine intrazelluläre Expression nachgewiesen worden war, verfügten über eine zum DLL1wt Protein deutlich verringerte NOTCH1-Aktivierung (21%, 30%, 22%), was mit der reduzierten Proteinmenge auf der Zelloberfläche korrelieren konnte. Die Proteinvariante DLL1 mEGF3.7 zeigte trotz der nachgewiesenen überwiegend intrazellulären Lokalisierung eine relative Luciferase-Aktivierung von 64%.

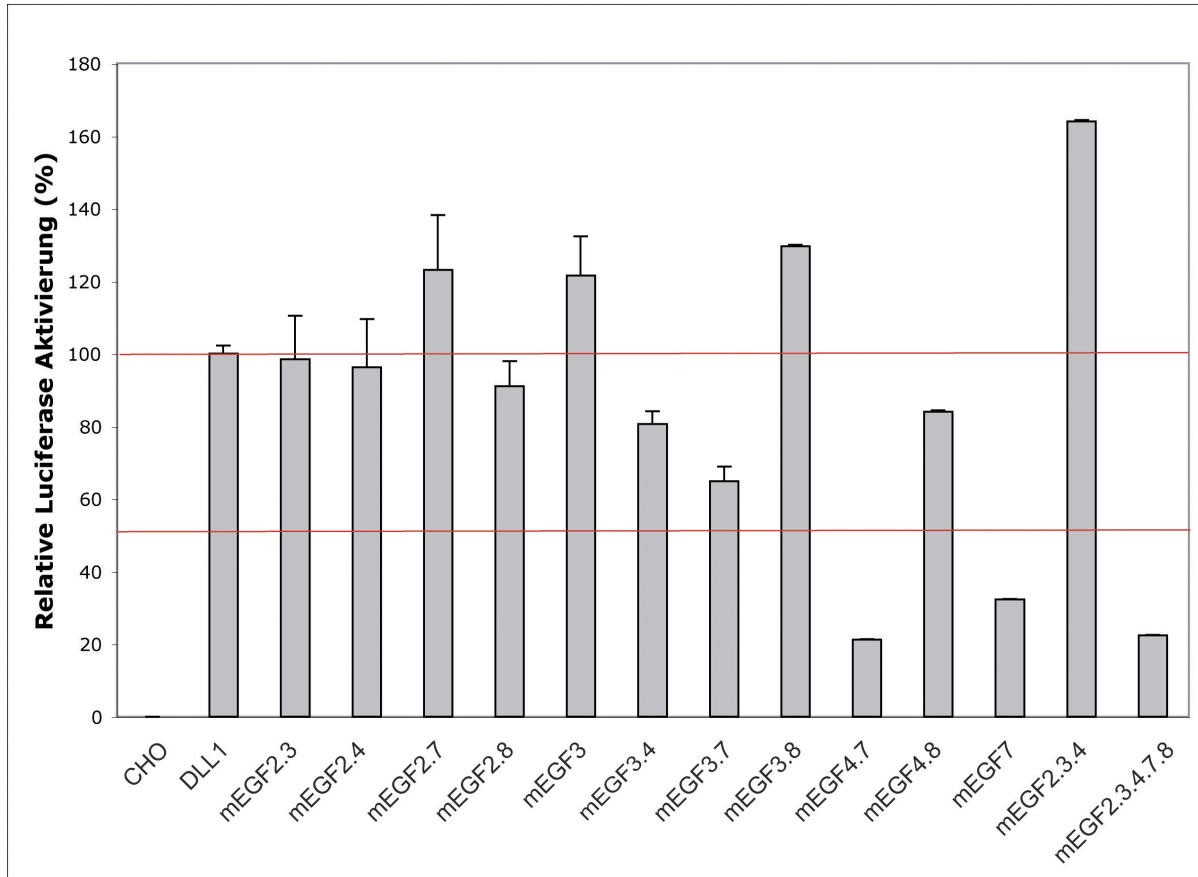


Abb. 4.8: Bestimmung der NOTCH1-Aktivierung der mutanten DLL1 mEGF Proteine. Mit Hilfe eines Transaktivierungsassays wurde die NOTCH1-Aktivierung der mutanten DLL1-Ligandenproteine getestet. Dazu wurden gleiche Zellzahlen von NOTCH1 stabil exprimierenden HeLa-Zellen, in die zuvor ein Luciferase-Reporter (RBP-luc)- und Renilla-Luciferase-Konstrukt (pRL-TK) transient transfiziert worden war, für 24h mit CHO-Zellen kokultiviert, die stabil DLL1wt und die mutanten DLL1 mEGF Proteinvarianten exprimierten. Eine Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor führte zur Aktivierung von NOTCH1 und zur Expression des Luciferase-Reporters. Als Maß der Transaktivierung wurde die Luciferase gemessen. Die DLL1 Proteinvarianten, für die eine intrazelluläre Lokalisierung nachgewiesen worden war (DLL1 mEGF4.7, DLL1 mEGF7 und DLL1 mEGF2.3.4.7.8), zeigten eine sehr geringe NOTCH1-Aktivierung (<30%). DLL1 mEGF3.7 erreichte trotz ermittelter intrazellulärer Lokalisierung einen Wert von 80%. Die Proteine DLL1 mEGF2.3, DLL1 mEGF2.4, DLL1 mEGF2.7, DLL1 mEGF2.8, DLL1 mEGF3, DLL1 mEGF3.4, DLL1 mEGF3.8, DLL1 mEGF4.8 und DLL1 mEGF2.3.4, für die eine Zelloberflächenpräsentation gezeigt wurde, waren in der Lage, NOTCH1 zu aktivieren (80-130%) wobei einige Zellklone sogar den Wert des DLL1wt Proteins überschritten, was auf eine unterschiedliche Klonalität der Zellen zurückgeführt wurde. Die relative Luciferase-Aktivität der untransfizierten CHO Zellen (CHO) wurde auf 0% und die des DLL1wt Proteins (DLL1) auf 100% gesetzt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe der Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert, für die ein Konstrukt (pRL-TK) kotransfiziert worden war. In drei unabhängigen Experimenten wurden 6 Kokultivierungen pro DLL1 mEGF Proteinvariante durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4.2.1.5 Metabolische Markierung von DLL1 und den Proteinvarianten DLL1 mEGF mit ^3H -Fucose und ^{35}S -Methion/Cystein

Um zu untersuchen, welche der Fucosylierungsstellen in den EGF-ähnlichen Domänen von DLL1 *in vitro* für die Fucosylierung essentiell waren und ob für DLL1 eine O-Fucosylierung ausschließlich an diesen Akzeptorstellen stattfand, wurden die mutanten DLL1 mEGF-Proteine metabolisch mit ^3H -Fucose markiert. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Proteine nach der Zellyse mit dem anti-DLL1-1F9-Antikörper immunpräzipitiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die markierten Proteine mit Hilfe von Autoradiographie detektiert. Zur Kontrolle der metabolischen Markierung und der Expression der verschiedenen Proteine aus den stabilen Zelllinien wurde diese parallel mit einem Gemisch aus ^{35}S -Methion und Cystein markiert und auf gleiche Weise wie die fucosylierten Proteine analysiert. Das DLL1wt Protein wurde als Positiv-, untransfizierte CHO-Zellen als Negativ-Kontrolle verwendet (siehe 3.2.3.5). Die Autoradiographie der ^{35}S -Methion/Cystein-markierten Proteine wies bereits nach einem Tag Exposition für das DLL1wt- und alle mutanten DLL1 mEGF-Proteine eine Expression nach (Abb. 4.9, unteres Gel). Wie die Autoradiographie zeigte, wurde der Ligand DLL1 *in vitro* ausschließlich an einer oder mehreren der vorhergesagten Fucosylierungsstellen in den EGF-Motiven 2, 3, 4, 7 und 8 fucosyliert, da bei Fehlen dieser Stellen in der Proteinvariante DLL1 mEGF2.3.4.7.8 kein Einbau von ^3H -Fucose detektiert wurde (Abb. 4.9, oberes Gel, Tabelle 15). Außerdem führte die gleichzeitige Mutation der Fucosylierungsstellen in EGF4 und 7, EGF4 und 8 sowie die alleinige Mutation der speziellen Konsensussequenz in EGF7 zu einem nicht detektierbaren ^3H -Fucose-Einbau. Die Proteine DLL1 mEGF2.3, DLL1 mEGF2.4, DLL1 mEGF2.7, DLL1 mEGF2.8, DLL1 mEGF3, DLL1 mEGF3.4, DLL1 mEGF3.7, DLL1 mEGF3.8 und DLL1 mEGF2.3.4 wurden trotz der Mutationen, die sie aufwiesen, *in vitro* fucosyliert, so dass diese Proteinvarianten *in vitro* Substrate für die O-Fucosylierung darstellten (Abb. 4.9, oberes Gel, Tabelle 15). Im Vergleich zum DLL1wt-Protein zeigten alle Proteinvarianten schwächere Fucosylierungssignale, wobei diese Abnahme nicht mit der nachgewiesenen Expression nach ^{35}S -Methion-/Cystein-Markierung korrelierte.

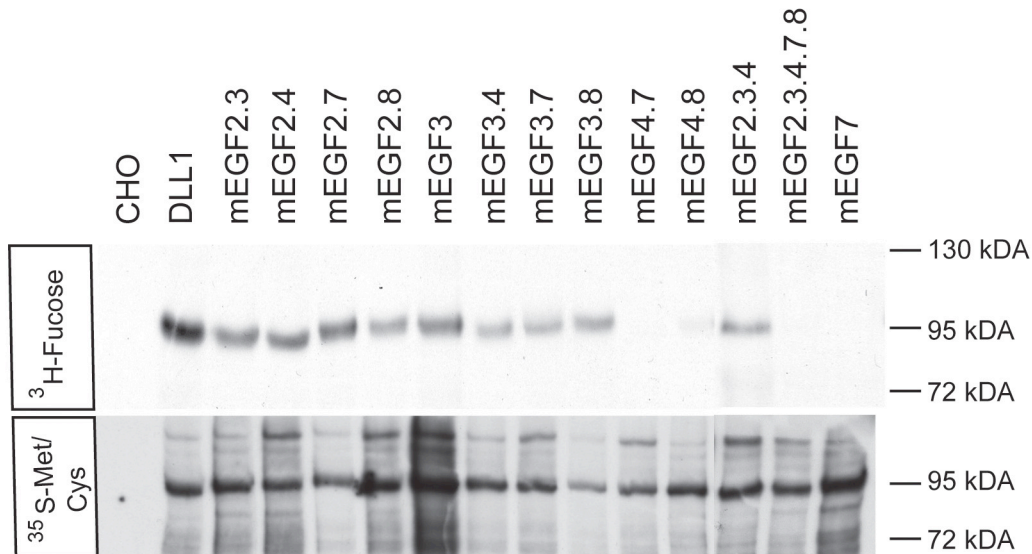















Abb. 4.9: Analyse der *in vitro* Fucosylierung der DLL1 mEGF-Proteinvarianten nach Einbau von ^3H -Fucose. Die CHO-Zellklone, die stabil DLL1 und die DLL1 mEGF-Proteinvarianten exprimierten wurden für 24 h mit ^3H -Fucose und einem Gemisch aus ^{35}S -Methion und Cystein inkubiert. Nach Zellyse und Immunpräzipitation mit dem anti-DLL1, 1F9-Antikörper wurden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Gele getrocknet und Röntgenfilmen exponiert. Die Autoradiographie der ^{35}S -Methion/Cystein-Markierung (unteres Gel) zeigte, dass alle Proteine exprimiert, aber für einige der mutanten Varianten kein Einbau von ^3H -Fucose detektiert wurde (DLL1 mEGF4.7, DLL1 mEGF4.8, DLL1 mEGF7, DLL1 mEGF2.3.4.7.8, oberes Gel). Für die Proteinvarianten DLL1 mEGF2.3, DLL1 mEGF2.4, DLL1 mEGF2.7, DLL1 mEGF2.8, DLL1 mEGF3, DLL1 mEGF3.4, DLL1 mEGF3.7, DLL1 mEGF3.8 und DLL1 mEGF2.3.4 wurde mittels Autoradiographie eine *in vitro* Fucosylierung durch den Einbau von ^3H -Fucose nachgewiesen.

Beim systematischen Vergleich aller Ergebnisse der *in vitro* Analysen (subzelluläre Lokalisierung, Zelloberflächenbiotinylierung, NOTCH1-Aktivierung, Akzeptorfähigkeit für die Fucosylierung) der verschiedenen DLL1 mEGF Proteinvarianten zeigte sich, dass in allen zweifachen Kombinationen der Mutation in der EGF-Domäne 2 mit einer weiteren in der EGF-Domäne 3, 4, 7 oder 8 die Ergebnisse vergleichbar zum DLL1wt Protein waren (DLL1 mEGF2.3, DLL1 mEGF2.4, mEGF2.7, DLL1 mEGF2.8 (Tabelle 15 I., II., III., IV.)). Diese Beobachtungen konnten ebenfalls für die Proteinvariante DLL1 mEGF3.4 und DLL1 mEGF 2.3.4 mit drei Mutationen in den EGF-Motiven 2, 3 und 4 gemacht werden (Tabelle 15 VI., XII.). Alle diese Proteine wurden wie das nichtmutierte DLL1wt Protein auf der Zelloberfläche exprimiert, waren in der Lage den NOTCH1 zu aktivieren und wurden als Substrate *in vitro* fucosyliert. Wenn auch die Konstrukte für DLL1 mEGF2 und DLL1 mEGF4 nicht exprimiert werden konnten, so schien aufgrund der Ergebnisse der Analyse der Proteine, in denen jeweils

nur die Fucosylierungsstellen in den EGF-Motiven 2, 3 und 4 in verschiedenen Kombinationen ausgeschaltet wurden, der Verlust dieser Konsensussequenzen keine essentielle Bedeutung für die Funktion von DLL1 zu haben. Wurden zu den drei Mutationen in den EGF-Motiven 2, 3 und 4 zwei weitere in den Fucosylierungsstellen der EGF-Domänen 7 und 8 hinzugefügt, zeigte die entstandene Proteinvariante DLL1 mEGF 2.3.4.7.8 alle Merkmale eines *in vitro* Phänotyps: Das Protein wurde überwiegend intrazellulär exprimiert, konnte aufgrund der fehlenden oder schwachen Oberflächenpräsentation, NOTCH1 nur schwach aktivieren und wurde in einer metabolischen Markierung nicht nachweisbar fucosyliert (Tabelle 15 XIII.). Der direkte Vergleich zwischen den Proteinvarianten DLL1 mEGF2.3.4 und DLL1 mEGF2.3.4.7.8 zeigte als einzigen Unterschied den Verlust der Fucosylierungsstellen in den EGF-Motiven 7 und 8, so dass die Hypothese aufgestellt werden konnte, dass diese EGF-Motive eine besondere Rolle für die Fucosylierung von DLL1 haben, deren Mutation zu den beobachteten Effekten führte.

Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung führte auch die Analyse der Ergebnisse der *in vitro*-Fucosylierungen: Der Verlust der Fucosylierungskonsensussequenzen in den EGF-Motiven 4, 7 und 8 waren allen 4 Proteinen gemeinsam, die keinen Einbau von ³H-Fucose zeigten, so dass sich die Frage stellte, ob diese drei Fucosylierungsstellen eine Minimaleinheit bildeten, die für eine O-Fucosylierung von DLL1 eine entscheidene Rolle spielte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein weiteres Expressionskonstrukt generiert, das Mutationen in den Konsensussequenzen für die EGF-Motive 4, 7 und 8 trug. Ähnlich zu den Konstrukten, die diese drei Mutationen einzeln bzw. in zweifacher Kombination aufwiesen (DLL1 mEGF4, DLL1 mEGF8 und DLL1 mEGF7.8 (Tabelle 15 XV., XVI., XVII.) konnte dieses Konstrukt ebenfalls nicht exprimiert werden, so dass eine weitere Untersuchung der Mutationen in diesen drei EGF-Domänen erschwert wurde. Da bei Kombination dieser drei Mutationen in den EGF-Motiven 4, 7 und 8 mit anderen Mutationen, die resultierenden Proteinvarianten wiederum das DLL1wt Verhalten aufwiesen, konnte diese drei Mutationen nicht allein dafür verantwortlich sein. So wurde zum Beispiel für DLL mEGF7 eine intrazelluläre Lokalisierung, ein geringe NOTCH1-Aktivierung und keine Fucosylierung nachgewiesen (Tabelle 15 XI.). Wie bereits zuvor erwähnt, zeigte aber die Kombination mit der Mutation in dem EGF-Motiv 2 die Wildtyp-ähnlichen Ergebnisse, dagegen ergab die Kombination mit einer Mutation in der EGF-Domäne 3 eine Proteinvariante, die überwiegend intrazellulär exprimiert wurde, aber noch NOTCH1 aktivierte und *in vitro* fucosyliert wurde (Tabelle 15 VII.).

Der Vergleich der Analysenergebnisse deutet final darauf hin, dass nicht die Mutationen der einzelnen EGF-Motive 4, 7 und 8 oder wenige Kombinationen der drei Mutationen für alle beobachteten Effekte verantwortlich waren. Vielmehr bestand die Möglichkeit, dass diese 3 Mutationen maßgeblich an den Effekten beteiligt waren, in Kombination mit anderen mutierten oder auch intakten EGF-Motiven aber so durch deren Einfluß verstärkt oder aufgehoben wurden, dass dieses vielfältige Spektrum an Ergebnissen entstehen konnte.

Nr.	Konstruktname	Exprimierbarkeit	Subzelluläre Lokalisierung	Notch1-Aktivierung	<i>in vitro</i> Fucosylierung
I.	mEGF 2.3	+	○		+
II.	mEGF 2.4	+	○		+
III.	mEGF 2.7	+	○		+
IV.	mEGF 2.8	+	○		+
V.	mEGF 3	+	○		+
VI.	mEGF 3.4	+	○		+
VII.	mEGF 3.7	+	●		+
VIII.	mEGF 3.8	+	○		+
IX.	mEGF 4.7	+	●		-
X.	mEGF 4.8	+	○		-
XI.	mEGF 7	+	●		-
XII.	mEGF 2.3.4	+	○		+
XIII.	mEGF 2.3.4.7.8	+	●		-
XIV.	mEGF 2	-			
XV.	mEGF 4	-			
XVI.	mEGF 8	-			
XVII.	mEGF 7.8	-			
XVIII.	mEGF 4.7.8	-			

○ Zelloberflächenexpression ● Intrazelluläre Expression

Tabelle 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der *in vitro* Analysen für die DLL1 mEGF Proteinvarianten: Analyse der Exprimierbarkeit (Daten hier nicht gezeigt), subzellulären Lokalisierung, NOTCH1-Aktivierung und *in vitro* Fucosylierung nach Einbau von ^3H -Fucose.

4.3 Ausschalten (*Knock Out*) der Pofut1 Expression in DLL1 exprimierenden Zellen mit Hilfe von RNA-Interferenz

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass das Enzym POFUT1 die Übertragung der O-Fucose auf spezifische Serin- und Threoninreste in Konsensussequenzen verschiedener EGF-Motive des Notch-Rezeptors katalysierte (Moloney et al., 2000, Chen et al., 2001). Bei gezielter Inaktivierung von OFUT1 wurde für den Rezeptor in *Drosophila* der Verlust der Zelloberflächenexpression und eine intrazelluläre Akkumulation beobachtet (Okajima et al., 2005 und 2007). Um die Rolle der O-Fucosylierung für den Liganden DLL1 in Abwesenheit der Modifikation zu untersuchen und mögliche Einflüsse von Punktmutationen durch Mutagenese des DLL1-Substrats auszuschließen, wurden *in vitro* CHO Zellen hergestellt, in denen DLL1 stabil exprimiert und die Genexpression von Pofut1 spezifisch ausgeschaltet wurde. Mit Hilfe der Expression von siRNA-Konstrukten, die gegen das Pofut1-Gen gerichtet waren, sollte dessen Expression ausgeschaltet (*Knock-Out*) und auf diese Weise die O-Fucosylierung des Liganden inhibiert werden. Vergleichbar zu den Proteinvarianten, in denen der Verlust der Fucosylierung durch Mutation der Fucosylierungsstellen erreicht wurde, sollten für DLL1 die subzelluläre Lokalisierung, die NOTCH1-Aktivierung sowie eine mögliche *in vitro* Fucosylierung in Abwesenheit von POFUT1 untersucht werden.

4.3.1 Herstellung von stabilen Zelllinien für die Expression der Pofut1 siRNA-Konstrukte

Für die Verringerung der Pofut1-Genexpression wurde mit Hilfe von Pamela Stanley drei zielerkennende siRNA-Sequenzen ausgewählt (siehe 3.1.4 Tabelle 3). Mit Hilfe von jeweils zwei komplementären Oligonukleotiden wurden die entsprechenden Genfragmente, die die siRNA Hairpin-Struktur codierten, durch Hybridisierung generiert. Diese wurden in die Vektoren *pSilencerTM 2.1-U6 puro* und *pSilencerTM 2.1-U6 hygro* kloniert, die neben dem humanen U6-Promotor für die Expression der siRNAs noch jeweils eine Puromycin- und Hygromycin-Resistenz-Kassette aufwiesen.

Zur Herstellung von drei Zelllinien, die gleichzeitig stabil DLL1-Flag und jeweils eines der beiden und beide siRNA-Expressionskonstrukte exprimierten, wurden die CHO-Zelllinie, die stabil DLL1 exprimierte mit den hergestellten siRNA-Konstrukten transfiziert. Mit Hilfe von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin, 500 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B oder beiden Antibiotika wurde auf das Wachstum von Zellklonen mit stabiler Expression selektiert. Um die erhaltenen Zellklone auf die Expression der einzelnen oder beiden siRNA-Expressionskonstrukten zu testen, wurden Zelllysate aus den Zellklonen hergestellt und diese zunächst auf einem Western Blot mit Hilfe eines anti-Pofut1-Antikörpers auf die Ausschaltung der Expression von POFUT1 untersucht. Als Positivkontrolle wurde die Expression von POFUT1 in Lysaten der DLL1 stabil exprimierenden CHO-Zelllinie, immortalisierter Pofut1+/+-Maus-Primärzellen sowie aus Pofut+/+- E9.5 Embryonen detektiert. Als Negativkontrolle wurden Lysate aus Pofut-/- E9.5 Embryonen verwendet. Der anti-Pofut1 Antikörper (von Y.Saga) war in der Lage, POFUT1 in den Lysaten der immortalisierten Maus-Primärzellen sowie der Embryonen nachzuweisen, dagegen nicht in den DLL1 exprimierenden CHO-Zellen, so dass ohne die Bestätigung der Expression der Positivkontrolle die schwachen Signale für die Expression einiger Zellklone, wie Klon #4, nicht auswertbar waren (Abb. 4.10 A). Der einzige kommerziell erhältliche anti-Pofut1 Antikörper (Abnova) zeigte keinerlei spezifische Detektion auf einem Western Blot (Daten hier nicht gezeigt), so dass die Analyse der Proteinexpressionen in den verschiedenen Zellklonen keine verlässlichen Aussagen zuließ.

Daher wurde mit Hilfe einer Northern Blot-Hybridisierung die RNA verschiedener Zellklone auf die Expression der Pofut1-Transkripte analysiert. Dazu wurde aus den Zellklonen die Gesamt-RNA präpariert, diese auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, mittels Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer ^{32}P -markierten DNA-Sonde aus dem proteincodierenden Bereich des murinen Pofut1-Gens hybridisiert (siehe 3.2.1.4.). Die Transkripte wurden autoradiographisch sichtbar gemacht.

Die Autoradiographie wies Pofut1-Transkripte in untransfizierten sowie DLL1 exprimierenden CHO-Zellen nach, die als Positivkontrollen keine gegen Pofut1 gerichteten siRNA-Expressionskonstrukte enthielten (Abb. 4.10 B). Wie erwartet konnten in Pofut1-/-Embryonen keine Pofut1-Transkript detektiert werden. In den hergestellten Zellklonen wurden unterschiedliche Mengen des Pofut1-Transkripts nachgewiesen, so zeigten die Klone #2, 3, 13 und 23 nur eine sehr geringe Transkriptmenge im Vergleich zu den Klonen 21, 22, 24 und 26, deren Signalintensität für die Expression aber insgesamt noch schwächer als die der

Positivkontrollen war. Mit Hilfe der Northern Blot-Analyse konnte kein Zellklon mit vollständiger Eliminierung des Pofut1-Transkripts gefunden werden, so dass für die Klone mit geringer Transkriptmenge eine Reduzierung statt einer Eliminierung des Pofut1-Transkripts erreicht wurde. Die Zellklone, die beide siRNA-Konstrukte stabil exprimierten, zeigten deutlich geringere Transkriptmengen auf, als die Zellen, die nur eines der beiden Konstrukte exprimierten. Für die weitere Analysen wurden die Klone 6, 13 und 23 ausgewählt, da sie unterschiedliche Mengen an Pofut1-Transkript aufwiesen und so die Beobachtung von Effekten ermöglichen sollten, die eventuell von der Pofut1-Dosis abhängig waren.

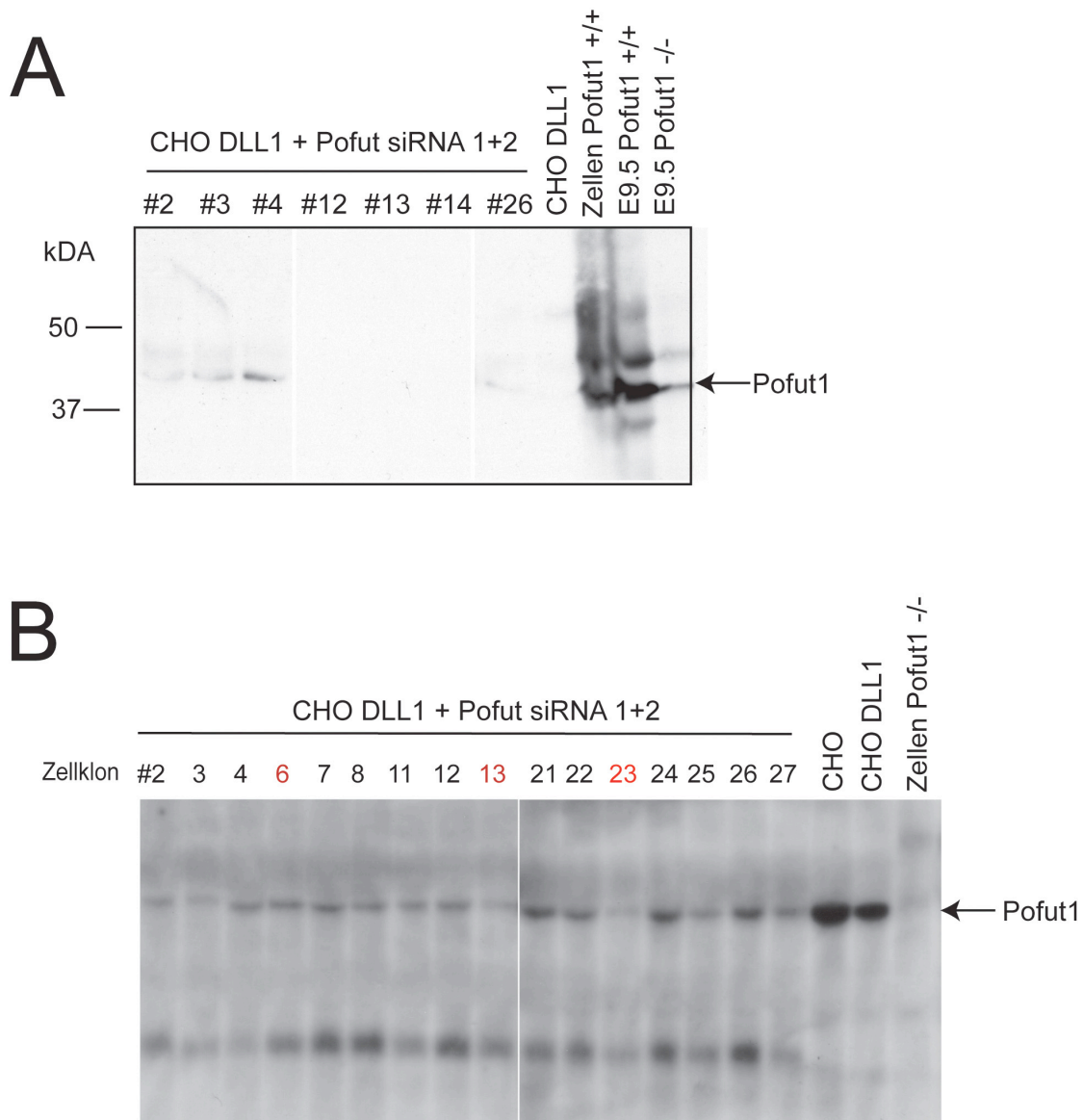


Abb. 4.10: Analysen von POFUT1-Protein- (A) und Pofut1-Genexpression (B) in DLL1 exprimierenden CHO-Zellen, die stabil gegen Pofut1 gerichtete siRNA-Expressionskonstrukte exprimierten.

A Western Blot-Analyse von Proteinlysaten einiger CHO-Zellklone, die stabil DLL1 und beide gegen Pofut1 gerichtete siRNA-Expressionskonstrukte exprimierten. Der anti-Pofut1 Antikörper detektierte POFUT1 in den Lysaten aus Pofut^{+/+}-Maus-Primärzellen und Pofut^{+/+}-Embryonen (E9.5), die als Positivkontrollen verwendet wurden, dagegen nicht in DLL1 exprimierenden CHO-Zellen. Für den Klon #4 wurde eine schwache POFUT1-Expression nachgewiesen.

B Northern Blot Analyse von Gesamt-RNA aus CHO-Zellklonen, die stabil Transkripte von Dll1 und den beiden siRNA-Expressionskonstrukten exprimierten. Der Blot wurde mit einer ³²P-markierten DNA-Sonde aus der proteinkodierenden Region des murinen Pofut1-Gens hybridisiert. Die Autoradiographie bestätigte für die Positivkontrollen, untransfizierte und stabil DLL1 exprimierende CHO-Zellen, die

Expression des Pofut1-Transkripts, sowie das Fehlen des Transkripts in Pofut^{-/-} Embryonen (E9.5) als Negativkontrolle (Abb. 4.10 B). Für alle hergestellten Zellklone wurden im Vergleich zur Positivkontrolle geringere Transkriptmengen nachgewiesen, wobei diese zwischen verschiedenen Klonen variierten. So zeigten die Klone #2, 3, 13 und 23 insgesamt die schwächsten Signalintensitäten im Vergleich zu den Klonen 21, 22, 24 und 26 mit höheren Pofut1-Transkriptmengen.

4.3.1 Analyse der subzellulären Lokalisierung, NOTCH1-Aktivierung und Fucosylierung von DLL1 in CHO-Zellen nach Reduzierung von POFUT1 durch RNA-Interferenz

Für den Notch-Rezeptor konnte in *Drosophila S2* Zellen, in denen POFUT1 durch siRNAs ausgeschaltet wurde, ein Verlust der NOTCH1-Expression an der Zelloberfläche und eine Akkumulation im ER beobachtet werden (Okajima et al., 2005). Um zu untersuchen, ob sich die subzelluläre Lokalisierung von DLL1 durch die Reduzierung von POFUT1 in CHO-Zellen veränderte, wurden die CHO-Zellklone #6, 13 und 23, die DLL1 und die beiden gegen Pofut1 gerichteten siRNA-Expressionskonstrukte exprimierten, mit dem anti-Flag-Antikörper und einem Alexa[®]488-konjugierten Sekundärantikörper angefärbt (siehe 3.3.6). Die konfokalen Aufnahmen zeigten für die Immunfluoreszenzfärbungen aller drei Klone eine Lokalisierung von DLL1 auf der Zelloberfläche, wie sie für DLL1 aus CHO-Zellen ohne siRNAs nachgewiesen wurde (Abb. 4.11 A, Repräsentativ Klon #6 dargestellt). Für die detektierte Zelloberflächenexpression der drei Zellklone, die sich durch die Proteinmenge von POFUT1 unterschieden, konnten keine Unterschiede in der Signalstärke oder -verteilung festgestellt werden, so dass auf die Darstellung der Färbungen aller drei Klone verzichtet wurde.

Um zu untersuchen, ob sich die NOTCH1-Aktivierung von DLL1 durch Reduktion von POFUT1 änderte, und diese Effekte von unterschiedlichen POFUT1-Proteindosen abhängig waren, wurde diese drei Zellklone in einem unter 3.2.4.5 beschriebenen Luciferase-basierten Transaktivierungsassay getestet. Die Messung der relativen Luciferase-Aktivierung zeigte, dass DLL1 in allen drei Zellklonen trotz unterschiedlicher POFUT1-Protein-Mengen NOTCH1 aktivierte (Abb. 4.11 B). Für die Zellklone #6, 13 und 26 wurden Luciferase-Aktivitäten von 96%, 104% und 87% ermittelt, die damit sehr nahe an der Aktivierung von DLL1 in CHO-Zellen ohne Reduktion von POFUT1 lagen bzw. diese übertrafen. Wie durch die Northern Blot-Analyse (Abb. 4.10 B) gezeigt wurde, wies von den drei Zellklonen der Klon #6 die höchste Menge des Pofut1-Transkripts auf, gefolgt von Klon #13 mit einem etwas schwächeren und Klon #23 mit einem sehr schwachen Signal für die Pofut1-Expression. Beim Vergleich der Werte für die

NOTCH1-Aktivierungen und POFUT1-Proteinmengen in den Zellklonen wurde nur für den Zellklon #23 eine Korrelation gefunden, da dieser bei stärkster Reduktion von POFUT1 auch den niedrigsten Wert für die Aktivierung von NOTCH1 zeigte.

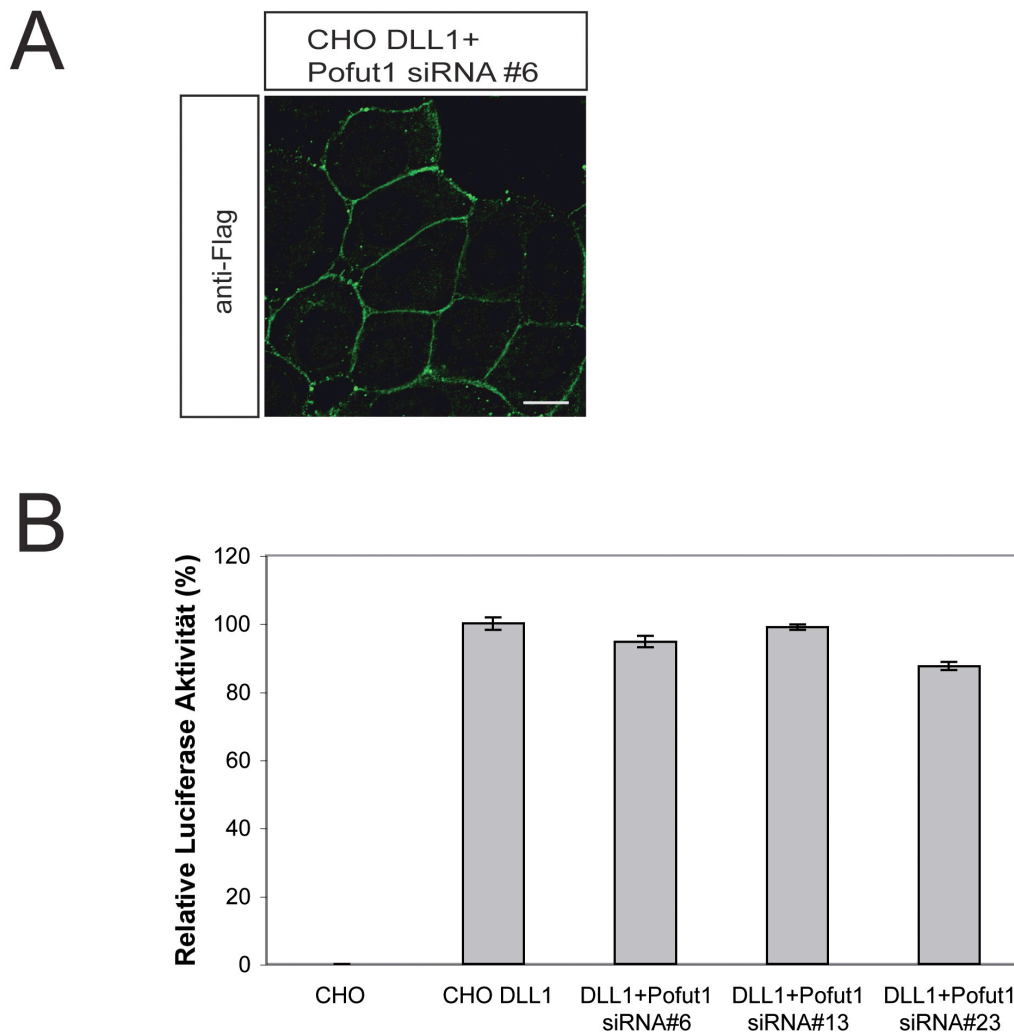


Abb. 4.11: Analyse der subzellulären Lokalisierung und NOTCH1-Aktivierung von DLL1 in CHO-Zellen nach Reduzierung von POFUT1 durch RNA-Interferenz.

A Immunfluoreszenzfärbung des Zellklons #6, der stabil DLL1 und die beiden gegen Pofut1 gerichteten siRNA-Konstrukte exprimiert, mit dem anti-Flag-Antikörper und einem Alexa®488-konjugierten Sekundärantikörper. Die Färbung wies DLL1 auf der Zelloberfläche nach (A) wie in CHO DLL1-Zellen ohne Expression von siRNA-Konstrukten (CHO DLL1, hier nicht gezeigt, siehe Abb. 4.2 A a-c, Abb. 4.5 A a-c). Da das Expressionsmuster aller drei untersuchten Zellklone (#6, 13, 23) identisch war, wird an dieser Stelle nur die Aufnahme eines Klons gezeigt. Maßstab, 10 µm.

Cystein inkubiert. Nach Zellyse und Immunpräzipitation mit dem anti-DLL1, 1F9-Antikörper wurden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Gele getrocknet und die markierten Proteine mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Alle drei Zellklone zeigten trotz der Reduzierung von POFUT1 noch einen Einbau von ^3H -Fucose vergleichbar zum DLL1wt Protein.

Die Abbildung 4.12 zeigte, dass alle drei Zellklone trotz unterschiedlicher Mengen an POFUT1 *in vitro* fucosyliert wurden und beim Vergleich des Einbaus kein Unterschied zwischen den einzelnen Zellklonen, noch der CHO DLL1-Zelllinie ohne POFUT1-Reduzierung zu erkennen war. Für die *in vitro* Fucosylierung wurde somit im Gegensatz zur Messung der NOTCH1-Aktivierung keine POFUT1-Dosis-abhängigen Effekte für DLL1 beobachtet.

Zusammenfassend wurde bei der Herstellung von Zellklonen, die stabil DLL1 und zwei gegen Pofut1 gerichtete siRNA-Konstrukte exprimierten, nur eine Reduzierung der POFUT1-Expression erreicht. Trotz dieser Reduzierung wurde DLL1 in diesen Zellen unverändert auf der Zelloberfläche exprimiert, zeigte eine nur etwas verringerte NOTCH1-Aktivierung und wurde mittels metabolischer Markierung *in vitro* fucosyliert. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Reduzierung von POFUT1 in den DLL1 exprimierenden Zellen möglicherweise nicht ausreichte, und dass für die Untersuchung der Rolle von POFUT1 für DLL1 eine vollständige Eliminierung von POFUT1 gewährleistet sein müsste.

4.4 Untersuchung des Einflusses der N-Glykosylierung auf DLL1

Der Notch-Rezeptor trägt in den EGF-Motiven der extrazellulären Domäne neben den Konsensussequenzen für O-Fucosylierung und O-Glykosylierung auch Konsensussequenzen für eine N-Glykosylierung (Johansen et al., 1989). 10 EGF-ähnliche Domänen des Rezeptors tragen als Modifizierung komplexe N-Glykane zusammen mit O-Fucose-Glykanen (Haines und Irvine, 2003; Haltiwanger und Lowe, 2004). Während die Eliminierung der Glycosyltransferaseaktivität von Genen, die für die Synthese von O-Fucose-Glykanen essentiell sind, zu Defekten in *Drosophila*, Zebrafisch und Vertebraten führten, die durch den Verlust des Notch-Signalwegs entstanden (Haines und Irvine, 2003, Appel et al., 2003, Lu und Stanley, 2006), wiesen mutante Mäuse, denen die komplexen N-Glykane fehlten, keine vom Notch-Signalweg abhängigen Defekte während der embryonalen Entwicklung auf (Panin et al., 2002; Haltiwanger und Lowe, 2004). Da auch für DLL1 eine Konsensussequenz in der EGF-ähnlichen Domäne 7 für eine Modifizierung durch N-Glykane beschrieben wurde, stellte sich die Frage, welche Rolle die N-Glykosylierung für DLL1 spielte und ob diese aufgrund der Nachbarschaft zu der begrenzten Fucosylierungs-Konsensussequenz im EGF-Motiv 7 einen Einfluß auf die O-Fucosylierung von DLL1 hatte.

4.4.1 Analyse von zellulären Eigenschaften von DLL1 nach Mutagenese der Konsensussequenz für die N-Glykosylierung in EGF-Motiv 7

Um die Rolle der N-Glykosylierung für DLL1 zu analysieren, wurde diese durch ortsgerichtete Mutagenese der Konsensussequenz in dem EGF-Motiv 7 von DLL1 inhibiert und die neu entstandene DLL1 Proteinvariante auf ihre subzelluläre Lokalisierung, NOTCH1-Aktivierung und einen Einfluß der N-Glykosylierung auf die Fucosylierung untersucht. In der Konsensussequenz für die N-Glykosylierung, NCS (Asparagin-Cystein-Serin) im EGF-Motiv 7 von DLL1, wurde Asparagin als Akzeptoraminosäure durch Glutamin ersetzt.

Das, wie unter 3.2.1.2 beschrieben, generierte Expressionskonstrukt Dll1 mutN-Glycosite wurde für die Herstellung einer stabilen Zelllinie in CHO Zellen transfiziert und mit Hilfe von 500 µg/ml Neomycin und 250 µg/ml Zeocin auf Zellklone selektiert, die das mutante Protein stabil exprimierten. Die stabile Zelllinie wurde im Anschluß subkloniert (siehe 3.2.4.3). Die

Proteinexpression wurde auf einem Western Blot mit dem anti-Flag-Antikörper, der gegen das am C-Terminus platzierte Flag-Tag gerichtet war, nachgewiesen .

Für die Analyse der subzellulären Lokalisierung wurde ein CHO-Zellklon, der stabil DLL1 mutN-Glycosite exprimiert, mit drei Primärantikörpern gegen verschiedene Epitope von DLL1 und Alexa488®-konjugierten Sekundärantikörpern angefärbt (Abb. 4.13). Die Immunfluoreszenzfärbungen der drei verschiedenen Primärantikörper zeigten für die mutante Proteinvariante DLL1 mutN-Glycosite eine Lokalisierung auf der Zelloberfläche (Abb. 4.13 d-f) vergleichbar zum DLL1 wt Protein (a-c). Der Verlust der N-Glykosylierung schien damit keinen Effekt auf die subzelluläre Lokalisierung von DLL1 zu haben.

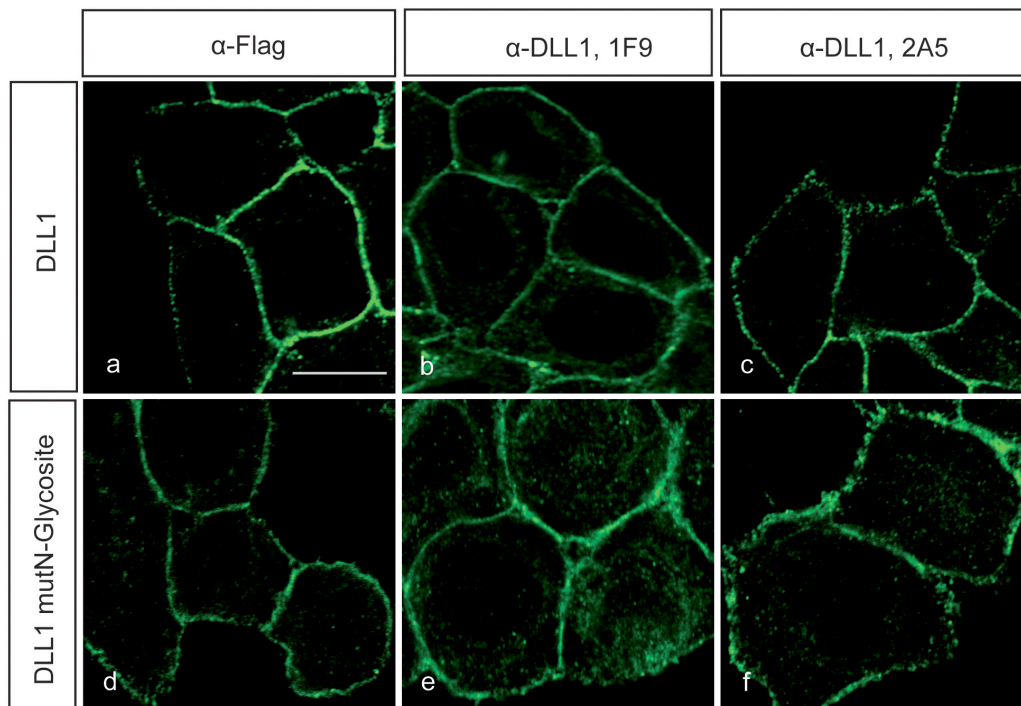


Abb. 4.13: Analyse der subzellulären Lokalisierung von DLL1 mutN-Glycosite. Das mutante Protein stabil exprimierende CHO-Zellen wurden mit drei Primärantikörpern gegen zwei intrazelluläre Epitope (Peptid 2A5 und das Flag-Tag) und ein extrazelluläres Epitop (Peptid 1F9) von DLL1 und Alexa488®-konjugierten Sekundärantikörpern angefärbt. Für das mutante Protein DLL1 mutN-Glycosite wurde mit allen drei Antikörpern eine Lokalisierung auf der Zelloberfläche (d-f) detektiert, wie sie auch das DLL1wt Protein als Positivkontrolle zeigte (a-c). Maßstab, 10 μ m.

Mit Hilfe einer Zelloberflächenbiotinylierung wurde auf eine zweite Weise die Verteilung des DLL1 mutN-Glycosite-Proteins in der Zelle untersucht. Dazu wurde CHO-Zellen, die diese Proteinvariante oder das DLL1wt Protein stabil exprimierten mit Biotin inkubiert und nach der Lyse der Zellen, die biotinmarkierten Proteine mit Hilfe von Streptavidin immunpräzipitiert. Auf einem Western-Blot wurde die Proteinexpression der für die Immunpräzipitation eingesetzten Lysate (Input) kontrolliert und die markierten Proteine mittels des anti-Flag-Antikörpers nachgewiesen (IP) (siehe 3.3.4). Die Zelloberflächenbiotinylierung zeigte sowohl für das DLL1wt Protein (DLL1) als auch für die mutante Proteinvariante eine Präsentation auf der Zelloberfläche (Abb. 4.14). Um zu ermitteln, wie viel von dem auf der Oberfläche präsentierten Protein tatsächlich in der Lage war, NOTCH1 zu aktivieren, wurde das mutante Protein in einem bereits unter 4.1.3 beschriebenen Transaktivierungsassay getestet (Abb. 4.15). Die relative Luciferase-Aktivierung, die als Maß für die NOTCH1-Aktivierung gemessen wurde, betrug für DLL1 mutN-Glycosite 78,4% und war damit gegenüber dem DLL1wt Protein verringert. Mit Hilfe der Lokalisierungsanalyse und der Zelloberflächenbiotinylierung war die Präsentation des mutanten Proteins auf der Zelloberfläche nachgewiesen worden, und mit der NOTCH1-Aktivierung, dass das auf der Oberfläche vorhandene Protein im Vergleich zum DLL1wt Protein eine verringerte Fähigkeit besaß, den Notch-Signalweg zu aktivieren.

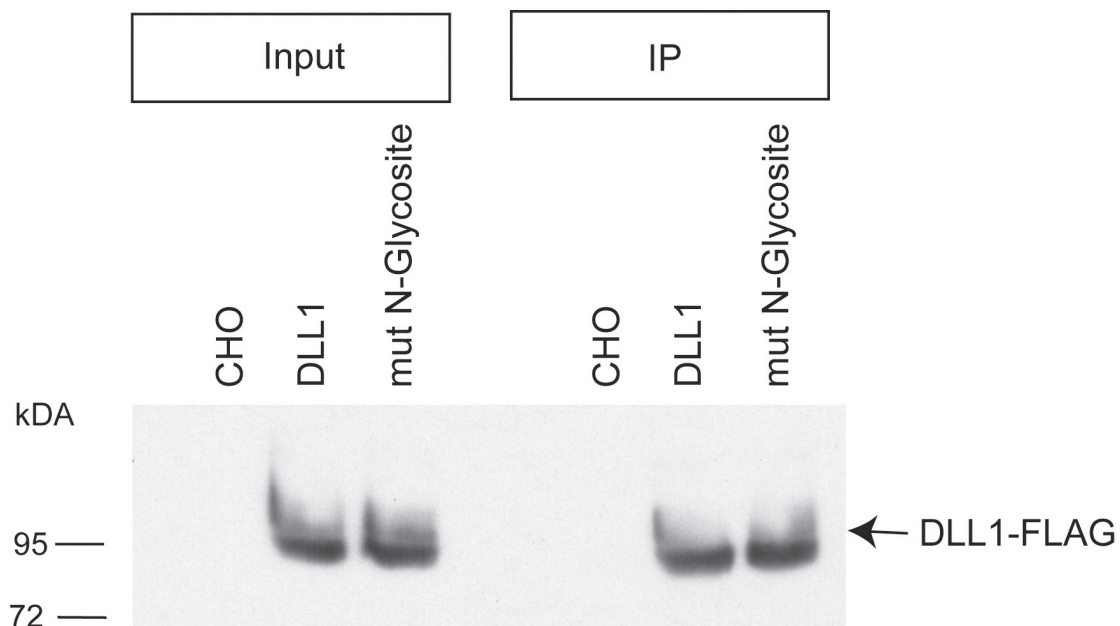


Abb. 4.14: Untersuchung der Zelloberflächenbiotinylierung von DLL1 mutN-Glycosite. CHO-Zellen, die stabil DLL1 und das mutante Protein DLL1 mutN-Glycosite exprimierten, wurden mit Biotin inkubiert. Nach der Lyse der Zellen und einer Streptavidin-Immunpräzipitation wurden die biotinmarkierten Proteine (IP) zusammen mit den Zelllysaten, die für die IP eingesetzt wurden (Input), mit Hilfe des anti-Flag-Antikörpers auf dem Western Blot nachgewiesen. Die Biotinylierung zeigte, dass die mutante Proteinvariante DLL1 mutN-Glycosite wie das DLL1wt Protein auf der Zelloberfläche präsentiert wurde.

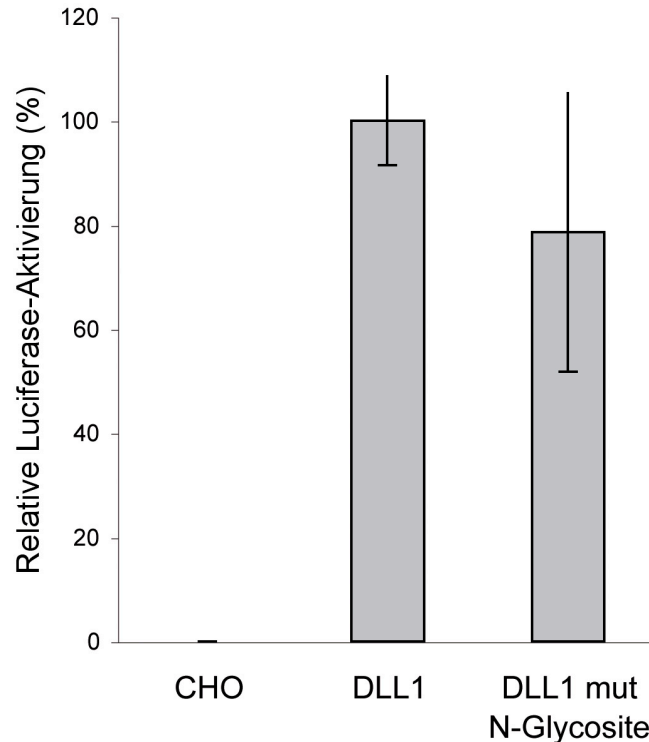


Abb. 4.15: Analyse der NOTCH1-Aktivierung von DLL1 mutN-Glycosite. Die mutante Proteinvariante DLL1 mutN-Glycosite zeigte im Vergleich zum DLL1wt Protein eine verringerte relative Luciferase- und damit NOTCH1-Aktivierung (78,4%). Die relative Luciferase-Aktivität der untransfizierten CHO Zellen (CHO) wurde auf 0% und die des DLL1wt Proteins (CHO DLL1) auf 100% gesetzt. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe der Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert, für die ein Konstrukt (pRL-TK) kotransfiziert worden war. Es wurden 4 Kokultivierungen pro Zellklon und CHO DLL1 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Um einen Einfluß der N-Glykosylierung auf die O-Fucosylierung zu untersuchen, wurden CHO Zellen, die stabil die generierte Proteinvariante exprimierten, *in vitro* mit ^3H -Fucose fucosyliert. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen gleichzeitig mit ^3H -Fucose und Tunicamycin als Inhibitor der N-Glykosylierung inkubiert. Die N-Glykosylierung von Proteinen erfolgt im

endoplasmatischen Retikulum durch Übertragung eines *Core*-Oligosaccharides von Dolicholphosphat an einen Asparaginrest des Proteins. Der erste Schritt der *Core*-Oligosaccharidsynthese ist die Addition von N-Acetylglucosamin an Dolicholphosphat. Dieser initiale Schritt wird durch Tunicamycin, einem hydrophoben Analogon des N-Acetylglucosamins, gehemmt, wodurch die N-Glykosylierung von Proteinen unterbunden wird. Außerdem bewirkt es einen Stillstand des Zellzyklus in der G1-Phase. Eine Folge der inhibierten N-Glykosylierung ist die Retention von Proteinen im ER, da nur vollständig glykosylierte Proteine nach Überprüfung durch die Chaperone das ER verlassen.

Zunächst wurden die CHO-Zellen, die DLL1 stabil exprimierten für 24 h metabolisch mit ^3H -Fucose, parallel mit einem Gemisch aus ^{35}S -Methionin und Cystein markiert und die Hälfte der Zellen zusätzlich mit Tunicamycin inkubiert. Nach der Zellyse und einer Immunpräzipitation mit dem anti-DLL1-1F9-Antikörper wurde das Protein gelelektrophoretisch aufgetrennt und radioaktiv markiertes DLL1 mit Hilfe der Autoradiographie detektiert. Der unveränderte Einbau von ^3H -Fucose in DLL1 in Ab- und Anwesenheit von Tunicamycin zeigte, dass ein Verlust der N-Glykosylierung keinen Einfluß auf die *in vitro* O-Fucosylierung hatte (Abb. 4.16). Beim Vergleich der detektierten Proteinmengen für die O-Fucosylierung wurde für die Anwesenheit von Tunicamycin eine Abnahme der Proteinmenge des markierten DLL1 beobachtet, die auf eine mögliche Retention des Proteins im ER oder eine Inhibition der Proteinsynthese zurückgeführt werden könnte.

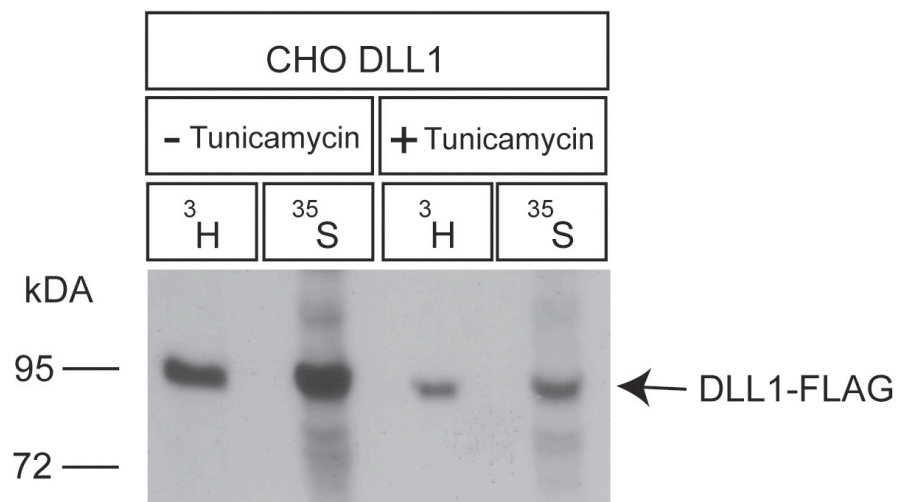


Abb. 4.16: Analyse des Einflusses der N-Glykosylierung auf die O-Fucosylierung von DLL1. Stabil DLL1 exprimierende CHO-Zellen wurden für 24 h mit ^3H -Fucose und zur Hälfte zusätzlich mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tunicamycin inkubiert. Nach der Lyse der Zellen und einer Immunpräzipitation mit dem anti-DLL1, 1F9-Antikörper wurde das Protein gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Gele getrocknet und DLL1 mit Hilfe von Autoradiographie detektiert. Durch den Verlust der N-Glykosylierung wurde der ^3H -Fucose-Einbau in DLL1 nicht verhindert. Beim Vergleich der detektierten Proteinsignale für die Fucosylierung wurde bei Anwesenheit von Tunicamycin für DLL1 eine Abnahme der Proteinmenge beobachtet, die durch eine mögliche ER-Retention des Proteins entstehen könnte.

Wie die Autoradiographie von Abb. 4.17 zeigte, wurde die Proteinvariante DLL1 mutN-Glycosite *in vitro* fucosyliert, so dass der Verlust der N-Glykosylierung den Einbau von ^3H -Fucose nicht verhinderte (Abb. 4.17 3. Bande von links). Auch die Zugabe von Tunicamycin führte nicht zu einer Veränderung dieses Einbaus in DLL1 mutN-Gycosite (Abb. 4.17, 4. Bande von links). Das als Positivkontrolle verwendete DLL1 zeigte die bereits in Abb. 4.16 beobachtete *in vitro* Fucosylierung unter beiden Bedingungen, wobei die Proteinmenge in diesem Experiment durch Zugabe von Tunicamycin nicht abnahm.

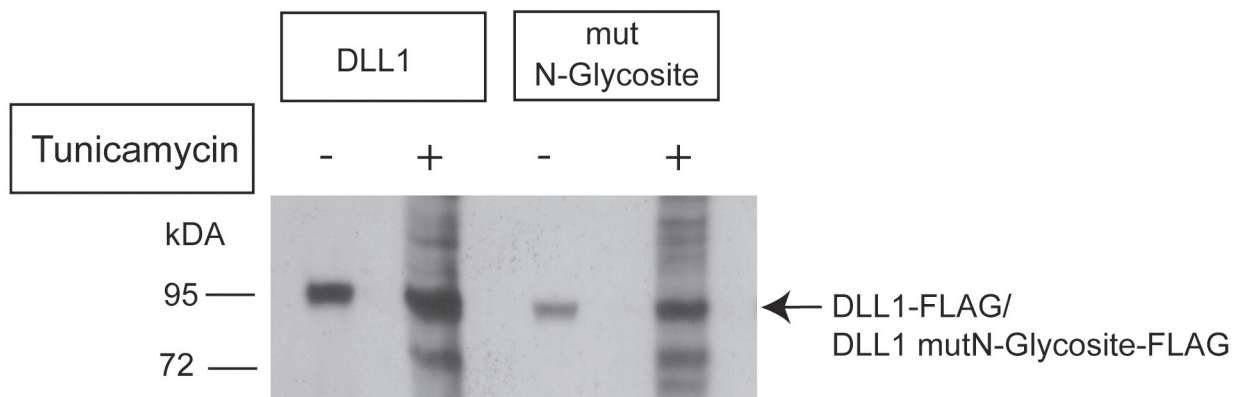


Abb. 4.17: Analyse des Einflusses der N-Glykosylierung auf die O-Fucosylierung der Proteinvariante DLL1 mutN-Glycosite. CHO-Zellklone, die stabil die DLL1 mutN-Gycosite-Proteinvariante und als Positivkontrolle DLL1 exprimierten, wurden für 24 h mit ^3H -Fucose und zur Hälfte mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tunicamycin inkubiert. Nach der Zelllyse und einer Immunpräzipitation mit dem anti-DLL1, 1F9-Antikörper wurden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Gele getrocknet und mittels Autoradiographie die markierten Proteine detektiert. Für die Proteinvariante DLL1 mutN-Glycosite und das DLL1wt Protein wurde ein Einbau von ^3H -Fucose nachgewiesen (1. und 3. Band von links). Die Inkubation mit Tunicamycin zur zusätzlichen Inhibition der N-Glykosylierung zeigte für beide Proteine keinen wesentlichen Einfluß auf diesen Einbau (2. und 4. Bande von links).

Der Verlust der N-Glykosylierung durch Mutagenese der Konsensussequenz zeigte keinen wesentlichen Einfluß auf die für den Notch-Signalweg potentiell wichtige O-Fucosylierung von DLL1, da die mutante Proteinvariante *in vitro* vergleichbar zum DLL1wt Protein ³H-Fucose einbaute. Die subzelluläre Lokalisierung wurde durch Mutagenese der Konsensussequenz ebenfalls nicht beeinflusst, da die Proteinvariante auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. Allein die gemessene NOTCH1-Aktivierung des mutanten Proteins war gegenüber dem DLL1wt Protein verringert.

4.5 Analyse der subzellulären Lokalisierung von endogenem DLL1 in Abwesenheit von POFUT1

4.5.1 Analyse der subzellulären Lokalisierung von endogenem DLL1 in Zellen des präsomitischen Mesoderms von Pofut1^{+/+} und Pofut1^{-/-} Embryonen

Zusätzlich zur Untersuchung der Rolle der O-Fucosylierung *in vitro* wurde die subzelluläre Lokalisierung von endogenem DLL1 in Abwesenheit von POFUT1 unter physiologischen Bedingungen mit Hilfe einer Ganzpräparat-Immunfluoreszenzfärbung analysiert.

In CHO-Zellen wurde für die subzelluläre Lokalisierung von DLL1 bei Verlust der Fucosylierung in den *in vitro* Analysen unterschiedliche Ergebnisse gefunden: Die DLL1 Proteinvariante DLL1 mEGF2.3.4.7.8 zeigte nach Fehlen der Fucosylierung durch Mutagenese aller Fucosylierungsstellen eine intrazelluläre Lokalisierung, dagegen wurde DLL1 bei Reduzierung der POFUT1-Proteinmenge durch Herabregulation der Pofut1-Genexpression in CHO-Zellen noch auf der Zelloberfläche exprimiert.

Mit Hilfe der Ganzpräparat-Immunfluoreszenzfärbung wurde DLL1 *in vivo* in Zellen des präsomitischen Mesoderms (PSM) in Pofut1^{+/+} und Pofut1^{-/-} E9.5 Embryonen, wie unter 3.2.3.7 beschrieben, angefärbt und mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Der verwendete polyklonale anti-DLL1 Antikörper war gegen den C-Terminus gerichtet und wurde mit Hilfe eines Alexa488[®]-konjugierten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht. Der Farbstoff Draq5 wurde als DNA-bindender Kernfarbstoff verwendet. Vor Beginn dieser Arbeit war durch *In situ Hybridisierung* gezeigt worden, dass Dll1 im PSM von Pofut1 E9.5 Embryonen exprimiert wurde. Um die Expression von endogenem DLL1 in PSM-Zellen des gleichen Embryonalstadiums miteinander vergleichen zu können, wurden für die Experimente Pofut1^{+/+} und Pofut1^{-/-} Embryonen derselben Würfe verwendet und innerhalb des PSM Zellen aus gleichen Regionen untersucht. Die Immunfluoreszenzfärbung von PSM-Zellen eines Pofut1^{+/+} Embryos zeigte für DLL1 *in vivo* eine überwiegend uniforme Lokalisierung auf der Plasmamembran der Zellen (Abb. 4.18 a, f, k, p), die durch die vollständige Überlagerung der Färbung mit der des Zelloberflächenproteins Pan-Cadherin bestätigt wurde (Abb. 4.18 a-t, Pfeile). Daneben wurde in einigen Zellen eine zusätzliche cytoplasmatische Färbung mit

punktierter Verteilung detektiert, die keine Überlagerung mit der Expression von Pan-Cadherin zeigte (Abb. 4.18 f, g, h, Sterne).

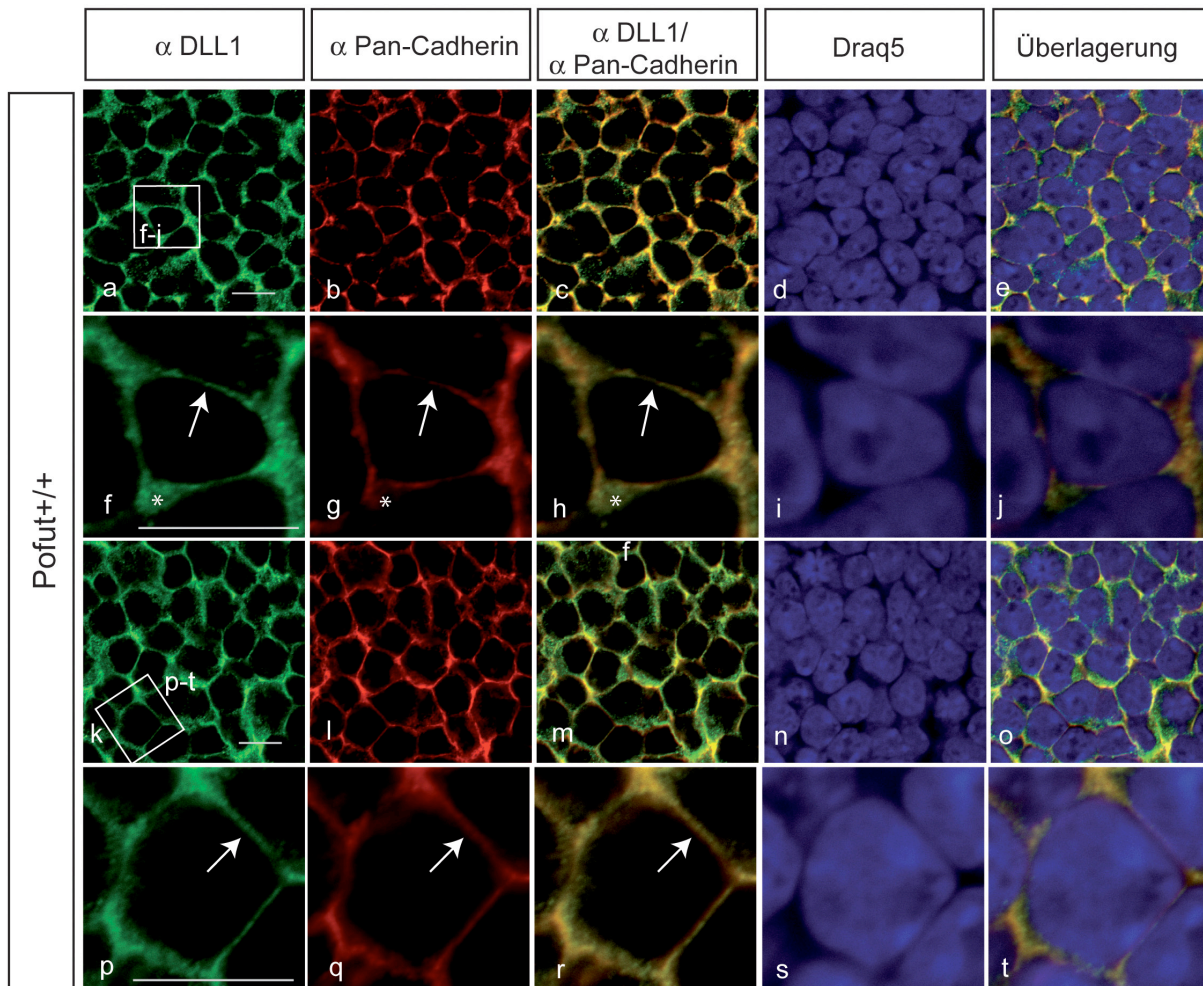


Abb. 4.18: Analyse der subzellulären Lokalisierung von endogenem DLL1 in Pofut1^{+/+} PSM-Zellen. Die PSM-Zellen von Pofut1^{+/+}-Embryonen wurden mit Antikörpern gegen die intrazelluläre Domäne von DLL1, das Zelloberflächenprotein Pan-Cadherin und dem Kernfarbstoff Draq5 sowie Alexa488[®]- und 555 konjugierten Sekundärantikörpern angefärbt und mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie analysiert. Endogenes DLL1 wurde überwiegend auf der Plasmamembran der Zellen nachgewiesen, was durch die Überlagerung der Färbung mit der von Pan-Cadherin bestätigt wurde (a, b, c, f, g, h, p, q, r, Markierung mit Pfeilen). In einigen Bereichen wurde zusätzlich eine cytoplasmatische Lokalisierung in Form vesikulärer Strukturen detektiert, die keine Koexpression mit Pan-Cadherin zeigte (f, g, h, Sterne). Maßstab, 10 μ m.

In Abwesenheit von POFUT1 und somit inhibierter O-Fucosylierung wurde DLL1 in PSM-Zellen von Pofut1^{-/-} Embryonen ebenfalls auf der Zelloberfläche mit Pan-Cadherin koexprimiert (Abb. 4.19 g, h, l, m, v, w, a', b'). Neben dieser Zelloberflächenexpression für DLL1, die

vergleichbar mit dem Expressionsmuster aus den *Pofut1*^{+/+} PSM-Zellen war (Abb. 4.18), wurde zusätzlich eine diffuse intrazelluläre Lokalisierung von DLL1 im Cytosol detektiert, die keine Überlagerung mit der Pan-Cadherin-Expression zeigte (Abb. 4.19 f, g,h, k, l, m, u, v, w, z, a', b', Markierung mit Pfeilen). In einigen Zellen erschien diese intrazelluläre Expression um den mit Draq5 angefärbten Kern nicht einheitlich, sondern vielmehr in vesikulären punktierten Strukturen vorzuliegen (Abb. 4.19 u).

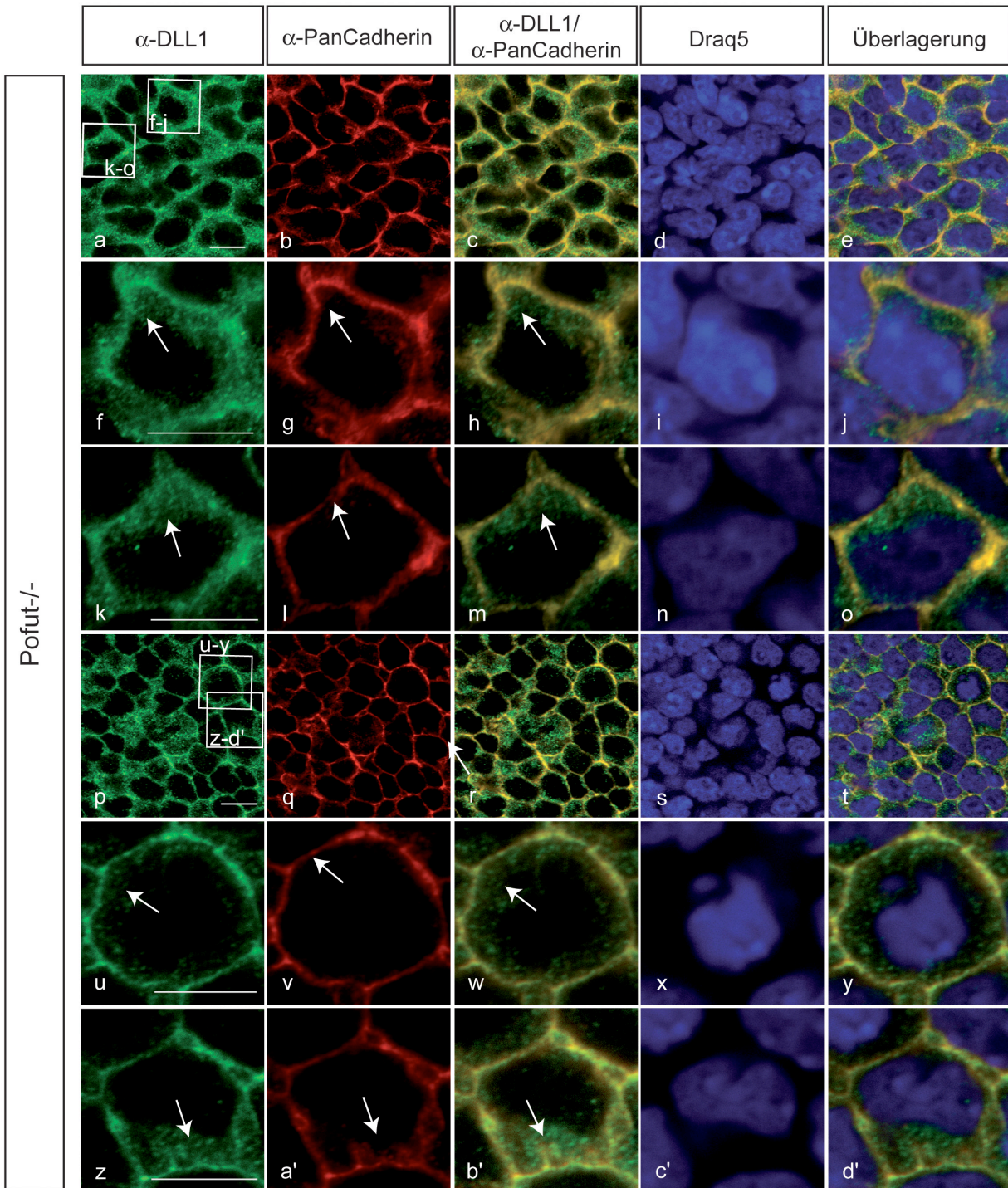


Abb. 4.19: Analyse der subzellulären Lokalisierung von endogenem DLL1 in Pofut1^{-/-} PSM-Zellen. Für DLL1 wurde *in vivo* auf der Plasmamembran der PSM-Zellen von Pofut1^{-/-} E9.5 Embryonen eine Koexpression mit Pan-Cadherin nachgewiesen (c, h, m, r, w, b'). Daneben zeigte DLL1 eine Expression im Cytosol der PSM-Zellen, für die keine Überlagerung mit der Pan-Cadherin Färbung und zum Teil eine punktierte Verteilung beobachtet wurde (f-h, k-m, u-w, z-b', Markierung mit Pfeilen). Maßstab, 10 μ m.

Um *in vivo* die ektopische intrazelluläre Lokalisierung von DLL1 in Pofut1^{-/-} PSM-Zellen auf eine Kolokalisierung mit dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) oder dem Golgi-Apparat als Syntheseort der O-Glykane und ihrer weiteren Modifizierung zu untersuchen, wurden Dreifachfärbungen mit Antikörpern gegen DLL1, den cis-Golgi-Marker GM130, das ER-Protein Calreticulin sowie Draq5 durchgeführt. In PSM-Zellen aus Pofut1^{+/+} Embryonen wurde eine partielle Kolokalisierung von endogenem DLL1 mit dem cis-Golgi-Protein GM130 in vesikulären Strukturen im Cytoplasma in Plasmamembrannähe der Zellen festgestellt (Abb. 4.20 a-e, siehe Markierung mit Pfeil in d). Diese wurde bereits in früheren Studien beobachtet (Geffers et al., 2007). In Pofut1^{-/-}-PSM-Zellen fand in den Bereichen, in denen das endogene DLL1 intrazellulär nachgewiesen wurde, eine Koexpression mit GM130 sehr nahe der Plasmamembran statt (Abb. 4.20 f-j, siehe Pfeil i).

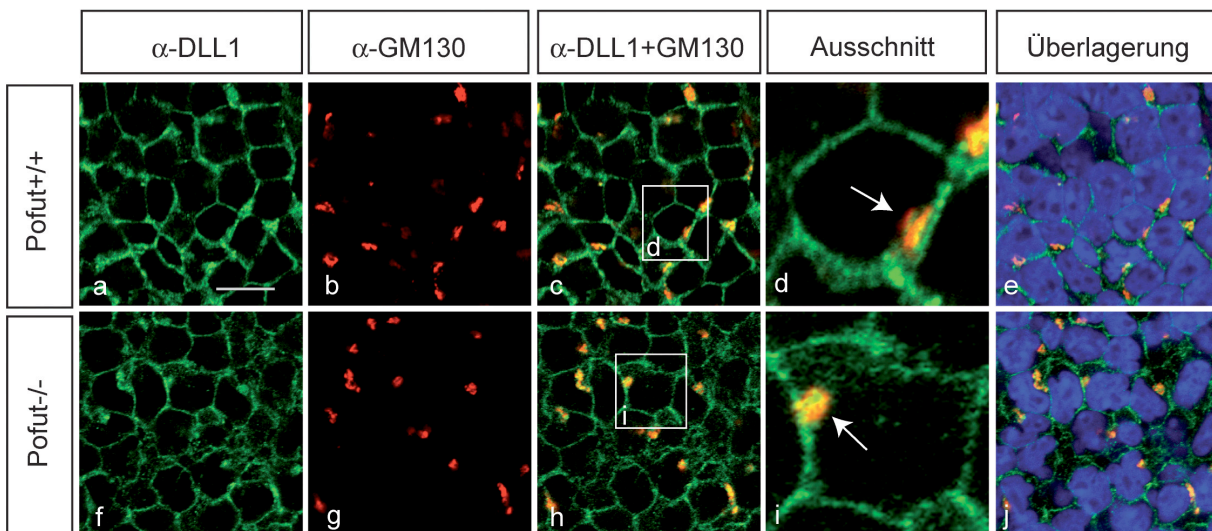


Abb. 4.20: Analyse der intrazellulären Lokalisierung von endogenem DLL1 in Pofut1^{-/-} PSM-Zellen mit Hilfe des cis-Golgi-Proteins GM130. Die PSM-Zellen aus Pofut1^{+/+} und Pofut1^{-/-} Embryonen wurden mit Antikörpern gegen DLL1 und das cis-Golgi-Protein GM130 sowie dem Kernfarbstoff Draq5 gefärbt. Für das endogene DLL1 wurde in den Pofut1^{+/+}-PSM Zellen eine partielle Kolokalisierung mit dem cis-Golgi-Protein GM130 in der Nähe der Plasmamembran nachgewiesen (c, d Markierung mit Pfeil). In Pofut1^{-/-} PSM-Zellen wurde in den Bereichen, in denen eine intrazelluläre Expression von DLL1 detektiert wurde, eine Koexpression mit GM130 in Plasmamembrannähe gezeigt (h, i mit Pfeil). Maßstab, 10 μ m.

Neben der subzellulären Lokalisierung von DLL1 als Ligand wurde auch die des Notch1-Rezeptors in den PSM-Zellen von Pofut1 Embryonen mit der Ganzpräparat-Immunfluoreszenzfärbung analysiert. In Doppelfärbungen gegen endogenes DLL1 und NOTCH1 in PSM-Zellen von Pofut1^{+/+} Embryonen wurde für beide Proteine eine Koexpression auf der Plasmamembran der Zellen nachgewiesen (Abb. 4.21 a-d), wie sie für die Wildtyp-Situation erwartet und für eine Interaktion vorausgesetzt wurde. Während sich dabei die Expression von DLL1 überwiegend uniform auf die Zelloberfläche beschränkte, wurde NOTCH1 sowohl auf der Oberfläche als auch diffus im Cytoplasma der Zellen in Form vesikulärer Strukturen detektiert (Abb. 4.21 a, b), wodurch die Überlagerung der Färbungen kleine Unterbrechungen aufwies (Abb. 4.21 c, d Pfeil). Die Färbungen in den Pofut1^{-/-} PSM-Zellen zeigten für DLL1 eine starke Zelloberflächenexpression neben einer schwächeren im Cytosol (e), wie bereits in vorangegangenen Färbungen beobachtet wurde. NOTCH1 wurde verstärkt in größeren vesikulären Strukturen im Cytosol exprimiert (Abb. 4.21 f Pfeil, h Pfeile). Daneben zeigten die Färbungen eine im Vergleich dazu schwächere uneinheitliche Expression im gesamten Cytosol, so dass eine deutliche Abgrenzung der einzelnen Zellen erschwert wurde. Die Kolo-kalisierung von DLL1 und NOTCH1 war im Vergleich zu der in den Pofut1^{+/+} PSM-Zellen sehr gering und wurde nur punktuell detektiert (Abb. 4.21 g, h Pfeil mit Stern).

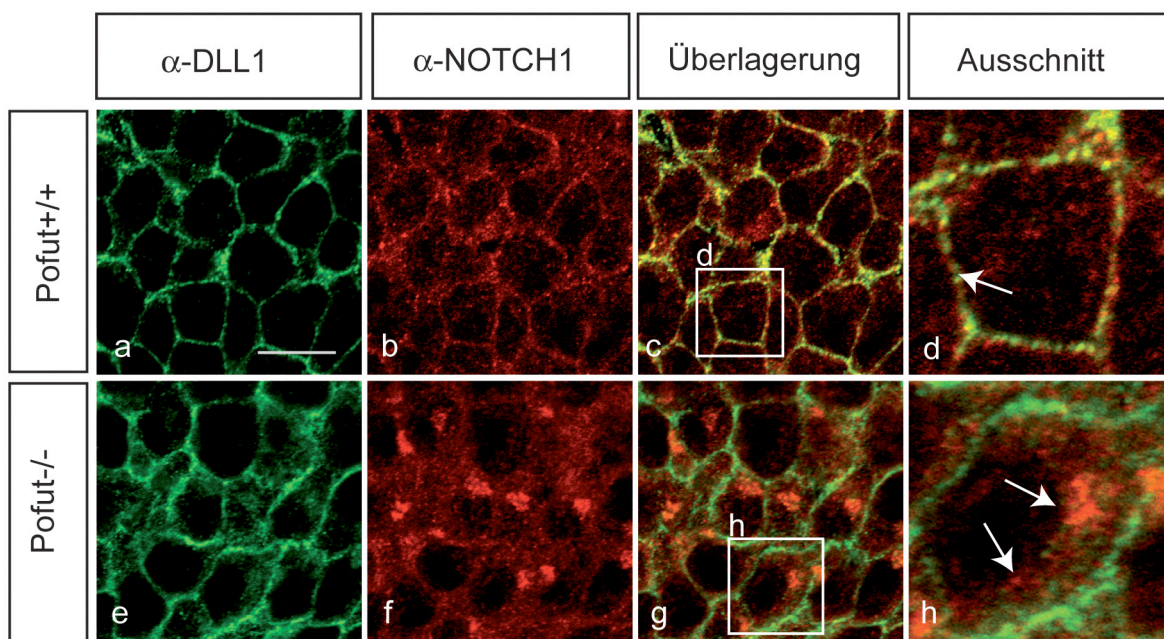


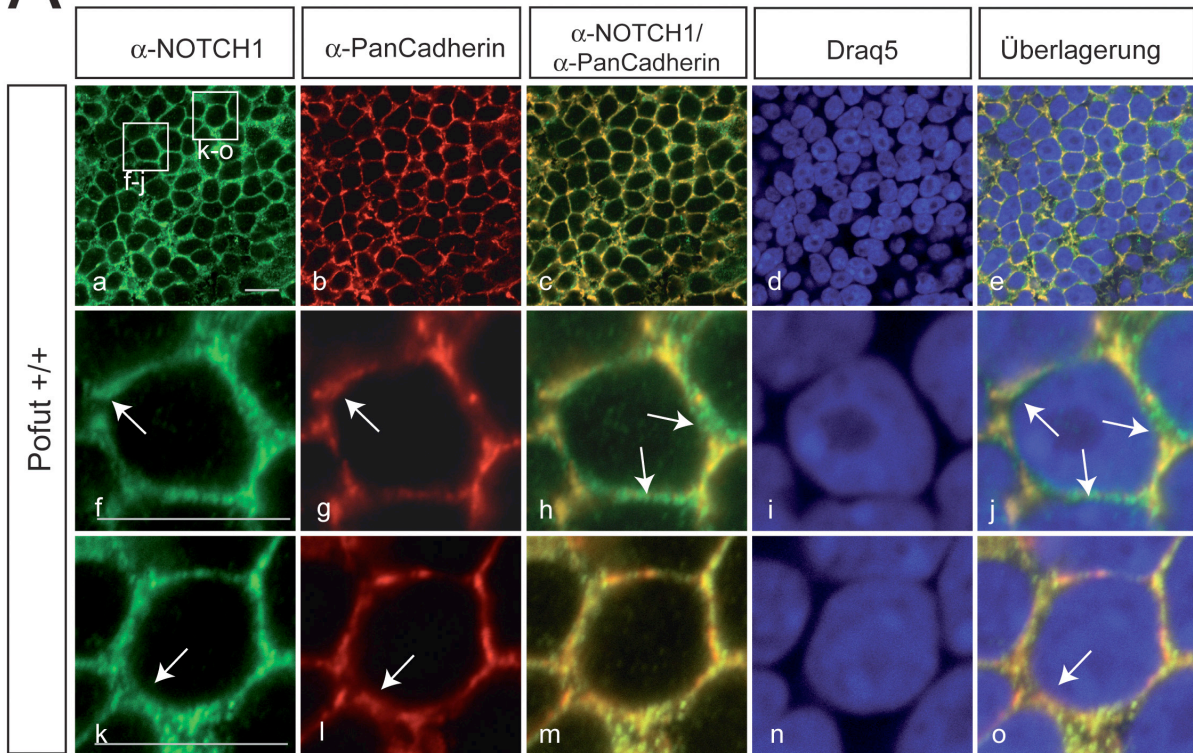
Abb. 4.21: Analyse der subzellulären Lokalisierung von endogenem DLL1 und NOTCH1 in Pofut1^{+/+} und -/- PSM-Zellen. Die PSM-Zellen aus Pofut1^{+/+} und Pofut1^{-/-} Embryonen wurden mit Antikörpern gegen DLL1 und NOTCH1 angefärbt. In Pofut1^{+/+}-PSM Zellen wurde endogenes DLL1 auf der Zelloberfläche exprimiert und NOTCH1 sowohl auf der Zelloberfläche als auch weniger distinkt im Cytoplasma (a-d). In Pofut1^{-/-} PSM-Zellen wurde endogenes DLL1 auf der Plasmamembran und im Cytosol der Zellen nachgewiesen (e). Für NOTCH1 wurde eine verstärkte Expression in vesikulären Strukturen im Cytosol detektiert (f, h Markierung mit Pfeilen), daneben eine schwache uneinheitliche Anfärbung des gesamten Cytosols und weniger konzentriert auf der Zelloberfläche im Vergleich zur Expression in Pofut1^{+/+} PSM-Zellen (f). Die Kolo-kalisierung von DLL1 und NOTCH1 in Pofut^{-/-} PSM-Zellen nahm ab und war nur punktuell zu beobachten (g, h Pfeil mit Stern). Maßstab, 10 µm.

Um die Ergebnisse der subzellulären Lokalisierungsanalyse von NOTCH1 mit denen von DLL1 vergleichen zu können, wurden für NOTCH1 ebenfalls Dreifachfärbungen mit dem Antikörper gegen das Oberflächenprotein Pan-Cadherin und Draq5 durchgeführt. In Pofut1^{+/+} PSM-Zellen wurde für NOTCH1 eine überwiegende Expression auf der Zelloberfläche nachgewiesen, die nicht uniform war, sondern vielmehr kleine Unterbrechungen aufwies. In einigen Bereichen reichte sie von der Plasmamembran bis ins Cytoplasma, was mit der Gegenfärbung durch Pan-Cadherin auf der Zelloberfläche gezeigt wurde (Abb. 4.22 A f-j, k-o). In Pofut1^{-/-} PSM-Zellen wurde das endogene NOTCH1 sowohl auf der Zelloberfläche kolo-kalisiert mit Pan-Cadherin nachgewiesen (Abb. 4.22 B f-j, k-o), als auch intrazellulär in vesikulären Strukturen im gesamten Cytoplasma (Abb. 4.22 B f, g, j, k, l, o Markierung mit Pfeilen).

Zusammenfassend wiesen die *in vivo* Färbungen von PSM-Zellen aus Pofut1^{+/+} Embryonen eine überwiegende Zelloberflächenexpression der endogenen Proteine DLL1 und NOTCH1 nach, die mit der des Oberflächenmarkerproteins Pan-Cadherin in großen Bereichen der Plasmamembran Überlagerungen zeigte. Im Gegensatz dazu wurde DLL1 bei Fehlen von POFUT1 in den PSM-Zellen auf der Zelloberfläche und im Cytoplasma der Zellen detektiert. Die größere Proteinmenge von DLL1 wurde auf der Plasmamembran in Kolo-kalisierung mit Pan-Cadherin nachgewiesen.

Intrazellulär zeigte DLL1 eine Lokalisierung in vesikulären bzw. punktierten Strukturen, wobei der größte Teil des Proteins außerhalb von ER und Golgi-Apparat detektiert und somit in noch nicht charakterisierten Strukturen exprimiert wurde. Für NOTCH1 wurde in den Pofut1^{-/-} PSM-Zellen ein ähnliches Expressionsmuster ermittelt: Der größte Anteil des endogen exprimierten NOTCH1 wurde auf der Zelloberfläche mit Pan-Cadherin koexprimiert. Intrazellulär wurde eine geringere Menge des Proteins im Cytosol nachgewiesen, wobei diese Expression wenig distinkt und in einigen Bereichen vesikulär erschien. Wie diese Ergebnisse zeigten, führte in den PSM-Zellen das Fehlen von POFUT1 und der Fucosylierung zu einer Veränderung der subzellulären Lokalisierung, so dass beide Proteine neben der Oberflächenexpression zusätzlich im Cytosol lokalisiert waren.

A



B

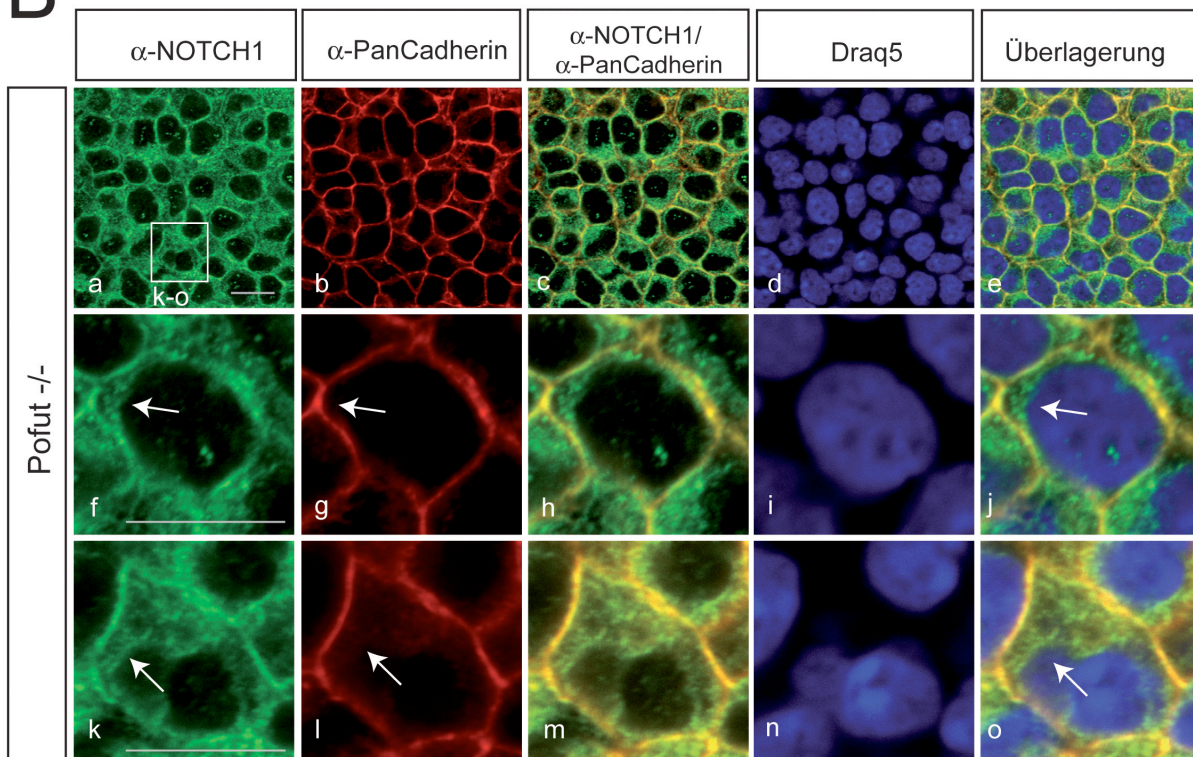


Abb. 4.22: Analyse der subzellulären Lokalisierung von endogenem NOTCH1 in Pofut1^{+/+} und -/- PSM-Zellen. Die PSM-Zellen aus Pofut1^{+/+} (A) und Pofut1^{-/-} (B) Embryonen wurden mit Antikörpern gegen NOTCH1, das Zelloberflächenprotein Pan-Cadherin und Draq5 angefärbt. Für NOTCH1 wurde in Pofut1^{+/+}-PSM Zellen eine überwiegende Koexpression mit Pan-Cadherin auf der Plasmamembran nachgewiesen (A), die nicht als homogen, sondern vielmehr mit kleinen Unterbrechungen beschrieben wurde (f, g, h, j, k, l, m, o, Markierung mit Pfeilen). In Pofut1^{-/-} PSM-Zellen zeigten die Färbungen für das endogene NOTCH1 eine Expression auf der Zelloberfläche, die mit der für Pan-Cadherin überlagert wurde (B, f, g, h und k, l, m, Pfeile). Zusätzlich wurde eine uneinheitliche intrazelluläre Lokalisierung von NOTCH1 im Cytosol der Zellen detektiert (B, f, g, h, j und k, l, m, o Pfeile). Maßstab, 10 µm.

4.5.2 *In vitro* Analyse der subzellulären Lokalisierung von DLL1 in embryonalen Pofut1^{-/-} Fibroblasten

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse der Lokalisierungsanalysen von DLL1 *in vivo* bei Abwesenheit von POFUT1 und *in vitro* durch Reduzierung der POFUT1-Menge wurden für weitere Untersuchungen von DLL1 embryonale Fibroblastenzelllinien aus E9.5 Pofut1^{+/+} und Pofut1^{-/-} E9.5 Embryonen generiert, die stabil DLL1 exprimierten.

Die immortalisierten embryonalen Fibroblasten aus Pofut1^{+/+} und Pofut1^{-/-}-Embryonen wurden wie unter 3.2.4.4 beschrieben hergestellt. Für eine stabile Expression von DLL1 wurde das Plasmid pTracerCMV-Dll1Flag in die Zellen transfiziert und mit 500 µg/ml Neomycin (G418) auf Zellklone selektiert, die DLL1-Flag stabil exprimierten. Mit Hilfe des anti-Flag-Antikörpers wurde auf einem Western-Blot die Proteinexpression für die stabilen Zellklone nachgewiesen. Für die Analyse der subzellulären Lokalisierung von DLL1 in den Pofut1-defizienten embryonalen Fibroblasten wurden diese mit Antikörpern gegen DLL1, das cis-Golgi-Protein GM130, das ER-Protein Calreticulin und Clathrin angefärbt (siehe 3.3.6). Das Protein Clathrin wirkt an der Einstülpung von Zellmembranen und der Bildung von Vesikeln mit. Außerdem wurde für die Clathrin-abhängige Endocytose eine Beteiligung am Recycling des Notch-Rezeptors, sowie der trans- und cis-Inhibierung des Signalwegs beschrieben (Gupta-Rossi et al., 2004; Sakata et al., 2004; Wilkin et al., 2004). Für die Pofut1^{+/+} embryonalen Fibroblasten, die stabil DLL1 exprimieren sollten, wurde erst nach mehrmonatiger Kultivierung und Selektion mit Neomycin Zellklone isoliert, so dass diese wenigen Zellen bis zur Fertigstellung dieser Arbeit nur mit Antikörpern gegen DLL1 und das ER-Protein Calreticulin angefärbt wurden. Die konfokalen Aufnahmen zeigten für DLL1 eine Expression auf der Zelloberfläche der Pofut^{+/+}-Primärzellen (Abb. 4.23 a, d, e) und keine Kolo-kalisierung mit dem ER-Protein Calreticulin (Abb. 4.23 c).

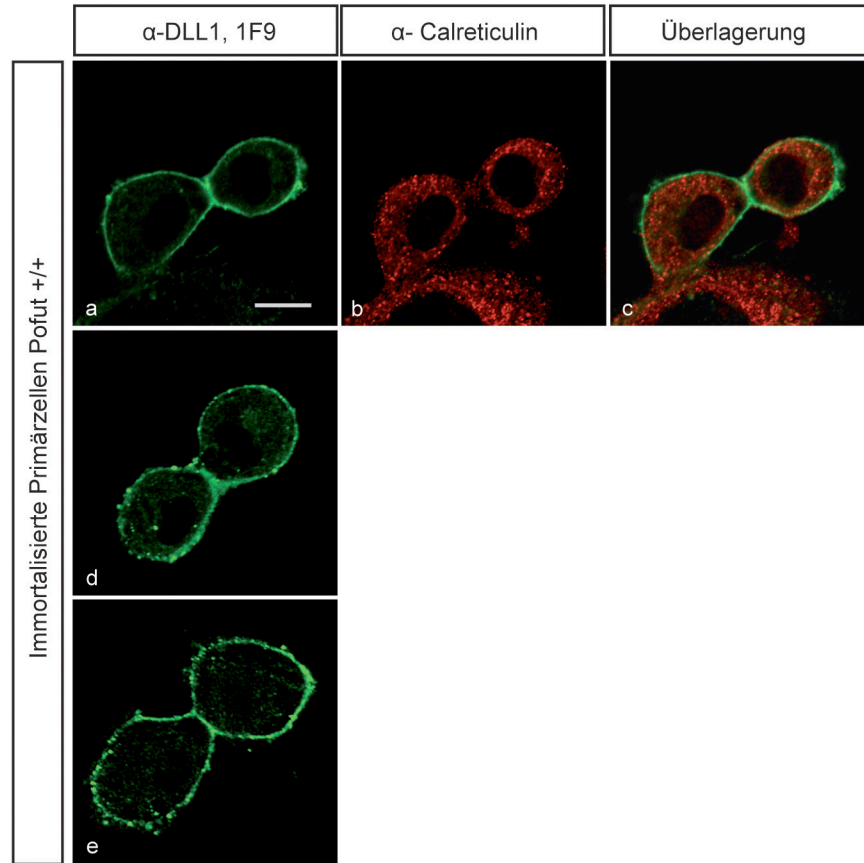


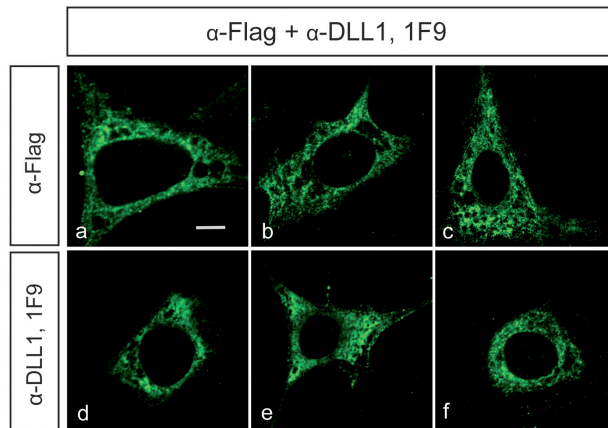
Abb. 4.23: Analyse der subzellulären Lokalisierung von DLL1 in embryonalen Pofut1^{+/+} Fibroblasten. Immortalisierte Fibroblasten aus Pofut1^{+/+} Embryonen, die stabil DLL1 exprimierten, wurden mit Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne von DLL1 und das ER-Protein Calreticulin angefärbt. DLL1 wurde auf der Zelloberfläche (a, d, e) nachgewiesen und zeigte keine Kolokalisierung mit dem ER-Protein Calreticulin (c). Maßstab, 10 μ m.

In Abwesenheit von POFUT1 wurde für DLL1 mit zwei Antikörpern, die gegen die intra- und extrazelluläre Domäne von DLL1 gerichtet waren, eine intrazelluläre Expression nachgewiesen (Abb. 4.24 A a-f, B a-f). In einigen Zellen wurde diese homogen im gesamten Cytosol beobachtet (A a-f, B b, d), in anderen perinukleär konzentriert (B a, e, f, Pfeile). Um die Anwesenheit von DLL1-Protein auf der Zelloberfläche zu überprüfen, wurde zusätzlich mit Antikörpern gegen die Zelloberflächenproteine Pan-Cadherin, das “Tight junction“ spezifische Protein1 (ZO1) sowie die die Na⁺-K⁺-ATPase als integrales Membranprotein gefärbt. Alle getesteten Antikörper zeigten jedoch auf den embryonalen Fibroblasten keine spezifische Detektion.

Die Doppelfärbungen von DLL1 und den intrazellulären Organellenmarkern wiesen partielle Kolokalisierungen nach, die aufgrund der zum Teil vesikulär vorliegenden Einzelfärbungen von

DLL1 und den Markerproteinen als punktuelle Überlagerungen detektiert wurden (B m-x, Markierung durch Pfeile). Durch den Vergleich der Einzelfärbungen von DLL1 und den Markerproteinen wurden diese aber als spezifische Signale verifiziert. So wurde für DLL1 und GM130 eine teilweise Koexpression im perinukleären Bereich des Cytosols detektiert (B m, n, s, t, Pfeile), für DLL1 und Calreticulin eine im peripheren Cytoplasma (B o, p, u, v, Pfeile) und für DLL1 und Clathrin eine überwiegend perinukleäre Kollokalisierung (B q, r, w, x, Pfeile).

A



B

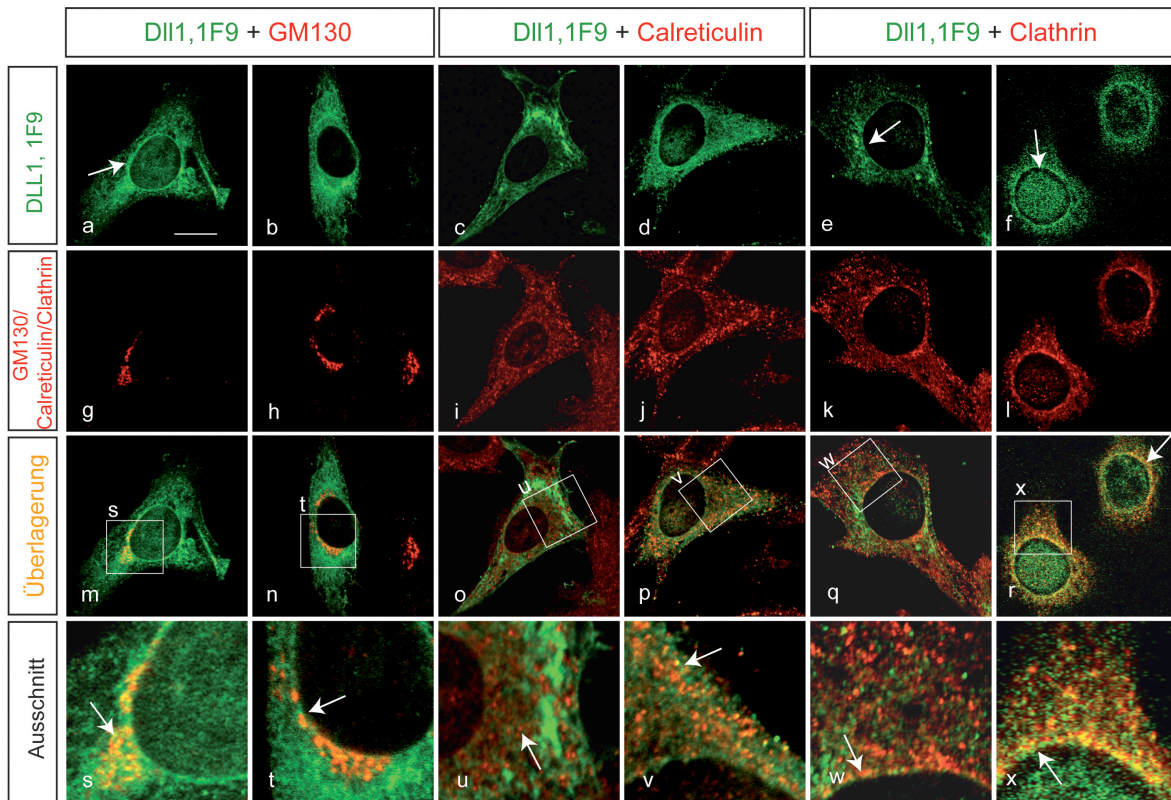


Abb. 4.24: Analyse der subzellulären Lokalisierung von DLL1 in embryonalen Pofut1^{-/-}-Fibroblasten. Immortalisierte Fibroblasten aus Pofut1^{-/-} Embryonen, die stabil DLL1 exprimierten, wurden mit Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne und den Flag-Tag von DLL1 (A), sowie gegen das cis-Golgi-Protein GM130, das ER-Protein Calreticulin und Clathrin. angefärbt (B). In den Pofut1-defizienten Zellen wurde DLL1 im Cytoplasma der Zellen nachgewiesen (A a-f, B a-f), in einigen Zellen homogen (A a-f, B b, d), in anderen zum Teil perinukleär konzentriert (B a, e, f, Markierung mit Pfeilen).

Die Doppelfärbungen mit dem cis-Golgi-Protein GM130 (B a, b, g, h, m, n, s, t), dem ER-Protein Calreticulin (B c, d, i, j, o, p, u, v) und Clathrin (B e, f, k, l, q, r, w, x Pfeile) zeigten in einigen Bereichen des Cytosols und für GM130 und Clathrin perinukleär teilweise Kollokalisierungen, die aufgrund der vesikulären Einzel-Expressionen punktuell nachgewiesen wurde (B m, n, s, t, o, p, u, v, q, r, w, x). Maßstab, 10 μ m.

Die *in vitro* Lokalisierungsanalysen in immortalisierten embryonalen Fibroblasten, die aus Pofut1^{+/+}- und Pofut1^{-/-} Embryonen hergestellt wurden und stabil DLL1 exprimierten, zeigten für DLL1 in Anwesenheit von POFUT1 eine Zelloberflächenexpression, wie sie vergleichbar in den zuvor beschriebenen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen als Wildtyp-Situation beobachtet wurde.

Dagegen wurde bei Abwesenheit von POFUT1 für DLL1 eine intrazelluläre Lokalisierung nachgewiesen, die sich überwiegend homogen über das gesamte Cytoplasma erstreckte, nur in wenigen Färbungen eine perinukleäre Konzentration zeigte und teilweise mit der Expression von GM130, Calreticulin oder Clathrin überlagerte. Vergleichbar zu den Ergebnissen der *in vitro* Studien nach Ausschaltung der Fucosylierungsstellen wurde DLL1 auch bei Fehlen von POFUT1 intrazellulär akkumuliert und ein großer Teil des Proteins außerhalb von ER und Golgi-Apparat in noch nicht charakterisierten Strukturen exprimiert.

5. Diskussion

5.1 Die Rolle der Integrität der konservierten Disulfidbrücken der EGF-ähnlichen Domänen von DLL1 *in vitro* für den Notch-Signalweg

Die EGF-Motive der extrazellulären Domäne von DLL1 haben eine entscheidende Bedeutung für die Bindung des Notch-Rezeptors, die anschließende Aktivierung des Notch-Signalwegs und als Substrate für die O-Fucosylierung und Glykosylierung (Rebay et al., 1991; Sakamoto et al., 2005; Panin et al., 2002). Obwohl in *Drosophila* beschriebene Mutationen in der extrazellulären Domäne von DELTA Änderungen für die Interaktion mit dem Rezeptor zeigten, wurde der Beitrag jeder einzelnen EGF-Domäne zu dieser Interaktion bislang nicht untersucht (Lieber et al., 1992; Brand und Campos-Ortega, 1990). Um den Einfluß der konservierten Disulfidbrücken als Strukturelemente innerhalb der EGF-Domänen von DLL1 für die Funktion des Liganden zu untersuchen und Hinweise auf die möglicherweise an der Bindung zum Rezeptor essentiellen Bereiche von DLL1 zu erlangen, wurde in den acht EGF-Motiven von DLL1 in jedem einzeln zwei konservierte Cysteine durch Glycine ersetzt. Durch die Punktmutationen wurde die Ausbildung von zwei der drei konservierten Disulfidbrücken innerhalb jeder EGF-Domäne inhibiert und die resultierenden Effekte der Mutationen auf die subzelluläre Lokalisierung und Aktivität von DLL1 analysiert. Die mutante DLL1 EGF1-Proteinvariante zeigte in den *in vitro* Analysen als einzige eine überwiegend intrazelluläre Expression und aufgrund der fehlenden Zelloberflächenpräsentation keine Aktivierung von NOTCH1 (Abb. 4.2; 4.4). Alle weiteren mutanten DLL1-Proteine (DLL1 EGF2-EGF8) wurden auf der Zelloberfläche detektiert und zeigten mit Ausnahme von DLL1 EGF2 und DLL1 EGF3 zum DLL1 wt Protein vergleichbare NOTCH1-Aktivierungen. Die Proteinvarianten DLL1 EGF2 und DLL1 EGF3 wiesen nur Aktivierungen des Rezeptors von ca. 20 und 25% auf. Der Verlust bzw. die geringe Aktivierung von NOTCH1 durch die DLL1 Proteine, die Mutationen in den EGF-Domänen 1 und 2 tragen, sind auf deren Bedeutung für die Rezeptorbindung zurückzuführen. Diese beiden Motive bilden zusammen mit der DSL-Domäne die essentielle minimale Einheit für die Bindung des Rezeptors, was mit Hilfe von *in vitro* Bindungsstudien gezeigt wurde (Shimizu et al., 1999; Muskavitch, 1994). Im DLL1-Protein sind an der Aktivierung von NOTCH1 der N-Terminus mit der DSL-Domäne und den EGF-Motiven 1 und 2 sowie die intrazelluläre Domäne beteiligt (Gefferis et al., 2007). Die Erforderlichkeit der EGF-Domäne 3 von DLL1, deren zugehöriges Protein eine

ebenfalls geringe NOTCH1-Aktivierung zeigte, für eine Rezeptor-Interaktion ist bislang nicht untersucht worden. Aufgrund ihrer distalen Lage zu den EGF-Motiven 1 und 2, welche die Bindung zum Rezeptor substantiell stabilisieren, ist ein unterstützender Einfluß durch das EGF-Motiv 3 ebenfalls denkbar.

Da bislang keine Proteinstruktur für die extrazelluläre Domäne (ECD) von DLL1 bekannt und somit die Anordnung der EGF-Motive zueinander ungeklärt ist, können für mögliche molekularen Mechanismen, welche die Erkennung, Bindung und Aktivierung des Rezeptors durch DLL1 bestimmen würden, nur Hypothesen in Analogie zu bekannten Strukturmodellen für die extrazelluläre Domäne von DLL1 aufgestellt werden. Denkbar für einen Einfluß wären strukturelle Effekte, die sich durch die Faltungen und Anordnung der EGF-Motive, sowie durch posttranslationelle Modifikationen wie die Glykosylierung ergeben könnten.

Der Vergleich der NOTCH1-Aktivierungen der DLL1 EGF Proteine *in vitro* in Bezug auf die Anordnung der mutierten EGF-Motive in DLL1 zeigt eine fast lineare Zunahme der Aktivierungen. Eine Korrelation zwischen den Effekten der Mutationen und der Entfernung des entsprechenden mutierten EGF-Motives zu der für die Bindung von NOTCH1 essentiellen DSL-Domäne könnte somit bestehen. Auf den *in vitro* Beobachtungen basierend wäre für die Struktur der extrazellulären Domäne von DLL1 ein stabförmiges Modell denkbar, in dem die acht EGF-Domänen linear hintereinander angeordnet wären. Der räumliche Abstand zwischen den einzelnen EGF-Domänen in der Reihenfolge von EGF-Motiv 1 bis EGF-Motiv 8 und der DSL-Domäne würde immer größer und umgekehrt proportional die Möglichkeit physikalisch direkt an der durch die DSL-Domäne vermittelten Bindung teilzunehmen oder diese zu unterstützen immer kleiner. Somit würde in diesem Modell die Abnahme der räumlichen Entfernung eines EGF-Motives von der Bindungsstelle auch die Abnahme seiner Signifikanz für die Liganden-Rezeptor-Interaktion bedeuten. Mutationen in den peripheren EGF-Domänen 6, 7 und 8 würden aufgrund ihres geringeren Einflusses für die Interaktion mit dem Rezeptor geringere Auswirkungen auf die Gesamtaktivität von DLL1 zeigen, was für die in dieser Arbeit gemessenen Aktivierungen nach der Mutation dieser EGF-Motive beobachtet wird.

Die Unterschiede in den *in vitro* NOTCH1-Aktivierungen der Proteinvarianten können auch auf unspezifische Effekte zurückgeführt werden, die durch die Einführung der Punktmutationen in die Proteinvarianten bedingt sind, wobei eine Unterscheidung bzw. Auftrennung der Einflüsse von spezifischen oder unspezifischer Effekten nicht möglich ist.

5.1.2 Die Analysen der Mutanten von DLL1 zeigen *in vitro* und *in vivo* deutliche Unterschiede für die Aktivität von DLL1

Parallel zu den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Studien wird die Rolle der Mutationen *in vivo* unter Verwendung von unterschiedlichen Mauslinien analysiert, welche jeweils einzeln die Mutationen tragen (K. Schuster-Gossler, unpublizierte Daten, siehe auch Abb. 5.1 C).

Während *in vitro* von den acht mutanten DLL1 Proteinvarianten nur die Proteine mit einer Mutation in der ersten, zweiten und dritten EGF-Domäne einen deutlichen Verlust ihrer biologischen Aktivität aufweisen und nicht mehr oder nur gering in der Lage sind, den Notch-Signalweg zu aktivieren, zeigt die *in vivo* Analyse, mit Ausnahme der Mutation im EGF-Motiv 6, für alle weiteren mutierten EGF-Motive von DLL1 Phänotypen. Diese Mutationen führen *in vivo* zu unterschiedlichen Ausprägungen des Phänotyps, der mit milden bis schweren Defekten in der Somitogenese, Neurogenese und Vaskulogenese und teilweise mit embryonaler Letalität verbunden ist. Während sich der Austausch der Cystein-Reste gegen Glycin in den EGF-Motiven 1 und 2 sehr früh in der Embryonalentwicklung letal auswirkt, Embryonen mit Mutationen in den EGF-Motiven 3, 4 und 8 perinatal letal sind, führen die Mutationen in den EGF-Domänen 5 und 7 zu lebensfähigen Mäusen mit milden Skelettphänotypen. Die Mutation in der EGF-Domäne 6 von DLL1 scheint als einzige keine Auswirkungen *in vivo* zu haben, da die Embryonen keine Auffälligkeiten zeigen (Abb. 5.1; K. Schuster-Gossler, unpublizierte Daten).

Der Vergleich der Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Studien zeigt deutliche Unterschiede in den Auswirkungen der Mutationen in den einzelnen EGF-Motiven von DLL1. Eine eindeutige Korrelation zwischen den Ergebnissen *in vitro* und *in vivo* besteht nur für die Mutationen im ersten und zweiten EGF-Motiv (DLL1 EGF1, EGF2). DLL1 EGF1 wurde *in vitro* im Vergleich zum DLL1 wt Protein überwiegend intrazellulär exprimiert (B b) und zeigte aufgrund der fehlenden Oberflächenpräsentation keine Aktivierung von NOTCH1. Embryonen mit dieser Mutation weisen schwere Defekte auf und sterben am Tag 12 der Embryonalentwicklung (A b, B b, C, zweite Spalte). Eine annähernde Korrelation kann noch für die Auswirkungen der Mutation im zweiten EGF-Motiv beschrieben werden. Das Protein DLL1 EGF2 wurde auf der Zelloberfläche exprimiert und zeigte eine schwache NOTCH1-Aktivierung, während *in vivo* die Schwere der Defekte und die frühe Letalität der Embryonen vergleichbar zu denen durch die Mutation im EGF-Motiv 1 sind (A; B, C dritte Spalte jeweils). Für DLL1 EGF3 wurde eine

höhere Funktionalität bei fast gleicher NOTCH1-Aktivierung beobachtet. Die Embryonen mit einer mutierten EGF-Domäne 3 zeigen schwere Defekte, sind aber nicht früh embryonal letal (A; B; C vierte Spalte). Zwischen den *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen für die Mutationen in den EGF-Domänen 4-8 sind, mit Ausnahme der Mutation in der EGF-Domäne 6, keine klaren Korrelationen zu erkennen, da den gemessenen und sehr ähnlichen relativen Luciferase-Aktivierungen von NOTCH1 *in vitro* sehr unterschiedliche Ausprägungen des Phänotyps *in vivo* gegenüberstehen.

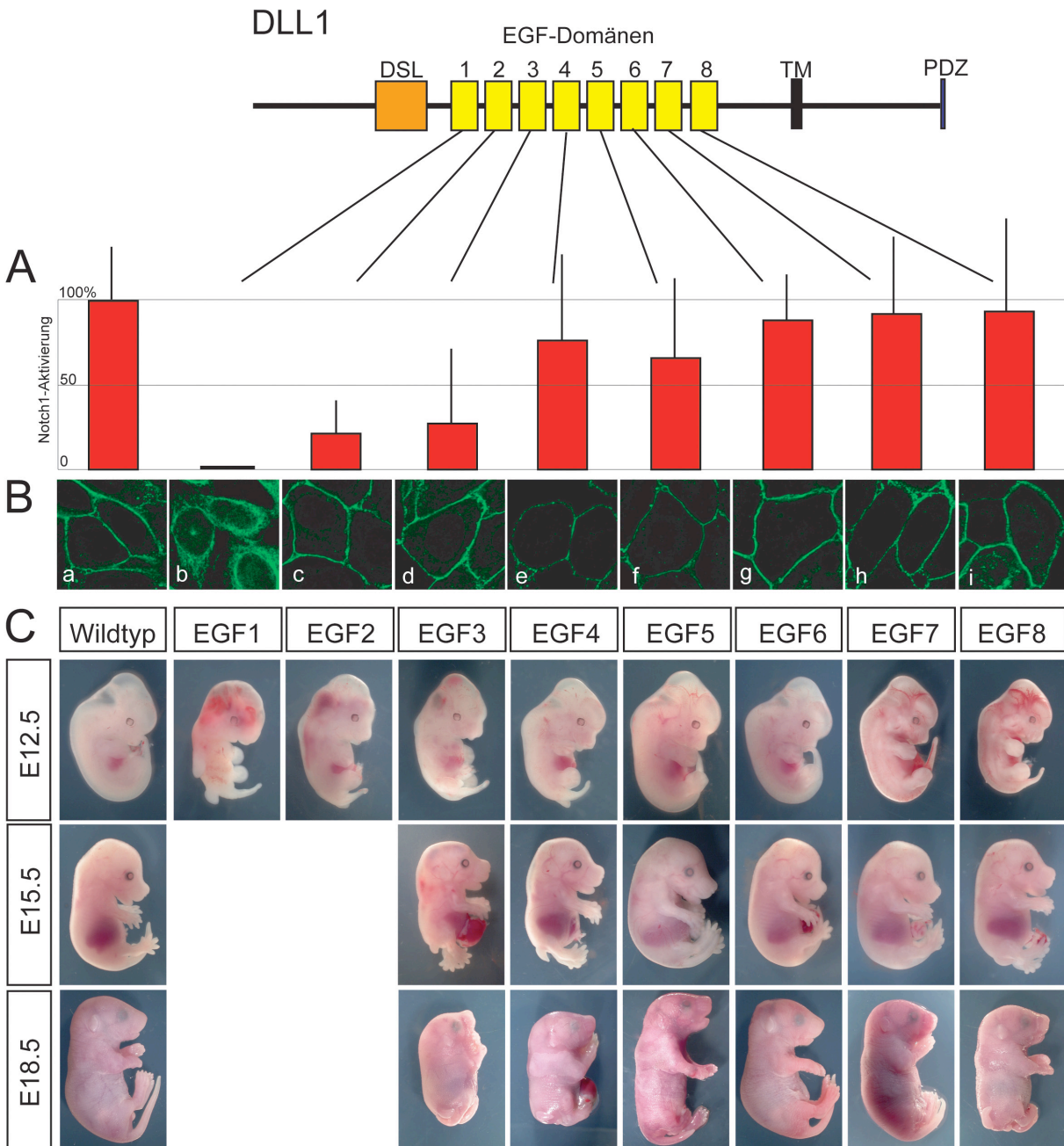


Abb. 5.1: Vergleich der *in vitro* und *in vivo* Effekte der Mutationen in den EGF-ähnlichen Motiven 1-8 der extrazellulären Domäne von DLL1, in denen jeweils zwei Cysteinreste ausgetauscht wurden. A. Analyse der NOTCH1-Aktivierungen von DLL1 und den DLL1 EGF-Proteinvarianten (siehe auch 4.1.3, Abb. 4.4). B. Analyse der subzellulären Lokalisierung von DLL1 und den DLL1 EGF-Proteinvarianten in CHO-Zellen (siehe auch 4.1.1, Abb. 4.2). C. *In vivo* Analyse der Mutationen in Mausembryonen aus drei unterschiedlichen Entwicklungsstadien (E12.5, E15.5 und E18.5) zeigen unterschiedlich stark ausgeprägte Phänotypen (Karin Schuster-Gossler, unpublizierte Daten). Die *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse korrelieren für die Mutation im ersten EGF-Motiv (EGF1). DLL1 EGF1 wurde *in*

in vitro überwiegend intrazellulär exprimiert (B b) und aktivierte aufgrund der fehlenden Oberflächenpräsentation NOTCH1 (N1) nicht. *In vivo* zeigen E12.5 Embryonen mit dieser Mutation schwere Defekte und sind früh embryonal letal (A b, B b, C, zweite Spalte). Für DLL1 EGF2 dagegen wird nur noch eine annähernde Korrelation nachgewiesen. Das auf der Zelloberfläche exprimierte Protein DLL1 EGF2 ist nur schwach in der Lage, N1 zu aktivieren. *In vivo* sind die Defekte und die frühe Letalität vergleichbar zu DLL1 EGF1 (A; B, C dritte Spalte jeweils). Für DLL1 EGF3 wurde eine Zelloberflächenexpression und im Vergleich zu DLL1 EGF1 und DLL1 EGF2 eine unwesentlich stärkere N1-Aktivierung gezeigt, während die Embryonen mit schweren Defekten perinatal letal sind (A; B; C vierte Spalte). Mäuse mit einer Mutation in der EGF-Domäne 6 zeigen keinen Phänotyp und können mit dem Wildtyp verglichen werden. Zwischen den *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen für die Mutationen in EGF4, 5, 7 und 8 sind keine klaren Korrelationen zu erkennen: Sehr ähnlichen N1-Aktivierungen von 70-90% *in vitro* stehen mutante Mausembryonen mit unterschiedlich schweren Phänotypen *in vivo* gegenüber.

Eine Ursache für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen könnte in der deutlich höheren Empfindlichkeit unter physiologischen Bedingungen liegen, die auch eine Unterscheidung von geringen Abweichungen zwischen den einzelnen Mutationen von DLL1 ermöglicht, während *in vitro* die hohen Proteinmengen aufgrund der Überexpression für leichte Funktionsverluste kompensieren könnten und somit geringe Unterschiede zwischen mutanten Proteinvarianten und deren Aktivität nicht erkennen lassen. Um die Bedeutung dieses möglichen Effekts zu untersuchen, könnten die Proteinvarianten *in vivo* für einen Vergleich überexprimiert werden.

Während die *in vitro* Ergebnisse den Eindruck vermitteln, dass die Aktivität von DLL1 nur durch Mutationen in den EGF-Motiven 1-3 beeinträchtigt wird, zeigen die *in vivo* Mutanten, dass die DLL1-Aktivität durch Mutationen in fast allen EGF-Motiven betroffen ist, was auf einen möglichen gemeinsamen Einfluß von fast allen EGF-Domänen auf die Interaktion mit dem Rezeptor hinweist, der neben einer direkten Beteiligung an der Bindung diese zusätzlich unterstützen könnte. Das Zusammenwirken von fast allen EGF-Motiven auf diese Interaktion würde ein Strukturmodell für die extrazelluläre Domäne von DLL1 favorisieren, in dem die einzelnen EGF-Motive Möglichkeiten haben, untereinander Wechselwirkungen einzugehen, so dass Variationen des stabförmigen Strukturmodells für die extrazelluläre Domäne, welches die *in vitro* Effekte allein erklären könnte, wahrscheinlicher wird. Die Möglichkeit von redundanten Effekten der einzelnen EGF-Motive könnte zusätzlich die Entstehung der unterschiedlichen Phänotypen und ihrer Ausprägungen erklären, da für jede einzelne Mutation eines EGF-Motives ein spezifisches Zusammenspiel von Einflüssen der übrigen EGF-Motive entstehen würde.

Da DLL1 in den EGF-Motiven 4 und 7 zwei Calciumbindungsstellen aufweist, ist auch ein Einfluß der Calciumbindung von den EGF-Domänen auf die Proteininteraktionen und Proteinstruktur denkbar und bereits für andere EGF-Proteine beschrieben (Hambleton et al., 2004; Saha et al., 2001). Calciumbindende EGF-Domänen sind physiologisch von Bedeutung. So wird beispielsweise das Marfan-Syndrom durch einen Cystein-Austausch in einer calciumbindenden EGF-Domäne des Bindegewebe Proteins Fibrillin verursacht (Suk et al., 2004; Downing et al., 1996; Wouters et al., 2006). Eine Calciumbindung kann Verbindungen zwischen Proteindomänen innerhalb eines Proteins stabilisieren und Tandemwiederholungen von calciumbindenden EGF-Motiven (cbEGF) verstärken. Im Notch-Rezeptor ist eine Calciumbindung für die an der Ligandenbindung beteiligten EGF-Motive 11 und 12 essentiell (Fehon et al., 1990). Außerdem wurde mit Hilfe von Bindungsstudien in *Drosophila* für die Interaktion der ECD von NOTCH1 mit den Liganden Delta und Serrate ein Strukturmodell beschrieben, das auch Hinweise für die ECD-Struktur von DLL1 liefern könnte. In diesem Modell sind innerhalb der EGF-Domänen 6-26 von NOTCH1 die calciumbindenden EGF-Motive starr miteinander verbunden und bilden unbiegsame Strukturbereiche, während in anderen Proteinregionen calciumbindende und nicht-calciumbindende EGF-Motive gegeneinander gefaltet sind und eine bogenähnliche flexible Struktur ausbilden (Abb. 5.2 A). Das resultierende Modell zeigt die Möglichkeit von Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen EGF-Motiven und einem Zusammenwirken bei der Bindung eines Liganden (Xu et al., 2005). Da wie bereits erwähnt, DLL1 ebenfalls zwei Calciumbindungsstellen in den EGF-Motiven 4 und 7 besitzt, kann für den Liganden in Analogie ein hypothetisches Strukturmodell unter Annahme von Wechselwirkungen der calciumbindenden EGF-Domänen beschrieben werden (Abb. 5.2 B).

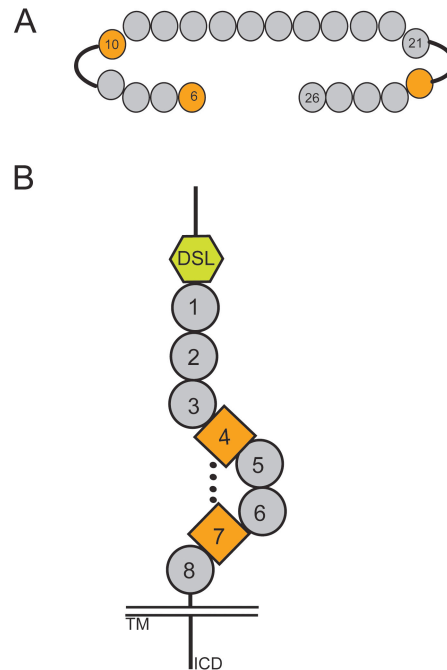


Abb. 5.2: Mögliche Strukturmodelle für die extrazelluläre Domäne von NOTCH1 (Xu et al., 2005) und daraus abgeleitet für DLL1. A Vorgeschlagene Proteinstruktur für die EGF-Motive 6-26 der ECD von NOTCH1, in der Wiederholungen von calciumbindenden EGF-Domänen starre Strukturabschnitte bilden (grau) und nicht-calciumbindende-Domänen (orange) sich gegeneinander falten, wodurch eine gebogene Struktur entsteht. Das Modell zeigt die Möglichkeit, dass die Bindung eines Liganden (in der leeren Bindungstasche) durch mehrere EGF-Motive beeinflusst würde (abgeändert aus Xu et al., 2005). B Hypothetisches Strukturmodell für die ECD von DLL1. Durch eine mögliche Wechselwirkung der beiden calciumbindenden EGF-Motive 4 und 7 könnte eine gebogene DLL1-Struktur entstehen, die Wechselwirkungen der EGF-Motive untereinander fördern würde. Außerdem könnte die Proteinestabilität verändert werden. Graue Kreise stehen für calciumbindende EGF-Motive, orangefarbene Kreise/Quadrate für nicht-calciumbindende EGF-Motive.

Die Proteinstruktur von DLL1 könnte durch die Bindung von Calcium so verändert werden, dass einige EGF-Motive zum Teil in eine engere Nachbarschaft gebracht würden, was Einflüsse zwischen den Domänen und bei Interaktionen mit dem Rezeptor begünstigen könnte. Die geringeren phänotypischen bzw. keine Auffälligkeiten für die Mutationen in den EGF-Motiven 5 und 6 könnten beispielsweise auf ihre Lage zwischen den beiden calciumbindenden Domänen zurückgeführt werden, die Wirkungen dieser EGF-Motive auf den Bindebereich verringern könnte. Daneben könnte eine Calciumbindung die Proteinestabilität von DLL1 erhöhen. Die Bindung betreffende Mutationen könnten so eine Destabilisierung bewirken. Denkbar sind auch von einer Calciumbindung abhängige Einflüsse auf die Halbwertszeit von DLL1 an der Membran sowie auf den membranären Vesikeltransport (Trafficking).

Die Verminderungen der DLL1-Aktivitäten *in vivo* und teilweise *in vitro* aufgrund der eingeführten Mutationen zeigen, dass die Integrität der EGF-Domänen eine entscheidende Rolle für die Funktion von DLL1 spielt. Normalerweise wird die Proteinstruktur mit Hilfe der drei Disulfidbrücken stabilisiert (Abb. 5.3), die drei Schleifen für die Verankerung der beiden β -Faltblätter der EGF-Domäne bilden (Montelione et al., 1992; Carray et al., 1995; Barnham et al., 1998). Durch den Austausch der konservierten Cysteine 4 und 5 und dem damit verursachten Verlust der zwei Disulfidbrücken, sowie der Strukturschleifen scheint die Proteinstruktur durch die Mutationen stark beeinträchtigt worden zu sein, entweder die Proteininstabilität selbst oder durch Effekte während der Proteinsynthese oder -faltung. Die beobachteten Ergebnisse legen nahe, dass die von den konservierten Disulfidbrücken abhängige Proteinstruktur oder -stabilität für die DLL1-Aktivität essentiell ist. Um den Beitrag der konservierten Disulfidbindungen für die Funktionalität von DLL1 eindeutig zu bestimmen, müsste zukünftig noch untersucht werden, auf welche Weise die strukturellen Änderungen diese modulieren.

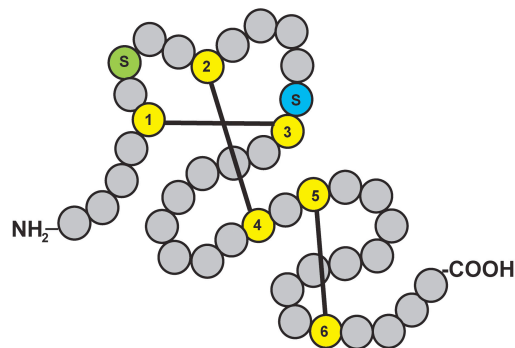


Abb. 5.3: Die Anordnung der drei konservierten Disulfidbrücken innerhalb einer EGF-Domäne (adaptiert aus Haltiwanger, 2003). Schematische Darstellung einer EGF-Domäne mit den 6 konservierten Cysteinen (gelb) und deren Beteiligung an den drei Disulfidbrücken. Durch Austausch der Cysteinreste 4 und 5 gegen Glycin wird die Ausbildung von 2 Disulfidbrücken in den mutanten Proteinen verhindert. Zwischen dem ersten und zweiten, sowie zweiten und dritten Cysteinrest befinden sich die Konsensussequenzen für die O-Glykosylierung und O-Fucosylierung von DLL1 mit Serin (S) als Akzeptoraminosäure.

Um zukünftig die Diskrepanz zwischen den *in vivo* DLL1-Aktivitäten der Embryonen und den als Maß für die Ligandenaktivitäten gemessenen NOTCH1-Aktivierungen aufzuklären, müssen die Affinitäten und Bindungsstärken der DLL1-Proteinvarianten zum Notch1-Rezeptor ermittelt werden. Mit Hilfe einer exakteren und sensitiveren *in vitro* Analyse der Interaktionen zwischen

den mutanten DLL1-Liganden und NOTCH1 sollte es gelingen, den Anteil des auf der Zelloberfläche präsentierten Liganden zu bestimmen, der an NOTCH1 binden kann, an der NOTCH1-Aktivierung beteiligt ist, sowie eine Messung der Bindungsstärke zu ermöglichen, um insgesamt die Zusammenhänge zwischen einer Zelloberflächenexpression eines Liganden und der Interaktion mit NOTCH1 präziser analysieren und vergleichen zu können.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die EGF-Domänen 1-3 der extrazellulären Domäne von DLL1 *in vitro* eine entscheidende Bedeutung für die Funktionalität von DLL1 haben, da durch Mutation dieser Motive ein Verlust bzw. eine starke Verringerung der NOTCH1-Aktivierung gezeigt wurde, die möglicherweise auf Veränderungen in der Proteinstruktur oder-stabilität zurückzuführen ist.

Auf welche Weise und mit welchem Beitrag die einzelnen EGF-Motive von DLL1 an der Bindung und Interaktion von DLL1 und NOTCH1 teilnehmen, kann nur mit Hilfe der Aufklärung der Proteinstruktur für die extrazelluläre Domäne von DLL1 beantwortet werden, für die bereits Bemühungen angestrengt werden.

5.2 Die Rolle der O-Fucosylierung für DLL1

Die Notch-Liganden JAGGED1 aus dem Menschen und DLL1 aus der Ratte sind als Substrate für eine O-Fucosylierung *in vivo* nachgewiesen worden, als diese Modifizierung bereits als essentiell für die Aktivität des Rezeptors und den Notch-Signalweg beschrieben war (Panin et al., 2002). Die Notch-Liganden bilden somit eine neue Gruppe von Proteinen, für die zusammen mit nur noch sechs weiteren, eine O-Fucosylierung innerhalb ihrer EGF-ähnlichen Wiederholungen nachgewiesen sind: Die Plasminogen-Aktivatoren, die Blutgerinnungs-Faktoren (VII, IX, XII), Crypto (human und murin) als Ligand des Nodal-Signalwegs, ein Protease-Inhibitor aus der Heuschrecke (PMP-C) und Thrombospondin (Schiffer et al., 2001; Yan et al., 2002; Panin et al., 2002, Harris et al., 1993, Kentzer et al., 1990). Die schweren Defekte in Mäusen aufgrund der Inaktivierung der an der Synthese von O-Fucose-Glykanen beteiligten Aktivitäten verdeutlichen deren außerordentliche Bedeutung für den Notch-Signalweg. Obwohl in zahlreichen Studien die O-Fucosylierung des murinen Notch1-Rezeptors analysiert wird, ist deren Rolle für den murinen Liganden DLL1 bislang ungeklärt.

5.2.1 Einige Konsensussequenzen für die O-Fucosylierung von DLL1 sind *in vitro* Substrate für diese Modifikation

Für die Untersuchung der Bedeutung der O-Fucosylierung für DLL1 *in vitro* sind Proteinvarianten generiert worden, in denen die fünf spezifischen Konsensussequenzen in den EGF-Motiven der extrazellulären Domäne von DLL1 einzeln und/oder in Kombination mutiert wurden. Um die Auswirkungen des partiellen oder vollständigen Verlusts der O-Fucosylierung für die biologische Aktivität im Notch-Signalweg zu analysieren und die dafür essentielle(n) Konsensussequenz(en) zu bestimmen, sind diese Proteinvarianten auf Veränderungen in ihrer subzellulären Lokalisierung, der NOTCH1-Aktivierung und ihrer Rolle als *in vitro* Substrate für den Einbau von ³H-Fucose im Vergleich zum DLL1wt Protein untersucht worden.

In der hier vorgelegten Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass durch den vollständigen Verlust der O-Fucosylierung *in vitro* durch Mutagenese aller fünf Konsensusstellen von DLL1 (DLL1 mEGF2.3.4.7.8), der begrenzten Fucosylierungssequenz in EGF-Motiv 7 (DLL1 mEGF7), sowie durch doppelte Mutation in den Konsensussequenzen der EGF-Motive 4 und 7 (DLL1 mEGF4.7) die resultierenden Proteine nicht mehr in der Lage waren, die Zelloberfläche

zu erreichen und intrazellulär exprimiert wurden. Die Proteinvarianten zeigten außerdem aufgrund der fehlenden Zelloberflächenpräsentation eine starke Verminderung der NOTCH1-Aktivierung, sowie einen Verlust des Einbaus von ^3H -Fucose nach metabolischer Markierung (siehe Tabelle 15). Da die beobachteten vom DLL1wt Protein stark abweichenden Effekte stets in Verbindung mit den Mutationen in den beiden Konsensussequenzen der EGF-Motive 4 und 7 auftraten, scheinen diese beiden Sequenzen eine besondere Bedeutung als Substratstellen für die O-Fucosylierung von DLL1 zu haben. Durch den Verlust des Einbaus von ^3H -Fucose in DLL1 mEGF2.3.4.7.8 wurde außerdem eine O-Fucosylierung an anderen als den mutierten fünf Konsensusstellen in DLL1 ausgeschlossen. Die perinukleäre Konzentrierung bzw. teilweise Koexpression der mutierten Proteine DLL1 mEGF4.7 und DLL1 mEGF2.3.4.7.8 mit dem ER-Protein Calreticulin lassen auf eine mögliche Retention der Proteine im ER schließen, wobei noch ungeklärt ist, ob diese Lokalisation aufgrund von Problemen in der Proteinfaltung oder -struktur infolge fehlender O-Fucosylierung oder der Einführung der Punktmutationen entsteht. Die intrazelluläre Akkumulation der mutanten Liganden in den CHO-Zellen könnte durch das Fehlen der O-Fucosylierung verursacht werden. Für den Notch-Rezeptor wurde bereits *in Drosophila* eine intrazelluläre Akkumulation im ER in Abwesenheit einer O-Fucosylierung aufgrund der Inaktivierung von Ofut1 beschrieben. Neben seiner Rolle als Glycosyltransferase wurde Ofut1 als Chaperon für NOTCH1 identifiziert, wobei letztere Funktion unabhängig von der Glycosyltransferaseaktivität ist, da mit Hilfe einer mutanten murinen POFUT1 Proteinvariante, der diese Aktivität fehlt (POFUT1 R245A) die Zelloberflächenexpression und Ligandenbindung von NOTCH1 ohne Fucosylierung in dieser Situation wieder hergestellt wird (Okajima et al., 2005 und 2007; Abb. 1.5 Modell 1). Eine vergleichbare Wirkung von POFUT1 auf die Notch-Liganden ist bisher nicht untersucht worden.

Für eine Lokalisierung der Proteinvarianten im ER spricht neben der teilweisen Kolokalisierung mit Calreticulin die fehlende Kolokalisierung mit dem Golgi-Protein GM130. Da die O-Fucosylierung als erster Schritt der Synthese von O-Fucose-Glykanen im ER stattfindet, könnte der Verlust des Einbaus von ^3H -Fucose als Hinweis auf diesen Ort dienen. Die Proteinvariante DLL1 mEGF3.7 zeigte eine überwiegend intrazelluläre Expression und teilweise Kolokalisierung mit GM130, aber im Vergleich zum DLL1wt Protein noch 60%ige NOTCH1-Aktivierung sowie die Aufnahme von ^3H -Fucose. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die potentielle Fucosylierung an den Konsensussequenzen der EGF-Motive 2, 4 und 8 für eine NOTCH-

Bindung ausreicht, aber ein effektiver Transport an die Zelloberfläche eingeschränkt ist. Die weiteren DLL1 Proteinvarianten mit meist kombinierten Mutationen von zwei Konsensussequenzen in den EGF-Motiven (DLL1 mEGF2.3, DLL1 mEGF2.4, DLL1 mEGF2.7, DLL1 mEGF2.8, DLL1 mEGF3, DLL1 mEGF3.4, DLL1 mEGF3.8 und DLL1 mEGF2.3.4) zeigen ein vielfältiges Spektrum in ihren Ergebnissen, weisen aber als Gemeinsamkeit eine Zelloberflächenexpression auf, aktivieren in unterschiedlichem Ausmaß den Notch-Signalweg und sind in der Lage, als Akzeptoren *in vitro* ³H-Fucose aufzunehmen (Tabelle 15). Obwohl diesen Proteinvarianten eine NOTCH1-Aktivierung gemeinsam ist, zeigen sie sehr unterschiedliche Werte, die von einer 50%igen (DLL1 mEGF3.4) bis über 100%ige Aktivierung variieren. Die über der Aktivität des DLL1wt Proteins liegenden NOTCH1-Aktivierungen könnten dabei durch Unterschiede in der Klonalität der stabilen Zelllinien zu erklären sein, welche die verschiedenen DLL1 Proteinvarianten exprimieren. Trotz Subklonierung der Zelllinien können diese Unterschiede in der Klonalität aufweisen. Fehlende oder verringerte Zelloberflächenpräsentationen der Ligandenvarianten als Ursache für die im Vergleich zum DLL1wt Protein verringerten NOTCH1-Aktivierungen sind aufgrund der Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen und der Oberflächenbiotinylierung unwahrscheinlich. Eine Abnahme der Aktivierungen könnte aber durch Veränderungen der Affinitäten oder Bindungsstärken der an der Oberfläche exprimierten DLL1-Liganden zum Rezeptor entstehen und gleichzeitig Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der O-Fucosylierung bestimmter EGF-Motive und den Auswirkungen auf die Liganden-Rezeptor-Interaktion liefern, was mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Transaktivierungsassay nicht bestimmt wurde. Um die NOTCH1-Aktivierungen der Proteinvarianten quantitativ vergleichen zu können, müßten die Aktivierungen in zukünftigen Experimenten zusätzlich auf die Zelloberflächenpräsentation der Proteine normalisiert werden.

Mit Hilfe der Kombination der verschiedenen mutierten Konsensussequenzen von DLL1 und dem Vergleich der Effekte auf die resultierenden Proteinvarianten sollten die für die Funktionen des Liganden relevanten Fucosylierungsstellen ermittelt werden. Für die mutanten Proteinvarianten wurde ein sehr großes Spektrum von Effekten beobachtet, die aber zum Teil durch die Kombinatorik der Mutationen gegensätzliche Bedeutungen einzelner Fucosylierungsstellen zeigten, so dass keine eindeutige Identifizierung von für die Ligandenfunktion signifikanten Konsensussequenzen möglich war. Eine besondere Rolle für die

O-Fucosylierung von DLL1 wurde aber für die beiden Konsensussequenzen in den EGF-Motiven 4 und 7 beobachtet. Sowohl deren gemeinsame Inaktivierung wie auch die Ausschaltung der einzelnen begrenzten Konsensussequenz in der EGF-Domäne 7 führten zum Verlust der Fucosylierung *in vitro*. Daneben waren diese Sequenzen noch in den ebenfalls nicht fucosylierten Proteinvarianten DLL1 mEGF4.8 und DLL1 mEGF2.3.4.7.8 vertreten. Während die Wirkung der Mutationen in den beiden Konsensussequenzen einzeln durch zusätzliche Inaktivierungen der Fucosylierungsstellen in EGF2 und 3 oftmals aufgehoben wurden bzw. für DLL1 mEGF3.7 nur eine veränderte subzelluläre Lokalisierung zeigte, konnte für die Proteinmutante DLL1 mEGF2.3.4.7.8 keine Veränderung im Vergleich zu der Proteinvariante DLL1 mEGF4.7 detektiert werden. Neben der besonderen Rolle für die Fucosylierung scheint die Mutation der Fucosylierungsstelle in der EGF-Domäne 7, die als einzige eine begrenzte Konsensussequenz ist, zusätzlich für die subzelluläre Lokalisierung relevant zu sein. Die Mutation in EGF7 war in allen in dieser Arbeit untersuchten intrazellulär exprimierten Proteinen vorzufinden und wies nur in Kombination mit der Mutation in EGF-Motiv 2 (DLL1 mEGF2.7) eine normalisierte Lokalisierung auf, was auf eine besondere Beziehung der Fucosylierungssequenzen der beiden EGF-Motive 2 und 7 hinweist. Zusammenfassend werden die beiden Konsensussequenzen in den EGF-Motiven 4 und 7 als besonders wichtige Substratstellen identifiziert.

Die unterschiedlichen Ergebnisse, die sich durch die Kombinatorik der Mutationen in den 5 Konsensussequenzen von DLL1 ergeben, zeigen, dass keine Fucosylierungsstellen für die O-Fucosylierung und damit für die Funktion von DLL1 alleine unabdingbar sind. Vielmehr ist anzunehmen, dass für die beobachteten Effekte für die DLL1 Proteinvarianten Einflüsse aus mehreren verschiedenen EGF-Motiven zusammenwirken können. Der zu diesen Ergebnissen führende Mechanismus ist noch ungeklärt, vermutlich spielen aber strukturelle Effekte der EGF-Domänen zueinander eine Rolle, z. B. durch Interaktionen oder Faltung zwischen den EGF-Motiven.

Die in diesen Analysen beobachteten Veränderungen der Proteineigenschaften der mutanten DLL1-Proteine können auf verschiedene Effekte zurückgehen: Einmal können diese durch Veränderungen der O-Fucosylierung zustande kommen, die sich direkt auf die zelluläre Lokalisierung und die NOTCH1-Aktivierung auswirken könnten und als solche in dieser Arbeit gemessen wurden. Daneben besteht aber auch die Möglichkeit, dass einige Eigenschaften

fucosylierungsunabhängig auf die Einführung der Punktmutationen zurückzuführen sind. Beide Effekte können die Proteinstruktur, die Proteinfaltung während der Synthese und den intrazellulären Membrantransport (Trafficking) beeinflussen, wobei nicht unterschieden werden kann, ob ein Effekt die Ergebnisse ausmacht oder von dem zweiten begleitet wird. Aufgrund dieser Einschränkung für die Auswertung der *in vitro* Experimente, in denen die Proteine außerdem noch überexprimiert werden, wären ergänzend *in vivo* Studien mit Knockout Mäusen, die diese Mutationen der Konsensussequenzen tragen, sinnvoll, allerdings aufgrund der hohen Anzahl von möglichen Kombinationen der Mutationen nur mit einem sehr hohen technischen Aufwand möglich.

Bedeutung der O-Fucosylierung für die Notch-Liganden

Hinweise auf eine Signifikanz oder Erforderlichkeit der O-Fucosylierung für die Funktion der Notch-Liganden liefert die Identifizierung von zahlreichen O-Fucose-Konsensussequenzen in allen Notch-Liganden, und ihre Konservierung in der Evolution (Panin et al., 2002). Außerdem lassen Mutationen in den O-Fucosylierungssequenzen der Liganden und die daraus resultierenden Phänotypen mit zum Teil schweren Defekten auf einen entscheidenden Einfluß der O-Fucosylierung der Liganden für den Notch-Signalweg schließen. So wurde u.a. eine Mutation in der Fucosylierungssequenz in EGF3 von *Drosophila* DELTA, Dll1^{sup5} als hypomorphes Allel von Delta entdeckt, das als Suppressor der Notch *split* Mutation wirkt (Lieber et al., 1992). Als Ursache ist eine Reduktion oder ein Verlust der O-Fucosylierung ermittelt worden, der durch einen Austausch von Glycin durch Arginin der engeren Konsensussequenz (²CXXGGTC³) hervorgerufen wird. Daneben ist für das humane *Alagille Syndrom* eine zu Dll1^{sup5} ähnliche Mutation in der engeren Fucosylierungsstelle in der EGF-Domäne 5 von JAGGED1 als Ursache identifiziert worden (Heritage et al., 2000).

Wie kann die O-Fucosylierung dabei auf den Notch-Liganden wirken und den Notch-Signalweg beeinflussen? In Fibroblasten-Wachstumsfaktoren spielen Heparansulfat-Proteoglykane eine wichtige Rolle für die Rezeptor-Aktivierung, in dem sie eine Liganden-Dimerisierung vermitteln, die für die Rezeptor-Aktivierung wichtig ist (Plotnikov et al., 1999). Daneben zeigen andere Studien, dass eine Liganden-Multimerisierung zur NOTCH-Aktivierung beitragen könnte (Berezovska et al., 2000). Die O-Fucose-Glykane auf den Liganden könnten auch die Erkennung zwischen Rezeptor und Liganden verstärken und somit die Bildung der Bindung unterstützen. In

sehr einfachen Modellen werden dabei die Liganden selbst als Lektine beschrieben, deren Erkennung und Bindung des Notch-Rezeptors durch die O-Fucosylierung beeinflusst werden (Sacchettini et al., 2001). Da viele Lektine als Dimere und Multimere bekannt sind (Rini und Lobsanov, 1999), besteht auch die Möglichkeit, dass ein Lektin O-Fucose-Glykane auf den Liganden erkennt und durch eine Liganden-Multimerisierung zur NOTCH-Aktivierung beiträgt. Die Anwesenheit von O-Fucose-Glykanen sowohl auf den Notch-Rezeptoren als auch auf den Liganden eröffnen zudem die Möglichkeit einer Verstärkung der NOTCH-Aktivierung durch einen direkten Einfluß von O-Fucose-bindenden Lektinen als Kofaktoren auf die Rezeptor-Liganden-Bindung.

Besteht ein Zusammenhang zwischen den intrazellulär exprimierten DLL1 O-Fucose defizienten Ligandenvarianten und der cis-Inhibition?

Die mutante intrazellulär exprimierte DLL1-Proteinvariante DLL1 mEGF2.3.4.7.8, die nicht *in vitro* O-fucosyliert wurde, zeigte eine sehr schwache Transaktivierung von NOTCH1. Hingegen wurden bei der Detektion von aktiviertem NOTCH1 (NICD) in Western-Blot-Analysen im Verhältnis dazu hohe Proteinmengen nachgewiesen (vorläufige Daten, hier nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob trotz der fehlenden NOTCH1-Transaktivierung diese Proteinvariante durch Koexpression in derselben Zelle (in cis) auf den Rezeptor wirken kann, wurde in ersten Experimenten der Einfluß des Verlustes der O-Fucosylierung und der ER-Retention des mutanten Ligandenproteins auf die cis-Inhibition mit Hilfe eines unter 3.2.4.5 beschriebenen Luciferase-basierten Transaktivierungsassays untersucht. In Studien aus *Drosophila* und Vertebraten (Huhn) war für Interaktionen des Notch1-Rezeptors mit koexprimierten Liganden in derselben Zelle (cis) eine Verminderung der Notch-Signalaktivierung beschrieben worden (de Celis und Bray, 2000; Jacobsen et al., 1998; Sakamoto et al., 2002). In NOTCH1-exprimierende HeLa-Zellen wurde dazu das Konstrukt für die Proteinvariante DLL1 mEGF2.3.4.7.8 transfiziert und diese mit DLL1wt exprimierenden CHO-Zellen kokultiviert. Die vorläufigen Experimente mit der mutanten Proteinvariante zeigten im Gegensatz zur cis-Inhibition durch das DLL1wt Protein eine Verstärkung der Transaktivierung von NOTCH1 um 30% (Daten hier nicht gezeigt). Dieses Ergebnis der Analyse der NOTCH1-Aktivierung durch DLL1 mEGF2.3.4.7.8 in cis zeigt vorerst, dass der mutante DLL1-Ligand trotz seiner veränderten funktionellen Eigenschaften und dem

Verlust der NOTCH1-Aktivierung in *trans* noch in der Lage ist, die NOTCH1-Aktivierung in *cis* zu beeinflussen. Der genaue Mechanismus der *cis*-Inhibition ist noch ungeklärt.

Da statt der erwarteten Verringerung eine Erhöhung der NOTCH1-Aktivierung beobachtet wurde und erste Hinweise als Ort der *cis*-Inhibition die Zelloberfläche beschreiben, könnte der Mechanismus für die beobachteten Effekte von DLL1 mEGF2.3.4.7.8 als intrazellulär exprimierter Ligand möglicherweise von dem der *cis*-Inhibition abweichen, der bislang ebenfalls noch ungeklärt ist (Glittenberg et al., 2006). Aufgrund der intrazellulären Lokalisierung und der O-Fucose-Defizienz des mutanten Liganden sollte in zukünftigen Experimenten getestet werden, ob diese Verstärkung der NOTCH1-Aktivierung durch eine direkte intrazelluläre Interaktion mit dem Notch-Rezeptor entstehen könnte oder auf noch ungeklärte Weise indirekt an die Rezeptoren auf der Zelloberfläche weitergeleitet wird und deren Fähigkeiten, mit Liganden benachbarter Zellen zu interagieren beeinflussen könnte. Daneben wären auch die anderen Proteinvarianten auf die NOTCH1-Aktivierung bei einer *cis*-Koexpression zu untersuchen und zu prüfen, ob die beobachtete Verstärkung der NOTCH1-Aktivierung spezifisch für eine intrazelluläre Lokalisierung oder den Fucosylierungszustand des koexprimierten Liganden ist.

5.2.2. Eine Reduktion von POFUT1 in CHO-Zellen beeinträchtigt die Aktivierung von NOTCH1 durch DLL1 nicht

Die Rolle der O-Fucosylierung für DLL1 wurde *in vitro* zusätzlich in Abwesenheit von POFUT1 in CHO-Zellen untersucht. Die Bedeutung von POFUT1 für den Notch-Signalweg war zuvor durch die gezielte Inaktivierung von Pofut1 in Mäusen gezeigt worden, die zu einem Phänotyp führte, der mit einem vollständigen Verlust von Notch-Aktivität verbunden war (Shi und Stanley, 2003). Während bereits begonnen wurde, die Rolle von Pofut1/Ofut1 für den Notch-Rezeptor zu untersuchen, ist die Bedeutung für die Notch-Liganden noch immer ungeklärt.

Im Vergleich zur Inhibition der O-Fucosylierung durch Mutagenese der Akzeptorstellen im Substrat sollte in dieser Analyse das modifizierende Enzym Pofut1 spezifisch mit Hilfe von RNA-Interferenz ausgeschaltet werden, um durch Punktmutationen eingeführte Effekte auf die Ergebnisse auszuschließen. Nach Ausschaltung der Pofut1-Genexpression wurde die subzelluläre Lokalisierung, die NOTCH1-Aktivierung und *in vitro* Fucosylierung mittels metabolischer Markierung mit ³H-Fucose in stabil DLL1 exprimierenden CHO-Zellklonen analysiert, die zwei gegen Pofut1 gerichtete siRNA-Expressionskonstrukte exprimierten. Mit

Hilfe von Northern Blot Analysen konnte statt einer vollständigen Ausschaltung nur eine ca. 50%ige Reduktion der Pofut1 Genexpression in den Zellklonen nachgewiesen werden. DLL1 wurde in Gegenwart der reduzierten POFUT1-Proteinmenge weiterhin auf der Zelloberfläche exprimiert, zeigte eine lediglich schwach verringerte Aktivierung und eine Aufnahme von ³H-Fucose als Akzeptor in der metabolischen Markierung (Abb. 4.11 und 4.12). Die im Vergleich zum DLL1wt Protein überwiegend unveränderten Proteineigenschaften ließen auf eine unzureichende Reduzierung der Pofut1-Genexpression schließen. Das noch vorhandene POFUT1-Protein in diesen CHO-Zellen bzw. die verbleibende 50%ige Genexpression von Pofut1 schien für die Wirkungen von POFUT1 auf DLL1 ausreichend. Ähnliche Pofut1-Expressionsmengen in heterozygoten Pofut1-Mäusen sind ebenfalls ausreichend, so dass diese Mäuse im Gegensatz zu homozygoten Pofut1-Null-Mäusen, lebensfähig sind und keine Defekte aufweisen (Shi und Stanley, 2002). Als Ursachen für die unzureichende Reduzierung der Pofut1-Genexpression ist möglicherweise eine nicht ausreichende Spezifität der beiden siRNA-Sequenzen für das Pofut1-Zielgen in den CHO-Zellen zu nennen. Daneben könnte auch die Bildung der siRNA-Sequenzen aus den stabil exprimierten Targeting-Konstrukten reduziert oder deren Stabilität beeinträchtigt sein. Um eine effektivere Hemmung der Genexpression von Pofut1 zu erreichen könnten neue siRNA-Konstrukte zunächst mit Hilfe transienter Transfektionen in den stabil DLL1 exprimierenden CHO-Zellen getestet werden.

In einer während der Anfertigung dieser Arbeit veröffentlichten Studie, in der die Rolle von O-Fucose und POFUT1 für NOTCH1 und die Liganden-Rezeptor-Bindung in Säugerzellen untersucht wurde, wird eine vollständigen Ausschaltung der Pofut1-Genexpression in Lec1 CHO Zellen mittels RNA-Interferenz erreicht und eine 3-6fache Verringerung von JAGGED1 und DELTA-induzierten Aktivierungen des endogenen Notch1-Rezeptors beobachtet. Eine Reduzierung der Pofut1-Expression führt dabei zu einer 1,5 fachen Verminderung der Aktivierungen. Es wird außerdem ausgeschlossen, dass die Abnahme der Aktivierungen auf eine Verringerung der Zelloberflächenexpression des Rezeptors zurückzuführen ist (Stahl et al., 2008). In Pofut1-defizienten ES-Zellen wird der vollständige Verlust der Notch-Signalaktivität bei unveränderter stabiler Zelloberflächenexpression von NOTCH1 im Vergleich zu Pofut1^{+/+} ES-Zellen festgestellt (Stahl et al., 2008).

Die Ergebnisse der obigen siRNA-Analysen zeigen, dass POFUT1 in Säugerzellen dosisabhängig die NOTCH1-Aktivierung beeinflussen kann und korrelieren so mit der Beobachtung dieser

Arbeit, dass eine 50%ige Reduzierung der Pofut1-Genexpression nicht ausreicht, um Effekte durch eine fehlende Wirkung des Enzyms nachzuweisen. Aktuelle Studien zur Untersuchung der Funktion von POFUT1 in Vertebraten zeigen gegensätzliche Ergebnisse in Bezug auf die Frage, ob POFUT1 in Vertebraten neben seiner Funktion als Glycosyltransferase auch als Chaperon fungiert ähnlich zu OFUT1 aus *Drosophila*. In der ersten Studie wird eine Chaperon-Funktion für POFUT1 ausgeschlossen, da NOTCH1 in Pofut1-defizienten ES-Zellen an der Zelloberfläche detektiert wird, allerdings nicht in der Lage ist, Liganden zu binden, was als Funktionsverlust durch eine mögliche unkorrekte Proteinfaltung oder die Notwendigkeit von O-Fucose-Glykanen für die Konformation oder die Erkennung der Liganden interpretiert wird. Außerdem reicht die Überexpression eines unspezifischen ER-Glycoproteins aus, um die Synthese von funktionellem NOTCH1 wiederherzustellen (Stahl et al., 2008). In einer zweiten Studie wird für NOTCH1 *in vivo* eine intrazelluläre Akkumulation nachgewiesen, während der Rezeptor in Anwesenheit von POFUT1 auf der Oberfläche detektiert wird (Okamura et al., 2008).

5.2.3 Die Mutation der Konsensussequenz für die N-Glykosylierung von DLL1 zeigt keinen wesentlichen Einfluß auf die Aktivität von DLL1

Um *in vitro* einen möglichen Einfluß einer N-Glykosylierung auf DLL1 zu untersuchen, wurde eine DLL1-Proteinvariante generiert, in der die einzige für DLL1 beschriebene N-Glykosylierungs-Konsensussequenz in der EGF-Domäne 7 durch Mutagenese ausgeschaltet wurde. Das Protein DLL1 mutN-Glycosite wurde auf der Zelloberfläche exprimiert und wies eine um ca. 20% verringerte NOTCH1-Aktivierung im Vergleich zum DLL1wt-Protein auf.

Da eine mögliche N-Glykosylierung von DLL1 bisher nicht nachgewiesen wurde, kann die beobachtete schwache Verringerung der NOTCH1-Aktivierung nicht eindeutig auf den Verlust der N-Glykosylierung zurückgeführt werden. Vielmehr muß zunächst die mögliche N-Glykosylierung für DLL1 *in vitro* bestätigt werden. Der beobachtete Effekt der Verringerung der NOTCH1-Aktivierung kann daher, wie bereits für die DLL1 Proteinvarianten mit mutierten O-Fucosylierungsstellen diskutiert, auch durch die Einführung der Punktmutation induziert worden sein. Um zu überprüfen, ob die für DLL1 beschriebene Konsensussequenz für die N-Glykosylierung *in vitro* als Akzeptorstelle fungiert, sind weitere Experimente nötig. Es kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass die N-Glykosylierung *in vivo* einen Effekt für DLL1 und seine Eigenschaften zeigt. Bislang ist allerdings keine physiologische Bedeutung der N-

Glykosylierung für die Notch-Signalaktivierung entdeckt worden. Mäuse mit Null-Mutationen in den Glykosyltransferase-Genen für die Synthese von komplexen N-Glykanen zeigen keine Defekte, die bei Inaktivierung des Notch-Signalwegs oder seiner Komponenten beobachtet werden (Haltiwanger und Lowe, 2004).

Aufgrund der Lage der N-Glykosylierungskonsensussequenz im EGF-Motiv 7 von DLL1 in unmittelbarer Nachbarschaft zu der begrenzten Konsensussequenz für die O-Fucosylierung sollte der Einfluß dieser möglichen N-Glykosylierung auf die O-Fucosylierung des Liganden mit Hilfe einer *in vitro* Fucosylierung untersucht werden. Trotz der engen Nachbarschaft der Konsensussequenzen ließen die Ergebnisse *in vitro* keinen Einfluß auf die O-Fucosylierung des Liganden erkennen. Da DLL1 als Akzeptor für die N-Glykosylierung nicht eindeutig ausgeschlossen werden kann, sind die Beobachtungen für einen fehlenden Einfluß auf die Fucosylierung als vorläufig anzusehen bis detaillierte Analysen die Existenz von N-Glykanen auf DLL1 ausschließen oder bestätigen.

5.2.4 DLL1 zeigt *in vivo* bei Inaktivierung von POFUT1 eine abweichende subzelluläre Lokalisierung

Aufgrund der Beteiligung von POFUT1 an der Bildung von NICD vorgeschalteten Prozessen kann das Enzym mittels der O-Fucosylierung auf verschiedene Weisen auf DLL1 und NOTCH1 einwirken: Auf die subzelluläre Lokalisierung des Liganden und Rezeptors, deren Bindung, anschließende Prozessierung und intrazellulären Transport (Trafficking). Mit Hilfe der Analyse der subzellulären Lokalisierung von DLL1 und NOTCH1 *in vivo* in Zellen des präsomitischen Mesoderms (PSM) von E9.5 Pofut1^{+/+} und Pofut1^{-/-} Embryonen wurden ergänzend zu den Ergebnissen der *in vitro* Studien Hinweise auf die Rolle der O-Fucosylierung durch POFUT1 für die beiden Interaktionspartner unter physiologischen Bedingungen gewonnen.

Die Ganzpräparat-Immunfluoreszenzfärbungen auf Pofut1^{+/+} PSM-Zellen zeigten für DLL1 eine überwiegend uniforme Expression auf der Plasmamembran der Zellen, die durch Kolokalisierung mit dem Zelloberflächenmarker Pan-Cadherin bestätigt wurde und damit dem erwarteten Expressionsmuster eines transmembranären Liganden entsprach, der auf der Zelloberfläche mit dem Rezeptor interagiert. In einigen Zellen wurde zusätzlich eine geringe cytoplasmatische, zum Teil nur punktuell nachweisbare, Expression in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran beobachtet, die partiell mit dem Golgi-Protein GM130 kolokalisierte (Abb. 4.18, 4.20). Diese

Strukturen könnten den intrazellulären Transport von DLL1 in Vesikeln detektieren, mit dessen Hilfe DLL1 entweder exocytotisch während der Synthese vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran gelangt oder nach der Rezeptor-Bindung endocytotisch aufgenommen wird, was für die Aktivität von DLL1 essentiell ist (Nichols et al., 2007; Le Borgne et al., 2005).

In *Pofut1*^{-/-} PSM-Zellen wurde DLL1 sowohl auf der Zelloberfläche mit Pan-Cadherin koexprimiert, als auch intrazellulär in Form von punktierten, vesikulären Strukturen, die teilweise mit GM130 kolokalisierten, nachgewiesen (Abb. 4.19, 4.20). Im Gegensatz zu der schwachen zum Teil nur punktuell detektierten intrazellulären Expression von DLL1 in direkter Nähe zur Plasmamembran in Anwesenheit von POFUT1, bewirkt das Fehlen des Enzyms die Expression und Verteilung der vesikulären Strukturen auf das gesamte Cytosol (Abb. 4.19). Diese intrazelluläre Anreicherung von DLL1 kann somit auf die fehlende Wirkung von POFUT1 zurückgeführt werden. Wie bereits in anderen Studien für den Notch1-Rezeptor beschrieben, könnte der fehlende Einfluß von POFUT1 auf DLL1 während der Synthese und Proteinfaltung dazu führen, dass nicht fucosyliertes DLL1 teilweise in der Zelle akkumuliert, was auf eine essentielle Rolle von POFUT1 für DLL1 hinweisen würde (Okajima et al., 2005 und 2007). Da DLL1 auf der Zelloberfläche der *Pofut1*^{-/-} PSM-Zellen aber noch in Koexpression mit Pan-Cadherin nachgewiesen wurde, erreicht ein Teil des neu synthetisierten DLL1-Proteins demnach noch die Zelloberfläche. Die Untersuchung dieses an der Oberfläche präsentierten DLL1 und seine Fähigkeit, den Notch-Rezeptor zu binden und aktivieren, könnte die Frage nach der Erforderlichkeit von POFUT1 für die Zelloberflächenexpression von aktivem DLL1 klären. Für NOTCH ist in *Drosophila in vitro* die Möglichkeit beschrieben worden, in Abwesenheit von OFUT1 zur Zelloberfläche transportiert zu werden. Der Rezeptor wird dort schnell mittels Transcytose in das Cytoplasma aufgenommen und in Vesikeln in der Nähe der Plasmamembran angereichert, die bislang nicht charakterisiert wurden (Sasaki et al., 2007; Sasamura et al., 2007). Die intrazelluläre Expression von DLL1 bei Fehlen von POFUT1 könnte aufgrund ihrer vesikulären Struktur neben einer Akkumulation von neu synthetisiertem DLL1 auch einen verstärkten intrazellulären Vesikeltransport von DLL1 nachweisen. DLL1 könnte demnach trotz der POFUT1-Defizienz mit Hilfe von Vesikeln zur Plasmamembran gelangen und anschließend durch Endocytose in Vesikeln aufgenommen werden, wodurch diese Prozesse vergleichbar zu den für NOTCH1 beobachteten wären (Sasamura et al., 2007). An dieser Stelle sollte in weiteren Studien mit Hilfe geeigneter Markerproteine, die in Vesikeln verschiedener Stadien des

Transports (frühe, mittlere, späte Endosomen z.B. mit Rab 5, 6 und 11) vorkommen, der Anteil von DLL1 an diesen Prozessen, mögliche Transportwege und -richtungen sowie die Dynamik bei Fehlen von POFUT1 untersucht werden.

Immunfluoreszenzfärbungen auf Cryoschnitten in einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigen für DLL1 *in vivo* in Pofut1^{+/+} PSM Zellen ebenfalls eine starke Zelloberflächenexpression und zusätzlich einzelne intrazelluläre vesikuläre Strukturen, die nahe der Zellmembran liegen und eine Kolokalisierung mit NOTCH1 aufweisen (Okamura und Saga, 2008). Für das Fehlen von POFUT1 wird in diesen Experimenten dagegen bei unveränderter Oberflächenexpression von DLL1 eine Abnahme der intrazellulären Vesikelstrukturen beschrieben und diese als Folge eines Mangels an NOTCH1-DLL1-Interaktionen an der Zelloberfläche vermutet, der aufgrund einer ER-Akkumulation von NOTCH1 entsteht (Okamura und Saga, 2008). Aufgrund der Verwendung von unterschiedlichen Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope von DLL1 (ECD und ICD), sowie Unterschiede in den für die Färbung verwendeten Präparaten (Embryonale Ganzpräparate versus Cryoschnitte) ist ein direkter Vergleich der beobachteten Ergebnisse für die Unterschiede in der intrazellulären Expression von DLL1 nicht möglich. Für eine Vergleichbarkeit und detailliertere Untersuchung der intrazellulären Expression müssten weitere Färbungen mit den verwendeten Antikörpern auf beiden Formen von Präparaten durchgeführt und vergleichend analysiert werden.

Um Hinweise auf die Bedeutung der O-Fucosylierung durch POFUT1 für die Liganden-Rezeptor-Interaktion und die anschließende Notch-Signalaktivierung zu erlangen, wurde zusätzlich die Lokalisierung von NOTCH1 untersucht. In Pofut1^{+/+} PSM-Zellen wurde NOTCH1 ebenfalls und ähnlich zu DLL1 sowohl auf der Plasmamembran als auch teilweise im Cytosol exprimiert (Abb. 4.21, 4.22), wobei im Vergleich zu DLL1 in einigen Zellen diese intrazelluläre Expression auf weitere Teile des Cytoplasmas und diffuser ausgebreitet erschien (Abb. 4.21). In Pofut1^{-/-} PSM-Zellen wurde NOTCH1 sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär exprimiert, wobei auch für den Rezeptor bei Fehlen von POFUT1 eine stärkere intrazelluläre Expression in Form von vesikulären Strukturen im gesamten Cytoplasma detektiert wurde, die auf eine Akkumulation des Proteins oder Anreicherung in Vesikeln hindeuten könnte. Die Färbungen für DLL1 und NOTCH1 zeigten somit übereinstimmend eine Zunahme der intrazellulären Expression für beide Interaktionspartner, was auf eine Notwendigkeit von

POFUT1 für beide Proteine und die daraus resultierende Interaktion im Notch-Signalweg schließen lässt. Doppelfärbungen gegen DLL1 und NOTCH1 zeigten in Pofut1^{+/+} PSM-Zellen eine Kolokalisierung auf der Zelloberfläche, die somit auf eine ungestörte Interaktion zwischen den beiden Proteinen für die Signalaktivierung hindeutete (Abb. 4.21). In Pofut1^{-/-} Zellen dagegen nahm die Kolokalisierung der beiden Interaktionspartner auf der Zelloberfläche stark ab, was auch auf eine Verringerung der NOTCH1-DLL1-Interaktionen schließen lässt. Folglich ist zu untersuchen, in welchem Maß die beiden Proteine auf der Plasmamembran von Pofut1^{-/-} PSM-Zellen in einer aktiven Form vorliegen, noch miteinander interagieren können und eine Interaktion zur Aktivierung des Notch-Signalwegs führt.

Zusammenfassend wurde aus den Analysen der *in vivo* Färbungen von DLL1 und NOTCH1 auf eine Beteiligung und Notwendigkeit der O-Fucosylierung durch POFUT1 für die beiden Proteine geschlossen, da bei Fehlen des Enzyms für beide Proteine eine veränderte subzelluläre Proteinverteilung detektiert wurde, welche die gemeinsame Interaktion sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär beeinflusst. Die biochemische Bedeutung der O-Fucosylierung durch Pofut1 für den Notch-Signalweg in der Maus ist dabei noch ungeklärt. Hinweise auf einen Einfluß der O-Fucosylierung für die Proteinfaltung des Liganden und Rezeptors während der Synthese geben dabei die intrazellulären Anreicherungen der Proteine bei Verlust des Enzyms, die auch in einer *in vivo* Studie in der Maus beobachtet wurde (Okamura und Saga, 2008). Da beide Proteine in Pofut1^{-/-} PSM-Zellen noch auf der Zelloberfläche detektiert werden, wird eine Funktion von POFUT1 als Chaperon für DLL1 und/oder NOTCH1 als weniger wahrscheinlich angesehen, wobei zunächst die Proteinaktivitäten an der Oberfläche überprüft werden müssten. Aufgrund der nachgewiesenen intrazellulären Expression, zum Teil in vesikulären Strukturen, ist auch ein Einfluß von POFUT1 auf intrazelluläre vesikuläre Transportvorgänge oder die Aufnahme der Proteine mittels Endocytose denkbar. Weitere Färbungen mit an Endocytosevorgängen teilnehmenden Proteinen wie dem AP2-Adaptorprotein, dem Transferrin-Rezeptor oder Clathrin könnten weitere Hinweise auf eine Beteiligung an Clathrin-abhängigen Endocytosewegen für die Inkorporation von DLL1 und NOTCH1 liefern, wobei die Teilnahme von Clathrin an den trans-aktivierenden und cis-inhibierenden Signalaktivierungsprozessen und Recyclingabläufen für den Notch-Rezeptor bereits bestätigt ist (Gupta-Rossi et al., 2004; Wilkin et al., 2004; Sakata et al., 2004). Kolokalisierungen von

NOTCH1 mit dem Protein Caveolin in Pofut1^{-/-} PSM-Zellen zeigen, dass auch eine Aufnahme des Rezeptors durch Clathrin-unabhängige Endocytose-Vorgänge möglich ist (Okamura und Saga, 2008).

DLL1 zeigt in immortalisierten Pofut1^{-/-}-Zellen eine überwiegend intrazelluläre Expression

Um zusätzliche Hinweise auf die Rolle der O-Fucosylierung von DLL1 durch POFUT1 zu erhalten, wurde die subzelluläre Lokalisierung von DLL1 ergänzend in immortalisierten embryonalen Mausfibroblasten untersucht, die aus E9.5 Pofut1 Embryonen generiert worden waren. Mit Hilfe dieser Zellen sollte zukünftig DLL1 in Abwesenheit von POFUT1 mit den *in vitro* Analysen untersucht werden, mit denen bereits die mutanten DLL1-Substrate (DLL1 mEGFs) untersucht wurden, mit dem wichtigen Unterschied, daß durch Punktmutationen mögliche Effekte ausgeschlossen und eine Ausschaltung von POFUT1 stabil gewährleistet wären. Erste Immunfluoreszenzfärbungen von Pofut1^{+/+} embryonalen Fibroblasten zeigten für DLL1 eine Expression auf der Zelloberfläche vergleichbar zu DLL1 in den Pofut1^{+/+} PSM Zellen (Abb. 4.23), so dass der Ligand theoretisch für eine Interaktion mit dem NOTCH1-Rezeptor an der Oberfläche zur Verfügung stünde. Das Fehlen von POFUT1 in den embryonalen Fibroblasten führte zu einer überwiegend intrazellulären Expression, die in einigen Zellen perinukleär konzentriert detektiert wurde und teilweise Kolokalisierungen mit GM130, Clathrin und Calreticulin im peripheren Cytoplasma aufwies (Abb. 4.24). Zusätzlich zu den Beobachtungen für DLL1 aus den Pofut1^{-/-} PSM-Zellen spricht für einen Einfluß von POFUT1 auf DLL1 bei Fehlen des Enzyms die Verringerung der Zelloberflächenlokalisierung, die cytosolische Expression in Form von vesikulären Strukturen, sowie die Kolokalisierungen mit Proteinen der Organellen, die an Synthese- und Endocytoseprozessen beteiligt sind.

Um die Rolle der O-Fucosylierung für DLL1 in diesen Zellen detaillierter zu untersuchen, sollten weitere Analysen anschließen, in denen mit Färbungen gegen NOTCH1 die Wirkungen von POFUT1 auf die Liganden-Rezeptor-Interaktion ermittelt würden. Außerdem könnte mit Hilfe der Transfektion einer Pofut1 cDNA bestimmt werden, in welchem Maß die Funktion von POFUT1 die Lokalisierung von DLL1 beeinflusst. Nach Inaktivierung der Glycosyltransferaseaktivität von POFUT1 könnte außerdem geprüft werden, ob die durch POFUT1 vermittelten Wirkungen von seiner enzymatischen Aktivität abhängen.

Als mögliche Ursache für den Unterschied zwischen den unterschiedlichen DLL1-Zelloberflächenexpressionen der Pofut1^{-/-} PSM-Zellen und den Pofut1^{-/-} embryonalen Fibroblasten wird die Überexpression von DLL1 in den Fibroblasten vermutet, die zur Synthese hoher Proteinmengen von DLL1 führt. Mögliche Wirkungen von POFUT1 auf DLL1 während der Synthese, die z.B. eine Akkumulation auslösen könnten, würden so durch die Überexpression verstärkt, so dass ein direkter Vergleich mit den Beobachtungen von DLL1 in den Pofut1^{-/-} Zellen nur eingeschränkt möglich ist, da der Ligand in den PSM-Zellen unter physiologischen Bedingungen exprimiert wird.

Der Vergleich der Auswirkungen der inhibierten O-Fucosylierung von DLL1 mit Hilfe verschiedener experimenteller Ansätze und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigt, dass DLL1 bei Inhibition der O-Fucosylierung verstärkt intrazellulär exprimiert wird, wobei dieses gemeinsame Ergebnis durch die unterschiedliche Sensitivität und andere Effekte der Modell-Systeme unterschiedliche Ausprägungen aufweist, die bei der Interpretation zu beachten sind. So scheint die beobachtete intrazelluläre Expression von DLL1 in den *in vitro* Analysen mit den mutierten DLL1-Substraten und DLL1 in Pofut1-defizienten Zellen stärker ausgeprägt, was auf die Überexpression der Proteine und für die mutierten Ligandensubstrate möglichen Einflüsse durch Punktmutationen zurückgeführt werden kann. Die starke intrazelluläre, zum Teil perinukleär konzentrierte Expression mit teilweiser Kolo-kalisierung im ER, würde deutlich auf eine Funktion von POFUT1 für die Synthese, Proteinfaltung und Oberflächenexpression hinweisen. DLL1 in Pofut1-defizienten PSM-Zellen dagegen wird *in vivo* sowohl auf der Zelloberfläche exprimiert, als auch intrazellulär im Cytosol in Form von vesikulären Strukturen nachgewiesen, was eine Bedeutung von POFUT1 für die Zelloberflächenexpression von DLL1 nicht unbedingt erforderlich machen würde, dafür aber Hinweise auf eine Funktion für den intrazellulären Transport liefert.

Potentielle Wirkungen von FRINGE auf die Liganden

Die Liganden JAGGED1 aus dem Menschen und DLL1 aus der Ratte sind nicht nur als Substrate für die O-Fucosylierung als ersten Schritt der O-Fucose-Glykansynthese beschrieben worden, vielmehr wurde für diese Liganden eine Verlängerung der O-Fucose-Strukturen mittels GlcNac durch FRINGE *in vitro* nachgewiesen (Panin et al., 2002). Da noch keine weiteren Daten für die O-Fucosylierung von Notch-Liganden aus Vertebraten vorliegen, wurde in dieser Arbeit vorwiegend versucht, die Bedeutung der O-Fucosylierung für DLL1 zu analysieren. Es konnte gezeigt werden, dass DLL1 *in vitro* O-fucosyliert wird, wodurch die Möglichkeit zur einer weiteren Modulation durch FRINGE gegeben ist.

Obwohl genetische Studien in *Drosophila* und Experimente mit Säugerzellen eine überwiegende Wirkung von FRINGE auf den Notch-Rezeptor als Schlüsselziel und zell-autonom in der Signalempfangenden Zelle beschrieben haben, besteht auch die Möglichkeit, dass FRINGE die NOTCH-Aktivität durch Modifikation der Liganden beeinflusst, da die Notch-Liganden sowohl als parakrine Agonisten und autokrine Antagonisten der Notch-Rezeptor-Aktivierung fungieren können. Die autokrine oder cis-Inhibierung der NOTCH-Aktivierung durch die Liganden ist dabei, wie bereits oben erwähnt, zell-autonom und der Mechanismus noch weitgehend ungeklärt. Experimente in Kulturen von Säugerzellen veranlassen zu der Vermutung, dass durch diese Inhibierung eine Aktivierung des Rezeptors durch Liganden auf benachbarten Zellen verhindert wird (Sakamoto et al., 2002). Eine Glykosylierung der Liganden durch FRINGE könnte so die Fähigkeit auf Liganden-exprimierende Nachbarzellen zu reagieren (trans) durch Beeinflussung der autonomen Inhibition (cis) verändert werden oder auf die Fähigkeit der Liganden wirken, Notch-Rezeptoren der Nachbarzellen zu aktivieren. Beispiele für eine nicht-autonome Wirkung von FRINGE liefern dabei die Beobachtungen aus *Drosophila*-Flügeln, in denen eine Signalweiterleitung durch SERRATE zu Nachbarzellen durch die Koexpression von FRINGE stimuliert wurde (Panin et al., 1997). Desweiteren scheint während der Flügelentwicklung in *Drosophila* die Expression von FRINGE die Wirkung von ektoptisch exprimiertem SERRATE oder DELTA auf Nachbarzellen zu verringern (Jacobsen et al., 1998). Außerdem beeinflusst LFNG im sich entwickelnden Thymus die Notch-Signalgebung in benachbarten Zellen (Koch et al., 2001). Wenn auch in diesen Beispielen der Einfluß von FRINGE auf die Liganden nur indirekt ist, so geben diese Hinweise auf Zusammenhänge zwischen FRINGE und den Liganden

im Signalweg. Da die Liganden als Substrate für FRINGE gezeigt wurden, ist eine biochemische Basis für eine weitere Aufklärung der Rolle der O-Fucosylierung gelegt.

Die Aufklärung der Funktion der O-Fucosylierung für NOTCH1 und DLL1 durch POFUT1 in der Maus bildet die Grundlage zu einem molekularen Verständnis, wie diese Modifikation des Rezeptors und der Liganden, deren Interaktion im Notch-Signalweg und damit dessen Aktivität reguliert wird. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die O-Fucosylierung des murinen Liganden DLL1 in der Maus eine entscheidende Bedeutung für seine zellulären Eigenschaften und die Funktion des Liganden darstellen. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führte eine Inhibition der O-Fucosylierung von DLL1 zu Veränderungen in der subzellulären Lokalisierung des Proteins, die *in vitro* zum Verlust der NOTCH1-Aktivierung führten. Ein weiteres Ziel der Aufklärung der O-Fucosylierung ist die Bestimmung der Funktion von POFUT1 für DLL1 und damit dessen Möglichkeit als Enzym, Chaperon oder beidem zu wirken, da weitere Kenntnisse über die O-Fucosylierung von DLL1 und NOTCH1 auch zu einem besseren Verständnis der Interaktion und Aktivierung im Notch-Signalweg beitragen.

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
μ	micro
A	Alanin
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cystein
cDNA	complementary DNA
CHO	Chinese Hamster Ovary
Ci	Curie
CMV	Cytomegalovirus
C-terminal	Carboxy-terminal
CTP	Cytosintriphosphat
dd H ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
ECD	Extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
ES Zellen	Embryonale Stammzellen
Fab	Antigen-bindendes Fragment
G	Glycin
h	Stunde
ICD	Intrazelluläre Domäne
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IRES	Internal ribosomal entry site
kb	Kilobasenpaar(e)
kD	Kilodalton
LB	Luria, Bertani
m	milli
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute
N	Asparagin
N-terminal	Amino-terminal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
POD	Peroxidase
PSM	Präsomitisches Mesoderm
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRNA	Small interfering RNA
T	Threonin
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units, Einheiten
ü.N.	über Nacht
w/o	without (ohne)
Wt	Wildtyp

Literatur

- Abate, C., Luk, D., Gentz, R., Rauscher III, F. J. and Curran, T.** (1990). Expression and purification of the leucine zipper and DNA-binding domains of Fos and Jun: both Fos and Jun contact DNA directly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1032-1036.
- Acar, M., Jafar-Nejad, H., Takeuchi, H., Rajan, A., Ibrani, D., Rana, N. A., Pan, H., Haltiwanger, R. S. and Bellen, H. J.** (2008). Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. *Cell* **132**, 247-58.
- Appel, B. and Eisen, J. S.** (1998). Regulation of neuronal specification in the zebrafish spinal cord by Delta function. *Development* **125**, 371-80.
- Appel, B., Marasco, P., McClung, L. E. and Latimer, A. J.** (2003). lunatic fringe regulates Delta-Notch induction of hypochord in zebrafish. *Dev Dyn* **228**, 281-6.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K. and Fortini, M. E.** (1995). Notch signaling. *Science* **268**, 225-232.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J.** (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-6.
- Ascano, J. M., Beverly, L. J. and Capobianco, A. J.** (2003). The C-terminal PDZ-ligand of JAGGED1 is essential for cellular transformation. *J Biol Chem* **278**, 8771-9.
- Aulehla, A. and Herrmann, B. G.** (2004). Segmentation in vertebrates: clock and gradient finally joined. *Genes Dev* **18**, 2060-7.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K.** (1994). Current Protocols In Molecular Biology, (ed.: John Wiley & Sons, Inc.
- Baron, M.** (2003). An overview of the Notch signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* **14**, 113-9.
- Baron, M., Aslam, H., Flaszka, M., Fostier, M., Higgs, J. E., Mazaleyrat, S. L. and Wilkin, M. B.** (2002). Multiple levels of Notch signal regulation (review). *Mol Membr Biol* **19**, 27-38.
- Beckers, J., Clark, A., Wunsch, K., Hrabe De Angelis, M. and Gossler, A.** (1999). Expression of the mouse Delta1 gene during organogenesis and fetal development. *Mech Dev* **84**, 165-8.
- Bellavia, D., Campese, A. F., Alesse, E., Vacca, A., Felli, M. P., Balestri, A., Stoppacciaro, A., Tiveron, C., Tatangelo, L., Giovarelli, M. et al.** (2000). Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *Embo J* **19**, 3337-48.
- Berdnik, D., Torok, T., Gonzalez-Gaitan, M. and Knoblich, J. A.** (2002). The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in Drosophila. *Dev Cell* **3**, 221-31.

- Berezovska, O., Jack, C., McLean, P., Aster, J. C., Hicks, C., Xia, W., Wolfe, M. S., Kimberly, W. T., Weinmaster, G., Selkoe, D. J. et al.** (2000). Aspartate mutations in presenilin and gamma-secretase inhibitors both impair notch1 proteolysis and nuclear translocation with relative preservation of notch1 signaling. *J Neurochem* **75**, 583-93.
- Berezovska, O., Jack, C., McLean, P., Aster, J. C., Hicks, C., Xia, W., Wolfe, M. S., Weinmaster, G., Selkoe, D. J. and Hyman, B. T.** (2000). Rapid Notch1 nuclear translocation after ligand binding depends on presenilin-associated gamma-secretase activity. *Ann N Y Acad Sci* **920**, 223-6.
- Bettenhausen, B., Hrabe de Angelis, M., Simon, D., Guenet, J. L. and Gossler, A.** (1995). Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta. *Development* **121**, 2407-18.
- Blaumueller, C. M. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1997). Comparative aspects of Notch signaling in lower and higher eukaryotes. *Perspect. Dev. Neurobiol.* **4**, 325-343.
- Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* **90**, 281-291
- Brand, M. and Campos-Ortega, J. A.** (1990). Second-site modifiers of the split mutation of Notch define genes involved in neurogenesis in Drosophila melanogaster. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **198**, 275-285.
- Bray, S. J.** (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 678-89.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A. and Israel, A.** (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* **5**, 207-16.
- Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H. and Cohen, S.** (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* **406**, 411-5.
- Bush, G., diSibio, G., Miyamoto, A., Denault, J. B., Leduc, R. and Weinmaster, G.** (2001). Ligand-Induced Signaling in the Absence of Furin Processing of Notch1. *Dev Biol* **229**, 494-502.
- Bussen, M., Petry, M., Schuster-Gossler, K., Leitges, M., Gossler, A. and Kispert, A.** (2004). The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments. *Genes Dev* **18**, 1209-21.
- Campbell, I. G. and Bork, P.** (1993). Epidermal growth factor-like modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 385-392.
- Campos-Ortega, J. A.** (1995). Genetic mechanisms of early neurogenesis in Drosophila melanogaster. *Mol. Neurobiol.* **10**, 75-89.

- Chan, Y. M. and Jan, Y. N.** (1998). Roles for proteolysis and trafficking in notch maturation and signal transduction. *Cell* **94**, 423-6.
- Chastagner, P., Israel, A. and Brou, C.** (2008). AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. *PLoS ONE* **3**, e2735.
- Chen, J., Li, X. and Greenwald, I.** (2004). sel-7, a positive regulator of lin-12 activity, encodes a novel nuclear protein in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **166**, 151-60.
- Chen, J., Lu, L., Shi, S. and Stanley, P.** (2006). Expression of Notch signaling pathway genes in mouse embryos lacking beta4galactosyltransferase-1. *Gene Expr Patterns* **6**, 376-82.
- Chen, J., Moloney, D. J. and Stanley, P.** (2001). Fringe modulation of Jagged1-induced Notch signaling requires the action of beta 4galactosyltransferase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13716-21.
- Chen, Y. W., Pedersen, J. W., Wandall, H. H., Levery, S. B., Pizette, S., Clausen, H. and Cohen, S. M.** (2007). Glycosphingolipids with extended sugar chain have specialized functions in development and behavior of *Drosophila*. *Dev Biol* **306**, 736-49.
- Chitnis, A.** (2006). Why is delta endocytosis required for effective activation of notch? *Dev Dyn* **235**, 886-94.
- Chitnis, A., Henrique, D., Lewis, J., Ish Horowicz, D. and Kintner, C.** (1995). Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *Delta*. *Nature* **375**, 761-766.
- Cohen, B., Bashirullah, A., Dagnino, L., Campbell, C., Fisher, W. W., Leow, C. C., Whiting, E., Ryan, D., Zinyk, D., Boulianne, G. et al.** (1997). Fringe boundaries coincide with Notch-dependent patterning centres in mammals and alter Notch-dependent development in *Drosophila*. *Nat. Genet.* **16**, 283-288.
- Cole, S. E., Levorse, J. M., Tilghman, S. M. and Vogt, T. F.** (2002). Clock Regulatory Elements Control Cyclic Expression of Lunatic fringe during Somitogenesis. *Dev Cell* **3**, 75-84.
- Colliton, R. P., Bason, L., Lu, F. M., Piccoli, D. A., Krantz, I. D. and Spinner, N. B.** (2001). Mutation analysis of Jagged1 (JAG1) in Alagille syndrome patients. *Hum Mutat* **17**, 151-2.
- Cordes, R., Schuster-Gossler, K., Serth, K. and Gossler, A.** (2004). Specification of vertebral identity is coupled to Notch signalling and the segmentation clock. *Development* **131**, 1221-33.
- Cordle, J., Johnson, S., Tay, J. Z., Roversi, P., Wilkin, M. B., de Madrid, B. H., Shimizu, H., Jensen, S., Whiteman, P., Jin, B. et al.** (2008). A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 849-57.

- Crosnier, C., Driancourt, C., Raynaud, N., Hadchouel, M. and Meunier-Rotival, M.** (2001). Fifteen novel mutations in the JAGGED1 gene of patients with Alagille syndrome. *Hum Mutat* **17**, 72-3.
- Dale, J. K., Maroto, M., Dequeant, M. L., Malapert, P., McGrew, M. and Pourquie, O.** (2003). Periodic Notch inhibition by Lunatic Fringe underlies the chick segmentation clock. *Nature* **421**, 275-8.
- Davis, R. L. and Turner, D. L.** (2001). Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* **20**, 8342-57.
- de Celis, J. F., Barrio, R., del Arco, A. and Garcia Bellido, A.** (1993). Genetic and molecular characterization of a Notch mutation in its Delta- and Serrate-binding domain in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 4037-41.
- de Celis, J. F. and Bray, S. J.** (2000). The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe. *Development* **127**, 1291-302.
- Defetos, M. L., Huang, E., Ojala, E. W., Forbush, K. A. and Bevan, M. J.** (2000). Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes. *Immunity* **13**, 73-84.
- Dievart, A., Beaulieu, N. and Jolicoeur, P.** (1999). Involvement of Notch1 in the development of mouse mammary tumors. *Oncogene* **18**, 5973-81.
- Donoviel, D. B., Hadjantonakis, A. K., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P. S. and Bernstein, A.** (1999). Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev* **13**, 2801-10.
- Downing, A. K., Knott, V., Werner, J. M., Cardy, C. M., Campbell, I. D. and Handford, P. A.** (1996). Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders. *Cell* **85**, 597-605.
- Dunwoodie, S. L., Clements, M., Sparrow, D. B., Sa, X., Conlon, R. A. and Beddington, R. S.** (2002). Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene Dll3 are associated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm. *Development* **129**, 1795-1806.
- Dunwoodie, S. L., Henrique, D., Harrison, S. M. and Beddington, R. S.** (1997). Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* **124**, 3065-3076.
- Ellisen, L. W.** (2002). Regulation of gene expression by WT1 in development and tumorigenesis. *Int J Hematol* **76**, 110-6.
- Evrard, Y. A., Lun, Y., Aulehla, A., Gan, L. and Johnson, R. L.** (1998). *lunatic fringe* is an essential mediator of somite segmentation and patterning. *Nature* **394**, 377-381.

- Fehon, R. G., Kooh, P. J., Rebay, I., Regan, C. L., Xu, T., Muskavitch, M. A. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci *Notch* and *Delta*, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* **61**, 523-534.
- Fisher, A. and Caudy, M.** (1998). The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. *Bioessays* **20**, 298-306.
- Fitzgerald, K. and Greenwald, I.** (1995). Interchangeability of *Caenorhabditis elegans* DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo. *Development* **121**, 4275-82.
- Fleming, R. J.** (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 599-607.
- Forsberg, H., Crozet, F. and Brown, N. A.** (1998). Waves of mouse Lunatic fringe expression, in four-hour cycles at two-hour intervals, precede somite boundary formation. *Curr. Biol.* **8**, 1027-1030.
- Fortini, M. E.** (2001). Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 627-34.
- Geffers, I., Serth, K., Chapman, G., Jaekel, R., Schuster-Gossler, K., Cordes, R., Sparrow, D. B., Kremmer, E., Dunwoodie, S. L., Klein, T. et al.** (2007). Divergent functions and distinct localization of the Notch ligands DLL1 and DLL3 in vivo. *J Cell Biol* **178**, 465-76.
- Gerhardt, C. C., Gros, J., Strosberg, A. D. and Issad, T.** (1999). Stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by human beta-3 adrenergic receptor: new pharmacological profile and mechanism of activation. *Mol Pharmacol* **55**, 255-62.
- Girard, L., Hanna, Z., Beaulieu, N., Hoemann, C. D., Simard, C., Kozak, C. A. and Jolicoeur, P.** (1996). Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTVD/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis. *Genes Dev.* **10**, 1930-1944.
- Glittenberg, M., Pitsouli, C., Garvey, C., Delidakis, C. and Bray, S.** (2006). Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis. *Embo J* **25**, 4697-706.
- Gossler, A. and Hrabe de Angelis, M.** (1998). Somitogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* **38**, 225-287.
- Greenwald, I.** (1994). Structure/function studies of lin-12/Notch proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 556-562
- Greenwald, I.** (1998). LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev* **12**, 1751-62.

- Guilmeau, S., Flandez, M., Bancroft, L., Sellers, R. S., Tear, B., Stanley, P. and Augenlicht, L. H.** (2008). Intestinal deletion of Pofut1 in the mouse inactivates notch signaling and causes enterocolitis. *Gastroenterology* **135**, 849-60, 860 e1-6.
- Haines, N. and Irvine, K. D.** (2003). Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 786-97.
- Haltiwanger, R. S.** (2002). Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 593-8.
- Haltiwanger, R. S. and Lowe, J. B.** (2004). Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem* **73**, 491-537.
- Haltiwanger, R. S. and Stanley, P.** (2002). Modulation of receptor signaling by glycosylation: fringe is an O-fucose-beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase. *Biochim Biophys Acta* **1573**, 328-35.
- Hambleton, S., Valeyev, N. V., Muranyi, A., Knott, V., Werner, J. M., McMichael, A. J., Handford, P. A. and Downing, A. K.** (2004). Structural and functional properties of the human notch-1 ligand binding region. *Structure* **12**, 2173-83.
- Harris, R. J. and Spellman, M. W.** (1993). O-linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. *Glycobiology* **3**, 219-24.
- Henderson, S. T., Gao, D., Lambie, E. J. and Kimble, J.** (1994). lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*. *Development* **120**, 2913-24.
- Heritage, M. L., MacMillan, J. C., Colliton, R. P., Genin, A., Spinner, N. B. and Anderson, G. J.** (2000). Jagged1 (JAG1) mutation detection in an Australian Alagille syndrome population. *Hum Mutat* **16**, 408-16.
- Hicks, C., Johnston, S. H., diSibio, G., Collazo, A., Vogt, T. F. and Weinmaster, G.** (2000). Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nat Cell Biol* **2**, 515-20.
- Hicks, C., Ladi, E., Lindsell, C., Hsieh, J. J., Hayward, S. D., Collazo, A. and Weinmaster, G.** (2002). A secreted Delta1-Fc fusion protein functions both as an activator and inhibitor of Notch1 signaling. *J Neurosci Res* **68**, 655-67.
- Hiratochi, M., Nagase, H., Kuramochi, Y., Koh, C. S., Ohkawara, T. and Nakayama, K.** (2007). The Delta intracellular domain mediates TGF-beta/Activin signaling through binding to Smads and has an important bi-directional function in the Notch-Delta signaling pathway. *Nucleic Acids Res* **35**, 912-22.

Hock, B., Bohme, B., Karn, T., Yamamoto, T., Kaibuchi, K., Holtrich, U., Holland, S., Pawson, T., Rubsamen-Waigmann, H. and Strebhardt, K. (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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9779-84.

Hofsteenge, J., Huwiler, K. G., Macek, B., Hess, D., Lawler, J., Mosher, D. F. and Peter-Katalinic, J. (2001). C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. *J Biol Chem* **276**, 6485-98.

Hori, K., Fostier, M., Ito, M., Fuwa, T. J., Go, M. J., Okano, H., Baron, M. and Matsuno, K. (2004). Drosophila deltex mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development* **131**, 5527-37.

Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J., 2nd and Gossler, A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* **386**, 717-21.

Hubbard, E. J., Wu, G., Kitajewski, J. and Greenwald, I. (1997). sel-10, a negative regulator of lin-12 activity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the CDC4 family of proteins. *Genes Dev.* **11**, 3182-3193.

Hukriede, N. A., Gu, Y. and Fleming, R. J. (1997). A dominant-negative form of Serrate acts as a general antagonist of Notch activation. *Development* **124**, 3427-37.

Ikeuchi, T. and Sisodia, S. S. (2003). The Notch ligands, Delta1 and Jagged2, are substrates for presenilin-dependent "gamma-secretase" cleavage. *J Biol Chem* **278**, 7751-4.

Irvine, K. D. (1999). Fringe, Notch, and making developmental boundaries. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 434-41.

Izon, D. J., Aster, J. C., He, Y., Weng, A., Karnell, F. G., Patriub, V., Xu, L., Bakkour, S., Rodriguez, C., Allman, D. et al. (2002). Deltex1 redirects lymphoid progenitors to the B cell lineage by antagonizing Notch1. *Immunity* **16**, 231-43.

Jacobsen, T. L., Brennan, K., Arias, A. M. and Muskavitch, M. A. (1998). Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila*. *Development* **125**, 4531-40.

Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R. and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* **377**, 355-358.

Jeffries, S., Robbins, D. J. and Capobianco, A. J. (2002). Characterization of a high-molecular-weight Notch complex in the nucleus of Notch(ic)-transformed RKE cells and in a human T-cell leukemia cell line. *Mol Cell Biol* **22**, 3927-41.

Jen, W. C., Wettstein, D., Turner, D., Chitnis, A. and Kintner, C. (1997). The Notch ligand, X-Delta-2, mediates segmentation of the paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development* **124**, 1169-1178.

Jiang, R., Lan, Y., Chapman, H. D., Shawber, C., Norton, C. R., Serreze, D. V., Weinmaster, G. and Gridley, T. (1998). Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev.* **12**, 1046-1057.

Johansen, K. M., Fehon, R. G. and Artavanis-Tsakonas, S. (1989). The *Notch* gene product is a glycoprotein expressed on the cell surface of both epidermal and neuronal precursor cells during *Drosophila* development. *J. Cell Biol.* **109**, 2427-2440.

Johnston, S. H., Rauskolb, C., Wilson, R., Prabhakaran, B., Irvine, K. D. and Vogt, T. F. (1997). A family of mammalian Fringe genes implicated in boundary determination and the Notch pathway. *Development* **124**, 2245-2254.

Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cecillion, M., Marechal, E. et al. (1996). Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* **383**, 707-10.

Joutel, A. and Tournier-Lasserre, E. (1998). Notch signalling pathway and human diseases. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 619-25.

Joutel, A., Vahedi, K., Corpechot, C., Troesch, A., Chabriat, H., Vayssiere, C., Cruaud, C., Maciazek, J., Weissenbach, J., Bousser, M. G. et al. (1997). Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet* **350**, 1511-5.

Jouve, C., Palmeirim, I., Henrique, D., Beckers, J., Gossler, A., IshHorowcz, D. and Pourquié, O. (2000). Notch signaling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm. *Development* **127**, 1421-1429.

Kato, H., Taniguchi, Y., Kurooka, H., Minoguchi, S., Sakai, T., Nomura-Okazaki, S., Tamura, K. and Honjo, T. (1997). Involvement of RBP-J in biological functions of mouse Notch1 and its derivatives. *Development* **124**, 4133-4141.

Kelley, M. R., Kidd, S., Deutsch, W. A. and Young, M. W. (1987). Mutations altering the structure of epidermal growth factor-like coding sequences at the *Drosophila* Notch locus. *Cell* **51**, 539-48.

Kentzer, E. J., Buko, A., Menon, G. and Sarin, V. K. (1990). Carbohydrate composition and presence of a fucose-protein linkage in recombinant human pro-urokinase. *Biochem Biophys Res Commun* **171**, 401-6.

Klug, K. M., Parody, T. R. and Muskavitch, M. A. (1998). Complex proteolytic processing acts on Delta, a transmembrane ligand for Notch, during *Drosophila* development. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1709-1723.

Knott, V., Downing, A. K., Cardy, C. M. and Handford, P. (1996). Calcium binding properties of an epidermal growth factor-like domain pair from human fibrillin-1. *J Mol Biol* **255**, 22-7.

- Kopan, R., Schroeter, E. H., Weintraub, H. and Nye, J. S.** (1996). Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1683-1688.
- Krebs, L. T., Iwai, N., Nonaka, S., Welsh, I. C., Lan, Y., Jiang, R., Saijoh, Y., O'Brien, T. P., Hamada, H. and Gridley, T.** (2003). Notch signaling regulates left-right asymmetry determination by inducing Nodal expression. *Genes Dev* **17**, 1207-12.
- Krebs, L. T., Shutter, J. R., Tanigaki, K., Honjo, T., Stark, K. L. and Gridley, T.** (2004). Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes Dev* **18**, 2469-73.
- Krebs, L. T., Xue, Y., Norton, C. R., Shutter, J. R., Maguire, M., Sundberg, J. P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R. et al.** (2000). Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* **14**, 1343-52.
- Kurooka, H., Kuroda, K. and Honjo, T.** (1998). Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region. *Nucleic Acids Res* **26**, 5448-55.
- Ladi, E., Nichols, J. T., Ge, W., Miyamoto, A., Yao, C., Yang, L. T., Boulter, J., Sun, Y. E., Kintner, C. and Weinmaster, G.** (2005). The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J Cell Biol* **170**, 983-92.
- Lai, E. C.** (2002). Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Rep* **3**, 840-5.
- Laufer, E., Dahn, R., Orozco, O. E., Yeo, C. Y., Piseni, J., Henrique, D., Abbott, U. K., Fallon, J. F. and Tabin, C.** (1997). Expression of Radical fringe in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation. *Nature* **386**, 366-373.
- LaVoie, M. J. and Selkoe, D. J.** (2003). The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. *J Biol Chem* **278**, 34427-37.
- Le Borgne, R., Bardin, A. and Schweisguth, F.** (2005). The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* **132**, 1751-62.
- Lei, L., Xu, A., Panin, V. M. and Irvine, K. D.** (2003). An O-fucose site in the ligand binding domain inhibits Notch activation. *Development* **130**, 6411-21.
- Lewis, J.** (1998). Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 583-9.
- Li, L., Krantz, I. D., Deng, Y., Genin, A., Banta, A. B., Collins, C. C., Qi, M., Trask, B. J., Kuo, W. L., Cochran, J. et al.** (1997). Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat. Genet.* **16**, 243-251.

- Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V. and Young, M. W.** (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev.* **7**, 1949-1965.
- Lieber, T., Kidd, S. and Young, M. W.** (2002). kuzbanian-mediated cleavage of Drosophila Notch. *Genes Dev* **16**, 209-21.
- Lieber, T., Wesley, C. S., Alcamo, E., Hassel, B., Krane, J. F., Campos-Ortega, J. A. and Young, M. W.** (1992). Single amino acid substitutions in EGF-like elements of Notch and Delta modify Drosophila development and affect cell adhesion in vitro. *Neuron* **9**, 847-859.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G. and Israel, A.** (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8108-12.
- Louvi, A. and Artavanis-Tsakonas, S.** (2006). Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* **7**, 93-102.
- Lowell, S., Benchoua, A., Heavey, B. and Smith, A. G.** (2006). Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biol* **4**, e121.
- Lu, L. and Stanley, P.** (2006). Roles of O-fucose glycans in notch signaling revealed by mutant mice. *Methods Enzymol* **417**, 127-36.
- Luo, Y. and Haltiwanger, R. S.** (2005). O-fucosylation of notch occurs in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **280**, 11289-94.
- Luo, Y., Nita-Lazar, A. and Haltiwanger, R. S.** (2006). Two distinct pathways for O-fucosylation of epidermal growth factor-like or thrombospondin type 1 repeats. *J Biol Chem* **281**, 9385-92.
- Lyman, D. and Young, M. W.** (1993). Further evidence for function of the Drosophila Notch protein as a transmembrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10395-9.
- Maier, M. M. and Gessler, M.** (2000). Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 652-60.
- Malecki, M. J., Sanchez-Irizarry, C., Mitchell, J. L., Histen, G., Xu, M. L., Aster, J. C. and Blacklow, S. C.** (2006). Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes. *Mol Cell Biol* **26**, 4642-51.
- Matsuno, K., Diederich, R. J., Go, M. J., Blaumueller, C. M. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1995). Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* **121**, 2633-44.

- Matsuno, K., Ito, M., Hori, K., Miyashita, F., Suzuki, S., Kishi, N., Artavanis-Tsakonas, S. and Okano, H.** (2002). Involvement of a proline-rich motif and RING-H2 finger of Deltex in the regulation of Notch signaling. *Development* **129**, 1049-59.
- Miele, L., Golde, T. and Osborne, B.** (2006). Notch signaling in cancer. *Curr Mol Med* **6**, 905-18.
- Moloney, D. J., Panin, V. M., Johnston, S. H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K. D., Haltiwanger, R. S. et al.** (2000). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **406**, 369-75.
- Moloney, D. J., Shair, L. H., Lu, F. M., Xia, J., Locke, R., Matta, K. L. and Haltiwanger, R. S.** (2000). Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. *J Biol Chem* **275**, 9604-11.
- Morales, A. V., Yasuda, Y. and Ish-Horowicz, D.** (2002). Periodic lunatic fringe expression during segmentation is controlled by a cyclic transcriptional enhancer responsive to Notch signalling. *Developmental Cell* **3**, 63-74.
- Morrison, A., Hodgetts, C., Gossler, A., Hrabe de Angelis, M. and Lewis, J.** (1999). Expression of Delta1 and Serrate1 (Jagged1) in the mouse inner ear. *Mech Dev* **84**, 169-72.
- Mumm, J. S. and Kopan, R.** (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* **228**, 151-65.
- Mumm, J. S. and Kopan, R.** (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* **228**, 151-65.
- Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Saxena, M. T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D. J., Ray, W. J. and Kopan, R.** (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* **5**, 197-206.
- Munro, S. and Freeman, M.** (2000). The notch signalling regulator fringe acts in the Golgi apparatus and requires the glycosyltransferase signature motif DXD. *Curr Biol* **10**, 813-20.
- Muskavitch, M. A.** (1994). Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice. *Dev. Biol.* **166**, 415-30.
- Muskavitch, M. A. and Hoffmann, F. M.** (1990). Homologs of vertebrate growth factors in Drosophila melanogaster and other invertebrates. *Curr. Top. Dev. Biol.* **24**, 289-328.
- Nam, Y., Sliz, P., Song, L., Aster, J. C. and Blacklow, S. C.** (2006). Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. *Cell* **124**, 973-83.
- Nellemann, C., de Bellard, M. E., Barembaum, M., Laufer, E. and Bronner-Fraser, M.** (2001). Excess lunatic fringe causes cranial neural crest over-proliferation. *Dev Biol* **235**, 121-30.

- Nichols, J. T., Miyamoto, A. and Weinmaster, G.** (2007). Notch signaling--constantly on the move. *Traffic* **8**, 959-69.
- Nie, J., McGill, M. A., Dermer, M., Dho, S. E., Wolting, C. D. and McGlade, C. J.** (2002). LNX functions as a RING type E3 ubiquitin ligase that targets the cell fate determinant Numb for ubiquitin-dependent degradation. *Embo J* **21**, 93-102.
- Niessen, K. and Karsan, A.** (2007). Notch signaling in the developing cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C1-11.
- Nita-Lazar, A. and Haltiwanger, R. S.** (2006). Methods for analysis of unusual forms of O-glycosylation. *Methods Mol Biol* **347**, 57-68.
- Oberg, C., Li, J., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M. and Lendahl, U.** (2001). The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol Chem* **276**, 35847-53.
- Oda, T., Elkahlon, A. G., Pike, B. L., Okajima, K., Krantz, I. D., Genin, A., Piccoli, D. A., Meltzer, P. S., Spinner, N. B., Collins, F. S. et al.** (1997). Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat. Genet.* **16**, 235-242.
- Oka, C., Nakano, T., Wakeham, A., de la Pompa, J. L., Mori, C., Sakai, T., Okazaki, S., Kawaichi, M., Shiota, K., Mak, T. W. et al.** (1995). Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development* **121**, 3291-3301.
- Okajima, T., Matsuura, A. and Matsuda, T.** (2008). Biological functions of glycosyltransferase genes involved in O-fucose glycan synthesis. *J Biochem* **144**, 1-6.
- Okajima, T., Reddy, B., Matsuda, T. and Irvine, K. D.** (2008). Contributions of chaperone and glycosyltransferase activities of O-fucosyltransferase 1 to Notch signaling. *BMC Biol* **6**, 1.
- Okajima, T., Xu, A. and Irvine, K. D.** (2003). Modulation of notch-ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and fringe. *J Biol Chem* **278**, 42340-5.
- Okajima, T., Xu, A., Lei, L. and Irvine, K. D.** (2005). Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding. *Science* **307**, 1599-603.
- Okamura, Y. and Saga, Y.** (2008). Pofut1 is required for the proper localization of the Notch receptor during mouse development. *Mech Dev* **125**, 663-73.
- Pan, D. and Rubin, G. M.** (1997). Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during drosophila and vertebrate neurogenesis. *Cell* **90**, 271-280.
- Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R. and Irvine, K. D.** (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* **387**, 908-12.

- Panin, V. M., Shao, L., Lei, L., Moloney, D. J., Irvine, K. D. and Haltiwanger, R. S.** (2002). Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltransferase-1 and Fringe. *J Biol Chem* **277**, 29945-52.
- Papayannopoulos, V., Tomlinson, A., Panin, V. M., Rauskolb, C. and Irvine, K. D.** (1998). Dorsal-ventral signaling in the Drosophila eye. *Science* **281**, 2031-4.
- Parks, A. L., Klueg, K. M., Stout, J. R. and Muskavitch, M. A.** (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* **127**, 1373-85.
- Pfister, S., Przemeck, G. K., Gerber, J. K., Beckers, J., Adamski, J. and Hrabe de Angelis, M.** (2003). Interaction of the MAGUK family member Acvrin1 and the cytoplasmic domain of the Notch ligand Delta1. *J Mol Biol* **333**, 229-35.
- Pintar, A., De Biasio, A., Popovic, M., Ivanova, N. and Pongor, S.** (2007). The intracellular region of Notch ligands: does the tail make the difference? *Biol Direct* **2**, 19.
- Plotnikov, A. N., Schlessinger, J., Hubbard, S. R. and Mohammadi, M.** (1999). Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* **98**, 641-50.
- Poodry, C. A.** (1990). shibire, a neurogenic mutant of Drosophila. *Dev Biol* **138**, 464-72.
- Qi, H., Rand, M. D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1999). Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* **283**, 91-4.
- Radtke, F., Schweisguth, F. and Pear, W.** (2005). The Notch 'gospel'. *EMBO Rep* **6**, 1120-5.
- Ramain, P., Khechumian, K., Seugnet, L., Arbogast, N., Ackermann, C. and Heitzler, P.** (2001). Novel Notch alleles reveal a Deltex-dependent pathway repressing neural fate. *Curr Biol* **11**, 1729-38.
- Rampal, R., Arboleda-Velasquez, J. F., Nita-Lazar, A., Kosik, K. S. and Haltiwanger, R. S.** (2005). Highly conserved O-fucose sites have distinct effects on Notch1 function. *J Biol Chem* **280**, 32133-40.
- Rampal, R., Li, A. S., Moloney, D. J., Georgiou, S. A., Luther, K. B., Nita-Lazar, A. and Haltiwanger, R. S.** (2005). Lunatic fringe, manic fringe, and radical fringe recognize similar specificity determinants in O-fucosylated epidermal growth factor-like repeats. *J Biol Chem* **280**, 42454-63.
- Rand, M. D., Grimm, L. M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S. C., Sklar, J. and Aster, J. C.** (2000). Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Mol Cell Biol* **20**, 1825-35.

Rangarajan, R., Courvoisier, H. and Gaul, U. (2001). Dpp and Hedgehog mediate neuron-glia interactions in Drosophila eye development by promoting the proliferation and motility of subretinal glia. *Mech Dev* **108**, 93-103.

Rebay, I., Fleming, R. J., Fehon, R. G., Cherbas, L., Cherbas, P. and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* **67**, 687-699.

Rini, J. M. and Lobsanov, Y. D. (1999). New animal lectin structures. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 578-84.

Ronchini, C. and Capobianco, A. J. (2001). Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol Cell Biol* **21**, 5925-34.

Sacchettini, J. C., Baum, L. G. and Brewer, C. F. (2001). Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. *Biochemistry* **40**, 3009-15.

Saha, S., Boyd, J., Werner, J. M., Knott, V., Handford, P. A., Campbell, I. D. and Downing, A. K. (2001). Solution structure of the LDL receptor EGF-AB pair: a paradigm for the assembly of tandem calcium binding EGF domains. *Structure* **9**, 451-6.

Sakamoto, K., Chao, W. S., Katsube, K. and Yamaguchi, A. (2005). Distinct roles of EGF repeats for the Notch signaling system. *Exp Cell Res* **302**, 281-91.

Sakamoto, K., Ohara, O., Takagi, M., Takeda, S. and Katsube, K. (2002). Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification. *Dev Biol* **241**, 313-26.

Santolini, E., Puri, C., Salcini, A. E., Gagliani, M. C., Pelicci, P. G., Tacchetti, C. and Di Fiore, P. P. (2000). Numb is an endocytic protein. *J Cell Biol* **151**, 1345-52.

Sasaki, N., Sasamura, T., Ishikawa, H. O., Kanai, M., Ueda, R., Saigo, K. and Matsuno, K. (2007). Polarized exocytosis and transcytosis of Notch during its apical localization in Drosophila epithelial cells. *Genes Cells* **12**, 89-103.

Sasamura, T., Ishikawa, H. O., Sasaki, N., Higashi, S., Kanai, M., Nakao, S., Ayukawa, T., Aigaki, T., Noda, K., Miyoshi, E. et al. (2007). The O-fucosyltransferase O-fut1 is an extracellular component that is essential for the constitutive endocytic trafficking of Notch in Drosophila. *Development* **134**, 1347-56.

Sasamura, T., Sasaki, N., Miyashita, F., Nakao, S., Ishikawa, H. O., Ito, M., Kitagawa, M., Harigaya, K., Spana, E., Bilder, D. et al. (2003). neurotic, a novel maternal neurogenic gene, encodes an O-fucosyltransferase that is essential for Notch-Delta interactions. *Development* **130**, 4785-95.

- Sato, Y., Yasuda, K. and Takahashi, Y.** (2002). Morphological boundary forms by a novel inductive event mediated by Lunatic fringe and Notch during somitic segmentation. *Development* **129**, 3633-44.
- Schiffer, S. G., Foley, S., Kaffashan, A., Hronowski, X., Zichittella, A. E., Yeo, C. Y., Miatkowski, K., Adkins, H. B., Damon, B., Whitman, M. et al.** (2001). Fucosylation of Cripto is required for its ability to facilitate nodal signaling. *J Biol Chem* **276**, 37769-78.
- Schweisguth, F.** (2004). Regulation of notch signaling activity. *Curr Biol* **14**, R129-38.
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S. and Rakic, P.** (1999). Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* **286**, 741-6.
- Seugnet, L., Simpson, P. and Haenlin, M.** (1997). Requirement for dynamin during Notch signaling in Drosophila neurogenesis. *Dev Biol* **192**, 585-98.
- Shao, L., Luo, Y., Moloney, D. J. and Haltiwanger, R.** (2002). O-glycosylation of EGF repeats: identification and initial characterization of a UDP-glucose: protein O-glycosyltransferase. *Glycobiology* **12**, 763-70.
- Shao, L., Moloney, D. J. and Haltiwanger, R.** (2003). Fringe modifies O-fucose on mouse Notch1 at epidermal growth factor-like repeats within the ligand-binding site and the Abruption region. *J Biol Chem* **278**, 7775-82.
- Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J. J., Lindsell, C., Bogler, O., Hayward, D. and Weinmaster, G.** (1996). Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* **122**, 3765-3773.
- Shaye, D. D. and Greenwald, I.** (2002). Endocytosis-mediated downregulation of LIN-12/Notch upon Ras activation in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **420**, 686-90.
- Shen, Q. and Temple, S.** (2002). Creating asymmetric cell divisions by skewing endocytosis. *Sci STKE* **2002**, PE52.
- Shi, S. and Stanley, P.** (2003). Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5234-9.
- Shimizu, K., Chiba, S., Hosoya, N., Kumano, K., Saito, T., Kurokawa, M., Kanda, Y., Hamada, Y. and Hirai, H.** (2000). Binding of Delta1, Jagged1, and Jagged2 to Notch2 rapidly induces cleavage, nuclear translocation, and hyperphosphorylation of Notch2. *Mol Cell Biol* **20**, 6913-22.
- Shimizu, K., Chiba, S., Kumano, K., Hosoya, N., Takahashi, T., Kanda, Y., Hamada, Y., Yazaki, Y. and Hirai, H.** (1999). Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods. *J Biol Chem* **274**, 32961-9.

- Shimizu, K., Chiba, S., Saito, T., Kumano, K., Hamada, Y. and Hirai, H.** (2002). Functional diversity among Notch1, Notch2, and Notch3 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 775-9.
- Shimizu, K., Chiba, S., Saito, T., Kumano, K., Takahashi, T. and Hirai, H.** (2001). Manic fringe and lunatic fringe modify different sites of the Notch2 extracellular region, resulting in different signaling modulation. *J Biol Chem* **276**, 25753-8.
- Shutter, J. R., Scully, S., Fan, W., Richards, W. G., Kitajewski, J., Deblandre, G. A., Kintner, C. R. and Stark, K. L.** (2000). Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev* **14**, 1313-8.
- Simpson, P.** (1997). Notch signaling in development. *Perspect. Dev. Neurobiol.* **4**, 297-304.
- Sisodia, S. S.** (2000). Neuroscience. An accomplice for gamma-secretase brought into focus. *Science* **289**, 2296-7.
- Six, E., Ndiaye, D., Laabi, Y., Brou, C., Gupta-Rossi, N., Israel, A. and Logeat, F.** (2003). The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7638-43.
- Six, E. M., Ndiaye, D., Sauer, G., Laabi, Y., Athman, R., Cumano, A., Brou, C., Israel, A. and Logeat, F.** (2004). The notch ligand Delta1 recruits Dlg1 at cell-cell contacts and regulates cell migration. *J Biol Chem* **279**, 55818-26.
- Sotillos, S., Roch, F. and Campuzano, S.** (1997). The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in *Notch* activation during growth and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Development* **124**, 4769-4779.
- Sparrow, D. B., Clements, M., Withington, S. L., Scott, A. N., Novotny, J., Sillence, D., Kusumi, K., Beddington, R. S. and Dunwoodie, S. L.** (2002). Diverse requirements for Notch signalling in mammals. *Int J Dev Biol* **46**, 365-74.
- Stahl, M., Uemura, K., Ge, C., Shi, S., Tashima, Y. and Stanley, P.** (2008). Roles of Pofut1 and O-fucose in mammalian Notch signaling. *J Biol Chem* **283**, 13638-51.
- Stanley, E., Biben, C., Kotecha, S., Fabri, L., Tajbakhsh, S., Wang, C. C., Hatzistavrou, T., Roberts, B., Drinkwater, C., Lah, M. et al.** (1998). DAN is a secreted glycoprotein related to *Xenopus* cerberus. *Mech Dev* **77**, 173-84.
- Stanley, P.** (2007). Regulation of Notch signaling by glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 530-5.
- Stanley, P.** (2008). Glucose: a novel regulator of notch signaling. *ACS Chem Biol* **3**, 210-3.
- Struhl, G. and Adachi, A.** (1998). Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* **93**, 649-60.

- Struhl, G. and Greenwald, I.** (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* **398**, 522-5.
- Suk, J. Y., Jensen, S., McGettrick, A., Willis, A. C., Whiteman, P., Redfield, C. and Handford, P. A.** (2004). Structural consequences of cysteine substitutions C1977Y and C1977R in calcium-binding epidermal growth factor-like domain 30 of human fibrillin-1. *J Biol Chem* **279**, 51258-65.
- Sun, X. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1996). The intracellular deletions of Delta and Serrate define dominant negative forms of the *Drosophila* Notch ligands. *Development* **122**, 2465-74.
- Sun, X. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1997). Secreted forms of DELTA and SERRATE define antagonists of Notch signaling in *Drosophila*. *Development* **124**, 3439-48.
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T. and Honjo, T.** (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr. Biol.* **5**, 1416-1423.
- Tani, S., Kurooka, H., Aoki, T., Hashimoto, N. and Honjo, T.** (2001). The N- and C-terminal regions of RBP-J interact with the ankyrin repeats of Notch1 RAMIC to activate transcription. *Nucleic Acids Res* **29**, 1373-80.
- Tiedemann, H., Asashima, M., Grunz, H., Knochel, W. and Tiedemann, H.** (1998). Neural induction in embryos. *Dev Growth Differ* **40**, 363-76.
- Valsecchi, C., Ghezzi, C., Ballabio, A. and Rugarli, E. I.** (1997). JAGGED2: a putative Notch ligand expressed in the apical ectodermal ridge and in sites of epithelial-mesenchymal interactions. *Mech. Dev.* **69**, 203-207.
- Vässin, H. and Campos-Ortega, J. A.** (1987). Genetic analysis of *Delta*, a neurogenic gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **116**, 433-445.
- Vodovar, N. and Schweisguth, F.** (2008). Functions of O-fucosyltransferase in Notch trafficking and signaling: towards the end of a controversy? *J Biol* **7**, 7.
- Wahl, M. B., Deng, C., Lewandoski, M. and Pourquie, O.** (2007). FGF signaling acts upstream of the NOTCH and WNT signaling pathways to control segmentation clock oscillations in mouse somitogenesis. *Development* **134**, 4033-41.
- Wang, S., Sdrulla, A. D., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G. and Barres, B. A.** (1998). Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* **21**, 63-75.
- Wang, W. and Struhl, G.** (2005). Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*. *Development* **132**, 2883-94.

- Wang, Y., Shao, L., Shi, S., Harris, R. J., Spellman, M. W., Stanley, P. and Haltiwanger, R. S.** (2001). Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. *J Biol Chem* **276**, 40338-45.
- Weinmaster, G.** (1997). The ins and outs of notch signaling. *Mol. Cell. Neurosci.* **9**, 91-102.
- Weinmaster, G. and Kintner, C.** (2003). Modulation of notch signaling during somitogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 367-95.
- Wouters, M. A., Rigoutsos, I., Chu, C. K., Feng, L. L., Sparrow, D. B. and Dunwoodie, S. L.** (2005). Evolution of distinct EGF domains with specific functions. *Protein Sci* **14**, 1091-103.
- Wright, G. J., Leslie, J. D., Ariza-McNaughton, L. and Lewis, J.** (2004). Delta proteins and MAGI proteins: an interaction of Notch ligands with intracellular scaffolding molecules and its significance for zebrafish development. *Development* **131**, 5659-69.
- Wu, G., Lyapina, S., Das, I., Li, J., Gurney, M., Pauley, A., Chui, I., Deshaies, R. J. and Kitajewski, J.** (2001). SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Mol Cell Biol* **21**, 7403-15.
- Wu, L., Aster, J. C., Blacklow, S. C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S. and Griffin, J. D.** (2000). MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet* **26**, 484-9.
- Xia, L., McDaniel, J. M., Yago, T., Doeden, A. and McEver, R. P.** (2004). Surface fucosylation of human cord blood cells augments binding to P-selectin and E-selectin and enhances engraftment in bone marrow. *Blood* **104**, 3091-6.
- Xu, A., Haines, N., Dlugosz, M., Rana, N. A., Takeuchi, H., Haltiwanger, R. S. and Irvine, K. D.** (2007). In vitro reconstitution of the modulation of Drosophila Notch-ligand binding by Fringe. *J Biol Chem* **282**, 35153-62.
- Xu, A., Lei, L. and Irvine, K. D.** (2005). Regions of Drosophila Notch that contribute to ligand binding and the modulatory influence of Fringe. *J Biol Chem* **280**, 30158-65.
- Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C. E., Norton, C. R., Chang, B., Hicks, C., Gendron-Maguire, M., Rand, E. B., Weinmaster, G. and Gridley, T.** (1999). Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 723-730.
- Yan, Y. T., Liu, J. J., Luo, Y., E, C., Haltiwanger, R. S., Abate-Shen, C. and Shen, M. M.** (2002). Dual roles of Cripto as a ligand and coreceptor in the nodal signaling pathway. *Mol Cell Biol* **22**, 4439-49.
- Yang, L. T., Nichols, J. T., Yao, C., Manilay, J. O., Robey, E. A. and Weinmaster, G.** (2005). Fringe glycosyltransferases differentially modulate Notch1 proteolysis induced by Delta1 and Jagged1. *Mol Biol Cell* **16**, 927-42.

Zagouras, P., Stifani, S., Blaumueller, C. M., Carcangiu, M. L. and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6414-6418.

Zecchini, V., Brennan, K. and Martinez-Arias, A. (1999). An activity of Notch regulates JNK signalling and affects dorsal closure in *Drosophila*. *Curr Biol* **9**, 460-9.

Publikationen

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Identification of mouse genes with highly specific expression patterns in differentiated intestinal epithelium.

Natalia Schröder, Aravind Sekhar, Insa Geffers, Julia Müller, Oliver Dittrich-Breiholz, Michael Kracht, J. Wedemeyer, Achim Gossler.

Gastroenterology. 2006 Mar;130(3):902-7.

Loss of Tmigd1, a putative Immunoglobulin-like cell adhesion molecule, does not disrupt the structural integrity of the kidney and the intestinal epithelium, but affects energy metabolism.

Aravind Sekhar, Karin Schuster-Gossler, Julia Müller, Jürgen Pöhl, Natalia Schröder, Jan Rozmann, Birgit Rathkolb, Sabine M. Hölter, Anja Schrewe, Cornelia Prehn, Valérie Gailus-Durner, Helmut Fuchs, Jerzy Adamski, Martin Klingenspor, Boris Ivandic, Wolfgang Wurst, Eckhard Wolf, Martin Hrabé de Angelis and Achim Gossler.

submitted

Posterbeiträge

Biochemische Charakterisierung von Chordal, einem Kandidatengen für die Danforth´s short tail Mutation in der Maus

Julia Müller, Katrin Serth, Karin Schuster-Gossler, Maria Pavlova, Ronald Maatmann, Achim Gossler

Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie in Münster. 06.-09. 2005.

Characterization of the Chordal protein, its biochemical properties und interacting partners

Julia Müller, Katrin Serth, Karin Schuster-Gossler, Maria Pavlova, Ronald Maatmann, Achim Gossler

European Workshop on Challenging Proteins and third European Contest for Young Scientists in Paris. 17.-18.Oktober 2005.

The role of glycosylation in EGF repeats of the mouse Notch ligands DLL1 and DLL3 for Notch signaling

Julia Müller, Achim Gossler

6. GfE-School in Günzburg. 28.-30.September 2006.

The role of glycosylation in EGF repeats of the mouse Notch ligands DLL1 and DLL3 for Notch signaling.

Julia Müller, Achim Gossler

Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie in Marburg. 21.-24.März 2007.

Lebenslauf

Name: Julia Müller

Geburtsdatum: 24.08.1978

Geburtsort: Trier

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1985-1989 Grundschule Binsfeld

1989-1998 Peter-Wust-Gymnasium Wittlich, Abschluß Abitur

Hochschulstudium:

1998-2003 Studium der Biochemie an der

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Diplom-Vorprüfung September 2000

Abschluß mit Diplom 27.10.2003

April bis Oktober 2003 Anfertigung der Diplomarbeit

am Institut für Molekularbiologie

der Medizinischen Hochschule Hannover

unter der Anleitung von Prof. Dr. Gossler

Januar 2004-Oktober 2008 Promotion bei Herrn Prof. Dr. Achim

Gossler am Institut für

Molekularbiologie der Medizinischen

Hochschule Hannover

Hannover, 2008