

Aus der  
Neurologischen Klinik und Poliklinik der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich

**Untersuchungen zur homophilen Interaktion von Notch3  
in der Pathogenese von CADASIL**

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

vorgelegt von  
Elisabeth Schneider  
aus München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Dichgans

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Joachim-Ulrich Walther  
Prof. Dr. med. Roman Haberl

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Christian Opherk

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FAGR,  
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1 CADASIL.....	5
1.1.1 Historische Aspekte.....	5
1.1.2 Klinik und Verlauf .....	6
1.1.3 Klinische Diagnostik .....	7
1.1.4 Therapie.....	10
1.2 Molekularbiologische Grundlagen .....	11
1.2.1 Notch3-Struktur.....	11
1.2.2 Notch3-Signaltransduktion .....	12
1.2.3 Mutationsspektrum bei CADASIL .....	13
1.2.4 Vorstellungen zur Pathogenese von CADASIL.....	15
1.3 Zielsetzung der Arbeit .....	17
<b>2 Geräte und Materialien .....</b>	<b>18</b>
2.1 Allgemeine Ausrüstung .....	18
2.2 Zellkultur Ausrüstung.....	20
2.3 Gele, Puffer , Lösungen .....	20
2.3.1 Zellkultur .....	20
2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	21
2.3.3 Dichtezentrifugation.....	22
2.3.4 Molekularbiologische Methoden .....	23
2.4 Chemikalien, Kits, Antikörper .....	24
2.4.1 Chemikalien .....	24
2.4.2 Kits.....	26
2.4.3 Antikörper.....	27
2.5 Verwendete Zellen .....	27
<b>3 Methoden .....</b>	<b>28</b>
3.1 Zellkultur .....	28
3.1.1 Kultivierung, Passagierung und Zellzählung von HEK293-Zellen .....	28
3.1.2 Transiente Transfektion.....	29
3.1.3 Ernte der transfizierten Zellen .....	30
3.2 Molekularbiologische Methoden .....	31
3.2.1 Retransformation.....	31
3.2.2 Präparation von Plasmid DNA in großem Maßstab (Maxi Prep) .....	31
3.2.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration .....	32

3.2.4	Restriktionsverdau .....	32
3.2.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	33
3.3	Proteinbiochemische Methoden .....	34
3.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
3.3.2	Westernblot.....	35
3.3.3	Proteindetektion .....	36
3.3.4	Proteinbestimmung .....	36
3.4	Dichtezentrifugation über einen Sucrose Gradienten.....	37
3.4.1	Probenvorbereitung, Ultrazentrifugation, Probengewinnung.....	37
3.4.2	TCA-Fällung.....	38
3.4.3	Densitometrie .....	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
4.1	cDNA-Konstrukte .....	40
4.2	Spezifischer Nachweis der Notch3S1 Expression .....	41
4.3	Nachweis höhermolekularer Banden von Notch3S1.....	41
4.4	Etablierung der Dichtezentrifugation.....	43
4.4.1	Refraktionsmessung.....	44
4.4.2	Etablierung des Konzentrationsgradienten .....	45
4.5	Dimerisierung von Notch3S1 .....	47
4.6	Statistische Auswertung .....	50
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>52</b>
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	52
5.2	Evaluierung der Versuchsbedingungen.....	53
5.3	Pathophysiologische Relevanz für CADASIL.....	54
5.3.1	Oligomerisierung der Notch3-ECD durch Strukturänderungen .....	54
5.3.2	Oligomerisierungsstatus von Notch-Rezeptoren.....	55
5.3.3	Bedeutung der Oligomerisierung von Notch3 für CADASIL .....	56
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>70</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>71</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

%	Prozent
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
APP	Amyloid Precursor Protein
β-Me	β-Mercaptoethanol
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CADASIL	Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
DDO	N,N Dimethyldodecylamine-N-oxide
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic Acid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECD	Extracellular Domain
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
g	Gramm bzw. Erdschwerebeschleunigung
GOM	Granular Osmiophilic Material
h	Stunde
HES	Hairy-enhancer of split
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LNR	cysteinreiche Notch/Lin12 Einheiten
m	Mittelwert
mA	Milliampere
mg	Milligramm

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MRT	Magnetresonanztomographie
mut	Mutante
N3	Notch3
N3S1	Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors
nM	Nanometer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic Acid
SEM	Standard error of the mean
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIFT	Selected-Ion Flow Tube
SOB	Super Optimal Broth
SOC	SOB Medium plus 20mM Glucose
TBE	Tris-Buffered-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TM	Transmembranregion
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
V-ADAS-cog	Vascular Alzheimer's Disease Assessment Scale Cognitive Subscale
VEGF	Vascular-Endothelien-Growth-Factor
W	Watt
WT	Wilytp

# 1 Einleitung

## 1.1 CADASIL

### 1.1.1 Historische Aspekte

1955 wurde bei zwei Schwestern eine autosomal dominant vererbte Form einer Angiopathie beschrieben, die sich durch rezidivierende Hirninfarkte und einen rapid progressiven Krankheitsverlauf auszeichnete (Bogaert 1955).

Zwanzig Jahre später präsentierten Sourander und Walinder fünf Patienten mit rezidivierenden ischämischen Episoden und Erstmanifestation der Symptome vor dem 40. Lebensjahr (Sourander and Walinder 1977).

In den nächsten Jahrzehnten wurden mehrere Familien mit ähnlichen klinischen und pathologischen Untersuchungsbefunden entdeckt (Stevens et al. 1977; Sonninen and Savontaus 1987; Davous and Fallet-Bianco 1991).

1993 beschrieb die Arbeitsgruppe um Baudrimont die Kardinalsymptome, Bildgebung und pathologischen Befunde einer neuen cerebrovaskulären Erkrankung (Baudrimont et al. 1993). Im selben Jahr konnte das verantwortliche Gen auf Chromosom 19 lokalisiert werden (Tournier-Lasserre et al. 1993). **CADASIL** (**C**erebral **A**utosomal **D**ominant **A**rteriopathy with **S**ubcortical **I**nfarcts and **L**eukoencephalopathy) wurde als Akronym für diese Erkrankung geprägt.

In den folgenden Jahren konnte der Genlokus weiter eingeeengt werden (Dichgans et al. 1996; Ducros et al. 1996). 1996 wurde schließlich das verantwortliche Gen als *NOTCH3* identifiziert (Joutel et al. 1996).

Mittlerweile gibt es Berichte von mehr als 500 Familien mit CADASIL weltweit. Damit wird diese Entität zur häufigsten monogenen Ursache von Schlaganfällen.

### 1.1.2 Klinik und Verlauf

CADASIL umfasst ein breites klinisches Erscheinungsbild. Die Symptome variieren sowohl zwischen den betroffenen Individuen einer Familie als auch zwischen den verschiedenen CADASIL Familien (Dichgans et al. 1998).

Es lassen sich dennoch vier Hauptsymptome charakterisieren: Rezidivierende ischämische Episoden (transitorisch ischämische Attacke oder cerebrale Ischämie), Migräne mit Aura, psychiatrische Manifestationen und in fortgeschrittenen Stadien vaskuläre Demenz und kognitive Beeinträchtigungen (Dichgans et al. 1998; Chabriat et al. 1995).

Bei bis zu 85 % der betroffenen Patienten treten rezidivierende ischämische Episoden (transitorisch ischämische Attacke oder cerebrale Ischämie) auf. Das mittlere Manifestationsalter liegt bei 46 Jahren. Die Episoden äußern sich häufig in lakunären Infarkten oder Hirnstammsyndromen. Typischerweise fehlen bei den Patienten die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren. Über Jahre führen die rezidivierenden ischämischen Episoden zu Störungen des Gangbildes, Pseudobulbärparalyse und Harninkontinenz (Dichgans et al. 1998).

Als zweithäufigstes Symptom treten bei 60 % der betroffenen Individuen kognitive Beeinträchtigungen auf. Zwei Drittel der 65-jährigen CADASIL Patienten sind demenz. Es kommt insbesondere zu einer psychomotorischen Verlangsamung und Einengung des Interessenfeldes. In den meisten Fällen sind die kognitiven Beeinträchtigungen langsam progredient mit schrittweiser Verschlechterung. Weitere Defizite betreffen Aufmerksamkeit und episodisches Gedächtnis (Dichgans et al. 1998).

Ein wichtiges Frühsymptom stellt die Migräne mit einem mittleren Erstmanifestationsalter von 26 Jahren dar. Dabei entwickeln die Patienten am häufigsten Migräne mit Aura (87 %). Basilarismigräne, hemiplegische Migräne und isolierte Auren zählen zu den selteneren Manifestationsformen (Chabriat et al. 1995; Dichgans et al. 1998).

In 30 % der Fälle kommt es zu psychiatrischen Manifestationen. Hierunter sind die affektiven Störungen am häufigsten. Neben Anpassungsstörungen entwickeln die

Patienten schwere Depressionen. Seltener treten Psychosen oder Panikstörungen auf. Ca. 10 % der betroffenen Individuen sind von epileptischen Anfällen betroffen (Dichgans et al. 1998).

Der klinische Verlauf variiert stark unter den betroffenen Individuen. Einige Patienten zeigen eine rapide Verschlechterung, wohingegen andere Patienten über einen langen Zeitraum stabil bleiben oder sich sogar verbessern (Peters et al. 2004a). Männer werden dabei schneller immobil und sterben früher als Frauen. Bei Eintritt des Todes sind 75 % der Patienten vollständig pflegebedürftig (Opherk et al. 2004). Das mittlere Todesalter beträgt dabei 60-65 Jahre (Dichgans et al. 1998; Chabriat et al. 1995).

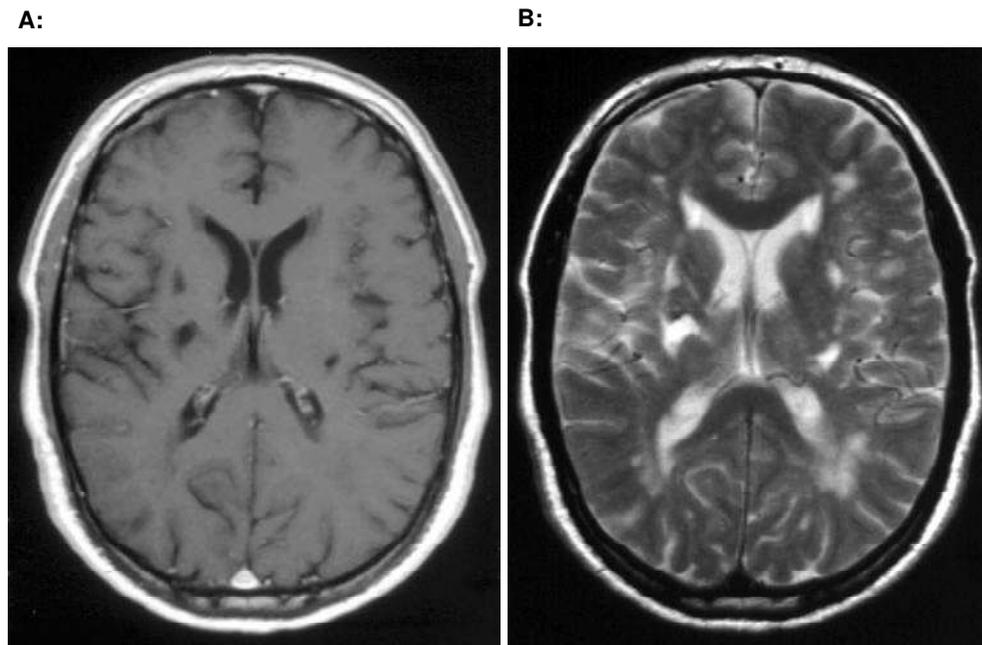
### **1.1.3 Klinische Diagnostik**

#### **1.1.3.1 Bildgebung**

Die Kernspintomographie nimmt eine zentrale Rolle in der CADASIL Diagnostik ein. Bereits bei jungen asymptomatischen Patienten zeigen sich in den T2-gewichteten Aufnahmen hyperintense Veränderungen im periventrikulären subkortikalen Marklager. In späteren Stadien konfluieren diese Läsionen und können einen Großteil des Marklagers einnehmen (Chabriat et al. 1998; Dichgans et al. 1999).

Daneben präsentieren sich in den T1-gewichteten Aufnahmen fokale Hypointensitäten in Basalganglien, Capsula interna und Hirnstamm (Chabriat et al. 1998; Desmond et al. 1999). Bis zum 35. Lebensjahr haben alle Genträger Läsionen entwickelt (Chabriat et al. 1995). Insbesondere Hyperintensitäten im Temporallappen und Veränderungen der subkortikalen U-Fasern des Temporalpols und der paramedianen Frontalregion sind hilfreiche radiologische Zeichen, um CADASIL von anderen Differenzialdiagnosen wie Multipler Sklerose oder Morbus Binswanger zu differenzieren (O'Sullivan et al. 2001).

Quantitative MRT-Studien haben gezeigt, dass eine Korrelation zwischen dem Volumen der Läsionen und den klinischen Symptomen besteht. Dabei hat insbesondere die Gesamtlast an lakunären Läsionen die größte Bedeutung für kognitive Funktionen und den Grad der Behinderung (Dichgans et al. 1999; Viswanathan et al. 2007).



Bildmaterial: Prof. Brückmann

**Abbildung 1: MRT eines CADASIL Patienten mit typischen Marklagerveränderungen**

**A:** T1-gewichtete Aufnahme; Multiple lakunäre Läsionen im Bereich der Basalganglien

**B:** T2-gewichtete Aufnahme; Hyperintense teils konfluierende Läsionen im periventrikulären Marklager

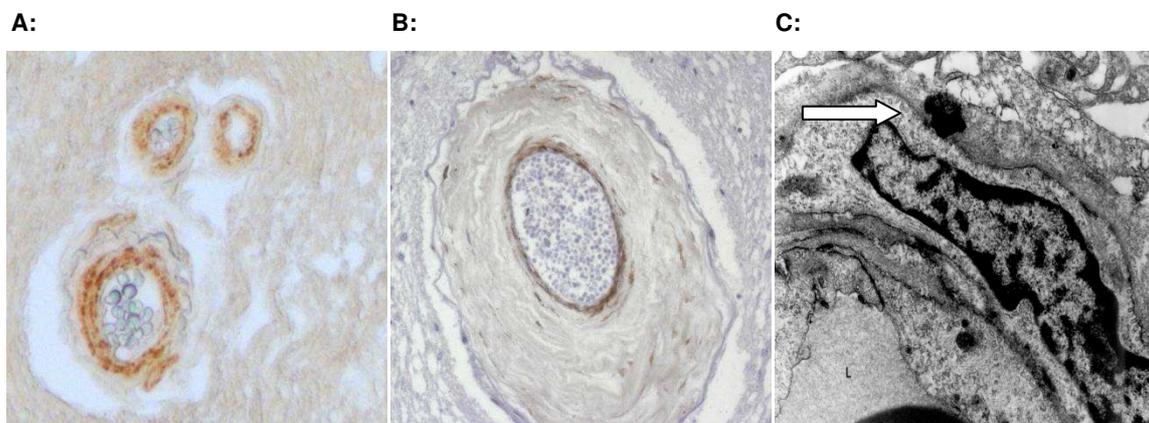
### **1.1.3.2 Neuropathologie**

Histopathologische Untersuchungen bei CADASIL-Patienten zeigen multiple lakunäre subkortikale Infarkte in der weißen Substanz, dem Hirnstamm und den Basalganglien. In bestimmten Arealen kommt es zu einem Verlust von Axonen, Demyelinisierung und Gliose. Kortex und Kleinhirn sind dabei nicht betroffen (Ruchoux et al. 1995).

Ursache für die Infarkte ist eine nicht-arteriosklerotische Amyloid-negative Angiopathie der kleinen Arterien und Kapillaren mit Verdickung der Gefäßwände und Degeneration der glatten Gefäßmuskulatur. Diese Mikroangiopathie findet sich außer in den Hirngefäßen auch in anderen Organen wie beispielsweise in der Haut oder in peripheren Nerven. Elektronenmikroskopisch finden sich Ablagerungen von „granulärem osmiophilen Material“, sogenannten GOM's (granular osmiophilic material), an der Zelloberfläche von glatten Gefäßmuskelzellen. Diese GOM's sind pathogno-

monisch für CADASIL (Baudrimont et al. 1993; Ruchoux and Muraige 1997; Ruchoux et al. 2000; Schroder et al. 2005).

Ferner wurde bei CADASIL Patienten und im Mausmodell eine starke Akkumulation der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors in den Gefäßwänden der glatten Gefäßmuskelzellen entdeckt. Diese Aggregate finden sich, wie erst kürzlich gezeigt werden konnte, als Hauptbestandteil innerhalb der GOM's wieder. Interessanterweise ist die Expression von Notch3 auf die glatten Gefäßmuskelzellen begrenzt (Joutel et al. 1996; Joutel et al. 2000; Ishiko et al. 2006; Ruchoux et al. 2003); (Abbildung 2).



Bildmaterial: Christian Opherk, AG Neurogenetik, unveröffentlichte Daten

#### **Abbildung 2: Typische Gefäßveränderungen bei CADASIL**

**A:** Ablagerung der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors in der Gefäßwand von glatten Gefäßmuskelzellen; Immunfärbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Notch3-Extrazellulärdomäne

**B:** Weitgehendes Fehlen einer Actin-Immunreaktivität in der Gefäßwand aufgrund einer Degeneration von glatten Gefäßmuskelzellen

**C:** Ablagerung von „granulärem osmiophilen Material“ (GOM's) in der Gefäßwand von glatten Gefäßmuskelzellen (siehe Pfeil)

#### **1.1.3.3 Diagnosesicherung**

Bei klinischem Verdacht auf CADASIL und auffälliger Bildgebung, kann die Diagnose mit einer Hautbiopsie und ultrastruktureller Untersuchung der Arteriolen gesichert werden. Es finden sich hier die beschriebenen granulären Ablagerungen in der Gefäßwand. Die Spezifität beträgt dabei nahezu 100 %, die Sensitivität wurde mit 45 % bewertet (Markus et al. 2002).

Alternativ lässt sich die Diagnose durch Immunfärbung mit einem monoklonalen Notch3 Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Notch3-Rezeptors sichern (Joutel et al. 2000; Joutel et al. 2001). Man hatte sich erhofft, hierdurch eine höhere Sensitivität zu erreichen. Allerdings wurde die Sensitivität auch hier nicht höher als 90 % eingestuft (Lesnik Oberstein et al. 2003).

Desweiteren besteht die Möglichkeit molekulargenetische Untersuchungen durchzuführen, um die Diagnose CADASIL zu bestätigen. Das *NOTCH3*-Gen besteht aus 33 Exons und kodiert einen transmembranen Rezeptor, der eine wichtige Rolle bei Differenzierungsprozessen in der Embryogenese einnimmt (Struktur des Notch3-Rezeptors siehe 1.2.1). Da sich 90 % der CADASIL-typischen Mutationen in den Exons 2 bis 6 wiederfinden, kann die molekulargenetische Testung auf diese Exons fokussiert werden. Ein negatives Testergebnis schließt CADASIL allerdings nicht aus. Daher sollte bei starkem klinischem Verdacht die Diagnostik durch eine Hautbiopsie komplettiert werden (Joutel et al. 1997; Peters et al. 2005).

#### **1.1.4 Therapie**

Es steht zurzeit keine kausale Therapie für CADASIL zur Verfügung. Es liegen keine evidenzbasierten Daten für eine Primär- oder Sekundärprophylaxe von cerebralen Ischämien bei CADASIL vor. Die Therapie erfolgt symptomorientiert. Den Patienten wird ausreichend Flüssigkeitszufuhr empfohlen. Überdies sollten kardiovaskuläre Risikofaktoren optimiert werden.

Eine multizentrische Studie mit 168 CADASIL Patienten, die die Wirksamkeit des Cholinesterasehemmers Donepezil auf kognitive Defizite bei CADASIL-Patienten untersucht hatte, konnte bezüglich des primären Endpunktes, einer Verbesserung der kognitiven Funktionen im V-ADAS-cog (vascular Alzheimer's Disease assessment scale cognitive subscale) keine signifikante Verbesserung gegenüber der Placebo-Gruppe zeigen. Allerdings konnten Verbesserungen in verschiedenen Testverfahren für die exekutiven Funktionen nachgewiesen werden (Dichgans et al. 2008).

## 1.2 Molekularbiologische Grundlagen

### 1.2.1 Notch3-Struktur

Notch3 gehört zu einer Familie von vier homologen hoch konservierten Notch/LIN-12 Rezeptoren (Notch1-Notch4) bei Säugetieren (Weinmaster 1997). Das *NOTCH3*-Gen kodiert einen großen transmembranen Rezeptor, der an der Zelloberfläche in Form eines Heterodimers vorliegt.

Notch-Rezeptoren sind Teil eines komplexen Signalsystems, das Differenzierungsprozesse, Proliferation und Apoptose während der Embryogenese steuert (Artavanis-Tsakonas et al. 1999). Notch1 wird beispielsweise im präsomitischen Mesoderm exprimiert, Notch2 zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie Notch1. Beide modulieren vermutlich Interaktionen von Zellen, die an der Kondensation der Somiten während der Embryogenese beteiligt sind (Gridley 1997; Wong et al. 1997; Reaume et al. 1992). Die Expression von Notch3 ist auf glatte Gefäßmuskelzellen beschränkt (Joutel et al. 2000). Notch4 scheint eine entscheidende Rolle bei der Vaskulogenese und Angiogenese zu spielen (Shirayoshi et al. 1997).

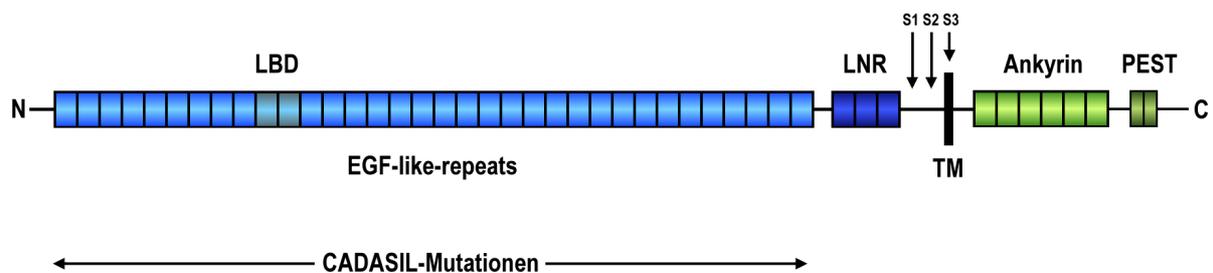
Das Notch-Signalsystem wurde erstmals bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Der Name Notch (deutsch Kerbe) rührt von den eingekerbten Flügeln der Fliege und nur einer Kopie des Gens her.

Der Notch3-Rezeptor besteht aus 2321 Aminosäuren. Er setzt sich zusammen aus einer großen extrazellulären Domäne (210 kDa), die für die Ligandenbindung zuständig ist und einer intrazellulären Domäne (97 kDa), welche die Signaltransduktion vermittelt.

Die Extrazellulärdomäne enthält eine stereotype Anordnung von 34 Einheiten, die dem „epidermal growth factor“ (EGF) ähneln und deshalb als EGF-like-repeats bezeichnet werden. Die EGF-like-repeats 10 und 11 sind für die Ligandenbindung von Bedeutung (Peters et al. 2004b; Rebay et al. 1991). Jedes dieser EGF-like-repeats enthält sechs Cysteinreste, die untereinander Disulfidbrücken bilden und so die Tertiärstruktur des Notch3-Rezeptors ausmachen (Dichgans et al. 2000).

Nach drei cysteinreichen Notch/Lin-12 Einheiten (LNR) und einer Transmembranregion (TM) folgt die intrazelluläre Domäne mit sechs Ankyrin Einheiten und einer

PEST-Sequenz, bestehend aus den Aminosäuren Prolin, Glutamat, Serin und Threonin (Weinmaster 1997); (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur des Notch3-Volllängen-Rezeptors**

Der Notch3-Rezeptor setzt sich aus einer Extrazellulärdomäne (blau), einer Transmembranregion (TM) und einer Intrazellulärdomäne (grün) zusammen. Die Extrazellulärdomäne enthält 34 EGF-like-repeats und eine Cysteinreiche Notch/Lin-12 Sequenz (LNR). Die Intrazellulärdomäne setzt sich aus sechs Ankyrin-repeats und einer PEST-Sequenz zusammen. Die Ligandenbindungsdomäne (LBD) befindet sich in der Extrazellulärdomäne in den EGF-like-repeats 10 und 11. Während seiner Reifung unterliegt der Notch3-Rezeptor drei proteolytischen Spaltungen S1-S3 (siehe Abb.4).

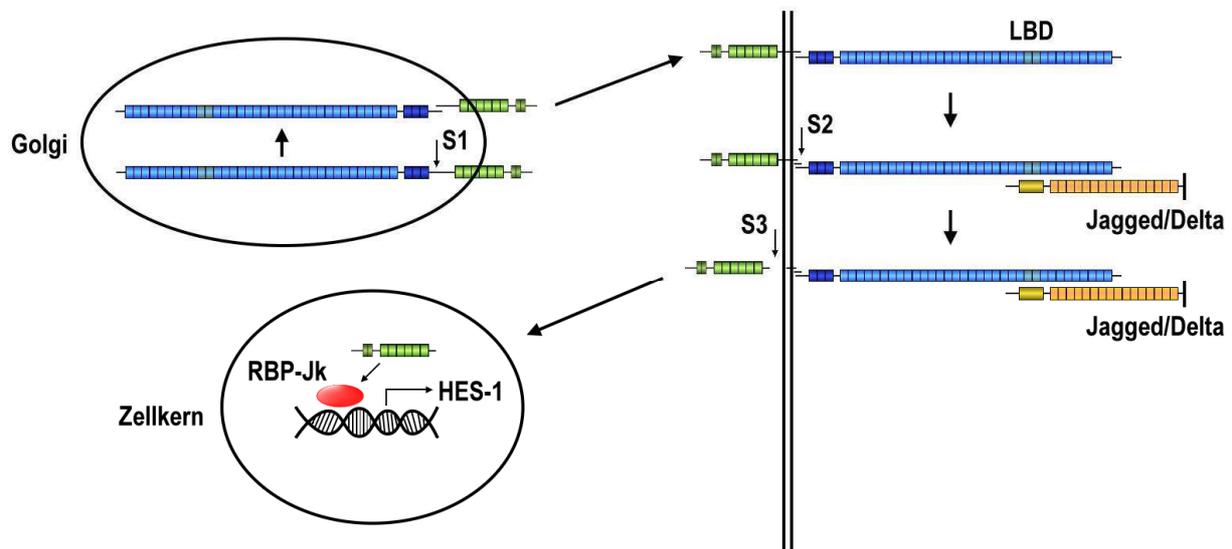
## 1.2.2 Notch3-Signaltransduktion

Während seiner Reifung und Aktivierung unterliegt der Notch3-Rezeptor drei proteolytischen Spaltungen. Die erste Spaltung (**S1**) erfolgt im Trans-Golgi-Netzwerk durch eine Furin-ähnliche Protease, woraufhin der Rezeptor als Heterodimer an die Zelloberfläche transportiert wird (Logeat et al. 1998).

An der Zelloberfläche interagiert der Rezeptor mit den Liganden Delta und Serrate/Jagged. Dies resultiert in einer zweiten proteolytischen Spaltung (**S2**), die durch eine Metalloprotease bewerkstelligt wird (Mumm et al. 2000).

Hierdurch wird ein Presenilin/ $\gamma$ -Secretase-Komplex freigesetzt, der die dritte proteolytische Spaltung induziert (**S3**). Die intrazelluläre Domäne kann daraufhin in den Zellkern translozieren und durch Interaktion mit dem RBP-Jk-Transkriptionsfaktor

Notch-Zielgene, wie beispielsweise Hairy-enhancer of split-Gene (HES), aktivieren (Artavanis-Tsakonas et al. 1999; Weinmaster 2000); (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Prozessierung des Notch3-Rezeptors**

Das Notch3-Rezeptor-Vorläuferprotein wird proteolytisch im Trans-Golgi-Netzwerk gespalten (S1) und als Heterodimer an die Zelloberfläche transportiert. Nach Ligandenbindung (Jagged/Delta) erfolgen zwei weitere proteolytische Spaltungen (S2 und S3), die die Intrazellulärdomäne freisetzen. Diese transloziert daraufhin in den Zellkern und aktiviert mit dem Transkriptionsfaktor RBP-Jk Notch3-Zielgene (z.B. HES-1-Gene).

### 1.2.3 Mutationsspektrum bei CADASIL

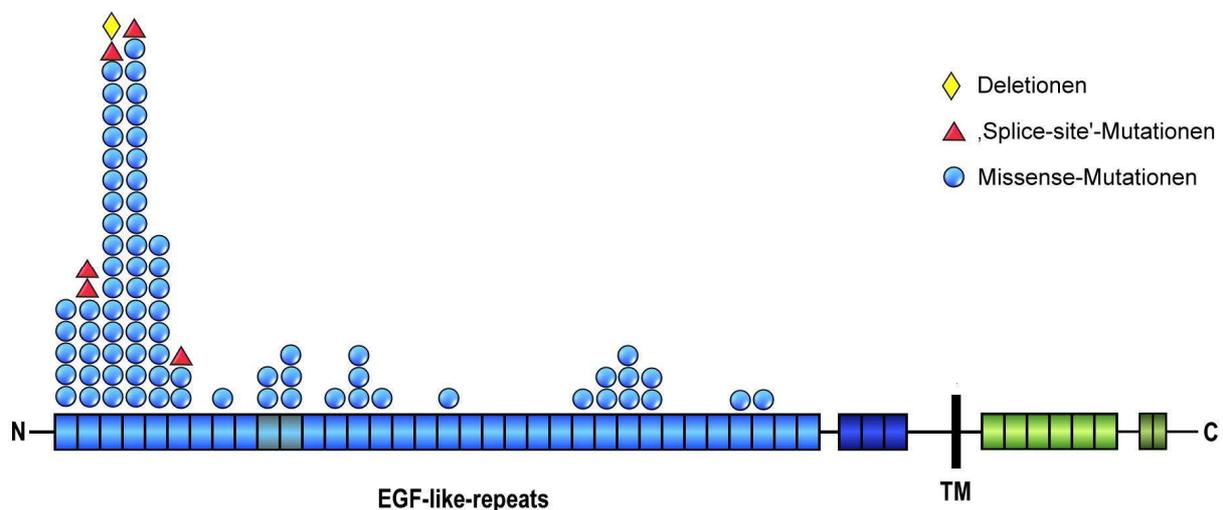
Es wurden seither über 100 verschiedene Mutationen bei CADASIL beschrieben. Alle Mutationen befinden sich innerhalb der 34 EGF-like-repeats der Extrazellulärdomäne. Die Mehrzahl dieser Mutationen treten in Exon 3 und 4 auf. 90 % aller Mutationen lassen sich auf die Exons 2 bis 6 einschränken (Peters et al. 2005; Joutel et al. 1997).

Das Mutationsspektrum umfasst zu 95 % Missense-Mutationen, daneben treten Deletionen, „Splice-site“-Mutationen und Polymorphismen auf (Abbildung 5). Alle Mutationen führen zu einer ungeraden Anzahl an Cysteinresten innerhalb eines EGF-like-

repeats. So werden aus sechs Cysteinresten beispielsweise fünf oder sieben. Da Cysteinreste Disulfidbrücken vermitteln, wurde postuliert, dass die entstehenden freien Cysteinreste die Bildung von Homodimeren und/oder Heterodimeren mit anderen Proteinen, die freie Cysteinreste enthalten, begünstigen könnten (Federico et al. 2005; Dichgans et al. 2001; Dichgans et al. 2000).

Desweiteren konnte belegt werden, dass die verschiedenen Mutationen bei CADASIL unterschiedliche Effekte auf die Ligandenbindung und Signaltransduktion haben. Mutationen innerhalb der postulierten Ligandenbindungsdomäne (EGF-like-repeat 10/11) führen zu einer reduzierten Signalgebung. Bei Mutationen außerhalb der Ligandenbindungsdomäne war die Signaltransduktion unbeeinträchtigt (Peters et al. 2004b; Joutel et al. 2004).

Einige Mutationen führten zu einer veränderten Prozessierung des Notch3-Rezeptors auf Höhe der ersten proteolytischen Spaltung (S1), was durch eine erhöhte Ratio zwischen dem unprozessierten 280-kDa Vollängenrezeptor und dem S1-gespaltenen Fragment evident wurde (Peters et al. 2004b; Karlstrom et al. 2002).



**Abbildung 5: Mutationsspektrum bei CADASIL**

Abbildung der bislang identifizierten Mutationen bei CADASIL Patienten. Die Positionen der CADASIL Mutationen des Notch3-Proteins wurden summiert. CADASIL Mutationen finden sich nur in den 34 EGF-like-repeats der Extrazellulärdomäne mit einer starken Konzentration auf den N-Terminus des Notch3-Proteins (Grafik modifiziert nach (Wang et al. 2008)).

## **1.2.4 Vorstellungen zur Pathogenese von CADASIL**

### **1.2.4.1 Pathogenese auf physiologischer Ebene**

Die beschriebenen Gefäßveränderungen bei CADASIL führen nicht zu Stenosen oder Okklusionen des Gefäßlumens. Dennoch lassen sich die auftretenden cerebralen ischämischen Läsionen durch hämodynamische Veränderungen erklären. Einige Studien belegen einen reduzierten basalen Blutfluss und eine reduzierte cerebrovasculäre CO<sub>2</sub>-Reaktivität sowie einen verminderten Glukoseverbrauch bei CADASIL Patienten (Pfefferkorn et al. 2001; Chabriat et al. 2000; Auer et al. 2001). Es konnte belegt werden, dass der basale Blutfluss mit der kognitiven Beeinträchtigung und dem Grad der Behinderung bei CADASIL Patienten negativ korreliert (Bruening et al. 2001).

Desweiteren könnte die Veränderung und Degeneration von Perizyten, die bei CADASIL auftritt, zu einer Abnahme der Gefäßpermeabilität führen. Da Perizyten und glatte Gefäßmuskelzellen den vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) ausschütten, der einen potenter Aktivator der Gefäßpermeabilität darstellt, führt die Degeneration von Perizyten zu einer Abnahme der VEGF-Ausschüttung und damit zu einer Verminderung der Gefäßpermeabilität (Ruchoux et al. 2002). Dies könnte eine weitere Ursache für die Leukoenzephalopathie bei CADASIL darstellen.

### **1.2.4.2 Pathogenese auf molekularer Ebene**

Bislang konnte noch nicht geklärt werden, welcher molekulare Mechanismus die für CADASIL typischen Gefäßveränderungen wie die Degeneration von glatten Gefäßmuskelzellen oder die Akkumulation der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors an der Zelloberfläche von glatten Gefäßmuskelzellen verursacht.

Es wird derzeit diskutiert, welchen Einfluss CADASIL-Mutationen auf die Funktion des Notch3-Rezeptors ausüben könnten. Dabei müssen drei verschiedene Mechanismen in Betracht gezogen werden: „loss of receptor function“, „gain of receptor function“ und neomorphe (z.B. toxische) Effekte.

Nach aktueller Studienlage führen CADASIL-Mutationen nicht zu einem „loss of receptor function“. Studien mit Notch3-Knock-out Mäusen konnten belegen, dass Notch3-Knock-out Mäuse im Gegensatz zu klassischen transgenen Mäusen keine CADASIL-typischen Gefäßveränderungen entwickeln (Ruchoux et al. 2003; Krebs et al. 2003). Überdies konnte mit Hilfe einer transgenen CADASIL-Maus gezeigt werden, dass die für CADASIL typische Mutation R90C *in vivo* nicht zu einer Beeinträchtigung der Notch3-Rezeptor-Funktion führt (Monet et al. 2007).

Darüberhinaus wurden eine Reihe von verschiedenen CADASIL-Mutationen in Bezug auf eine Beeinträchtigung der Notch3-Signaltransduktion *in vitro* untersucht. Bei der Mehrzahl dieser Mutationen war die Notch3-Signaltransduktion ebenfalls unverändert. Somit scheinen „loss of receptor function“ und „gain of receptor function“ eher unwahrscheinliche molekulare Mechanismen für die Entstehung von CADASIL darzustellen (Haritunians et al. 2002; Haritunians et al. 2005; Joutel et al. 2000; Joutel et al. 2004; Karlstrom et al. 2002; Peters et al. 2004b; Low et al. 2006).

Vielmehr lassen sich CADASIL-Mutationen mit einem neomorphen Effekt vereinbaren. Hierbei spielen homophile Interaktionen zwischen Notch3-Rezeptoren eine zentrale Rolle. Es wird diskutiert, ob Oligomere der Extrazellulärdomäne einen toxischen Effekt auf glatte Gefäßmuskelzellen ausüben und so zu deren Degeneration führen könnten. Darüberhinaus könnte die Akkumulation der Notch3-Extrazellulärdomäne einen dominant negativen Effekt auf die Notch3-Signaltransduktion ausüben, indem Notch3-Oligomere durch kompetitive Hemmung des Liganden oder eine Absonderung des Liganden die Ligandenbindung beeinträchtigen. Ferner könnte die Akkumulation der Notch3-Extrazellulärdomäne den physiologischen Transportweg und Abbau des Notch3-Rezeptors beeinflussen.

Welche dieser Hypothesen am wahrscheinlichsten ist, wird am Ende dieser Arbeit unter Einbeziehung der Ergebnisse diskutiert werden.

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

CADASIL stellt die häufigste monogen vererbte Ursache von Schlaganfällen dar. Die Erkrankung manifestiert sich häufig schon in jungen Jahren mit schwerwiegenden Symptomen und verläuft nicht selten rapid progredient. Der genaue Pathomechanismus der Erkrankung konnte bislang noch nicht entschlüsselt und damit auch keine entsprechenden kausalen Therapiekonzepte entwickelt werden.

Es gibt Hinweise dafür, dass CADASIL-Mutationen zu einem neomorphen Effekt führen. Insbesondere die Akkumulation der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors an der Zelloberfläche von glatten Gefäßmuskelzellen spielt hierbei eine zentrale Rolle (Joutel et al. 2000).

Demzufolge wurde diese Arbeit auf den Aspekt der Oligomerisierung der Notch3-Extrazellulärdomäne fokussiert. Da aus der Literatur bereits bekannt war, dass Notch1-Rezeptoren die Fähigkeit zur Dimerisierung besitzen (Kidd et al. 1989; Sakamoto et al. 2005), stellt sich die Frage, ob auch Notch3-Rezeptoren Oligomere ausbilden können.

Zielsetzung dieser Arbeit ist folglich CADASIL-mutiertes Notch3 und Wildtyp-Notch3 in Bezug auf die Fähigkeit zur Oligomerisierung der Extrazellulärdomäne des Rezeptors zu untersuchen. Um diese homophilen Interaktionen aufzudecken, soll zunächst eine Methode etabliert werden, mit deren Hilfe Notch3-Proteine in Monomere und Dimere aufgetrennt werden können. Falls sich Dimere detektieren lassen, wird durch eine Quantifizierung untersucht, ob ein Unterschied im Akkumulationsverhalten der Extrazellulärdomäne von Wildtyp-Notch3 und mutiertem Notch3 besteht.

Anschließend wird unter Einbeziehung der bestehenden Hypothesen diskutiert, welche Bedeutung die Ergebnisse dieser Arbeit für die molekulare Pathogenese von CADASIL haben.

## 2 Geräte und Materialien

### 2.1 Allgemeine Ausrüstung

Blot-Kammer	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad Laboratories, München, Germany
Blot-Papier	extra thick Blot Paper, Protean xi size, BioRad Laboratories, München, Germany
Entwicklungsmaschine	Agfa Scopix LR5200, Agfa Gevaert N.V., Mortsel, Belgium
Eppendorfröhrchen	Vmax [ml]: Safe-Lock 0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml, Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany
Film	BioMax MR Film MR-1, Kodak Industries, Chalon-sur-Saône, France
Gradient Master	Model 106, BioComp Instruments, Fredericton, Canada
Küvetten	Quartz spectrophotometer cell micro, BioRad Laboratories, München, Germany
PCR tubes	Thermo-Fast® 96 PCR Plates, PEQLAB, Erlangen, Germany
Pipetten	Pipetman P2, P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, France
Pipettenspitzen	Safeseal Tips Premium 10 µl, 200 µl, 1000 µl, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Germany, epT.I.P.S. 10 µl, 200 µl, 1000 µl, Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany
pH-Meter	pH-Digi 520, Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten &Co KG (WTW), Weilheim, Germany
Photometer	Gene Quant II RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany

Refraktometer	2WAJ Carl Zeiss, Jena, Germany
Rotor	SW41 Ti, Beckman Coulter, Krefeld, Germany
Schüttler	KM-2, Edmund Bühler GmbH & Co., Bodelshausen, Germany
Software	Ascent Software for Multiscan RC, Thermo Labsystems, Helsinki, Finland  AIDA (Advantage Image Data Analyzer) 3.50, raytest, Straubenhardt, Germany
Thermoblock	Block Heater, Stuart Scientific, Redhill in Surrey, UK
Transfer-Membran	Immobilon TM PVDF 0.45 µm, Millipore, Schwalbach, Germany
Tubes	Falcon® BLUE MAX™ 50 ml Polypropylene Clonical Tube, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Ultrazentrifugenröhrchen	14x89 mm, Beckman Coulter, Krefeld, Germany
Waage	GX-400, AND A&D Weighing, Bradford, USA
Wippe	Mini Rocker MR1, Peqlab Biotechnology, Erlangen, Germany
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415R, Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany  Ultracentrifuge Optima L-90K, Beckman Coulter, Krefeld, Germany

## 2.2 Zellkultur Ausrüstung

6-well	BD Falcon TM Multiwell Cell Culture Plates, Becton Dickinson; Franklin Lakes, USA
Haemocytometer	Neubauer improved, LO-Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Germany
Inkubator	HERAcell®150, Heraeus Instruments GmbH, Fellbach, Germany
Sterilbank	HERAsafe HS18, Heraeus Instruments GmbH, Fellbach, Germany
Zellkulturflaschen	75 cm <sup>2</sup> , PS, gammasterilisiert, Corning B.V., Schiphol-Rijk, Netherlands

## 2.3 Gele, Puffer , Lösungen

### 2.3.1 Zellkultur

<u>HEK293-Medium</u>	DMEM (+4500 mg/l Glucose+Glutamax+Pyruvat)	
	Fetal Bovine Serum	10 %
	Penicillin/Streptomycin	100 mg/l
<u>Transfektionsmedium</u>	Optimem (+Glutamax)	
<u>PBS (10x)</u>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	14,8 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3 g
	NaCl	90,0 g
	Aqua purificata	ad 1000 ml

### 2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

<u>Laemmli-Puffer (5x)</u>	Tris	375 mM
	Glycerin 100 %	30 %
	SDS	6 %
	β-Mercaptoethanol	5 %
	Bromphenolblau	0,03 %
<u>„4 x Lower Tris“</u>	Tris Base	181,7 g
	SDS 10 %	40 ml
	Aqua purificata	ad 1000 ml
	pH 8,8	
<u>„4 x Upper Tris“</u>	Tris Base	60,6 g
	SDS 10 %	40 ml
	Aqua purificata	ad 1000 ml
	pH 6,8	
<u>Trenngel 5 %</u>	4 x Lower Tris	3,75 ml
	H <sub>2</sub> O	8,55 ml
	Acrylamid	2,50 ml
	APS 10 %	125 µl
	TEMED	12,5 µl
<u>Sammelgel 5 %</u>	4 x Upper Tris	1,7 ml
	H <sub>2</sub> O	4,9 ml
	Acrylamid	925 µl
	APS 10 %	75 µl
	TEMED	7,5 µl

<u>“10 x Running Buffer”</u>	Tris Base	30 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	Aqua purificata	ad 1000 ml
<u>Blotpuffer</u>	Tris-Base	3,03 g
	Glycin	14,4 g
	Methanol	200 ml
	Aqua purificata	ad 1000 ml
<u>10 x TBST</u>	Tris HCl 1 M Lsg.	100 ml
	NaCl 5 M Lsg.	300 ml
	Tween 20	10 ml
	Aqua purificata	ad 1000 ml
<u>10 x PBS</u>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	14,8 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3 g
	NaCl	90,0 g
	Aqua purificata	ad 1000 ml

### 2.3.3 Dichtezentrifugation

<u>DDO-Lyse-Puffer</u>	Tris HCl	50 mM
	NaCl	200 mM
	DDO	0,5 %
	pH 8,0	
<u>Sucroselösung</u>	Sucrose	15 % bzw. 55 %
	DDO	ad 50 ml

<u>Spüllösung</u>	DDO	1 ml
	SDS	2 %

### 2.3.4 Molekularbiologische Methoden

<u>LB-Medium</u>	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
<u>Agarplatten</u>	+Agar	15 g/l

Nach dem Autoklavieren wurde 100 µl/l Ampicillin hinzugefügt.

<u>TBE-Puffer (10x)</u>	Tris-HCl	109,9 g
	Borsäure	55,0 g
	EDTA	9,3 g
	pH 8,3-8,5	

<u>Ladepuffer "Blue Juice"</u>	H <sub>2</sub> O	8,0 ml
	Glycerin	20,0 ml
	EDTA (0,5 M pH 8)	8,0 ml
	SDS 1 %	4,0 ml
	Bromphenolblau	20,0 mg
	Xylencyanol	20,0 mg

## 2.4 Chemikalien, Kits, Antikörper

### 2.4.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Ampicillin	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Bacto Trypton	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Bromphenolblau	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Coomassie® Brilliant Blue G250	SIGMA, Deisenhofen, Germany
DMEM	Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, Germany
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Ethanol	Merck Bioscience GmbH, Schwalbach, Germany
Ethidiumbromid	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Fetal Bovine Serum	Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, Germany
Frischhaltefolie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Glycerol BioChemikaUltra	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Glycin	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Isopropanol	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Kaliumacetat	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Kaliumchlorid	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Kaliumhydroxid	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany

---

LE Agarose Sea Kem®	Cambrex Bio Science, Rockland, USA
Lipofectamin™ Transfection Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche Diagnostic, Mannheim, Germany
Magermilchpulver «Naturaflo»	Töpfer GmbH, Dietmannsried, Germany
β-Mercaptoethanol	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Methanol	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
N, N-Dimethyldodecylamine-N-oxide	FLUKA BioChemika, Buchs, Switzerland
Natriumacetat	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Natriumchlorid	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Natriumhydroxid	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Nonidet P40	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Optimem	Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, Germany
Penicillin	Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, Germany
Plus Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Precision Plus Protein™	BioRad Laboratories, München, Germany
Proteaseinhibitor «Complete Mini»	Roche Diagnostic, Mannheim, Germany
Restrictionsenzyme+Puffer	New England Biolabs, Beverly, USA
SDS	Sigma, Deisenhofen, Germany
Select Agar	Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, Germany
Select Yeast Agar	Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, Germany

Streptomycin	Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, Germany
Sucrose	Calbiochem, La Jolla, USA
TEMED	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Trichloressigsäure	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Germany
Trizma Base	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Triton-X-100 SigmaUltra	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Trypan blue	Carl Roth KG, Karlsruhe, Germany
Trypsin-EDTA	Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, Germany
Tween 20	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Xylencyanol	Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg, Germany

#### **2.4.2 Kits**

BCA™ Protein-Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
HiSpeed Pasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Germany

### 2.4.3 Antikörper

#### Primärantikörper:

Name	Verdünnung	Epitop	Spezies	Typ	Hersteller
A-V5-AK	1:2000	GKPIPPELLGLDST	Maus	monoclonal IgG2a	Invitrogen

#### Sekundärantikörper:

Name	Verdünnung	Spezies	Hersteller
Polyclonal Goat anti mouse Ig	1:2000	Ziege	DakoCytomation P0447

### 2.5 Verwendete Zellen

Name	Organismus	Gewebe
HEK293-Zellen	Menschliche zellen	Embryonal- Niere

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

#### 3.1.1 Kultivierung, Passagierung und Zellzählung von HEK293-Zellen

Die Kultivierung der HEK293-Zellen erfolgte in ihrem Medium (12 ml) in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator. Abhängig von ihrer Ausgangsdichte wuchsen die Zellen innerhalb von 3-4 Tagen bis zur Konfluenz.

Zum Passagieren wurden die Zellen in 10 ml vorgewärmtem PBS gewaschen und durch vorsichtiges Klopfen vom Boden der Kulturflasche gelöst. Diese Zellsuspension wurde je nach Bedarf in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 aufgeteilt und in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt. Danach wurde für 5 min bei 1000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in vorgewärmtem Vollmedium resuspendiert.

Vor dem Ausplattieren wurde die Zellzahl der Suspension in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit Medium verdünnt und anschließend 10 µl dieser Dilution mit 10 µl Trypanblau versetzt. Lebende Zellen können den Farbstoff aktiv ausschließen, abgestorbene Zellen dagegen erscheinen blau. Auf diese Weise können tote Zellen bei der Zählung ausgeschlossen werden.

Von dieser Zellsuspension wurden wiederum 10 µl in die Neubauer Zählkammer pipettiert. Jedes Eckquadrat hat ein Volumen von 0,1 µl. Unter dem Mikroskop erfolgte die Bestimmung der Zellzahl in den vier großen Eckdquadraten unter Bildung des Mittelwertes. Bei der Auszählung eines Quadrats wurden nur die Zellen auf zwei Grenzlinien (links und oben) mitgezählt, die Zellen auf den beiden anderen Grenzlinien wurden nicht berücksichtigt. Zur Ermittlung der Zellkonzentration wurde folgende Formel verwendet :

$$\text{Zellkonzentration/ml} = \frac{\text{mittlere Zellzahl pro Quadrat} \times 10^5}{10^6} \times 10^6$$

Dann wurde die benötigte Zellmenge mit Vollmedium aufgefüllt und auf die Kulturflaschen verteilt. Ein gleichmäßiges Wachstum wurde durch gründliches Mischen gewährleistet. Anschließend wurden die Flaschen wieder zur Kultivierung in den Inkubator gestellt.

### 3.1.2 Transiente Transfektion

Mindestens 24 Stunden nach dem Ausplattieren bzw. bei einer Konfluenz von 70-90 % wurde das Vollmedium verworfen und die Zellen mit zusatzfreiem Medium (Optimem) gewaschen. Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamin™/Plus nach folgendem Schema :

**A :**

	6-well (9,6 cm <sup>2</sup> )	75 cm <sup>2</sup> Flasche
Optimem/well	100	800 µl
Plus Reagenz/well	6	48 µl
DNA/well	1	8 µg

**B :**

Optimem/well	100	800 µl
Lipofectamin/well	8	64 µl

Beide Gemische wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurde B zu A pipettiert. Nach kurzem Vortexen wurde das Gemisch erneut für 15 min inkubiert. Daraufhin wurden jeweils 0,8 ml Optimem in das 6-well und 6,4 ml in die große Flasche vorgelegt und das Gemisch auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 3 Stunden inkubiert. Dann wurde das Optimem abgenommen und Vollmedium hinzugegeben.

### **3.1.3 Ernte der transfizierten Zellen**

Die Ernte der Zellen erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. Hierzu wurde das Medium verworfen und die Zellen mit PBS gespült. Durch vorsichtiges Klopfen wurden die Zellen in PBS gelöst und in 1 ml Portionen auf Eppendorfröhrchen verteilt. Nach der Zentrifugation (7000 U/min, 15 min, 4 °C) wurde das PBS abgesaugt und verworfen. Zur Konservierung wurden die Zellpellets bei -80 °C eingefroren.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Retransformation**

Kompetente transformierte E.coli wurden bei -80 °C stammkonserviert. Zur Retransformation ließ man diese auf Eis auftauen. Nach kurzem Zentrifugieren versetzte man die Bakterien mit 200 ng DNA und inkubierte für 30 min auf Eis, so dass sich die DNA an die Zellen anlagern konnte.

Durch einen 30-sekündigen Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad wurde die Aufnahme der DNA in die Zelle gewährleistet. Nach ebensolanger Inkubation auf Eis wurden 200 µl SOC-Medium hinzugefügt und das Gemisch unter Schütteln (200 U/min) bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert.

Anschließend erfolgte die Ausplattierung auf antibiotikahaltige Agarplatten, die zuvor mit 200 µl SOC-Medium versetzt worden waren. Inkubiert wurde für 12-16 Stunden bei 37 °C.

### **3.2.2 Präparation von Plasmid DNA in großem Maßstab (Maxi Prep)**

Für einen Maxi-Prep-Ansatz wurde eine Kolonie der Agarplatte mit 150 ml antibiotikahaltigem LB-Medium (Ampicillin 1:1000) versetzt und bei 37 °C, 220 U/min für 16-20 Stunden inkubiert.

Die Bakterien in der Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (4000 U/min, 10 min, 4 °C). Die Lyse des Pellets und die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des HISpeed Plasmid Maxi Kits (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers. Das Prinzip beruht auf alkalischer Zellyse und Ausfällung von Proteinen, genomischer DNA und anderen Zellbestandteilen. Der Zelldebridus wird von einem Filter abgefangen, während die Plasmid DNA von der Säule eluiert und mit 0,7 Volumenanteilen Isopropanol ausgefällt wird. Nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol wurde die DNA nach Trocknung in 800-1000 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.2.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA-Lösungen wurde durch Messung der UV-Absorption bei 260 nm bestimmt (= Absorptionsmaximum des DNA-Spektrums). Es gilt folgende Formel :

$$c_{\text{DNA}} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = A_{260 \text{ nm}} \times 50 \text{ (DNA - Extinktionskoeffizient)} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zusätzlich wurde die DNA-Qualität bestimmt, die insbesondere von der Verunreinigung durch Proteine beeinflusst wird. Hierbei wird der Absorptionsquotient (Q) bestimmt, der sich aus den Absorptionswerten bei 260 nm und 280 nm (Maximum des Spektrums von aromatischen Aminosäuren in Proteinen) ergibt. Es gilt:

$$Q = (A_{260 \text{ nm}} - A_{320 \text{ nm}}) / (A_{280 \text{ nm}} - A_{320 \text{ nm}})$$

Für reine DNA-Lösungen liegt Q zwischen 1,7 und 2,0.

### 3.2.4 Restriktionsverdau

Zur Kontrolle der resynthetisierten Plasmide wurde ein Kontrollverdau mit Restriktionsendonukleasen angesetzt. Diese erkennen und spalten spezifische palindromische DNA-Sequenzen, so dass Fragmente bestimmter Länge herausfallen, die dann mittels einer Agarose-Gelelektrophorese charakterisiert werden können. Der Ansatz des Kontrollverdaus lautete wie folgt:

Plasmid-DNA	1 µg
Restriktionsenzym Xho I	0,25 µl
Restriktionsenzym Not I	0,25 µl
Puffer 10x	1,0 µl
BSA 10x	1,0 µl
Aqua	ad 10 µl

Inkubiert wurde über Nacht bei 37 °C.

### 3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der im Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Die DNA-Moleküle wandern hierbei in einem elektrischen Feld von der Kathode zur positiv geladenen Anode, da es zur elektrostatischen Anziehung zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und der Anode kommt

Es wurden jeweils 8 µl Probe mit 2 µl „Blue Juice“ vermischt und in die Geltaschen eines Agarosegels (1 % Agarose in TBE) pipettiert. Das Agarosegel wurde zuvor mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Als Laufpuffer diente der TBE-Puffer. Nach Anlegen der Spannung (80 V) wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente im UV-Licht detektiert (Ethidiumbromid, das mit der DNA interkaliert) und zur Dokumentation fotografiert.

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine wurde die SDS-PAGE eingesetzt. Hierbei überdeckt das anionische Detergenz SDS (sodium dodecyl sulfate) die Eigenladung von Proteinen, so dass negativ geladene Micellen entstehen. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben dann mit einem Überschuss an SDS auf 95 °C (oder 55 °C) erhitzt, so dass die Sekundär- und Tertiärstruktur durch Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen zerstört wird. Schwefelbrücken zwischen Cysteinen werden durch das reduzierende  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgespalten. Die so entstandenen ellipsoiden Micellen wandern im Polyacrylamid-Gel in einem linearen Bereich, so dass mit der Hilfe von Standards die Molekulargewichte der Proteine bestimmt werden können.

Für die Auftrennung von Notch3 eignet sich entsprechend des Molekulargewichts ein 5 %iges Trenngel. Zunächst wurden die Glasplatten mit Ethanol von Rückständen befreit. Dann wurde das Trenngel bis zu einer Höhe von ca. 3 cm unterhalb des oberen Glasrandes gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und das Gel mit Aqua dest. gereinigt. Anschließend wurde das Sammelgel bis zum oberen Glasrand eingegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt.

Nach vollständiger Aushärtung des Gels wurde das System des Gellaufs zusammengebaut und mit Running-Buffer gefüllt. Dann wurden die Kämmen vorsichtig entfernt, und die Taschen mit verdünntem Lämmli-Puffer gespült.

Zur Probenaufbereitung wurden die Pellets der zuvor in der Zellkultur transfizierten und geernteten Zellen (siehe 3.1.2) zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend mittels DDO-Lyse-Puffer unter Zugabe von Proteaseinhibitor lysiert.

Anschließend wurden entweder Supernatants oder Crude Lysates weiterverarbeitet. Bei den Crude Lysates handelt es sich um die Lysate, die unmittelbar nach der Lyse vorliegen. Sie bestehen aus den lysierten Bakterien mit ihrem Zellinhalt und dem gesamten Debris. Durch eine kurze Zentrifugation (5 min, 2000 U/min, 4 °C) wird nur der größte Debris abzentrifugiert. Die Supernatants entstehen durch stärkere Zentri-

fugation der Lysate (20 min, 14000 U/min, 4 °C). Hierbei wird der gesamte Zelldetritus sedimentiert und nur der Überstand weiterverarbeitet.

Nach der Zentrifugation erfolgte eine Proteinbestimmung der Lysate (siehe unten). Danach wurden die Proben mittels Lysepuffer auf ein einheitliches Volumen gebracht und mit 5x Lämmli-Puffer versetzt. Nach Erhitzen der Proben (5 min auf 55 °C) wurden die Taschen der Gele vorsichtig beschickt.

Für den Gellauf ließ man die Proben zunächst bei einer Spannung von 80 V in das Trenngel laufen, um die Spannung dann auf 120 V zu erhöhen. Als Größenmarker wurde der Precision Plus Protein™ Standards verwendet. Der Gellauf wurde beendet, wenn die Lauffront ca. 1 cm vor dem Unterrand der Glasplatte angekommen war.

### 3.3.2 Westernblot

Beim „Blotting“ mit der „Semi-Dry“-Methode werden die in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine über Elektrotransfer auf einen Träger (z.B. PVDF oder Nitrozellulose) übertragen und für die nachfolgende Immundetektion immobilisiert.

Hierzu wurde eine PVDF-Membran zunächst für 30 Sekunden in Methanol und anschließend ca. 10 Minuten in Blot-Puffer äquilibriert. Die auf die richtige Größe zurechtgeschnittenen Whatman-Papiere wurden ebenfalls in Blot-Puffer eingeweicht. Der Transferaufbau beinhaltete:

- Anodenplatte
- Whatman-Papier
- PVDF-Membran
- SDS-Polyacrylamid-Gel
- Whatman-Papier
- Kathodenplatte

Kleine Luftblasen wurden mittels einer Pipette durch vorsichtiges Rollen entfernt. Dann wurde für 60 min bei 25 V, 250 mA und 50 W geblottet.

### 3.3.3 Proteindetektion

Nach dem Proteintransfer erfolgte die Proteindetektion mittels Immundetektion und Chemilumineszenz. Hierzu wurde die PVDF-Membran zunächst für eine Stunde in 4 % Milchpulver/TBST blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper bei 4 °C über Nacht auf der Wippe.

Dann wurde die Membran 50 min lang unter leichten Schüttelbewegungen bei Raumtemperatur gewaschen. Alle 10 min wurde die Waschlösung erneuert. Daraufhin erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur, ebenfalls unter leichten Schüttelbewegungen.

Nach einem erneuten intensiven Waschgang, 5 mal 10 min in TBST und 30 min in PBS, konnte zur Sichtbarmachung der Banden mit der Chemilumineszenz begonnen werden. Hierzu wurde die PVDF-Membran nach Abgießen des letzten Waschschruttes für 5 min mit ca. 5 ml Lumi-light Reagenz (1:1 Gemisch aus Luminol/Enhancer und stabiler Peroxidlösung) überschichtet. Die dadurch entstehende Lichtemission wurde auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

### 3.3.4 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde das BCA™ Protein Assay Kit von Pierce verwendet. Dieses Verfahren beruht auf dem kolorimetrischen Nachweis eines Bicinchoninsäure/Cu<sup>+</sup> Farbkomplexes, der durch die reduzierende Wirkung von Proteinen auf Cu<sup>2+</sup>-Ionen und anschließender Inkubation mit Bicinchoninsäure entsteht. Die Absorption bei 562 nm verhält sich annähernd direkt proportional zur Proteinkonzentration.

Die Standardkurve wurde gemäß den Angaben des Herstellers angesetzt. Als Referenzprotein wurde BSA im Konzentrationsbereich 0-2 mg/ml genutzt.

### 3.4 Dichtezentrifugation über einen Sucrose Gradienten

#### 3.4.1 Probenvorbereitung, Ultrazentrifugation, Probengewinnung

Bevor die zu untersuchenden Zielproteine auf den Dichtegradienten geladen werden konnten, wurden die Zellpellets auf Eis aufgetaut und in DDO-Lysepuffer lysiert. Dann wurde für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 2000 U/min, 4 °C = Crude Lysates).

In der Zwischenzeit wurde der Gradient generiert. Hierzu wurden zunächst eine 15 %ige und eine 55 %ige Sucrose-Lösung hergestellt (Sucrose in DDO-Lysepuffer). Die 15 % Lösung wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegt, anschließend die höher konzentrierte Lösung mit einer Spritze vorsichtig unterschichtet und das Röhrchen luftblasenfrei verschlossen.

Als nächstes wurde der „Gradient Master“ mit den Ultrazentrifugenröhrchen bestückt. Das Programm bestand aus zwei Schritten:

1. 5:40 min/55%/30 Speed
2. 0:30 min/85%/08 Speed

Dann wurden die Proteinlysate vorsichtig auf den Dichtegradienten pipettiert, wobei für jede einzelne Probe ein eigener Gradient verwendet wurde. Nach sorgfältigem Austarieren der verschiedenen Gradienten wurde für 24 Stunden, 4 °C bei 222082 g zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Dichtegradient mit Hilfe einer Kanüle und einer Pumpe von apikal beginnend aus den Ultrazentrifugenröhrchen abgesaugt und in elf Proben zu 1 ml fraktioniert. Der Boden des Ultrazentrifugenröhrchens wurde als zwölfte Fraktion mit 1 ml DDO/2 % SDS sorgfältig gespült, um eventuelle Proteinablagerungen am Grund des Röhrchens nicht zu übersehen.

### 3.4.2 TCA-Fällung

Zur Reinigung der im Gradienten gesammelten Proben von der Sucrose-Lösung und zur Konzentrierung der niedrigen Proteinmenge in den einzelnen Fraktionen wurden die Proben mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Diese Methode beruht auf der Interaktion von präzipitierenden Agenzien (z.B. TCA) mit den in Lösung befindlichen Proteinen. Bei der Fällung mit TCA werden die Proteine irreversibel denaturiert.

Zunächst wurden die Proben auf Eis aufgetaut, ein Teil der Probe mit DDO-Lyse-Puffer verdünnt und TCA bis zu einer Endkonzentration von 10 % hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (13200 U/min, 4 °C, 30 min). Dann wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und es folgte ein Waschschriff mit 100 % eisgekühltem Aceton. Nach erneuter Zentrifugation (13200 U/min, 4 °C, 15 min) wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und die Proben offen bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur Vorbereitung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Pellets in DDO-Lyse-Puffer/5x Lämmli aufgenommen. Nach Einstellung des pH-Wertes unter Titration von 2 M Tris Base Lösung erfolgte die Resuspendierung der Proben auf dem Eppendorfschüttler (30 min, 40 °C). Anschließend wurden die Proben bei 55 °C aufgeköcht.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und der Western Blot wurden nach dem beschriebenen Protokoll durchgeführt (vgl. 3.3.1, 3.3.2).

### **3.4.3 Densitometrie**

Zur Quantifizierung der Proteinmenge in den einzelnen Banden der Western Blots wurde eine Dichtemessung mit Hilfe der AIDA Software vorgenommen. Hierzu wurden die einzelnen Western Blots digitalisiert und die zu bestimmenden Banden umrahmt. Das Programm bestimmt das Integral aus der Dichte der Bildpunkte über der festgelegten Fläche und korrigiert diesen Wert für die Bildpunkte des Hintergrundes. Je intensiver und größer eine Bande ist, desto höher ist auch der ermittelte Wert.

Nach Ermittlung der Intensitäten der spezifischen Banden wurden aus der Gesamtintensität aller Banden die relativen Anteile der Einzelbanden errechnet. Die Versuchsreihe bestand aus zehn Gradienten. Für die gleichen Konzentrationsbereiche wurde jeweils der Mittelwert aller Gradienten ermittelt und graphisch mittels Microsoft Excel 2007 dargestellt.

## 4 Ergebnisse

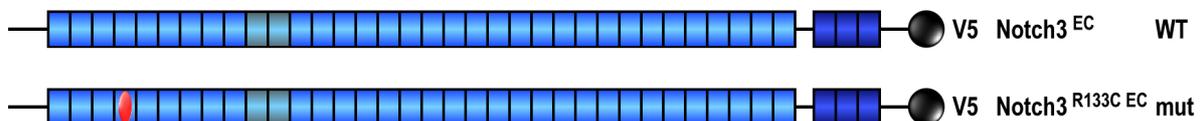
### 4.1 cDNA-Konstrukte

Der Notch3-Rezeptor unterliegt während seiner Reifung drei proteolytischen Spaltungen. Bei der ersten Spaltung (S1) im Trans-Golgi-Netzwerk entsteht aus dem Vorläuferprotein ein heterodimerer Rezeptor, bestehend aus einer Extrazellulärdomäne (210 kDa) und einer intrazellulären Domäne (97 kDa); (siehe Einleitung, Abbildung 4).

Da die Akkumulation der Extrazellulärdomäne von Notch3 an der Zelloberfläche von glatten Gefäßmuskelzellen offenbar eine zentrale Rolle in der Pathogenese von CADASIL spielt, wurde diese Arbeit auf den Aspekt der Oligomerisierung der Notch3-Extrazellulärdomäne fokussiert (Joutel et al. 2000).

Zur Untersuchung des Akkumulationsverhaltens von Notch3 wurde die entsprechende Plasmid-DNA zunächst transient in HEK293-Zellen transfiziert. Dabei wurden die im Labor konstruierten cDNA-Konstrukte von Wildtyp (WTS1) und Mutante R133C (mutS1) verwendet.

Zur Detektion der cDNA-Konstrukte sind diese am C-terminalen Ende mit dem V5-Epitop konjugiert. Dadurch lässt sich das Zielprotein durch den Einsatz von kommerziell erhältlichen V5-Antikörpern, die gegen das V5-Epitop gerichtet sind, spezifisch detektieren (Abbildung 6).

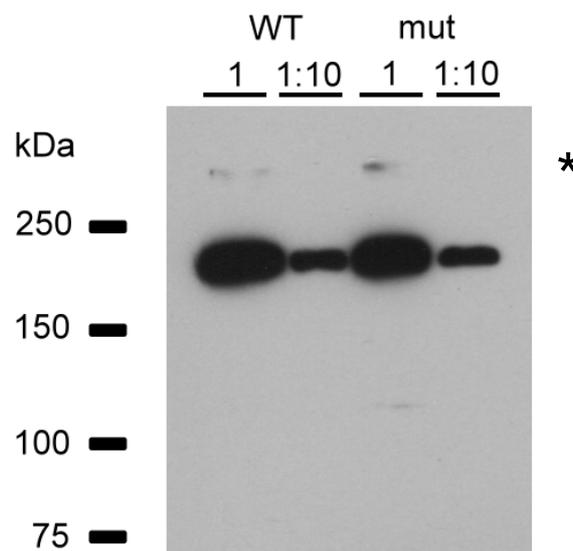


**Abbildung 6: Schematische Darstellung der cDNA-Konstrukte**

Darstellung der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors von Wildtyp (WT) und CADASIL-Mutation R133C (mut). Die hellblauen Kästchen repräsentieren die 34 EGF-like-repeats, EGF-like-repeat 10 und 11 stellen die Ligandenbindungsdomäne dar. Die dunkelblauen Kästchen stehen für die Notch/Lin-12 Sequenz. Bei dem mutierten Protein handelt es sich um eine Mutation im 4. EGF-like-repeat, dargestellt durch den roten Punkt. Beide cDNA-Konstrukte besitzen ein V5-Epitop am C-terminalen Ende.

## 4.2 Spezifischer Nachweis der Notch3S1 Expression

HEK293-Zellen wurden mit der entsprechenden cDNA transient transfiziert. Die Ernte erfolgte nach 24 Stunden. Der Nachweis der Expression der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors (Notch3S1) erfolgte im Western Blot mit Hilfe des V5-Antikörpers. Der V5-Antikörper bindet spezifisch an das V5-Epitop der im Labor konstruierten Notch3S1-Konstrukte. Die Extrazellulärdomäne von Notch3 zeigt bei Wildtyp und Mutante entsprechend ihres Molekulargewichts eine charakteristische Bande bei 210 kDa (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Spezifischer Nachweis von Notch3 WTS1 und mutS1 im Western Blot**

Im Western Blot lässt sich für WTS1 und mutS1 unter reduzierenden Bedingungen eine Bande bei 210 kDa detektieren. Aufgetragen wurden jeweils 10  $\mu$ l des Proteinlysates und eine 1:10 Verdünnung desselben. Der Nachweis erfolgte mittels V5-Antikörper. Dieser bindet spezifisch an das V5-Epitop der beiden cDNA-Konstrukte. (\*) Bereits unter reduzierenden Bedingungen zeigen sich bei WTS1 und mutS1 höhermolekulare Banden.

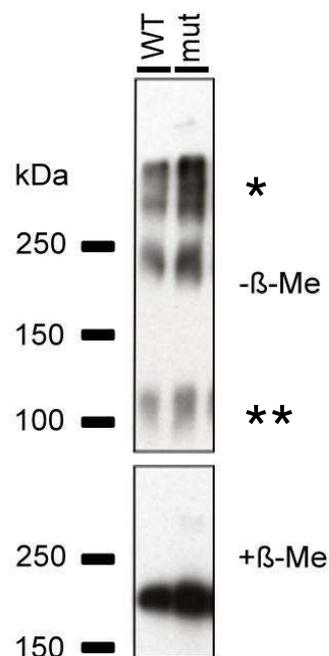
## 4.3 Nachweis höhermolekularer Banden von Notch3S1

Die mit WTS1 und mutS1 transfizierten und 24 Stunden nach Transfektion geernteten Zellen wurden unter verschiedenen Bedingungen lysiert. Für ein reduzierendes Milieu wurde  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -Me) hinzugefügt, für ein nicht-reduzierendes Milieu wurde  $\beta$ -Mercaptoethanol weggelassen.

Durch die unterschiedlichen Lysebedingungen lässt sich evaluieren, ob die Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors in einigen Milieus eine stärkere Tendenz ausbildet zu akkumulieren.

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE zeigten sich im Western Blot neben der zu erwartenden 210 kDa Bande bei WTS1 und mutS1 unter nicht-reduzierenden zusätzlich höhermolekulare Banden. Unter reduzierenden Bedingungen verschwanden die höhermolekularen Banden dagegen (Abbildung 8).

$\beta$ -Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten. Dadurch wird die Tertiärstruktur von Proteinen zerstört und Oligomere von Proteinen somit denaturiert.



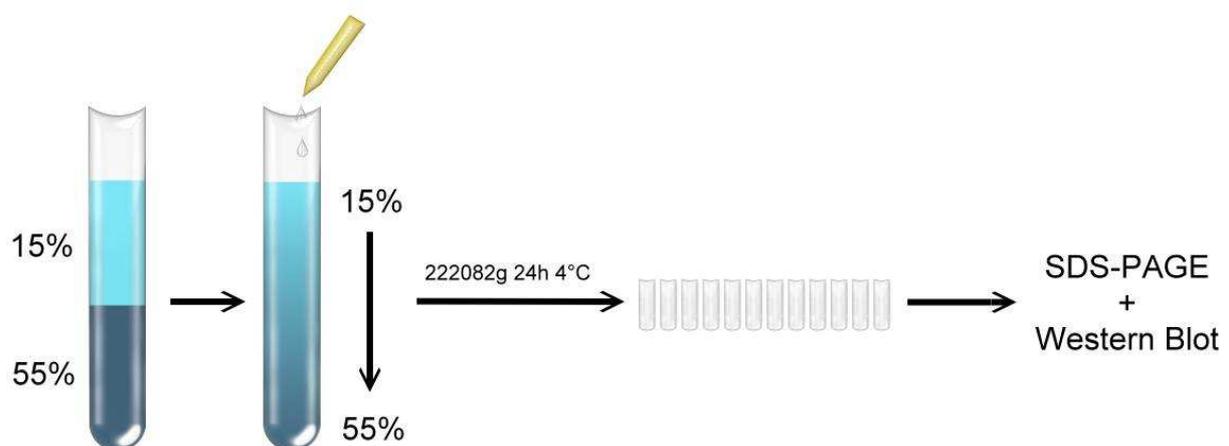
**Abbildung 8: Nachweis von höhermolekularen Banden im Western Blot**

Die transfizierten Zellen wurden unter reduzierenden (+ $\beta$ -Me) und nicht-reduzierenden (- $\beta$ -Me) Bedingungen lysiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot detektiert. Es zeigen sich unter nicht-reduzierenden Bedingungen sowohl bei WT als auch bei mut zusätzlich zur 210 kDa Bande höhermolekulare Banden (\*). Unter reduzierenden Bedingungen sind die höhermolekularen Banden nicht zu detektieren. (\*\*) Zusätzlich lässt sich unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine 100 kDa Bande bei WT und mut detektieren. Hierbei könnte es sich um eine intramolekulare Disulfidbrücke handeln, die in einer Konformationsänderung des Notch3-Proteins resultiert.

Tendenziell scheint das Signal der höhermolekularen Banden bei mutS1 stärker ausgeprägt zu sein. Daher sollten die höhermolekularen Banden quantifiziert werden, um diesen Unterschied im Akkumulationsverhalten der Extrazellulärdomäne von Wildtyp-Notch3 und mutierten Notch3 herauszuarbeiten. Hierzu wurde die Methode der Dichtezentrifugation über einen Sucrose-Gradienten etabliert.

#### 4.4 Etablierung der Dichtezentrifugation

Die Methode der kontinuierlichen Dichtezentrifugation über einen Sucrose-Gradienten wurde im Labor neu eingeführt. Das Prinzip besteht darin, aus unterschiedlich konzentrierten Sucrose-Lösungen einen kontinuierlichen Konzentrationsgradienten herzustellen, über den das zu untersuchende Protein ultrazentrifugiert wird. Anschließend werden die einzelnen Fraktionen gesammelt. Zur Detektion der Proteine in den jeweiligen Fraktionen eignet sich die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Dichtezentrifugation**

Zunächst wird ein kontinuierlicher Dichtegradient hergestellt. Die Konzentration nimmt von apikal nach basal zu. Nach Beladung des Gradienten mit dem Zielprotein erfolgt die Ultrazentrifugation. Dann werden von apikal beginnend die einzelnen Fraktionen gesammelt. Zur Detektion der Proteine in den Fraktionen wird die SDS-PAGE mit nachfolgendem Western Blot eingesetzt.

Durch die Ultrazentrifugation lassen sich Proteine anhand ihrer Dichte und Sedimentationsgeschwindigkeit voneinander trennen. Jedes Protein wird während der Zentrifugation in dem Dichtebereich stabilisiert, der seiner eigenen Dichte entspricht. Dadurch ist es möglich, Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts voneinander zu trennen.

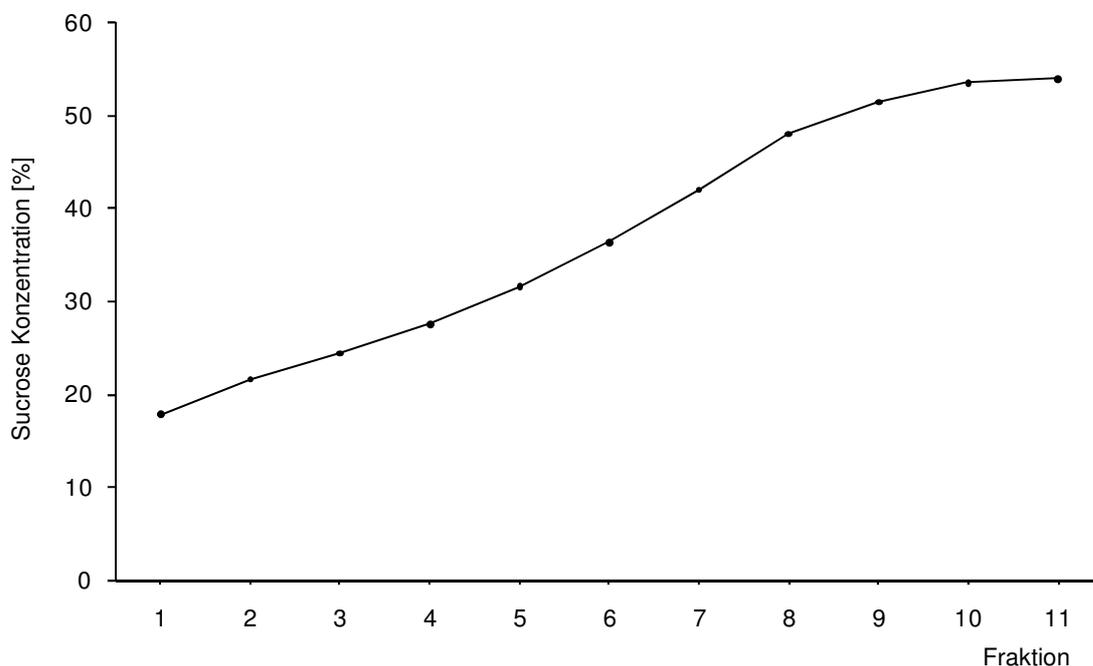
#### 4.4.1 Refraktionsmessung

Zur Evaluierung der Dichtezentrifugation bezüglich eines kontinuierlichen Anstiegs der Sucrose-Konzentration im Ultrazentrifugenröhrchen wurden Refraktionsmessungen der einzelnen Fraktionen durchgeführt. Hierdurch lässt sich die Qualität des jeweiligen Dichtegradienten beurteilen.

Mit dem Refraktometer nach Abbe wird der Grenzwinkel der Totalreflexion bestimmt, aus dem die Brechzahl einer Lösung hervorgeht. Diese Methode beruht darauf, dass die Brechzahl einer Sucrose-Lösung umso höher ist, je höher ihr Sucrosegehalt und damit die Dichte ist.

Bei dem hier verwendeten Abbe Refraktometer wurde die Sucrose-Konzentration direkt auf einer Skala abgelesen.

Als Qualitätskriterium bei der Beurteilung des Gradienten diene der monotone Anstieg der Sucrose-Konzentration (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Beispiel einer Refraktionsmessung eines Sucrose-Gradienten**

Für jede der 11 Fraktionen eines Sucrose Gradienten wurde mittels Refraktometer die Sucrose Konzentration gemessen und von links nach rechts aufgetragen. Es zeigt sich ein monotoner Anstieg der Konzentration über die 11 Fraktionen.

#### 4.4.2 Etablierung des Konzentrationsgradienten

Der Dichtegradient muss auf das jeweilige Zielprotein individuell abgestimmt werden. Um den verschiedenen Sucrose-Konzentrationen später die entsprechenden Molekulargewichte der Proteine zuordnen zu können, wurden Standardproteine bekannten Molekulargewichts eingesetzt.

Zur Herstellung eines geeigneten Dichtegradienten zur Analyse des Akkumulationsverhaltens der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors (N3S1), mit einem Molekulargewicht von 210 kDa, wurde zunächst mit unterschiedlichen Sucrose-Konzentrationen und den entsprechenden Standardproteinen experimentiert.

Als Standardprotein eignete sich zum einen Katalase, die ein Molekulargewicht von 223 kDa aufweist, entsprechend dem Molekulargewicht von N3S1. Zur Detektion von Dimeren der Extrazellulärdomäne, mit einem doppelt so großen Molekulargewicht, benötigte man zusätzlich einen Standard von ca. 420 kDa. Hierfür wurde Ferritin mit 440 kDa eingesetzt.

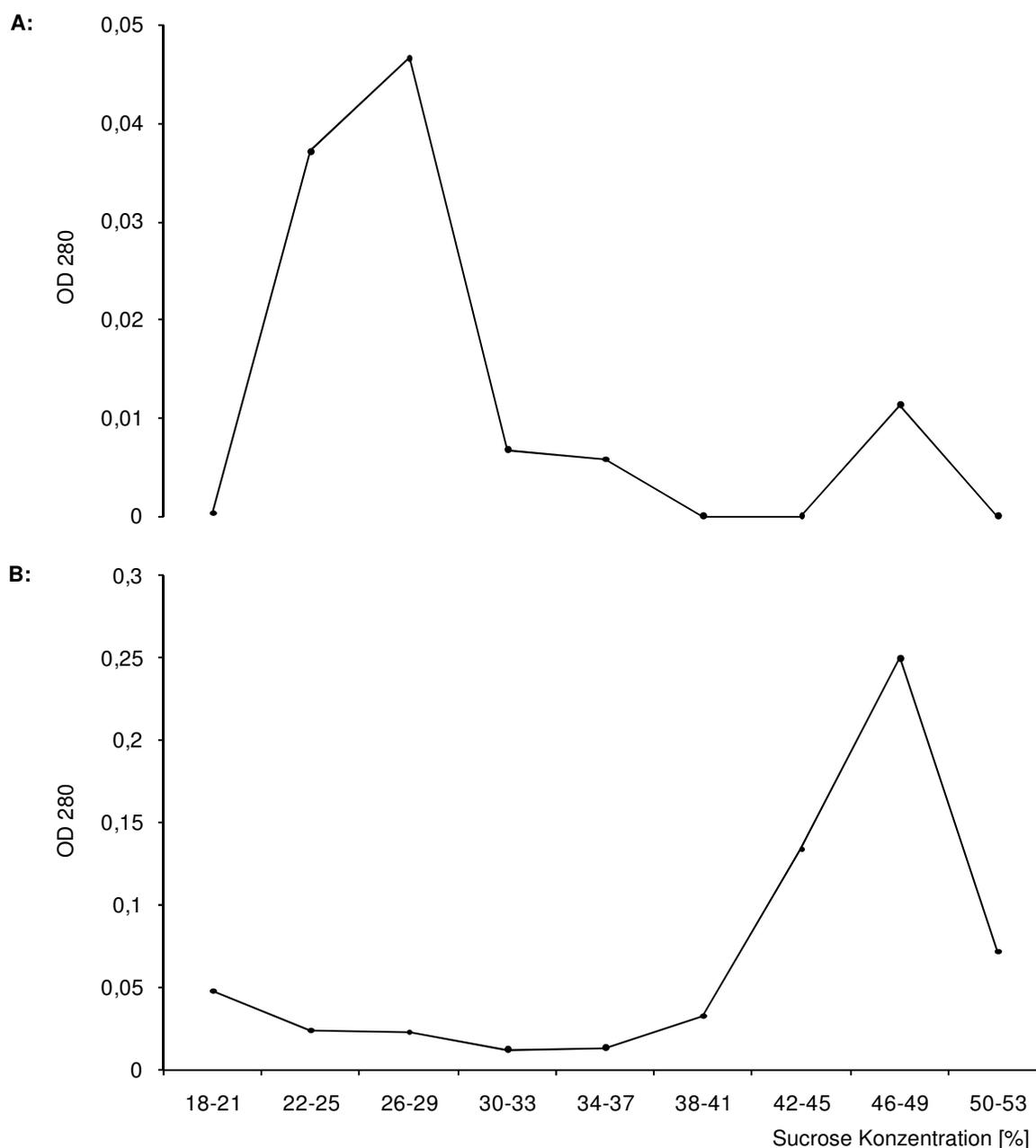
Zunächst wurden zwei Sucrose-Lösungen (Sucrose in DDO-Lyse-Puffer) unterschiedlicher Konzentration hergestellt. Die niedriger konzentrierte Lösung wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegt, anschließend die höher konzentrierte Lösung mit einer Spritze vorsichtig unterschichtet und das Röhrchen luftblasenfrei verschlossen.

Der Gradient wurde auf einem speziellen Gerät zur Ausbildung von Konzentrationsgradienten, dem „Gradient-Master“, unter Einstellung des jeweiligen Programms, entsprechend der Sucrose-Konzentrationen, ausgebildet.

Anschließend wurden Katalase und Ferritin vorsichtig auf den Dichtegradienten geladen und die Proben ultrazentrifugiert (222082 g, 4 °C, 24 h).

Nach der Ultrazentrifugation wurden jeweils 11 1ml-Fraktionen gesammelt. Zur Detektion der Proteinstandards wurde die optische Dichte bei 280 nm (Maximum des Spektrums von aromatischen Aminosäuren in Proteinen) photometrisch in den einzelnen Fraktionen gemessen.

Nach dem Experimentieren mit zahlreichen Sucrose-Konzentrationen stellte sich heraus, dass sich die Standardproteine bei einem Gradienten bestehend aus 15 %igen und einer 55 %igen Sucrose-Lösung optimal auftrennten. Katalase hatte einen Peak in der 3.-4. Fraktion, Ferritin in der 9. Fraktion (Abbildung 11).

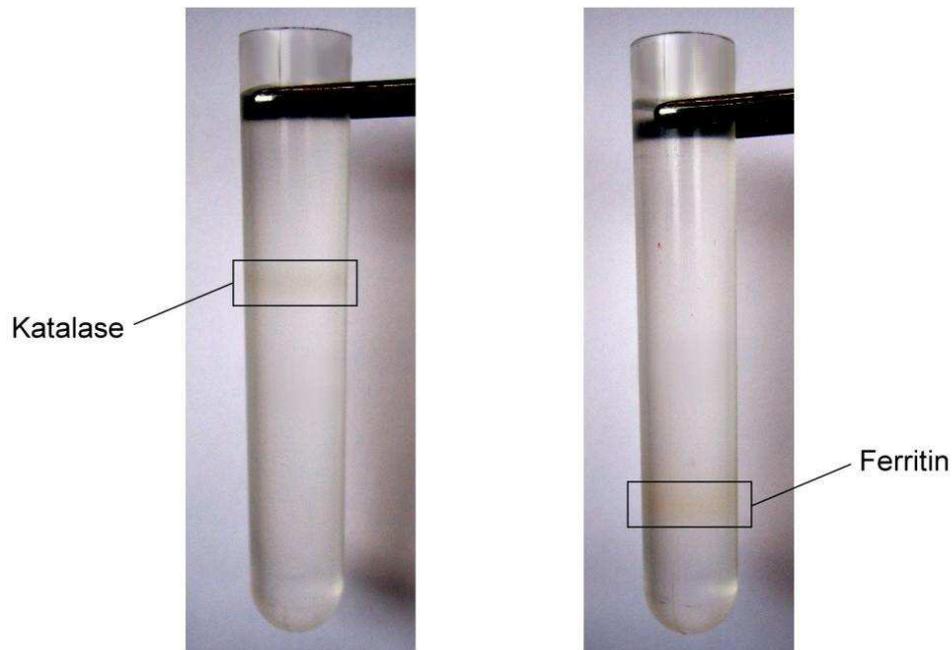


**Abbildung 11: Messung der Optischen Dichte von Katalase (A) und Ferritin (B)**

**A:** Messung der Optischen Dichte (OD) bei 280nm für jeden Konzentrationsbereich des Gradienten. Katalase zeigt ein Konzentrationsmaximum bei 22-29 %.

**B:** Messung der Optischen Dichte (OD) bei 280nm für jeden Konzentrationsbereich des Gradienten. Ferritin zeigt ein Konzentrationsmaximum bei 46-49 %.

Da Katalase in Lösung grün und Ferritin braun erscheint, lässt sich die Auftrennung der beiden Proteine im Gradienten auch optisch demonstrieren (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Auftrennung der Proteine im Dichtegradienten**

Die Sucrose Konzentration nimmt im Ultrazentrifugenröhrchen von apikal nach basal zu. Durch die Färbung der Proteine in Lösung lässt sich die Ansammlung der Proteine jeweils als schmaler Streifen erkennen. Katalase sammelt sich entsprechend seines niedrigeren Molekulargewichts weiter oben, Ferritin weiter unten im Zentrifugenröhrchen.

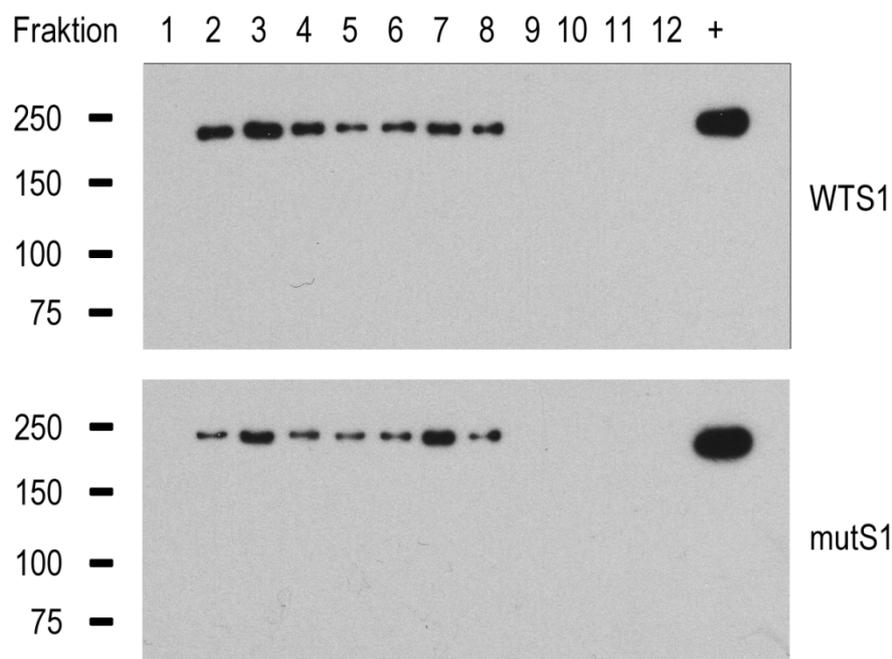
#### 4.5 Dimerisierung von Notch3S1

Zur Quantifizierung der im Western Blot unter verschiedenen Lysebedingungen detektierten höhermolekularen Banden von Notch3S1 WT und mut wurde die Dichtezentrifugation über den zuvor etablierten Sucrose-Gradienten durchgeführt. Es sollte das Akkumulationsverhalten der extrazellulären Domäne, insbesondere in Hinblick auf Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante, analysiert werden.

Dabei war zu erwarten, dass sich nach Ultrazentrifugation entsprechend des Molekulargewichts von Monomeren der Extrazellulärdomäne des N3-Rezeptors ein Kon-

zentrationmaximum im Bereich von 26–29 % zeigte. Dieser Bereich entsprach laut Standardkurve Proteinen von einem Molekulargewicht von 210 kDa.

Nach Ultrazentrifugation und Detektion der Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot ließ sich bei Wildtyp und Mutante das erwartete Konzentrationsmaximum bei 26–29 % detektieren. Zusätzlich zeigte sich ein zweites Konzentrationsmaximum im Bereich von 42–49 %. Hier sammeln sich Proteine mit einem Molekulargewicht von 420 kDa, entsprechend dem Molekulargewicht von Dimeren der extrazellulären Domäne des Notch3 Rezeptors. Es hat den Anschein, dass die Mutante stärker dazu tendiert, Dimere auszubilden (Abbildung 13).

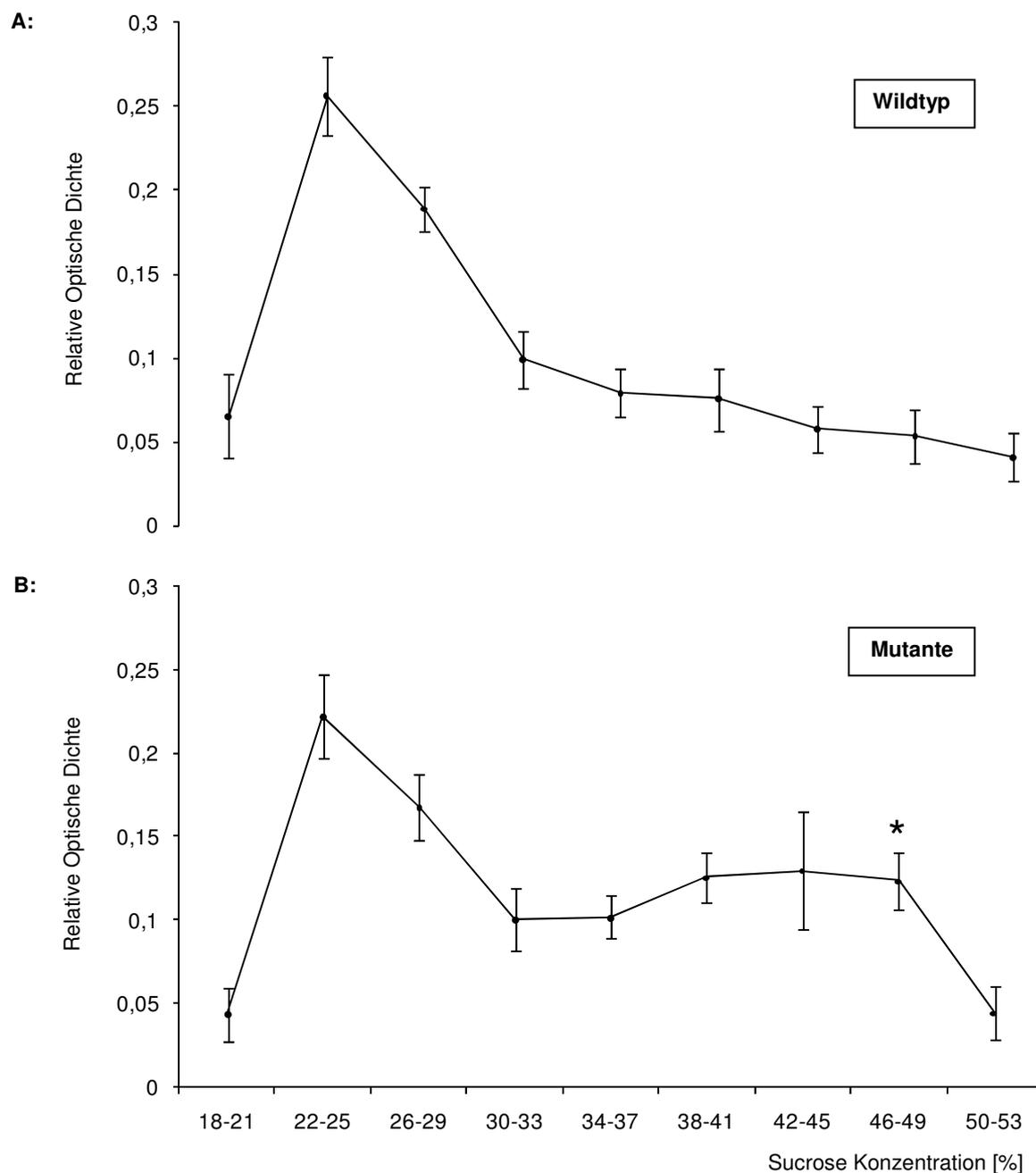


**Abbildung 13: Auftrennung von WTS1 und mutS1 im Dichtegradienten**

Dargestellt sind die 12 Fraktionen der Dichtegradienten von WTS1 und mutS1 und die Positivkontrollen (+). Von links nach rechts nimmt die Sucrose-Konzentration zu. WTS1 und mutS1 verteilen sich im Gradienten über sieben Fraktionen. Es lässt sich hierbei jeweils ein Konzentrationsmaximum in der 3. und 7. Fraktion detektieren. (Beispiel für einen der zehn Gradienten)

Zur genauen Beurteilung eines Unterschiedes im Akkumulationsverhalten zwischen Wildtyp und Mutante wurde die Proteinmenge in den einzelnen Banden durch densitometrische Messungen quantifiziert.

Insgesamt wurden jeweils zehn Dichtezentrifugationen für WTS1 und mutS1 durchgeführt. Die Mittelwerte der Optischen Dichte und damit der Proteinmenge in den einzelnen Fraktionen wurden für jeden Konzentrationsbereich erhoben und graphisch dargestellt (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Quantifizierung der Proteinmenge in den Fraktionen**

**A:** Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der Mittelwerte der Optischen Dichte von WTS1 für jeden Konzentrationsbereich. Es zeigt sich ein deutlicher Peak für den Konzentrationsbereich 22-29 %.

**B:** Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der Optischen Dichte von mutS1 für jeden Konzentrationsbereich. Hier zeigt sich ein Peak im Konzentrationsbereich 22-29 % und ein zweiter Peak im Konzentrationsbereich 42-49 %. (\*)  $p < 0,05$

Als Ergebnis präsentiert sich für WTS1 und mutS1 ein Peak im Konzentrationsbereich von 22-29 %. Hier sammeln sich im Dichtegradienten Monomere der extrazellulären Domäne des Notch3-Rezeptors mit einem Molekulargewicht von 210 kDa. Für mutS1 zeigt sich ein zweiter Peak im Konzentrationsbereich 42-49 %. Hier erwartet man Dimere der extrazellulären Domäne des Notch3-Rezeptors mit einem Molekulargewicht von 420 kDa.

#### 4.6 Statistische Auswertung

Zur Beurteilung der Unterschiede der Mittelwerte von WTS1 und mutS1 wurde ein zweiseitiger T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Ein Alphaniveau von 0,05 wurde festgesetzt. Ein  $p < 0,05$  ist folglich statistisch signifikant (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Statistische Auswertung**

Konzentration [%]	WTS1		mutS1		t-Test p
	Mittelwert ± m	SEM	Mittelwert ± m	SEM	
18-21	0,07	0,02	0,04	0,02	0,48
22-25	0,26	0,02	0,22	0,03	0,34
26-29	0,19	0,01	0,17	0,02	0,40
30-33	0,10	0,02	0,10	0,02	0,96
34-37	0,08	0,01	0,10	0,01	0,25
38-41	0,08	0,02	0,13	0,01	0,05
42-45	0,06	0,01	0,13	0,04	0,21
<b>46-49</b>	<b>0,05</b>	<b>0,02</b>	<b>0,12</b>	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>
50-53	0,04	0,01	0,04	0,02	0,85

Für den Konzentrationsbereich 26-29 %, in dem sich Monomere der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors konzentrieren, zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante ( $p=0,40$ ). In dem Konzentrationsbereich, in dem man Dimere der Extrazellulärdomäne erwartet (46-49 %) ist der Unterschied signifikant ( $p=0,01$ ). Daraus lässt sich schließen, dass die Extrazellulärdomäne des mutierten Rezeptors unter diesen Versuchsbedingungen offenbar eine stärkere Tendenz besitzt, sich zu Dimeren aneinander zu lagern.

## 5 Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Da die Akkumulation der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von CADASIL spielt (Joutel et al. 2000), wurde diese Arbeit auf die Untersuchung des Akkumulationsverhaltens des Notch3-Rezeptors fokussiert.

Bei der Detektion der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors mittels SDS-PAGE und Western-Blot ließen sich neben der zu erwartenden 210 kDa Bande unter nicht-reduzierenden Bedingungen zusätzlich höhermolekulare Banden sowohl bei Wildtyp als auch bei Mutante detektieren. Diese höhermolekularen Banden entsprachen bisher noch nicht quantifizierten Oligomeren der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors, die möglicherweise aufgrund ihrer Größe nicht vollständig in das SDS-Gel diffundieren konnten.

Daher wurde eine Methode etabliert, mit deren Hilfe Aggregate der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden konnten, um diese dann zu quantifizieren. Hierzu wurde die Ultrazentrifugation über einen Sucrose-Gradienten eingesetzt. Da es in der Literatur bereits Hinweise drauf gab, dass Notch1-Rezeptoren dimerisieren können (Sakamoto et al. 2005; Kidd et al. 1989), wurden die Versuchsbedingungen so gewählt, dass Monomere und Dimere der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors differenziert und quantifiziert werden konnten.

Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl bei Wildtyp als auch bei Mutante Homodimere der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors auftraten. Nach der Ultrazentrifugation und Detektion der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot offenbarte sich bereits eine stärkere Tendenz von mutS1 zu dimerisieren. Bei der genaueren Quantifizierung zeigte sich, dass unter den vorliegenden Versuchsbedingungen die Extrazellulärdomäne des mutierten Rezeptors eine höhere Tendenz zur Dimerisierung aufweist. Der Student T-Test war für die Fraktion, in der Dimere erwartet wurden signifikant ( $p=0,01$ ).

## 5.2 Evaluierung der Versuchsbedingungen

Bei der Bewertung der Ergebnisse muss diskutiert werden, unter welchen Versuchsbedingungen der Unterschied im Akkumulationsverhalten von WTS1 und mutS1 zustande kam.

Zum einen sollte berücksichtigt werden, dass durch die artifizielle Protein-Überexpression bei transfizierten Zellen eine Akkumulation der Extrazellulärdomäne begünstigt werden könnte: In normalen menschlichen Geweben, wo das prozessierte Notch3 nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird, findet diese Akkumulation vielleicht in geringerem Ausmaß statt. Daher wird die Beurteilung eines Unterschiedes im Akkumulationsverhalten von Wildtyp-Notch3S1 und Mutante-Notch3S1 *in vitro* in Bezug auf die Übertragbarkeit *in vivo* erschwert.

Desweiteren ist auch der Aspekt relevant, ob sich außer Dimeren noch höhere Oligomere der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors finden. Der Versuchsaufbau war darauf ausgelegt, zwischen Monomeren und Dimeren zu differenzieren. Da sich in der letzten Fraktion kein Protein detektieren ließ, könnte man postulieren, dass größere Aggregate bei der Ultrazentrifugation aufgrund ihres höheren Molekulargewichts durch den gesamten Konzentrationsgradienten diffundieren und sich am Boden des Ultrazentrifugenröhrchens sammeln. Daher wurde der Boden des Ultrazentrifugenröhrchens mit DDO/2 % SDS gespült und als 12. Fraktion bei der Proteindetektion mittels SDS-PAGE und Western Blot aufgetragen. Es konnte allerdings kein Notch3 in der 12. Fraktion detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte allerdings dadurch begründet sein, dass sich höhere Oligomere nicht vom Grund des Ultrazentrifugenröhrchens resuspendieren ließen.

Mittlerweile wurden die Ergebnisse durch weitere biochemische Methoden, wie beispielsweise die Immunpräzipitation (IP) und Massenspektrometrie (Selected-ion flow tube = SIFT) bestätigt. Hierbei konnten auch höhere Oligomere des Notch3-Rezeptors aufgedeckt werden (Daten nicht gezeigt).

An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob es sich bei der Bildung von Notch3-Oligomeren um eine indirekte oder eine direkte Interaktion handelt. Hierzu sind weiterführende biochemische Untersuchungen nötig. Bislang konnte allerdings noch kein Vermittlerprotein ausgemacht werden.

### 5.3 Pathophysiologische Relevanz für CADASIL

Das pathologische Kennzeichen von CADASIL sind die charakteristischen Gefäßveränderungen. CADASIL ist eine nicht-arteriosklerotische Amyloid-negative Mikroangiopathie. Es kommt zu einer Verdickung der Intima der Gefäßwände und zur Degeneration von glatten Gefäßmuskelzellen. Desweiteren finden sich Ablagerungen von granulärem osmiophilen Material (GOM's) in der Wand von glatten Gefäßmuskelzellen (Baudrimont et al. 1993; Ruchoux and Maurage 1997). Der genaue pathophysiologische Mechanismus, der letztendlich zu diesen Gefäßveränderungen führt, konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Im Folgenden sollen einige mögliche Modelle zur Pathogenese von CADASIL in Bezug auf den Aspekt der Oligomerisierung der Extrazellulärdomäne von Notch3 diskutiert werden.

#### 5.3.1 Oligomerisierung der Notch3-ECD durch Strukturänderungen

Der Notch3-Rezeptor unterliegt während seiner Reifung und Aktivierung drei proteolytischen Spaltungen. Nach der ersten proteolytischen Spaltung (S1) im Trans-Golgi-Netzwerk wird der Notch3-Rezeptor als Heterodimer, bestehend aus einer Extrazellulärdomäne und einer Intrazellulärdomäne an die Zelloberfläche transportiert. Dort wird nach Ligandenbindung die zweite proteolytische Spaltung (S2) induziert. Hierdurch wird die Extrazellulärdomäne in den Extrazellulärraum entlassen (siehe 1.2.2, Abbildung 4). Hier stellt sich die Frage, wie die Akkumulation der Extrazellulärdomäne zustande kommt.

Es ist bekannt, dass CADASIL-Mutationen innerhalb der 34 EGF-like-repeats der Extrazellulärdomäne von Notch3 auftreten. Ca. 70 % der Mutationen konzentrieren sich auf das N-terminale Ende des Notch3-Proteins (Joutel, Vahedi et al. 1997); (1.2.3, Abbildung 5). Alle Mutationen führen innerhalb eines EGF-like-repeats zu einer ungeraden Anzahl an Cysteinresten (Peters et al. 2005). Da Cysteinreste Disulfidbrücken vermitteln wurde postuliert, dass die entstehenden freien Cysteinreste die Bildung von Homodimeren und/oder Heterodimeren mit anderen Proteinen, die freie Cysteinreste enthalten, begünstigen könnten (Dichgans et al. 2000). Dies könnte eine Ursache für die starke Akkumulation der Extrazellulärdomäne an der Oberfläche

von glatten Gefäßmuskelzellen sein, die sowohl im Mausmodell als auch bei CADASIL Patienten demonstriert wurde. Die Ablagerungen finden sich, wie erst kürzlich gezeigt werden konnte, als Hauptbestandteil innerhalb der GOM's wieder (Joutel et al. 2000; Ruchoux et al. 2003; Ishiko et al. 2006).

Desweiteren könnte die exzessive Akkumulation der Extrazellulärdomäne dadurch verstärkt werden, dass die Aggregate nicht von der Zelloberfläche abgebaut werden können. Allerdings existieren zu diesem Aspekt bislang keine experimentellen Studien.

### **5.3.2 Oligomerisierungsstatus von Notch-Rezeptoren**

Der Oligomerisierungsstatus der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors wurde bislang noch nicht untersucht. In Bezug auf den Notch-Vollängenrezeptor ist bekannt, dass die Mehrzahl als Monomere an der Zelloberfläche vorliegt (Vooijs et al. 2004). Zu Beginn dieser Arbeit gab es bereits Hinweise dafür, dass Notch-Rezeptoren die Fähigkeit zur Dimerisierung besitzen (Sakamoto et al. 2005; Kidd et al. 1989). Für ein kleineres Fragment der Extrazellulärdomäne, bestehend aus den ersten fünf EGF-like-repeats wurde bereits gezeigt, dass es zur Bildung von Homo- und Heterodimeren kommen kann (Arboleda-Velasquez et al. 2005).

In dieser Arbeit wurde das Augenmerk auf den Oligomerisierungsstatus der kompletten Extrazellulärdomäne des Nocht3-Rezeptors, bestehend aus den 34 EGF-like-repeats gelegt. Es wurde demonstriert, dass sowohl die Extrazellulärdomäne des Wildtyp-Notch3-Rezeptors als auch die Extrazellulärdomäne der Mutante R133C in der Lage sind Homodimere auszubilden. Bei der genauen Quantifizierung stellte sich heraus, dass die Mutante unter diesen Versuchsbedingungen offenbar eine stärkere Tendenz zur Dimerisierung aufweist.

### 5.3.3 Bedeutung der Oligomerisierung von Notch3 für CADASIL

Die Tatsache, dass die Extrazellulärdomäne des mutierten Notch3 stärker zur Dimerisierung tendiert, lässt darauf schließen, dass der Aspekt der Oligomerisierung bedeutsam für den pathophysiologischen Mechanismus von CADASIL ist. Im Folgenden wird diskutiert, welche Rolle die Oligomerisierung von Notch3 in der Pathogenese von CADASIL spielen könnte.

Bei anderen neurologischen Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Alzheimer, wurde gezeigt, dass die Bildung von Homodimeren und Tetrameren des Amyloid Precursor Protein (APP) einen wichtigen Schritt in der Vermittlung der Signaltransduktion darstellt. Dass eine ligandeninduzierte Homodimerisierung von Notch-Rezeptoren physiologischerweise die Signaltransduktion vermittelt, wird für Notch eher kontrovers diskutiert (Sakamoto et al. 2005; Vooijs et al. 2004)

Vielmehr scheint die Akkumulation der Extrazellulärdomäne mit einem neomorphen Effekt vereinbar zu sein. Es existiert die Hypothese, dass durch die Oligomerisierung der Extrazellulärdomäne von Notch3 die Signaltransduktion durch Behinderung der Ligandenbindung, entweder durch kompetitive Hemmung oder durch eine Absonderung des Liganden gestört wird. Allerdings spricht gegen diese Hypothese, dass nur Mutationen innerhalb der Ligandenbindungsdomäne (LBD), in den EGF-like-repeats 10 und 11, die Signaltransduktion beeinträchtigen (Peters et al. 2004b; Joutel et al. 2004). Bei der Mehrzahl der bislang beschriebenen Mutationen (so auch die hier verwendete Mutation R133C) bleibt die Ligandenbindung und damit die Signaltransduktion unbeeinträchtigt (Haritunians et al. 2002; Haritunians et al. 2005; Joutel et al. 2000; Joutel et al. 2004; Karlstrom et al. 2002; Peters et al. 2004b; Low et al. 2006; Monet et al. 2007). Dabei muss erwähnt werden, dass die Level der akkumulierten Notch3-Extrazellulärdomäne zumindest bei drei der untersuchten Mutationen gleich waren (Joutel et al. 2004). Diese Tatsache spricht eher für eine lokale Zerstörung der LBD durch Mutationen innerhalb der EGF-like-repeats 10 und 11 als dass eine Akkumulation der Extrazellulärdomäne generell die Ligandenbindung und damit die Signaltransduktion beeinflussen würde.

Ein anderer Gesichtspunkt betrifft den physiologischen Transportweg von Notch3 von seiner Reifung bis zum Abbau. Es wird diskutiert, ob Oligomere der Extrazellulärdo-

mäne des Notch3-Rezeptors störend in diesen Mechanismus eingreifen. Allerdings existieren derzeit nur wenige Studien, die den Protein-Transportweg untersuchen. Diese Untersuchungen beschränken sich auf die Reifung des Notch3-Rezeptors vom Trans-Golgi-Netzwerk bis zur Zelloberfläche. Bei fast allen beschriebenen Mutationen präsentiert sich der Rezeptor korrekt an der Oberfläche, so dass es unwahrscheinlich ist, dass der Protein-Transportweg bis zur Zelloberfläche beeinträchtigt ist. Lediglich bei vier der untersuchten Mutationen kam es zu einer verzögerten oder reduzierten ersten proteolytischen Spaltung (S1), was durch einen erhöhten Quotienten von Notch3S1 und dem Volllängenrezeptor evident wurde (Haritunians et al. 2005; Karlstrom et al. 2002; Peters et al. 2004b). Allerdings konnte bislang noch kein direkter Zusammenhang zwischen der Akkumulation der Extrazellulärdomäne und dem Protein-Transportweg aufgedeckt werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Pathogenese von CADASIL stellt die Degeneration von glatten Gefäßmuskelzellen dar. Einige Studien konnten belegen, dass Notch3 bei Prozessen, die durch Gefäßverletzung induziert werden, beteiligt ist und eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Apoptose und Überleben von glatten Gefäßmuskelzellen spielt (Wang et al. 2002a; Wang et al. 2002b; Sweeney et al. 2004). In diesem Zusammenhang wird desweiteren diskutiert, ob Oligomere der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors eine toxische Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen ausüben und so zu deren Degeneration führen. Dieser Aspekt ist bislang nicht ausreichend untersucht und muss durch weitere Experimente geklärt werden. Es ist allerdings bekannt, dass kleine Oligomere von fehlgefalteten Proteinen bei vielen neurologischen Erkrankungen, die sich erst im Erwachsenenalter manifestieren, wie beispielsweise auch bei Morbus Alzheimer, eine entscheidende Rolle spielen (Bucciantini et al. 2002).

Bis zur endgültigen Klärung des molekularbiologischen Mechanismus, der zu CADASIL führt, sind weitere experimentelle Studien nötig, bis zielgerichtete Therapie-Konzepte entwickelt werden können.

## 6 Zusammenfassung

CADASIL (**C**erebral **A**utosomal **D**ominant **A**rteriopathy with **S**ubcortical **I**nfarcts and **L**eukoencephalopathy) ist eine erbliche Mikroangiopathie, die durch Mutationen im *NOTCH3*-Gen verursacht wird. Das klinische Erscheinungsbild umfasst rezidivierende ischämische Attacken, Migräne mit Aura, psychiatrische Manifestationen und in fortgeschrittenen Stadien vaskuläre Demenz und kognitive Beeinträchtigungen mit großer Variabilität zwischen den betroffenen Individuen.

Als pathologisches Korrelat finden sich typische Gefäßveränderungen wie die Verdickung der Basalmembran und Degeneration von glatten Gefäßmuskelzellen. Desweiteren kommt es zur Ablagerung von „granulärem osmiophilen Material“ (GOM's), das offenbar als Hauptbestandteil eine Akkumulation der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors beinhaltet.

Der pathophysiologische Mechanismus von CADASIL ist bislang nicht im Einzelnen geklärt. Es gibt in der Literatur allerdings Hinweise dafür, dass die Akkumulation der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors in der Gefäßwand von glatten Gefäßmuskelzellen eine wichtige Rolle spielt.

Daher wurde diese Arbeit auf den Aspekt der Oligomerisierung der Extrazellulärdomäne fokussiert. Bislang war nicht klar, ob eine homophile Interaktion zwischen Notch3-Rezeptoren existiert. Mittels einer selbständig etablierten Methode, der Dichtezentrifugation über einen Konzentrationsgradienten, konnte gezeigt werden, dass in diesem experimentellen System sowohl Wildtyp als auch Mutante von Notch3 Homodimere der Extrazellulärdomäne ausbilden. Bei der Quantifizierung stellte sich heraus, dass das mutierte Notch3-Protein unter diesen Versuchsbedingungen eine stärkere Tendenz zur Akkumulation besitzt ( $p=0,01$ ).

Dies ist ein weiterer Anhaltspunkt dafür, dass die Oligomerisierung von Notch3-Proteinen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von CADASIL spielt und könnte einen wichtigen Hinweis für die Aufklärung des pathophysiologischen Mechanismus liefern. Nun muss durch weitere experimentelle Untersuchungen geklärt werden, inwieweit Dimere und höhere Oligomere der Extrazellulärdomäne toxische Wirkungen auf glatte Gefäßmuskelzellen ausüben und so zu deren Degeneration führen.

Da CADASIL mit über 500 betroffenen Familien weltweit die häufigste monogen vererbte Ursache von Schlaganfällen darstellt und bei vielen Patienten zu schwerwiegenden Symptomen führt, sind weiterführende molekularbiologische Untersuchungen insbesondere in Hinblick auf die Entwicklung von Therapiekonzepten von großer Bedeutung.

## 7 Literaturverzeichnis

- Arboleda-Velasquez, J. F., R. Rampal, E. Fung, D. C. Darland, M. Liu, M. C. Martinez, C. P. Donahue, M. F. Navarro-Gonzalez, P. Libby, P. A. D'Amore, M. Aikawa, R. S. Haltiwanger, and K. S. Kosik. 2005. CADASIL mutations impair Notch3 glycosylation by Fringe. *Hum Mol Genet* 14 (12):1631-1639.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, and R. J. Lake. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284 (5415):770-776.
- Auer, D. P., T. Schirmer, J. O. Heidenreich, J. Herzog, B. Putz, and M. Dichgans. 2001. Altered white and gray matter metabolism in CADASIL: a proton MR spectroscopy and <sup>1</sup>H-MRSI study. *neurology* 56 (5):635-642.
- Baudrimont, M., F. Dubas, A. Joutel, E. Tournier-Lasserre, and M. G. Bousser. 1993. Autosomal dominant leukoencephalopathy and subcortical ischemic stroke. A clinicopathological study. *Stroke* 24 (1):122-125.
- Bogaert, V. 1955. Encéphalopathie sous-corticale progressive (Binswanger) à évolution rapide chez deux soeurs. *Méd Hellénique* 24:961-972.
- Bruening, R., M. Dichgans, C. Berchtenbreiter, T. Yousry, K. C. Seelos, R. H. Wu, M. Mayer, G. Brix, and M. Reiser. 2001. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: decrease in regional cerebral blood volume in hyperintense subcortical lesions inversely correlates with disability and cognitive performance. *AJNR Am J Neuroradiol* 22 (7):1268-1274.
- Bucciantini, M., E. Giannoni, F. Chiti, F. Baroni, L. Formigli, J. Zurdo, N. Taddei, G. Ramponi, C. M. Dobson, and M. Stefani. 2002. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416 (6880):507-511.

- Chabriat, H., C. Levy, H. Taillia, M. T. Iba-Zizen, K. Vahedi, A. Joutel, E. Tournier-Lasserre, and M. G. Bousser. 1998. Patterns of MRI lesions in CADASIL. *neurology* 51 (2):452-457.
- Chabriat, H., S. Pappata, L. Ostergaard, C. A. Clark, M. Pachot-Clouard, K. Vahedi, A. Jobert, D. Le Bihan, and M. G. Bousser. 2000. Cerebral hemodynamics in CADASIL before and after acetazolamide challenge assessed with MRI bolus tracking. *Stroke* 31 (8):1904-1912.
- Chabriat, H., K. Vahedi, M. T. Iba-Zizen, A. Joutel, A. Nibbio, T. G. Nagy, M. O. Krebs, J. Julien, B. Dubois, X. Ducrocq, and et al. 1995. Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Lancet* 346 (8980):934-939.
- Davous, P., and C. Fallet-Bianco. 1991. [Familial subcortical dementia with arteriopathic leukoencephalopathy. A clinico-pathological case]. *Rev Neurol (Paris)* 147 (5):376-384.
- Desmond, D. W., J. T. Moroney, T. Lynch, S. Chan, S. S. Chin, and J. P. Mohr. 1999. The natural history of CADASIL: a pooled analysis of previously published cases. *Stroke* 30 (6):1230-1233.
- Dichgans, M., M. Filippi, R. Bruning, G. Iannucci, C. Berchtenbreiter, L. Minicucci, I. Uttner, A. Crispin, H. Ludwig, T. Gasser, and T. A. Yousry. 1999. Quantitative MRI in CADASIL: correlation with disability and cognitive performance. *neurology* 52 (7):1361-1367.
- Dichgans, M., J. Herzog, and T. Gasser. 2001. NOTCH3 mutation involving three cysteine residues in a family with typical CADASIL. *neurology* 57 (9):1714-1717.
- Dichgans, M., H. Ludwig, J. Muller-Hocker, A. Messerschmidt, and T. Gasser. 2000. Small in-frame deletions and missense mutations in CADASIL: 3D models

- predict misfolding of Notch3 EGF-like repeat domains. *Eur J Hum Genet* 8 (4):280-285.
- Dichgans, M., H. S. Markus, S. Salloway, A. Verkkoniemi, M. Moline, Q. Wang, H. Posner, and H. S. Chabriat. 2008. Donepezil in patients with subcortical vascular cognitive impairment: a randomised double-blind trial in CADASIL. *Lancet Neurol* 7 (4):310-318.
- Dichgans, M., M. Mayer, B. Muller-Myhsok, A. Straube, and T. Gasser. 1996. Identification of a key recombinant narrows the CADASIL gene region to 8 cM and argues against allelism of CADASIL and familial hemiplegic migraine. *Genomics* 32 (1):151-154.
- Dichgans, M., M. Mayer, I. Uttner, R. Bruning, J. Muller-Hocker, G. Rungger, M. Ebke, T. Klockgether, and T. Gasser. 1998. The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases. *Ann Neurol* 44 (5):731-739.
- Ducros, A., T. Nagy, S. Alamowitch, A. Nibbio, A. Joutel, K. Vahedi, H. Chabriat, M. T. Iba-Zizen, J. Julien, P. Davous, J. Y. Goas, O. Lyon-Caen, B. Dubois, X. Ducrocq, F. Salsa, M. Ragno, P. Burkhard, C. Bassetti, M. Hutchinson, M. Verin, F. Viader, F. Chapon, M. Levasseur, J. L. Mas, O. Delrieu, and et al. 1996. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, genetic homogeneity, and mapping of the locus within a 2-cM interval. *Am J Hum Genet* 58 (1):171-181.
- Federico, A., S. Bianchi, and M. T. Dotti. 2005. The spectrum of mutations for CADASIL diagnosis. *Neurol Sci* 26 (2):117-124.
- Gridley, T. 1997. Notch signaling in vertebrate development and disease. *Mol Cell Neurosci* 9 (2):103-108.
- Haritunians, T., J. Boulter, C. Hicks, J. Buhrman, G. DiSibio, C. Shawber, G. Weinmaster, D. Nofziger, and C. Schanen. 2002. CADASIL Notch3 mutant proteins localize to the cell surface and bind ligand. *Circ Res* 90 (5):506-508.

- Haritunians, T., T. Chow, R. P. De Lange, J. T. Nichols, D. Ghavimi, N. Dorrani, D. M. St Clair, G. Weinmaster, and C. Schanen. 2005. Functional analysis of a recurrent missense mutation in Notch3 in CADASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76 (9):1242-1248.
- Ishiko, A., A. Shimizu, E. Nagata, K. Takahashi, T. Tabira, and N. Suzuki. 2006. Notch3 ectodomain is a major component of granular osmiophilic material (GOM) in CADASIL. *Acta Neuropathol (Berl)* 112 (3):333-339.
- Joutel, A., F. Andreux, S. Gaulis, V. Domenga, M. Cecillon, N. Battail, N. Piga, F. Chapon, C. Godfrain, and E. Tournier-Lasserre. 2000. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J Clin Invest* 105 (5):597-605.
- Joutel, A., C. Corpechot, A. Ducros, K. Vahedi, H. Chabriat, P. Mouton, S. Alamo-witch, V. Domenga, M. Cecillion, E. Marechal, J. Maciazek, C. Vayssiere, C. Cruaud, E. A. Cabanis, M. M. Ruchoux, J. Weissenbach, J. F. Bach, M. G. Bousser, and E. Tournier-Lasserre. 1996. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383 (6602):707-710.
- Joutel, A., P. Favrole, P. Labauge, H. Chabriat, C. Lescoat, F. Andreux, V. Domenga, M. Cecillon, K. Vahedi, A. Ducros, F. Cave-Riant, M. G. Bousser, and E. Tournier-Lasserre. 2001. Skin biopsy immunostaining with a Notch3 monoclonal antibody for CADASIL diagnosis. *Lancet* 358 (9298):2049-2051.
- Joutel, A., M. Monet, V. Domenga, F. Riant, and E. Tournier-Lasserre. 2004. Pathogenic mutations associated with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy differently affect Jagged1 binding and Notch3 activity via the RBP/JK signaling Pathway. *Am J Hum Genet* 74 (2):338-347.
- Joutel, A., K. Vahedi, C. Corpechot, A. Troesch, H. Chabriat, C. Vayssiere, C. Cruaud, J. Maciazek, J. Weissenbach, M. G. Bousser, J. F. Bach, and E.

- Tournier-Lasserre. 1997. Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet* 350 (9090):1511-1515.
- Karlstrom, H., P. Beatus, K. Dannaeus, G. Chapman, U. Lendahl, and J. Lundkvist. 2002. A CADASIL-mutated Notch 3 receptor exhibits impaired intracellular trafficking and maturation but normal ligand-induced signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (26):17119-17124.
- Kidd, S., M. K. Baylies, G. P. Gasic, and M. W. Young. 1989. Structure and distribution of the Notch protein in developing Drosophila. *Genes Dev* 3 (8):1113-1129.
- Krebs, L. T., Y. Xue, C. R. Norton, J. P. Sundberg, P. Beatus, U. Lendahl, A. Joutel, and T. Gridley. 2003. Characterization of Notch3-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a Notch1 mutation. *Genesis* 37 (3):139-143.
- Lesnik Oberstein, S. A., S. G. van Duinen, R. van den Boom, M. L. Maat-Schieman, M. A. van Buchem, H. C. van Houwelingen, I. M. Hegeman-Kleinn, M. D. Ferrari, M. H. Breuning, and J. Haan. 2003. Evaluation of diagnostic NOTCH3 immunostaining in CADASIL. *Acta Neuropathol (Berl)* 106 (2):107-111.
- Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N. G. Seidah, and A. Israel. 1998. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (14):8108-8112.
- Low, W. C., Y. Santa, K. Takahashi, T. Tabira, and R. N. Kalaria. 2006. CADASIL-causing mutations do not alter Notch3 receptor processing and activation. *Neuroreport* 17 (10):945-949.
- Markus, H. S., R. J. Martin, M. A. Simpson, Y. B. Dong, N. Ali, A. H. Crosby, and J. F. Powell. 2002. Diagnostic strategies in CADASIL. *neurology* 59 (8):1134-1138.

- Monet, M., V. Domenga, B. Lemaire, C. Souilhol, F. Langa, C. Babinet, T. Gridley, E. Tournier-Lasserre, M. Cohen-Tannoudji, and A. Joutel. 2007. The archetypal R90C CADASIL-NOTCH3 mutation retains NOTCH3 function in vivo. *Hum Mol Genet* 16 (8):982-992.
- Mumm, J. S., E. H. Schroeter, M. T. Saxena, A. Griesemer, X. Tian, D. J. Pan, W. J. Ray, and R. Kopan. 2000. A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* 5 (2):197-206.
- O'Sullivan, M., J. M. Jarosz, R. J. Martin, N. Deasy, J. F. Powell, and H. S. Markus. 2001. MRI hyperintensities of the temporal lobe and external capsule in patients with CADASIL. *neurology* 56 (5):628-634.
- Opherk, C., N. Peters, J. Herzog, R. Luedtke, and M. Dichgans. 2004. Long-term prognosis and causes of death in CADASIL: a retrospective study in 411 patients. *Brain* 127 (Pt 11):2533-2539.
- Peters, N., J. Herzog, C. Opherk, and M. Dichgans. 2004a. A two-year clinical follow-up study in 80 CADASIL subjects: progression patterns and implications for clinical trials. *Stroke* 35 (7):1603-1608.
- Peters, N., C. Opherk, T. Bergmann, M. Castro, J. Herzog, and M. Dichgans. 2005. Spectrum of mutations in biopsy-proven CADASIL: implications for diagnostic strategies. *Arch Neurol* 62 (7):1091-1094.
- Peters, N., C. Opherk, S. Zacherle, A. Capell, P. Gempel, and M. Dichgans. 2004b. CADASIL-associated Notch3 mutations have differential effects both on ligand binding and ligand-induced Notch3 receptor signaling through RBP-Jk. *Exp Cell Res* 299 (2):454-464.
- Pfefferkorn, T., S. von Stuckrad-Barre, J. Herzog, T. Gasser, G. F. Hamann, and M. Dichgans. 2001. Reduced cerebrovascular CO(2) reactivity in CADASIL: A transcranial Doppler sonography study. *Stroke* 32 (1):17-21.

- Reaume, A. G., R. A. Conlon, R. Zirngibl, T. P. Yamaguchi, and J. Rossant. 1992. Expression analysis of a Notch homologue in the mouse embryo. *Dev Biol* 154 (2):377-387.
- Rebay, I., R. J. Fleming, R. G. Fehon, L. Cherbas, P. Cherbas, and S. Artavanis-Tsakonas. 1991. Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* 67 (4):687-699.
- Ruchoux, M. M., P. Brulin, J. Brillault, M. P. Dehouck, R. Cecchelli, and M. Bataillard. 2002. Lessons from CADASIL. *Ann N Y Acad Sci* 977:224-231.
- Ruchoux, M. M., P. Brulin, E. Leteurtre, and C. A. Maurage. 2000. Skin biopsy value and leukoaraiosis. *Ann N Y Acad Sci* 903:285-292.
- Ruchoux, M. M., V. Domenga, P. Brulin, J. Maciazek, S. Limol, E. Tournier-Lasserre, and A. Joutel. 2003. Transgenic mice expressing mutant Notch3 develop vascular alterations characteristic of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Am J Pathol* 162 (1):329-342.
- Ruchoux, M. M., D. Guerouaou, B. Vandehaute, J. P. Pruvo, P. Vermersch, and D. Leys. 1995. Systemic vascular smooth muscle cell impairment in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 89 (6):500-512.
- Ruchoux, M. M., and C. A. Maurage. 1997. CADASIL: Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 56 (9):947-964.
- Sakamoto, K., W. S. Chao, K. Katsube, and A. Yamaguchi. 2005. Distinct roles of EGF repeats for the Notch signaling system. *Exp Cell Res* 302 (2):281-291.

- Schroder, J. M., S. Zuchner, M. Dichgans, Z. Nagy, and M. J. Molnar. 2005. Peripheral nerve and skeletal muscle involvement in CADASIL. *Acta Neuropathol (Berl)* 110 (6):587-599.
- Shirayoshi, Y., Y. Yuasa, T. Suzuki, K. Sugaya, E. Kawase, T. Ikemura, and N. Nakatsuji. 1997. Proto-oncogene of int-3, a mouse Notch homologue, is expressed in endothelial cells during early embryogenesis. *Genes Cells* 2 (3):213-224.
- Sonninen, V., and M. L. Savontaus. 1987. Hereditary multi-infarct dementia. *Eur Neurol* 27 (4):209-215.
- Sourander, P., and J. Walinder. 1977. Hereditary multi-infarct dementia. Morphological and clinical studies of a new disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 39 (3):247-254.
- Stevens, D. L., R. H. Hewlett, and B. Brownell. 1977. Chronic familial vascular encephalopathy. *Lancet* 1 (8026):1364-1365.
- Sweeney, C., D. Morrow, Y. A. Birney, S. Coyle, C. Hennessy, A. Scheller, P. M. Cummins, D. Walls, E. M. Redmond, and P. A. Cahill. 2004. Notch 1 and 3 receptor signaling modulates vascular smooth muscle cell growth, apoptosis, and migration via a CBF-1/RBP-Jk dependent pathway. *FASEB J* 18 (12):1421-1423.
- Tournier-Lasserre, E., A. Joutel, J. Melki, J. Weissenbach, G. M. Lathrop, H. Chabriat, J. L. Mas, E. A. Cabanis, M. Baudrimont, J. Maciazek, and et al. 1993. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nat Genet* 3 (3):256-259.
- Viswanathan, A., A. Gschwendtner, J. P. Guichard, F. Buffon, R. Cumurciuc, M. O'Sullivan, M. Holtmannspotter, C. Pachai, M. G. Bousser, M. Dichgans, and H. Chabriat. 2007. Lacunar lesions are independently associated with disability and cognitive impairment in CADASIL. *neurology* 69 (2):172-179.

- Vooijs, M., E. H. Schroeter, Y. Pan, M. Blandford, and R. Kopan. 2004. Ectodomain shedding and intramembrane cleavage of mammalian Notch proteins is not regulated through oligomerization. *J Biol Chem* 279 (49):50864-50873.
- Wang, T., M. Baron, and D. Trump. 2008. An overview of Notch3 function in vascular smooth muscle cells. *Prog Biophys Mol Biol* 96 (1-3):499-509.
- Wang, W., A. H. Campos, C. Z. Prince, Y. Mou, and M. J. Pollman. 2002a. Coordinate Notch3-hairy-related transcription factor pathway regulation in response to arterial injury. Mediator role of platelet-derived growth factor and ERK. *J Biol Chem* 277 (26):23165-23171.
- Wang, W., C. Z. Prince, Y. Mou, and M. J. Pollman. 2002b. Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation. Resistance to Fas ligand-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277 (24):21723-21729.
- Weinmaster, G. 1997. The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci* 9 (2):91-102.
- Weinmaster, G. 2000. Notch signal transduction: a real rip and more. *Curr Opin Genet Dev* 10 (4):363-369.
- Wong, P. C., H. Zheng, H. Chen, M. W. Becher, D. J. Sirinathsinghji, M. E. Trumbauer, H. Y. Chen, D. L. Price, L. H. Van der Ploeg, and S. S. Sisodia. 1997. Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 387 (6630):288-292.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: MRT eines CADASIL Patienten mit typischen Marklagerveränderungen.....	8
Abb. 2: Typische Gefäßveränderungen bei CADASIL.....	9
Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur des Notch3-Volllängen-Rezeptors..	12
Abb. 4: Prozessierung des Notch3-Rezeptors.....	13
Abb. 5: Mutationsspektrum bei CADASIL.....	14
Abb. 6: Schematische Darstellung der cDNA-Konstrukte.....	40
Abb. 7: Spezifischer Nachweis von Notch3 WTS1 und mutS1 im Western Blot.....	41
Abb. 8: Nachweis von höhermolekularen Banden im Western Blot.....	42
Abb. 9: Schematische Darstellung der Dichtezentrifugation.....	43
Abb. 10: Beispiel einer Refraktionsmessung eines Sucrose-Gradienten.....	44
Abb. 11: Messung der Optischen Dichte von Katalase (A) und Ferritin (B) .....	46
Abb. 12: Auftrennung der Proteins im Dichtegradienten.....	47
Abb. 13: Auftrennung von WTS1 und mutS1 im Dichtegradienten.....	48
Abb. 14: Quantifizierung der Proteinmenge in den Fraktionen .....	49

## 9 Danksagung

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

Insbesondere danke ich mich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Martin Dichgans für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Korrektur des Manuskripts und die stete Unterstützung sowie ausgezeichnete wissenschaftliche Beratung während der gesamten Promotionszeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. med. Christian Opherk für die exzellente Betreuung, die Einführung in wissenschaftliche Arbeitstechniken, sowie für seine andauernde Hilfsbereitschaft und stets freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei Dr. med. Andreas Gschwendtner bedanken, für die Einarbeitung in experimentelle Techniken und intensive Unterstützung zu Beginn dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Dr. Peter Breuer und der Abteilung Zelluläre Biochemie unter der Leitung von Prof. Dr. Franz-Ulrich Hartl am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried für die Mitbenutzung der Ultrazentrifuge, die Hilfsbereitschaft sowie intensive wissenschaftliche Beratung.

Ganz besonders möchte ich mich beim gesamten Team der AG Neurogenetik an der Neurologischen Klinik der Universität München bedanken, für die Hilfsbereitschaft und wissenschaftlichen Ratschläge, sowie ein sehr angenehmes freundliches Arbeitsklima. Im Einzelnen bedanke ich mich bei Dr. med. Tobias Freiling, Dr. med. Nils Peters, Dr. med. Marco Düring, Johanna Sailer, Marc Meidlinger, Natalie Wunderlich, Melanie Schneider, Nina Kühn, Andreas Koch, Anna Karpinska.

Mein besonderer Dank gebührt vor allem meinen Eltern Ursula Schneider und Dr. Hartmut Schneider, meinen Geschwistern, insbesondere Philip, Sascha, Tilman, Johanna und besonders auch Mike Lingenfelder für fortwährende Unterstützung jedweder Art und bedingungslosen Rückhalt.

## 10 Lebenslauf

### ***Persönliche Daten***

---

Name, Vorname:	Schneider, Elisabeth
Geburtstag:	17.11.1980
Geburtsort:	München
Adresse:	Theresienstr. 54 80333 München elisa.schneider@gmx.de

### ***Ärztliche Staatsprüfungen***

---

05/2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Gesamtnote: 1,0
04/2003	Ärztliche Vorprüfung

### ***Schul- und Hochschulausbildung***

---

2001 – 2008	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
2000	Krankenpflegepraktikum, Klinikum Schwabing, München
1991 – 2000	Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium, München Abitur: Gesamtnote: 1,6
1987 – 1991	Grundschule Ostpreußenstraße, München

### ***Famulaturen/Praktisches Jahr***

---

2007	3.Tertial: Chirurgie, Klinikum Schwabing, München
2006/2007	2.Tertial: Innere Medizin, Med. Poliklinik, München
2006	1.Tertial: Neurologie, Klinikum Großhadern, München
2006	Neurologie, Klinikum Großhadern, München
2006	Allgemeinmedizin, Allgemeinarztpraxis, Esslingen
2004	Anästhesiologie, Klinikum Großhadern, München
2004	Innere Medizin, Klinikum Bogenhausen, München