

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktorin: Prof. Dr. med. M. Dieterich

**Molekulare Pathogenese von CADASIL:
Mechanismen der Notch3 Rezeptoraggregation**

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

vorgelegt von
Anna Magdalena Karpinska

aus
Krakau/ Polen

2009

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Dichgans

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Roman Haberl
Prof. Dr. rer. nat. Harald Steiner

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

Dekan: Prof. Dr. Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen

Prüfung: 19. Februar 2009

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Klinischer Überblick und molekulare Grundlagen der Erkrankung	3
1.2 Fragestellung der Arbeit	6
2 MATERIAL UND METHODIK	8
2.1 Material.....	8
2.1.1 Allgemeine Ausrüstung und Geräte	8
2.1.2 Reagenzien	9
2.1.3 Puffer, Lösungen.....	12
2.1.3.1 DNA	12
2.1.3.2 Zellkultur.....	15
2.1.3.3 Proteine.....	16
2.2 Methodik.....	17
2.2.1 DNA-Methoden	17
2.2.1.1 Transformation von Bakterien	17
2.2.1.2 Stammkonservierung	17
2.2.1.3 Maxi-Preparation	17
2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung.....	18
2.2.1.5 Kontrolle der resynthetisierten Plasmide per Restriktionsverdau	19
2.2.1.6 Sequenz-PCR	19
2.2.2 Zellkultur-Methoden	20
2.2.2.1 Kultivierung der Zelllinie	20
2.2.2.2 Transfektion	21
2.2.2.3 Zellyse	21
2.2.3 Protein-Methoden.....	21
2.2.3.1 Antikörper.....	21
2.2.3.2 Proteinbestimmung	22
2.2.3.3 SDS-Page	22
2.2.3.4 Western Blot.....	23
2.2.3.5 Co-Immunopräzipitation (IP)	23
2.2.3.6 Zeitreihen	24
2.2.3.7 SIFT scanning for intensely fluorescent targets	24

3	ERGEBNISSE	27
3.1	Notch3-Konstrukte	27
3.2	Expressionsnachweis von Notch3 in HEK293 Zellen	28
3.3	Immunopräzipitation zur Untersuchung einer homophilen N3 ^{EC} Interaktion	29
3.4	Immunopräzipitation zur Untersuchung einer homophilen N3 ^{FL} Interaktion	32
3.5	Untersuchung eines Ca ²⁺ Einflusses auf die N3 ^{EC} - Interaktion	35
3.6	Zeitabhängige Bildung höhermolekularer β -ME resistenter N3-Komplexe	36
3.7	Untersuchung der N3 ^{EC} -Interaktion mittels SIFT	39
4	DISKUSSION	42
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	42
4.1.1	Co-Immunopräzipitationen	42
4.1.2	Zeitabhängigkeit der Komplexbildung	43
4.1.3	SIFT - scanning for intensely fluorescent targets	43
4.2	Evaluierung der Versuchsbedingungen	44
4.2.1	Fehlende Proteinaufreinigung	44
4.2.2	Artifizielle Überexpression	45
4.2.3	Vorteile des SIFT gegenüber anderen Proteinnachweismethoden	45
4.2.4	Indirekte Fluoreszenzmarkierung im SIFT	45
4.3	Relevanz der Ergebnisse hinsichtlich der CADASIL-Pathogenese	46
4.3.1	Strukturänderungen des N3-Rezeptors	46
4.3.2	Störungen des Notch3-Signalweges	47
4.3.3	Neomorpher Effekt der CADASIL-Mutationen	48
4.3.4	Bedeutung der zeitabhängigen Komplexbildung für die Pathogenese	48
5	ZUSAMMENFASSUNG	50
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	52
7	LITERATURVERZEICHNIS	53
8	LEBENS LAUF	56

Abkürzungsverzeichnis

Neben den international gültigen (SI-) Einheiten und chemischen Symbolen wurden folgende Abkürzungen verwendet:

AD	Alzheimer-Demenz
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
A β	Amyloid-Beta
β -ME	beta-Mercaptoethanol
BSA	Bovines Serumalbumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	‚Desoxyribonucleic Acid‘, Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
GFP	‚green fluorescent protein‘; grün fluoreszierendes Protein
HRP	‚horse radish peroxidase‘; Meerrettich-Peroxidase
ICR-191	2-methoxy-6-chloro-9-(2-chloroethylaminopropylamino)acridine
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
MOCK	Leervektorkontrolle
mod	modifiziert
mut	Mutante
N1	Notch1-Rezeptorprotein
N3	Notch3-Rezeptorprotein
N3 ^{EC}	extrazelluläre Domäne des Notch3-Rezeptors
N3 ^{FL}	Notch3-Vollängen-Rezeptor
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
p. a.	pro analysi, zur Analyse

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	,polymerase chain reaction'; Polymerasekettenreaktion
SDS	,sodium dodecyl sulfate'; Natriumdodecylsulfat
SIFT	scanning for intensely fluorescent targets
s1	Schnittstelle der ersten proteolytischen Spaltung
s2	Schnittstelle der zweiten proteolytischen Spaltung
s3	Schnittstelle der dritten proteolytischen Spaltung
TBE	Tris-Buffered-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
Wt	Wildtyp
v/v	volume per volume'; Volumenanteil
w/v	weight per volume'; Gewichtsanteil

Einbuchstabencode der Aminosäuren

A Alanin	K Lysin	T Threonin
C Cytosin	L Leucin	V Valin
D Asparaginsäure	M Methionin	W Tryptophan
E Glutaminsäure	N Asparagin	Y Tyrosin
F Phenylalanin	P Prolin	
G Glycin	Q Glutamin	
H Histidin	R Arginin	
I Isoleucin	S Serin	

1 Einleitung

1.1 Klinischer Überblick und molekulare Grundlagen der Erkrankung

1977 beschrieben Stevens et al. eine chronische, familiäre, vaskuläre Enzephalopathie, die überwiegend im jungen Erwachsenenalter beginnt und mit neuropsychiatrischen Symptomen einhergeht (Stevens et al. 1977). Heute ist die Erkrankung bekannt unter dem Akronym CADASIL: cerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie (Tournier-Lasserre et al. 1993; Dichgans 2002). CADASIL ist die häufigste monogen vererbte Schlaganfallerkrankung. Bisher wurden europaweit über 500 CADASIL-Familien identifiziert. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 50,7 Jahren (Opherk et al. 2004). Das morphologische Korrelat der Erkrankung sind subkortikale, lakunäre Infarkte infolge einer zerebralen Mikroangiopathie mit nicht-arteriosklerotischen, nicht-amyloiden Plaques (Joutel et al. 1996; Dichgans 2002). Vaskuläre Risikofaktoren wie Hypertonus, Diabetes mellitus und andere fehlen meist.

Klinisch fallen die Patienten typischerweise durch folgende Manifestationen auf: rezidivierende transitorisch ischämische Attacken (TIA) oder ischämische Schlaganfälle, kognitive Defizite bis hin zur Demenz, Migräne mit Aura, psychiatrische Störungen und epileptische Anfälle. Dabei finden sich cerebrale Ischämien als häufigste Manifestation bei 85% aller symptomatischen Patienten im Alter von 50 Jahren und kognitive Defizite bei 60% der Patienten (Tournier-Lasserre et al. 1993; Chabriat et al. 1995; Dichgans et al. 1998).

Die Veränderungen im Gehirnparenchym lassen sich mit bildgebenden Verfahren nachweisen. In der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) zeigen sich schon vor Ausbruch der Erkrankung kleine unregelmäßige T2-Hyperintensitäten in der periventrikulären und tiefer gelegenen weißen Substanz (Abbildung 1A). Im Verlauf nehmen diese Läsionen der weißen Substanz zu und es bilden sich zusätzlich subkortikale Lakunen vor allem in den Basalganglien, dem Thalamus, der Capsula interna sowie im Hirnstamm (Abbildung 1B). Besonders die T2-Hyperintensität in der temporopolen weißen Substanz und die Miteinbeziehung der subkortikalen U-Fasern im temporopolen und frontalen Bereich sind wegweisend für die Diagnose (Chabriat et al. 1998; Auer et al. 2001). Ebenso stellt sich bei CADASIL-Patienten im MRT eine zunehmende Gehirnatrophie dar (Peters et al. 2006; Viswanathan et al. 2007).

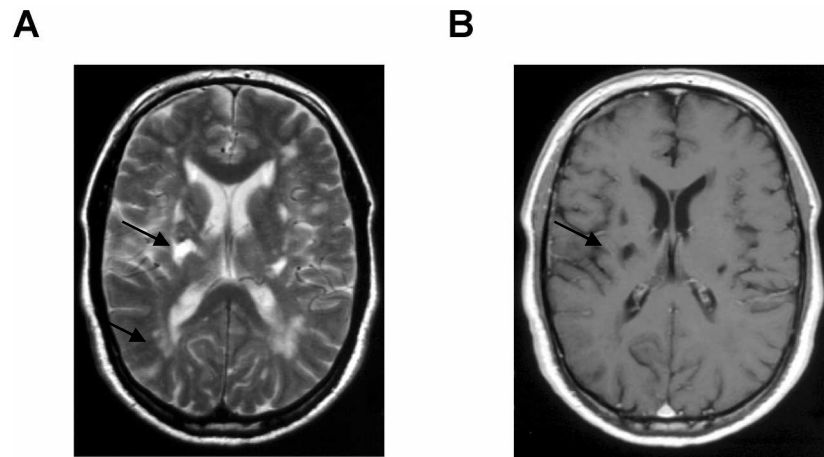


Abbildung 1 Magnet-Resonanz-Tomographie eines CADASIL-Patienten

(A) Die T2-gewichtete Aufnahme zeigt hyperintense Areale in der periventrikulären und tiefer gelegenen weißen Substanz, die einer Leukenzephalopathie entsprechen.

(B) In der T1-gewichteten Aufnahme stellen sich die ischämischen, subkortikalen Infarktgebiete und Lakunen vor allem im Bereich der Basalganglien dar.

Die Ursache für die oben beschriebenen Veränderungen sind Mutationen im *NOTCH3*-Gen, welches auf Chromosom 19q12 lokalisiert ist (Tournier-Lasserre et al. 1993; Joutel et al. 1996). *NOTCH3* ist eines von vier homologen *NOTCH*-Genen und kodiert für einen Typ-I Transmembranrezeptor (Notch3, N3). Diesem Rezeptor wird eine Rolle in Differenzierungsprozessen und Zell-Zell-Interaktionen während der Embryogenese zugesprochen (Artavanis-Tsakonas et al. 1999). Im adulten Organismus wird der N3-Rezeptor in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert (Villa et al. 2001). Der Aufbau des Rezeptors ist in Abbildung 2 dargestellt: Er umfasst die extrazelluläre Domäne (ECD) mit 34 „epidermal growth factor like repeats“ (EGF-like repeats) und der Ligandenbindungsdomäne (LBD), die Transmembrandomäne (TM) und die intrazelluläre Domäne (IC) (Logeat et al. 1998). Insgesamt besteht das Protein aus 2321 Aminosäuren und besitzt eine Größe von 280 kDa.

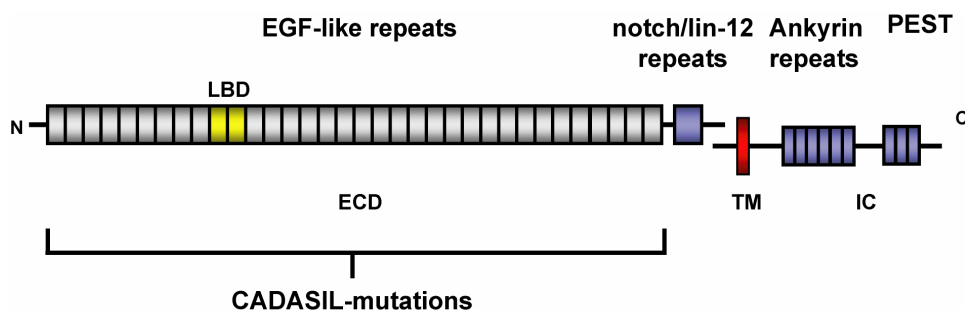


Abbildung 2 schematische Darstellung des Notch3-Transmembranrezeptors

N-terminal findet sich die extrazelluläre Domäne (ECD) mit 34 EGF-like repeats, der Ligandenbindungsdomäne (LBD) und den notch/lin-12 repeats. Zusätzlich sind der transmembrane Anteil (TM), und die intrazelluläre Domäne (IC) mit den Ankyrin repeats und der PEST Sequenz dargestellt. Im Bereich der 34 EGF-like repeats finden sich alle bekannten CADASIL-Mutationen.

Nach der Synthese erfährt der N3-Rezeptor drei proteolytische Spaltungen: die erste durch eine Furin-ähnliche Konvertase im trans-Golgi-Netzwerk, wobei zwei Fragmente entstehen, die ein Heterodimer bilden und zur Zelloberfläche transportiert werden (Logeat et al. 1998). Die zweite Spaltung erfolgt nach Interaktion mit einem spezifischen Liganden (Jagged oder Delta) durch eine Metalloprotease, wobei die extrazelluläre Domäne des Rezeptors ($N3^{ECD}$) freigesetzt wird. Eine dritte Spaltung durch einen Presinilin/ γ -Sekretase-Komplex hat den Transport der Intrazellulärdomäne ($N3^{IC}$) in den Zellkern zur Folge. Dort aktiviert diese durch Interaktion mit dem RBP-Jk-Transkriptionsfaktor Notch-Zielgene, wie beispielsweise Hairy-enhancer of split-Gene (HES) (Abbildung 3) (Weinmaster 2000).

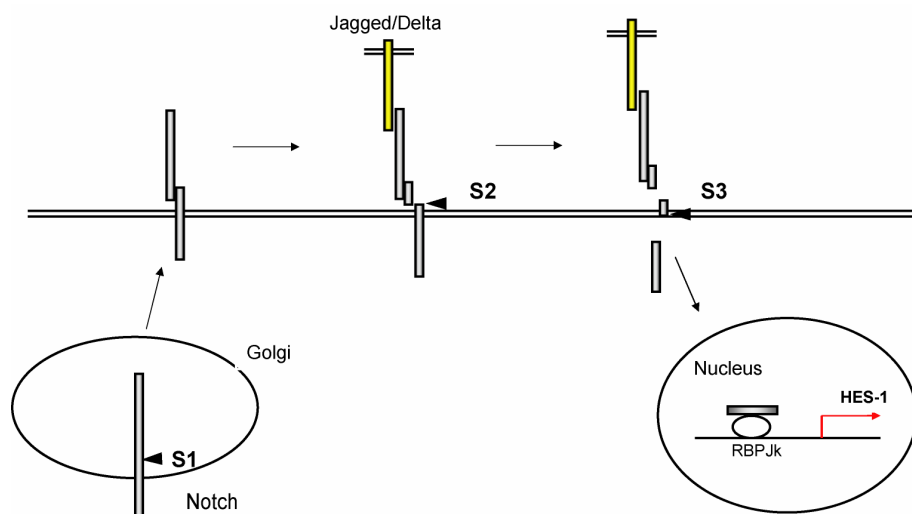


Abbildung 3 Die proteolytische Spaltung des Notch3-Rezeptors

Die erste Spaltung erfolgt im trans-Golgi-Netzwerk durch eine Furin-ähnliche Konvertase und führt zur Bildung des N3-Heterodimers, welches dann zur Zelloberfläche transportiert wird (S1). Nach Bindung eines spezifischen Liganden (Jagged/Delta) erfolgt die zweite Spaltung (S2) durch eine Metalloprotease. Die dritte Spaltung (S3) durch einen Presinilin/ γ -Sekretase-Komplex hat den Transport der Intrazellulärdomäne in den Zellkern und die Aktivierung von Notch-Zielgenen durch den RBP-Jk –Transkriptionsfaktor zur Folge.

Nahezu alle CADASIL-relevanten Mutationen finden sich in den „EGF-like repeats“ der extrazellulären Domäne, bevorzugt am N-terminalen Ende in Exon 3 und 4 oder in der Ligandenbindungsdomäne (Joutel et al. 1997; Arboleda-Velasquez et al. 2002; Peters et al. 2005). Bei den Mutationen handelt es sich in der Regel um „missense“ Punktmutationen oder um Deletionsmutationen (Dichgans et al. 2000). Alle Mutationen führen zu einem Gewinn oder einem Verlust eines Cysteinrestes innerhalb der EGF-like repeats. Da jede EGF-Einheit im gesunden Fall sechs Cysteinreste beinhaltet, resultiert daraus eine ungerade Anzahl an Cysteinresten im mutierten Rezeptor (Joutel et al. 1997; Peters et al. 2005). Hieraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass mutiertes N3 über aberrante Disulfidbrückenbindungen mit anderen Proteinen oder weiteren N3-Rezeptoren interagiert und es zu einer Dimerisierung bzw. Multimerisierung der Rezeptoren kommen könnte.

In der Tat finden sich bei betroffenen Patienten Ablagerungen der extrazellulären N3-Domänen in enger Nachbarschaft zu glatten Gefäßmuskelzellen in kleineren Arteriolen (Abbildung 4A) (Joutel et al. 2000). Des Weiteren lässt sich dort in elektronenmikroskopischen Untersuchungen granuläres osmophiles Material (sogenannte GOM's) nachweisen (Abbildung 4B) (Baudrimont et al. 1993; Ruchoux et al. 1995; Joutel et al. 2000; Schroder et al. 2005). Ob Notch3 ein Bestandteil des granulären Materials ist, wird bislang kontrovers diskutiert (Joutel et al. 2000; Ishiko et al. 2006). Als drittes morphologisches Charakteristikum fällt in immunhistochemischen Darstellungen eine Degeneration der glatten Gefäßmuskelzellen auf (Abbildung 4C). Diese Veränderungen finden sich nicht nur an zerebralen Gefäßen, sondern auch extrazerebral, zum Beispiel in Hautarteriolen.

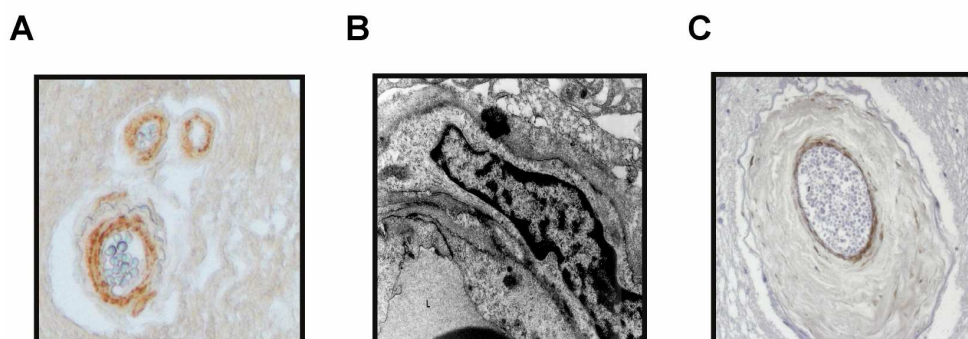


Abbildung 4: morphologische Veränderungen bei CADASIL

(A) Nachweis der N3-Ablagerungen an glatten Gefäßmuskelzellen in der Immunhistochemie mit einem N3^{ECD}-Antikörper. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme glatter Gefäßmuskelzellen mit GOM's. (C) Querschnitt einer Arterie mit degenerierenden glatten Gefäßmuskelzellen in einer α -actin-Färbung. (Quelle: AG Neurogenetik, unveröffentlichte Daten)

1.2 Fragestellung der Arbeit

Die molekularen Mechanismen der Krankheitsentstehung bei CADASIL sind bislang nicht bekannt. *In vitro* Versuche zeigen, dass CADASIL- Mutationen weder den Transport des Rezeptors an die Zelloberfläche noch seine Ligandenbindung und Signaltransduktion beeinflussen (Joutel A 2004; Peters N 2004; Low et al. 2006). Notch3 knock-out Mäuse weisen zwar Störungen der Gefäßdifferenzierung, aber keinen CADASIL-Phänotyp auf (Ruchoux et al. 2003; Domenga et al. 2004). Zudem zeigten sich in Rescue-Experimenten mit CADASIL mutierten Notch3-Konstrukten im Notch3- defizienten background keine Störungen der Signaltransduktion (Monet et al. 2007). Diese Ergebnisse sprechen gegen einen gain oder loss of function Mechanismus. Alternativ kommt somit ein toxischer oder neomorpher Effekt der Mutationen auf den Notch3-Rezeptor in Betracht.

Gut vereinbar hiermit ist das zentrale biochemische und immunhistologische Merkmal bei CADASIL: die Akkumulation/Aggregation der extrazellulären Notch3-Domänen. Als Grundlage der Aggregatentstehung könnten homophile Interaktionen der Rezeptoren eine wichtige Rolle spielen. Deshalb sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob homophile Interaktionen der Notch3-Rezeptoren *in vitro* stattfinden und ob diese durch CADASIL-assoziierte Mutationen beeinflusst werden. In Co-Immunopräzipitationsversuchen, im Western Blot und mit der Methode des „scanning for intensely fluorescent targets“ sollten die Grundlagen der homophilen Interaktion und einer möglichen Multimerisierung untersucht und anschließend deren Relevanz für die CADASIL Pathogenese beurteilt werden.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Ausrüstung und Geräte

Blot-Kammer	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad Laboratories, München, Germany
Blot-Papier	extra thick Blot Paper, Protean xi size, BioRad Laboratories
Elektrophoresekammer	Mini-Protean 3 Cell, BioRad Laboratories, München
Elisa Reader	Multiskan RC, Thermo Labsystems, Helsinki, Finnland
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
Inkubator	HERAcell 150, Heraeus Instruments GmbH, Fellbach, Germany
Küvetten	Quartz spectrophotometer cell micro, BioRad Laboratories, München, Germany
Mikroskop	Zeiss Axiovert 25, Carl Zeiss AG, Göttingen Insight Reader, Evotec-Technologies, 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 10µl, 200µl, 1000µl, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Germany, epT.I.P.S. 10µl, 200µl, 1000µl, Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany
pH-Meter	pH-Digi 520, Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten &Co KG (WTW). Weilheim, Germany
Photometer	Gene Quant II RNA/DANN Calculator, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg im BR., Germany

Schüttler	KM-2, Edmund Bühler GmbH & Co., Bodelshausen, Germany
Sequenziergerät	ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Science Ort
Software	Ascent Software for Multiscan RC, Thermo LabSystems, Helsinki, Finland
Spinning Wheel	NeoLab Rotator 2-1175, Heidelberg
Sterilbank	HERAsafe HS18, Heraeus Instruments GmbH, Fellbach, Germany
Thermoblock	Block Heater, Stuart Scientific, Redhill in Surrey
Thermocycler	PTC-200 Peltier Thermo Cycler, MJ Research, USA
Transfer-Membran	Immobilon TM PVDF 0.45 mm, Millipore, Schwalbach, Germany
Tubes	Falcon® BLUE MAX™ 50ml Polypropylene Clonical Tube, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Ultrazentrifugenröhrchen	14x89mm, Beckman Coulter, Krefeld, Germany
Waage	GX-400, AND A&D Weighing, Bradford USA
Wippe	Mini Rocker MR1, Peqlab Biotechnology, Erlangen, Germany
Zellkulturflaschen	75 cm ² , PS, gammasterilisiert, Corning B.V., Schiphol- Rijk, Netherlands
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415R, Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany
	Ultracentrifuge Optima L-90K, Beckman Coulter, Krefeld, Germany

2.1.2 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
1,2-Diamonocyclohexane-Tetraessigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Acridine Mutagen ICR-191	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bacto-Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Borsäure	Merck Biosciences GmbH, Bad Soden
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DAPT	Merck Biosciences GmbH, Bad Soden
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethanol	Merck Biosciences GmbH, Bad Soden
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycin	Merck Biosciences GmbH, Bad Soden
Hefe-Extrakt	BD Biosciences, Heidelberg
Immobilon™ Western Detection Reagents	Millipore Corporation, Billerica
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kaliumacetat	Merck Biosciences GmbH, Bad Soden
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Lipofectamine™ Transfection Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Magermilchpulver	Töpfer GmbH, Dietmannsried, Germany
Magnesiumacetat	Merck Biosciences GmbH, Bad Soden
Methanol	Merck Biosciences GmbH, Bad Soden
MOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
N, N, N', N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
N,N-Dimethylformamide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
N,N-Methylenbisacrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck Biosciences GmbH, Bad Soden
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Natriumchlorid NaCl	Merck Biosciences GmbH, Bad Soden
Natriumdihydrogenphosphat NaH ₂ PO ₄	Appllichem GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumkarbonat Na ₂ CO ₃	Appllichem GmbH, Darmstadt
Nonidet P 40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Nukleotidmix	Amersham Biosciences, Freiburg
Plus Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Proteaseinhibitor „Complete mini“	Roche Diagnostic, Mannheim
Precision Plus Protein Standard	BioRad Laboratories, München
Salzsäure HCl 37%	Merck Biosciences GmbH, Bad Soden
Select Agar	Invitrogen-Gibco, Karlsruhe
Select yeast Extract	Invitrogen-Gibco, Karlsruhe
Tricine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	Invitrogen-Gibco, Karlsruhe
Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Tween-20	Merck Biosciences GmbH, Bad Soden
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂	Merck Biosciences GmbH, Bad Soden
Xylencyanol	Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg

2.1.3 Puffer, Lösungen

2.1.3.1 DNA

Bakterienzellen: Escherichia coli Top 10 Invitrogen, Karlsruhe

LB-Medium: 10 g Trypton

5 g Hefe-Extrakt;

5 g NaCl;

ad 1 Liter H₂O (pH 7,0)

LB-Agar: 10 g Trypton;

5 g Hefe-Extrakt;

5 g NaCl;

ad 1 Liter H₂O (pH 7,0)

+1% select Agar

Selektionsantibiotika für die Bakterienkultur:

Resistenzgen	Antibiotikum	Stammlösung	Medium-Konzentration
amp	Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
kan	Kanamycin	25 mg/ml	25 µg/ml

Enzyme

Taq-Polymerase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Restriktionsenzyme (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main):

AflI, AflII, AflIII, BamHI, BbvCI, BsrGI, BstBI, ClaI, EcoRI, EcoRV, HindIII, NarI,

NheI, PflMI, SmaI, SnaBI

Quick T4 DNA Ligase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)

Puffer

Restriktionsverdau- Puffer (New England Biolabs):

Puffer 1: 10 mM Bis-Tris Propan-HCl (pH 7,0)

10 mM MgCl₂

1 mM DTT

Puffer 2: 10 mM Tris-HCl (pH 7,9)

10 mM MgCl₂

50 mM NaCl

1 mM DTT

Puffer 3: 50 mM Tris-HCl (pH 7,9)

10 mM MgCl₂

100 mM NaCl

1 mM DTT

Puffer 4: 20 mM Tris-Acetat (pH 7,9)

10 mM Magnesiumacetat

50 mM Kaliumacetat

1 mM DTT

TBE-Puffer (10x): 109,9 g Tris-HCl

55,0 g Borsäure

9,3 g EDTA

bei pH 8,3-8,5

2X-Ligationspuffer (New England Biolabs):

132 mM Tris-HC
120 mM MgCl₂
2 mM DDT
2 mM ATP
15% Polyethylene glycol (PEG 6000)
pH 7.6 @ 25°C

Puffer zur DNA-Preparation (QIAGEN GmbH, Hilden):

Puffer P1: 100 µg/ml RNase A
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
10 mM EDTA

Puffer P2: 20 mM NaOH
1 % w/v SDS

Puffer P3: 3,0 mM Kaliumacetat (pH 5,5)

Puffer QBT: 750 mM NaCl
50 mM MOPS (pH 7,0)
15 % v/v Isopropanol
0,15 % v/v Triton X-100

Puffer QC: 1,0 M NaCl
50 mM MOPS (pH 7,0)
15 % v/v Isopropanol (pH 7,0)

Puffer QF: 1,25 M NaCl
50 mM Tris-HCl
15 % v/v Isopropanol (pH 8,5)

Puffer QN: 1,6 mM NaCl
50 mM MOPS (pH 7,0)
15 % Ethanol (pH 8,5)

TE-Puffer : 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA

Ladepuffer Blue Juice : 8,0 ml H₂O

20,0 ml Glycerin

8,0 ml EDTA (0,5M pH 8)

4,0 ml SDS (1%)

20,0 mg Bromphenolblau

20,0 mg Xylencyanol

DNA Größenmarker „Smart Ladder“(sml): Eurogentec, Seraing

2.1.3.2 Zellkultur

verwendeter Zelltyp:

HEK293 Zellen

Zelllinie 293

Zelltyp humane embryonale Nierenzellen

DSMZ-No ACC 305

Morphologie adhärente fibroblastoide Zellen

Kulturmedium

DMEM (+ 4500mg/l Glucose +Glutamax+ Pyruvat)

Fetal Bovine Serum (hitzeinaktiviert) 10%

Penicillin 100mg/l

Transfektionsmedium: Optimem (+Glutamax), Invitrogen-Gibco

TNT-Lysepuffer: 50mM TrisHCl

200mM NaCl

0,5% Nonidet 40

pH 8,0

10x TBST	100ml	Tris HCl 1M
	300ml	NaCl 5M
	10ml	Tween 20
	ad 1 Liter H ₂ O (pH 7,5)	

Immunopräzipitation

Anti-c-myc Agarose conjugate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Anti-v5 Agarose Affinity Gel	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.2 Methodik

2.2.1 DNA-Methoden

2.2.1.1 Transformation von Bakterien

Für einen Transformationsansatz wurde ein Aliquot kompetenter E.coli TOP 10 auf Eis aufgetaut und sofort danach 60µl der Bakterienzellen mit 1µl auf Eis gekühlter Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock zur DNA-Aufnahme bei 42°C im Wasserbad (30sec) und nach der Zugabe von 250-400µl soc-Medium wurde erneut 1h, diesmal bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf LB-Agarplatten mit Ampicilin ausplattiert und diese für 16 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.2 Stammkonservierung

Zur Aufbewahrung transformierter Zellen wurden 500µl einer LB-Übernachtskultur von E. coli TOP 10 mit 500µl sterilem Glycerol 85% versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.3 Maxi-Preparation

Zur Gewinnung größerer Mengen höherkonzentrierter DNA wurden zunächst 150 ml LB-Medium mit Ampicilin bzw. Kanamycin (1:1000) entweder mit einem Bakterienklon aus der Transformation oder 500µl bei -80°C gelagertem Bakterienstock angeimpft und 16-20h bei 220Upm und 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Die Preparation wurde dann mit dem Qiagen HiSpeed Plasmid Purification Kit durchgeführt. Die über Nacht gewachsenen Bakterien wurden 10min bei 4000Upm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde mit 10ml P1 resuspendiert, die Zellen mit 10ml P2 5min lysiert und mit 10ml P3 10min neutralisiert. Danach wurde das Lysat in eine zuvor mit 10ml QBT-Puffer equilibrierte Säule gedrückt und 10-15 min gewartet, bis die Lösung die Säule passierte. Nach dem Waschen der Säule mit 60ml QC-Puffer, wurde die DNA mit 15ml QF-Puffer eluiert und mit 70% Isopropanol 5min bei -20°C gefällt. Dieses Gemisch wurde dann durch das Maxi Modul gedrückt, diese mit 2ml 70%igem Ethanol gewaschen und 3min luftgetrocknet. Mit 800µl EB-Puffer wurde die Membran eluiert und das Eluat nochmals durch die das Maxi Modul gedrückt um eine größere Ausbeute zu erhalten. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der im Maxi-Prep gewonnenen Plasmid-DNA erfolgte zum Einen im Photometer und zum Anderen im Agarosegel.

mittels Photometer

Die Bestimmung der Absorption bei 260nm Wellenlänge (OD260) diente zur Ermittlung der Konzentration c_{Plasmid} der aufgereinigten doppelsträngigen Plasmid-DNA. Nach 1:100 Verdünnung mit Aqua dest. wurde die OD260 am zuvor gegen Aqua dest. geeichten Photometer gemessen. Die Konzentration c_{Plasmid} der Stammlösung wurde gemäß der folgenden Formel berechnet:

$$c_{\text{Plasmid}} = 50 \mu\text{g/ml} \cdot \text{OD260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zur Bestimmung der Reinheit wurde der Quotient OD260/OD280 herangezogen, der zwischen 1,8 und 1,95 liegen sollte. Werte kleiner als 1,6 sprechen für eine deutliche Kontamination mit Protein. Daher wurden Präparationen mit einem kleineren Quotienten verworfen.

im Agarosegel

Die mit TE-Puffer auf 100ng/µl eingestellte Konzentration der Plasmid-DNA sollte im Agarosegel überprüft werden. Dazu wurden 5µl Plasmid + 3µl Ladepuffer „Blue Juice“ vermischt und in die Taschen eines Agarosegels geladen (0,8% Agarose in TBE-Puffer ad 50ml Aqua dest. mit 6µl Ethidiumbromid). Als Laufpuffer diente ebenfalls TBE-Puffer und als Marker 5µl sml. Der Gellauf erfolgte 30-60 min bei 65-70V. Danach wurden die Plasmid-Banden mit der UV-Lampe detektiert und photographisch dokumentiert. Anschließend wurde die Fläche der Banden ausgemessen mit der Größe und Signalintensität der Markerbanden verglichen und über die Dreisatzrechnung die Konzentration der DNA bestimmt.

2.2.1.5 Kontrolle der resynthetisierten Plasmide per Restriktionsverdau

Um die Richtigkeit der resynthetisierten Plasmide zu überprüfen, wurden diese mit Restriktionsendonukleasen verdaut und anhand der Größenaufftrennung in der Agarose-Gelelektrophorese charakterisiert.

Der Restriktionsverdau wurde wie folgt angesetzt:

1µl	10x Restriktionspuffer (je nach Herstellerempfehlung)
1µl	BSA
1µl	Restriktionsenzym
1-1,5µg	DNA
ad 10µl	HPLC-H ₂ O

Die Zugabe der Restriktionsenzyme erfolgte als letztes, wonach der Ansatz kurz gemischt, abzentrifugiert und 1-2h bei 37°C inkubiert wurde. Für die Gelelektrophorese wurden 3µl Ladepuffer „Blue Juice“ zugefügt und das weitere Prozedere analog zu 2.2.1.4. durchgeführt.

2.2.1.6 Sequenz-PCR

Die Sequenzierung der DNA-Plasmide erfolgte nach dem modifizierten Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger et al. 1977).

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Sequencing reaction kit (Big Dye), welcher *Taq*-DNA-Polymerase, F1, dNTPs, ddNTPs, MgCl₂ und Puffer enthält, in folgenden 10µl-Ansätzen durchgeführt:

1µl Plasmid-DNA

2µl Big Dye

1µl Primer 313

ad 10µl H₂O

Das folgende Programm wurde für die Sequenzierungsreaktion im Thermocycler verwendet.

Programm für die Sequenzierungsreaktion:

	<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
1 Zyklus	Denaturierung	95°C	5 min
30 Zyklen	Denaturierung	95°C	1 min
	Annealing	60°C	1 min
	Elongation	50°C	1 min
1 Zyklus	Abkühlung	4°C	1 min

Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 30µl 100% Ethanol und 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur gefällt. Danach wurden die Ansätze für 30min zentrifugiert (14000Upm) und die DNA-Pellets nach dem Waschen mit 100µl 70%-Ethanol (10min bei RT) erneut 20min zentrifugiert. Die für 45min bei RT getrocknete DNA wurde in 30µl H₂O 45min gelöst und schließlich im Sequenziergerät sequenziert und ausgewertet.

2.2.2 Zellkultur-Methoden

2.2.2.1 Kultivierung der Zelllinie

Die HEK 293 Zellen wurden im Inkubator (Temperatur 37 °C, CO₂ 5%, Luftfeuchtigkeit 95%) adhären in sterilen Zellkulturflaschen (75 cm²) mit dampfdurchlässigem Deckel kultiviert. Die Kulturmediummenge betrug 18-20 ml. Bei einer Konfluenz von 95-100%, die nach 3-4 Tagen erreicht war, wurden die Zellen vereinzelt und je nach Wachstumsrate und Bedarf im Verhältnis 1:2 bis 1:10 neu ausgesät. Dazu wurde das Medium abgesaugt und durch 3ml Trypsin-EDTA ersetzt. Nach 3minütiger Inkubation im Brutschrank erfolgte die Zugabe von 7ml Kulturmedium und die Überführung der Zellsuspension in ein 50ml FalconTM-Gefäß. Die HEK293 Zellen wurden zentrifugiert (1000Upm, 20°C, 5min), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10ml Kulturmedium resuspendiert. Danach wurden die Zellen in Flaschen oder in 6-well Platten eingesetzt, wobei die Zelldichte in den Flaschen (75cm²) über 2x*10⁶

und in den 6-well Platten über $7 \cdot 10^5$ gehalten wurde. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Neumann Zählkammer zu Hilfe genommen.

2.2.2.2 Transfektion

Die Transfektion der Zelllinie mit Plasmid-DNA wurde mittels Lipofektion durchgeführt. Pro 6-well-plate wurden $2 \mu\text{g}$ DNA mit $6 \mu\text{l}$ Plus Reagenz vermischt und mit Optimem auf $100 \mu\text{l}$ aufgefüllt. Nach 15min Inkubation wurden $8 \mu\text{l}$ Lipofectamin und $92 \mu\text{l}$ Optimem dazugegeben und wiederum für 20min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die HEK293 Zellen einmal mit 1ml Optimem gewaschen und in $0,8 \text{ml}$ Optimem vorgelegt. Anschließend wurde der Mastermix auf die Zellen gegeben, so dass ein Transfektionsvolumen von 1ml vorlag. Der Wechsel zum Kulturmedium erfolgte nach 3 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C .

2.2.2.3 Zellyse

Zum Zellaufschluss wurde zunächst jedes 6-well-plate zweimal mit 1ml 1xPBS gewaschen und der zweite Waschschrift in 1ml Eppendorf Tubes überführt, zentrifugiert (5000Upm , 5min, 4°C), und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in $100 \mu\text{l}$ TNT-Lysepuffer mit EDTA-freiem Proteaseinhibitor (Mischverhältnis 1:10) resuspendiert und 20min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension erneut zentrifugiert (14000Upm , 20min, 4°C) und der Überstand in weiteren Proteinmethoden aufgearbeitet.

2.2.3 Protein-Methoden

2.2.3.1 Antikörper

Western Blot Primärantikörper

Maus-anti-V5	Invitrogen 46-0705,
Maus-anti-myc Klon 9E10	erhalten von E. Kremmer GSF, München
Ratte-anti-Notch 3G6	generiert von E.Kremmer GSF, München
Ratte-anti-Notch 2G8	generiert von E.Kremmer GSF, München

Western Blot Sekundärantikörper

Ziege-anti-Maus-HRP	DakoCytomation P0447,
Ziege-anti-Ratte-HRP	Affinipure 112-035-068 Jackson,

SIFT Antikörper

Alexa647 konjugierter anti-Prion-Rhodamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa488 konjugierter anti-v5 –FITC	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa647 konjugierter anti-v5-Rhodamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.2.3.2 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der BCATM Protein Assay Kit von Pierce (Rockford, USA) verwendet. Zur Festlegung der Standardkurve diente BSA in TNT-Lysepuffer unterschiedlicher Konzentrationen (0-2mg). Mit dem BCA Protein Assay lassen sich insbesondere Peptidbindungen detektieren. Cu²⁺-Ionen werden dabei im alkalischen Milieu zu Cu¹⁺-Ionen reduziert. Diese komplexieren mit 2 Molekülen BCA (Bichinolin-4-Carbonsäure) und ergeben einen violetten Farbstoff mit einer Absorption bei 562nm.

Es wurden 10µl Lysat bzw. Proteinstandard in einer 96-well Mikrotiterplatte vorgelegt und 80µl des Gemischs der Reagenzien A und B (50:1) zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Messung der Absorption und Bestimmung der Konzentration im Elisa-Reader. Danach wurden die Lysate unter Verdünnung mit TNT-Lysepuffer auf eine Konzentration von 1µg/µl eingestellt.

2.2.3.3 SDS-Page

Bei allen Polyacrylamidgelen für die Gelelektrophorese handelte es sich um selbst hergestellte Tris-Glycin-Gele, die nach folgendem Schema gegossen wurden (Pipettierschema jeweils für 2 Gele):

Trenngel:

	5%	7,5%
4x Lower Tris	3,75 ml	3,75 ml
H ₂ O	8,60 ml	7,35 ml
Acrylamid	2,50 ml	3,75 ml
TEMED	12,5 µl	12,5 µl
APS (10%)	125 µl	125 µl

Sammelgel:

4x Upper Tris	1,7 ml
H ₂ O	4,9 ml
Acrylamid	925 µl
TEMED	7,5 µl
APS (10%)	75 µl

Die Proben für die Gelelektrophorese wurden im Verhältnis 1:5 mit 5-fach Lämmli-Puffer versetzt, bei 95°C 5min aufgeköcht und nochmals in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 80V für den Lauf durch das Sammelgel und bei 120V für den Durchlauf des Trenngels. Die Zeit betrug je nach Fragestellung zwischen 1-2h bis die Lauffront mindestens am unteren Gelrand angelangt war. Als Marker wurden 6-8µl des BioRad Precision Plus Protein Standard verwendet.

2.2.3.4 Western Blot

Zur Vorbereitung des Blotvorgangs wurde zunächst eine PVDF-Membran (Immobilon-P Transfer Membran, Millipore Corp., USA) 15 sec in Methanol und anschließend 10min in Blotpuffer eingeweicht. Das Gel und die Membran wurden zwischen ebenfalls in Blotpuffer befeuchtetes Whatman-Papier (BioRad Laboratories, München) gelegt und in der Blotkammer 1h bei 25V, 250mA, 50W geblottet. Zur Kontrolle des vollständigen Proteintransfers wurde der Größenmarker herangezogen. Danach erfolgte das Blockieren der Membran in 4% Milchpulver in 1xTBST für 1h bei RT und die Inkubation mit dem Primärantikörper (in 4%Milchpulver in 1xTBST) bei 4°C über Nacht.

Nach mehreren Waschschritten (5x10min) in 1xTBST wurde die Membran 1h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert, danach nochmals gewaschen (3x15min) und zum Schluss 5 min mit 4ml ImmobilonTM Western Detection Reagents (Millipore Corp., USA) benetzt. Daraufhin folgte die Belichtung eines Röntgenfilms (BioMax MR Film, Kodak Industries, France) im Fotolabor.

2.2.3.5 Co-Immunopräzipitation (IP)

Nach der Zelllyse und Proteinbestimmung (siehe oben) wurde zuerst ein Aliquot von 40µl des Totallysates (Konz 1µg/µl) entnommen und mit 10µl 5xLämmli 5min bei 95°C aufgeköcht.

Für die Immunopräzipitation (IP) wurden kommerziell erhältliche anti-V5 bzw. anti-myc Agarose-Beads verwendet. Diese wurden zunächst 5mal in 1ml 1xPBS gewaschen, wobei nach jedem Waschschriff kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Der IP-Ansatz bestand aus:

25µl Beadsuspension

100µl Lysat

75µl 1xPBS+PI (10:1).

Nach einer dreistündigen Inkubation im Rotator bei 4°C wurden die Beads erneut dreimal wie schon beschrieben gewaschen und mit 50µl 1,25xLämmli eluiert (5min, 95°C)

Das Probenvolumen wurde so gewählt um im Anschluss jeweils zwei SDS-PAGEs durchführen zu können.

Für die IP mit EDTA wurde schon zum TNT-Lyse-Puffer und im weiteren Verlauf zum 1xPBS 5mM EDTA-Lösung zugegeben.

2.2.3.6 Zeitreihen

Für die Zeitreihen wurden 100µl des Zelllysates ohne Zugabe von Agarose-Beads bei 4°C rotierend inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten Aliquots von 10µl entnommen. Anschließend wurden die Proben mit 2,5µl 5xLämmli 5min bei 95°C aufgekocht und eine SDS-Page sowie ein Western Blot durchgeführt (siehe oben).

2.2.3.7 SIFT scanning for intensely fluorescent targets

Funktionsprinzip

Die SIFT-Methode wurde 2000 aus der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) zum Nachweis der *de novo* Aggregation verschiedener Proteine weiterentwickelt (Bieschke et al. 2000; Giese et al. 2005). Die Detektion mittels SIFT ist 10-mal sensitiver als mittels Western Blot und erlaubt eine quantitative Aussage über die Aggregatbeschaffenheit.

In der Messlösung befanden sich die zu untersuchenden, mit einem v5-Epitop versehenen, N3-Proteine und fluoreszenzmarkierte Antikörper, die mit einem Argon (488nm) oder Helium-Neon (633nm) Laser angeregt wurden. Der Focus des Lasers betrug 0,44fl, was das Streulicht und den Rauschhintergrund verringerte. Um die Sensitivität zu erhöhen und die Messung zu beschleunigen, wurde der Laser mit 1mm/s durch die Messlösung bewegt. Wenn ein rot oder grün markiertes Molekül in den Brennpunkt geriet, sendete es Licht in der jeweiligen Farbe aus. Durch die Verwendung von verschiedenfarbig fluoreszierenden und gegen unterschiedliche Epitope gerichteten Antikörpern konnte die Spezifität der Methode erhöht werden (Abbildung 5). Monomere sendeten schwache Lichtimpulse aus, während Aggregate zu einem starken Signalanstieg führten.

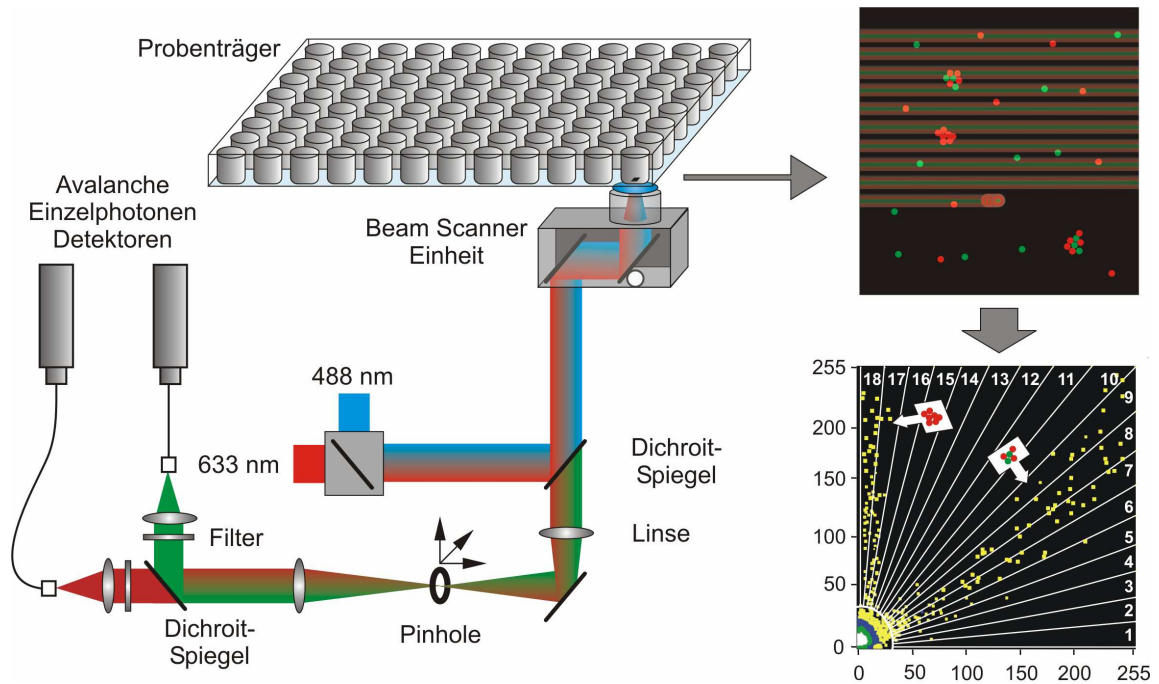


Abbildung 5: Funktionsprinzip des Zwei-Farben-SIFT

Durch die Anregung mit zwei unterschiedlichen Lasern können gleichzeitig zwei unterschiedlich fluoreszierende Teilchen im selben Probenvolumen untersucht werden. Der Laser wird aktiv durch das Probenvolumen bewegt. Wenn ein mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen versehenes Aggregat den Focus passiert, resultiert dies in einem starken Signalanstieg. Zusätzlich kann die Zusammensetzung der Aggregate anhand der Farbverteilung beurteilt werden.

(Mit freundlicher Genehmigung von B.Bader, Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, LMU München)

Die Darstellung der Messung erfolgte im Intensitätshistogramm. Die x-Achse zeigt die grünen Photonen, die y-Achse die roten. Die Häufigkeitsverteilung erfolgt farbkodiert. Wenige Kanäle mit einer bestimmten Photonenzahl werden mit gelb gekennzeichnet, viele Kanäle mit grün. 1 bin ist ein Zeitintervall von $40\mu\text{s}$ in dem die detektierten Photonen aufsummiert werden. Monomere finden sich im Diagramm nahe dem Nullpunkt, Multimere hingegen weiter entfernt lokalisiert (Abbildung 6).

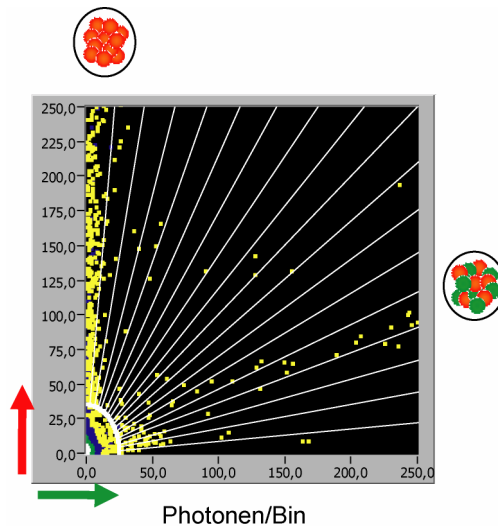


Abbildung 6: SIFT Darstellung im Intensitätshistogramm

x-Achse: grüne Photonen, y-Achse: rote Photonen, farbkodierte Häufigkeitsverteilung der Kanäle. Die Einheit Photonen/bin entspricht der Anzahl der Photonen, die in 40 µs detektiert wurden. Je mehr Lichtimpulse zu einem Zeitpunkt vernommen werden, desto größer ist das aussendende Molekül. (Mit freundlicher Genehmigung von B.Bader, Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, LMU München)

Versuchsdurchführung

Zunächst wurde der Antikörper-Mix hergestellt und im SIFT vermessen:

V5 mAb Mix 10x: 2 µl V5-FITC + 5 µl V5-647 + 750 µl Lysepuffer

Prion Mix 10x: 3 µl SAF37-488 + 3 µl 12F10-647 + 94 µl Lysepuffer.

Anschließend wurde die Autofluoreszenz des TNT-Lysepuffers bestimmt.

Der Probenansatz bestand aus:

60 µl Zelllysate

3 µl β-ME (5%) bzw. H₂O 50% SL

10 µl Antikörper 10x

27 µl TNT-Lysepuffer

Als Antikörper wurde der V5-mAb-Mix bzw. der Prion-Mix zugegeben und als Negativkontrolle wurden der Ansatz mit Zelllysaten mock-transfizierter Zellen oder TNT-Lysepuffer verwendet. Die Messung wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: Justage 200/300 µW, 5 Meander, 10 Sek./Well, Beams Scanner yes, Temperatur 22°C.

3 Ergebnisse

3.1 Notch3-Konstrukte

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche zur Untersuchung der Notch3 Akkumulation wurden sowohl die Extrazellulärdomänen ($N3^{ECD}$) als auch die Vollängenrezeptoren ($N3^{FL}$) verwendet. Die cDNA Konstrukte wurden transient in HEK293 Zellen transfiziert. Die $N3^{ECD}$ -Konstrukte wurden C-terminal und die $N3^{FL}$ -Konstrukte N-terminal mit einem v5 bzw. myc-Epitop konjugiert. Zum besseren Überblick sind in Abbildung 7 alle verwendeten Konstrukte schematisch dargestellt.

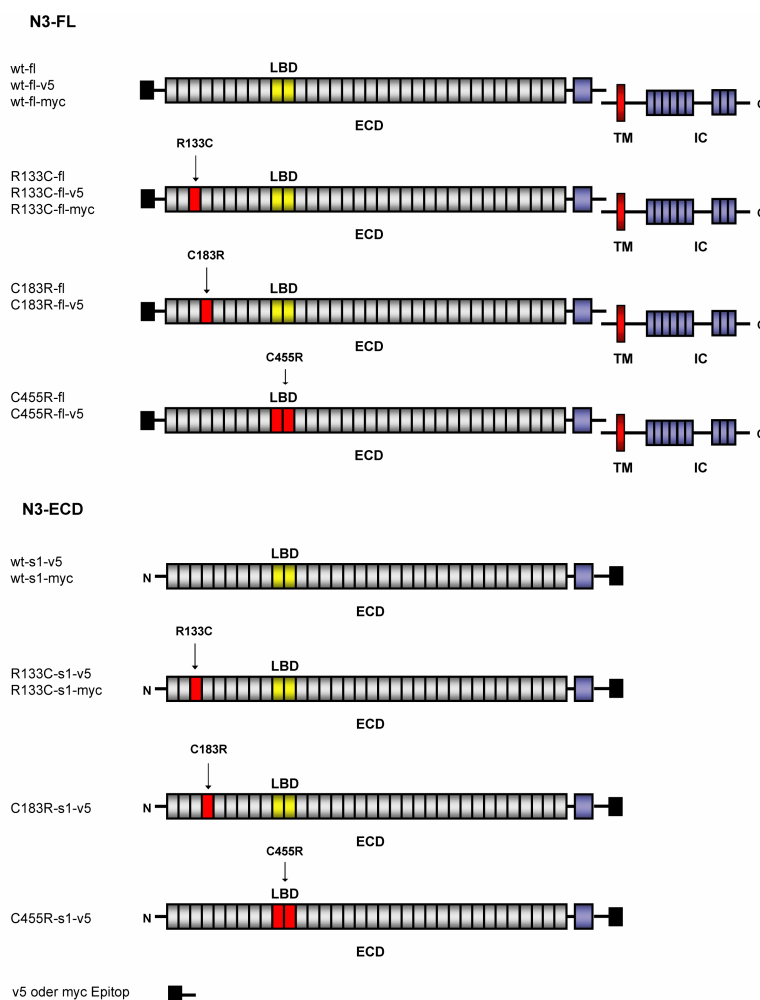


Abbildung 7: schematische Darstellung der in der Arbeit untersuchten N3-Konstrukte

Unter N3-FL abgebildet sind alle verwendeten Notch3-Vollängenrezeptoren mit einem N-terminalen v5 oder myc Epitop als tag. ECD: extrazelluläre Domäne des Rezeptors, TM: Transmembrandomäne, IC: intrazelluläre Domäne, LBD: Ligandenbindungsdomäne.

Mit N3-ECD bezeichnet sind die trunkierten N3-Konstrukte (s1), worunter nur die extrazelluläre Domäne des Rezeptors mit einem C-terminalen tag verstanden wird. Für die Versuche verwendet wurden die Wildtyprezeptoren sowie die CADASIL-assoziierten Mutationen R133C, C183R und C455R.

3.2 Expressionsnachweis von Notch3 in HEK293 Zellen

Zur Untersuchung der Notch3-Rezeptorinteraktion wurden in ersten Experimenten die schon zuvor in der Arbeitsgruppe klonierten N3^{ECD} und N3^{FL} Konstrukte transient in HEK293 Zellen überexprimiert.

Der Expressionsnachweis der oben genannten Konstrukte erfolgte im Western Blot (Abbildung 8); zunächst wurden alle vier Konstrukte mit einem Ratte anti-N3 Primärantikörper (Abbildung 8A) und dann wt-v5 und R133C-v5 mit dem Maus anti-v5 (Abbildung 8B), wt-myc und R133C-myc mit dem Maus anti-myc Primärantikörper (Abbildung 8C) dargestellt. Als Sekundärantikörper stand ein Ziege anti-Maus HRP Antikörper zur Verfügung und zur Kontrolle wurden Leervektor transfizierte (mock) Zellen herangezogen.

Alle Konstrukte und deren quantitativ gleichmäßige Expression in HEK293 Zellen konnte mit einem spezifischen Signal nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Beobachtung gemacht, dass trotz Zugabe von 5% β -Mercaptoethanol, wodurch alle bestehenden Disulfidbrücken gelöst werden sollten, höhermolekulare, deutlich oberhalb des erwarteten Signals liegende Banden zur Darstellung kamen (Abbildung 8 *). Diese könnten Dimeren des N3-Rezeptors entsprechen.

Die Expression der Vollängenrezeptoren wurde in gleicher Weise im Western Blot nachgewiesen.

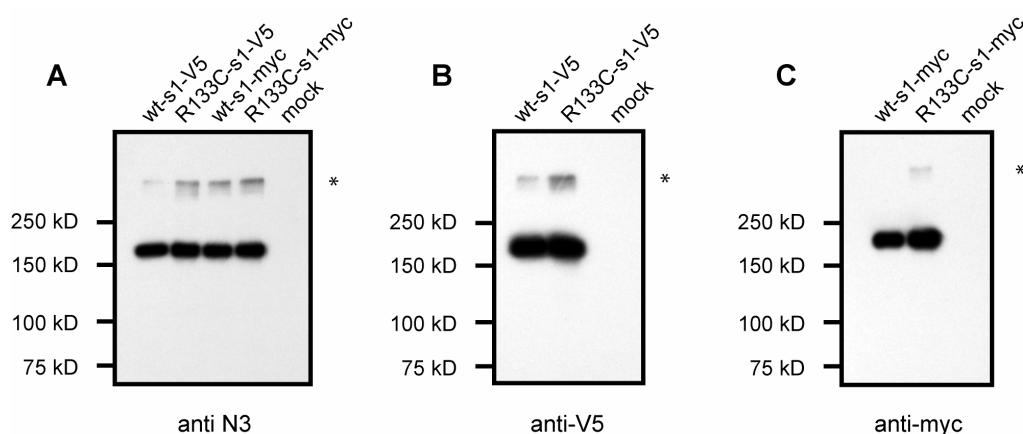


Abbildung 8: Expressionsnachweis von N3^{ECD} in HEK 293 Zellen im Western Blot.

Der Nachweis der Konstrukte in Zellysaten erfolgte unter Zugabe von 5% β -Mercaptoethanol. Als Negativkontrolle wurden Leervektor transfizierte Zellen (mock) verwendet. (A) Detektion der v5 und myc-markierten Wildtyprezeptoren und der R133C-Mutanten mit dem anti-N3 Antikörper. (B) Nachweis der Expression von wt-s1-v5 und R133C-s1-v5 unter Verwendung des anti-v5 Antikörpers. (C) Darstellung von wt-s1-myc und R133C-s1-myc mit dem anti-myc Antikörper. Zusätzlich kamen in allen drei Abbildungen höhermolekulare β -Mercaptoethanol resistente Banden zur Darstellung (*).

3.3 Immunopräzipitation zur Untersuchung einer homophilen N3^{ECD}

Interaktion

Um diese höhermolekularen Komplexe genauer zu erfassen und die Rezeptorinteraktion zu analysieren, wurden die N3-Konstrukte in Co-Immunopräzipitationen untersucht. Da die extrazelluläre Domäne des Rezeptors für die Erkrankung die Hauptrolle zu spielen scheint, wurden die Versuche zunächst mit N3^{EC} durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden myc- und v5-markierte Extrazellulärdomänen des Wildtyprezeptors und der R133C-Mutante in HEK293 Zellen transient kotransfiziert:

wt-v5 + wt-myc

R133C-v5 + R133C-myc

wt-v5 + R133C-myc

R133C-v5 + wt-myc

mock (Leervektor)

Im zweiten Schritt erfolgte unter Einsatz gegen das v5-Epitop gerichteter Agarose-Beads die Präzipitation der v5-markierten Rezeptoren. Anschließend wurden die Präzipitate in zwei gleichen Ansätzen im Western Blot analysiert. Ein Ansatz wurde mit dem anti-v5 Primärantikörper inkubiert (Kontrolle) und der zweite mit dem anti-myc Primärantikörper.

Nach Detektion zeigte sich im Western Blot des ersten Ansatzes ein deutliches positives Signal für beide mit einem v5-Epitop versehene Konstrukte. Die Banden verliefen auf der für N3^{ECD} charakteristischen Höhe von 210kD. Dies konnte als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Durchführung der Immunopräzipitation gewertet werden.

Auch nach Inkubation mit dem anti-myc Antikörper zeigte sich im Western Blot ein spezifisches positives Signal für die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, welches die Schlussfolgerung zuließ, dass auch die myc markierten Rezeptoren alle in gleicher Weise mit anti-v5-Agarose-Beads zu präzipitieren waren (Abbildung 9A).

Analog zum eben beschriebenen Versuchsaufbau wurde die Co-Immunopräzipitation mit anti-myc-Agarose-Beads durchgeführt. Auch hier konnte ein für N3^{ECD} spezifisches Signal in beiden Ansätzen nachgewiesen werden (Abbildung 9B).

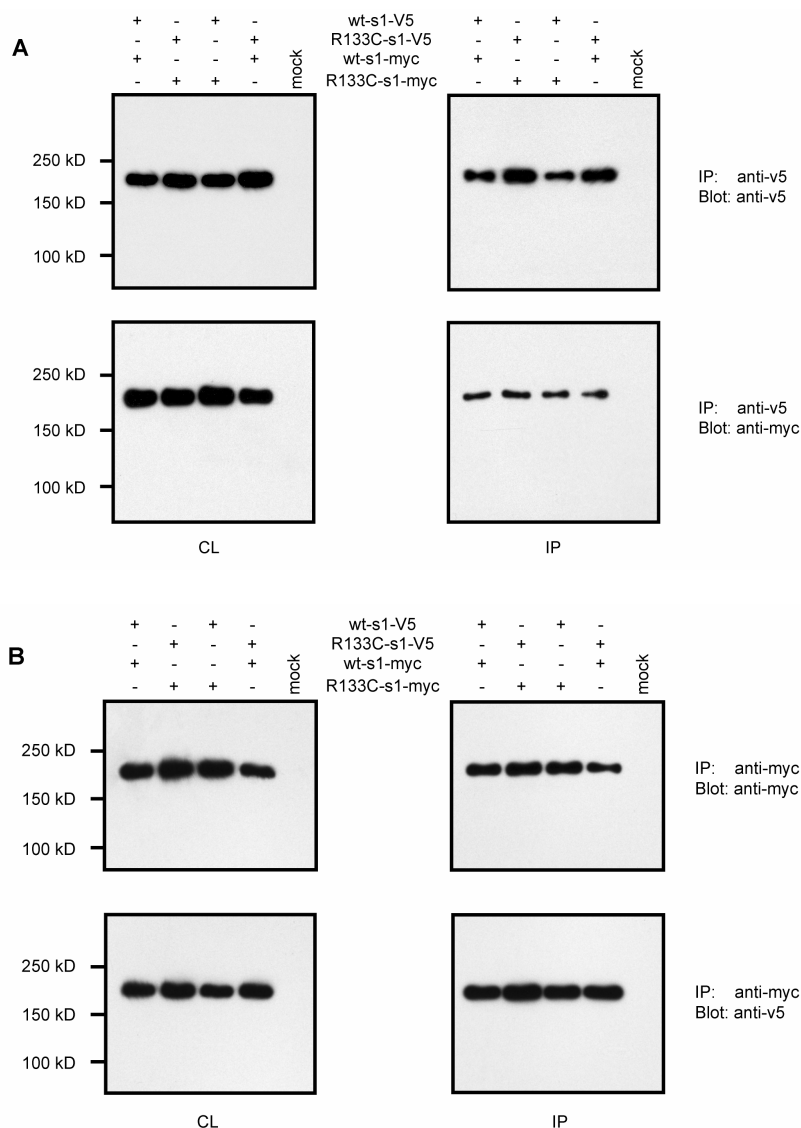


Abbildung 9: homophile Interaktion von N3^{ECD}

Co-Immunopräzipitation von wt-s1-v5 und R133C-s1-v5 mit wt-s1-myc und R133C-s1-myc und mock (Leervektor transfizierte Zellen) als Negativkontrolle. In der linken Spalte wurden Zelllysate (CL) und in der rechten die Eluate nach Präzipitation (IP) dargestellt. (A) N3^{ECD} wurde mit anti-v5 Antikörper präzipitiert und die Analyse im Western Blot erfolgte in der oberen Reihe mit anti-v5 Antikörper und in der unteren Reihe mit anti-myc Antikörper. (B) Analog zur Abbildung A wurde die Präzipitation mit anti-myc Antikörper durchgeführt und zur Detektion im Western Blot wiederum anti-myc (obere Reihe) bzw. anti-v5 Antikörper (untere Reihe) eingesetzt.

In beiden Versuchen zeigte sich ein N3^{ECD} spezifisches Signal bei 210kDa.

Um Interaktionsartefakte, die durch eine unspezifische Bindung der Rezeptoren an die Agarose-Beads bedingt sein könnten, auszuschließen, wurde ein zusätzlicher Experimentalansatz gewählt. Es wurde versucht wt-v5 und R133C-v5 mit anti-myc Agarose-Beads zu präzipitieren. Das Eluat wurde anschließend im Western Blot aufgetragen. Wie erwartet, konnte nur für die Positivkontrolle (wt-myc) ein N3^{ECD} spezifisches Signal erzielt werden (Abbildung 10A).

Auch die unspezifische Bindung von wt-myc und R133C-myc wurde auf diese Weise mit wt-v5 als Positivkontrolle und Leervektor transfizierten Zellen (mock) als Negativkontrolle ausgeschlossen (Abbildung 10B).

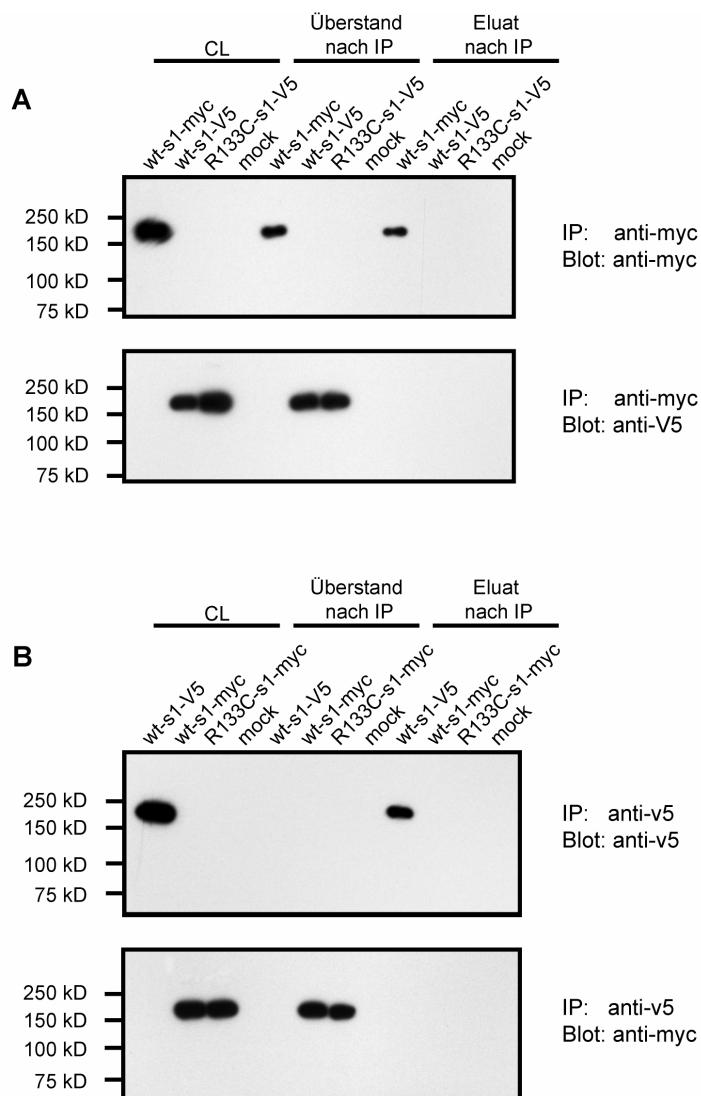


Abbildung 10: Ausschluß einer unspezifischen Bindung von N3^{ECD} an Agarose-Beads

(A) Co-Immunopräzipitation von wt-s1-myc, wt-s1-v5, R133C-s1-v5 mit anti-myc Antikörper. Im Western Blot aufgetragen wurden die Zelllysate (CL), die Überstände nach Immunopräzipitation und die Eluate nach Präzipitation. Anschließend wurde anti-myc Antikörper (oben) und anti-v5 Antikörper (unten) eingesetzt. (B) Hier wurde die Präzipitation von wt-s1-v5, wt-s1-myc, R133C-s1-myc mit anti-v5 Antikörper durchgeführt und wie in Abbildung (A) im Western Blot aufgetragen. Der erste Blot wurde mit anti-v5 Antikörper und der zweite mit anti-myc Antikörper inkubiert.

In beiden Ansätzen wurden als Negativkontrolle Leervektor transfizierte (mock) Zellen verwendet.

Somit konnte festgehalten werden, dass eine Präzipitation der extrazellulären Domäne mit Wildtyp und mutierten Rezeptoren reziprok möglich ist. Dies bestätigte, dass eine homophile Interaktion der Rezeptoren stattfand, wenn diese kotransfiziert wurden. Es zeigten sich noch keine Unterschiede in der Interaktion zwischen den Wildtyp bzw. den mutierten Rezeptoren.

Zu beachten ist aber, dass mit diesem Versuch noch keine quantitativen Aussagen über die Interaktion gemacht werden konnten.

3.4 Immunopräzipitation zur Untersuchung einer homophilen N3^{FL} Interaktion

Da die Versuche mit der extrazellulären Domäne des N3-Rezeptors schon einen deutlichen Hinweis auf eine Interaktion lieferten, wurden die Immunopräzipitationsexperimente auf die Notch3 Vollängenkonstrukte ausgeweitet. Hiermit wollte man sich den physiologischen, in der Zelle vorliegenden Bedingungen annähern.

Es wurden wiederum HEK293 Zellen mit folgenden N3^{FL} Plasmiden transient kotransfiziert:

wt-v5 + wt-myc

R133C-v5 + R133C-myc

wt-v5 + R133C-myc

R133C-v5 + wt-myc

mock (Leervektor)

Analog zu den N3^{ECD}-Versuchen wurden Co-Immunopräzipitationen mit anti-v5-Agarose-Beads und anti-myc-Agarose-Beads durchgeführt. Anschließend erfolgte die Analyse der Präzipitate im jeweils zweifachen Ansatz (siehe oben) im Western Blot mit dem anti-v5 (Abbildung 11A) und dem anti-myc Primärantikörper (Abbildung 11B).

Ebenso wurden auch die Experimente zum Ausschluß einer unspezifischen Rezeptor-Bead-Interaktion wie in 3.2 beschrieben mit den N3^{FL} wiederholt (Abbildung 12).

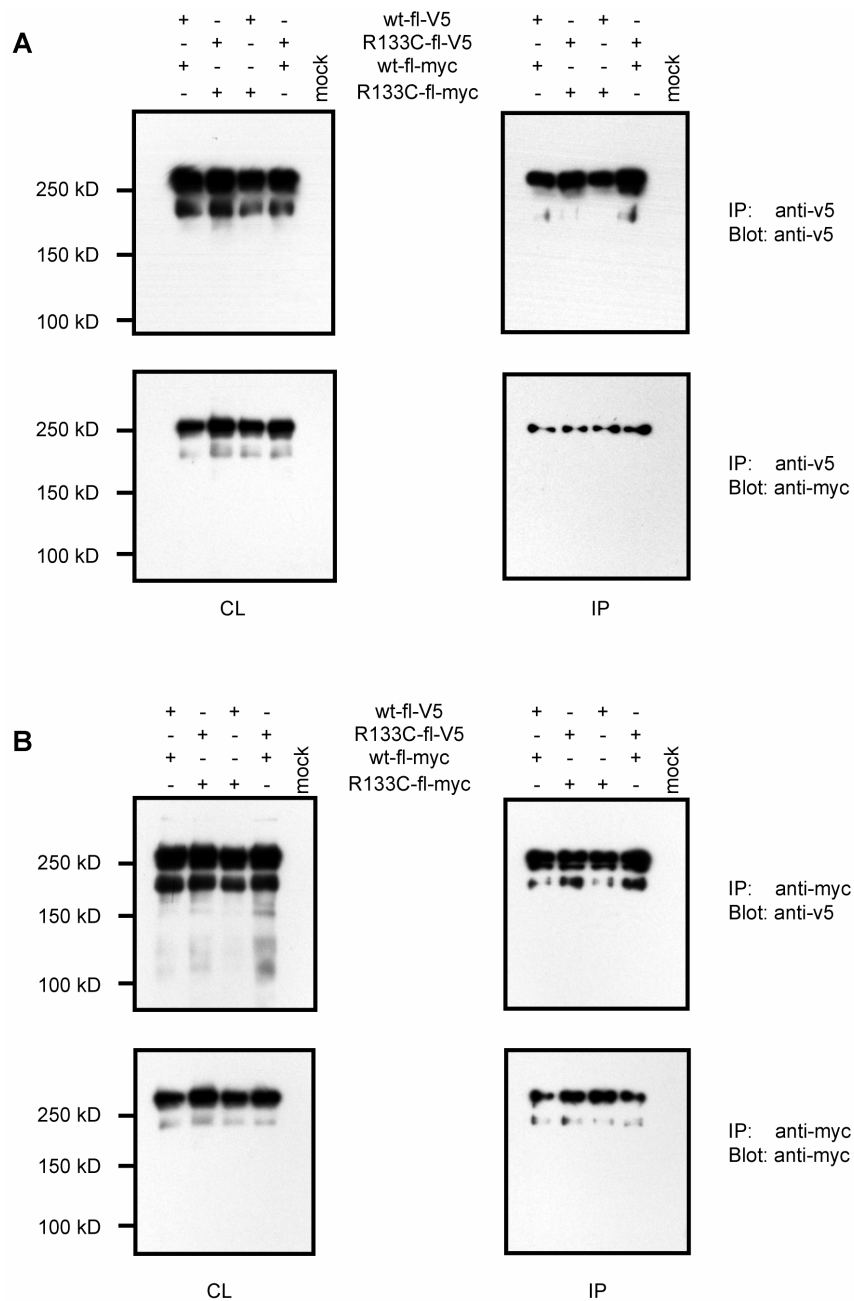


Abbildung 11: homophile Interaktion von N3^{FL}

Co-Immunopräzipitation von wt-fl-v5 und R133C-fl-v5 mit wt-fl-myc und R133C-fl-myc und mock (Leervektor transfizierte Zellen). Die beiden Darstellungen links zeigten die Zellysate (CL), die rechten Darstellungen die Eluate nach Präzipitation (IP). Sowohl die Vollängenbanden (280kD) als auch die Banden der extrazellulären Domänen (210kD) waren zu erkennen. (A) Es wurden die N3^{FL} Rezeptoren mit anti-v5 Antikörper präzipitiert und anschließend mit anti-v5 und anti-myc Antikörpern im Western Blot dargestellt. (B) In Analogie zu Abb (A) wurde die Immunopräzipitation mit anti-myc Antikörper durchgeführt und zur Analyse ebenso anti-myc und anti-v5 Antikörper verwendet.

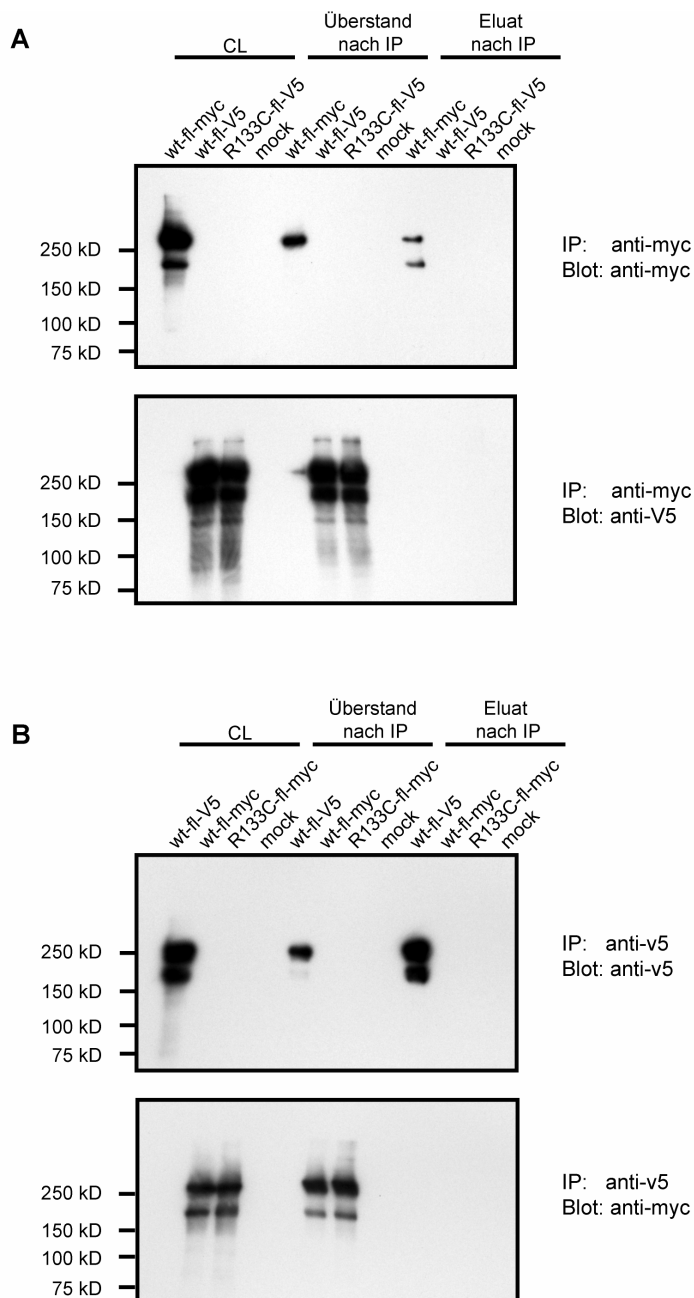


Abbildung 12: Ausschluß einer unspezifischen Bindung von Notch3^{FL} an Agarose-Beads

(A) Analog zu den Versuchen mit N3^{EC} wurden wt-fl-myc, wt-fl-v5 und R133C-fl-v5 mit anti-myc Agarose-Beads präzipitiert. (B) In dieser Abbildung wurde die Immunopräzipitation von wt-fl-v5, wt-fl-myc und R133C-fl-myc mit anti-v5 Agarose-Beads durchgeführt.

In beiden Ansätzen wurden die Zelllysate (CL), die Überstände nach Immunopräzipitation und die Eluate nach Immunopräzipitation im Western Blot aufgetragen und zur Detektion ein anti-v5 und ein anti-myc Antikörper herangezogen. Als Negativkontrolle dienten Leervektor transfizierte (mock) Zellen.

In diesen Experimenten bestätigte sich, dass analog zu den Versuchen mit N3^{ECD} auch eine homophile Interaktion der Vollängenrezeptoren vorlag. Daneben wurden auch die extrazellulären Domänen des Rezeptors, die schon im Zelllysate vorzufinden waren, präzipitiert. Ob das schwächere Signal dieser Banden im Western Blot auf eine geringere

Präzipitation des N3^{ECD} oder auf technische Fehler zurückzuführen war, konnte nicht geklärt werden.

Auch in der Untersuchung mit den Vollängenrezeptoren zeigte sich kein eindeutiger Unterschied im Ausmaß der Präzipitation zwischen Wildtyp- und mutierten Rezeptoren.

3.5 Untersuchung eines Ca²⁺ Einflusses auf die N3^{ECD}- Interaktion

Für Notch1 wurde bereits eine mögliche Ca²⁺Abhängigkeit der intermolekularen Interaktion untersucht (Vooijs et al. 2004; Sakamoto et al. 2005). Für den Wildtyprezeptor hatte diese offenbar keine Bedeutung, da sich keine Änderung der Heterodimerbildung zeigte.

Für Notch3 ist bekannt, dass fast alle bisher bekannten CADASIL-Mutationen innerhalb der Ca²⁺bindenden EGF-like repeats, zum Gewinn oder Verlust eines Cysteinrestes führen und somit eine Konformationsänderung des Rezeptors zur Folge haben könnten. Ferner wurde diskutiert, ob diese Konformationsänderung eine Ursache für die Notch3 Akkumulationen sein könnte. Deswegen sollte die Ca²⁺Abhängigkeit der Interaktion von N3^{ECD} untersucht werden.

Dazu wurden HEK293 Zellen, die mit N3^{ECD} transient kotransfiziert wurden (siehe 3.3) zunächst mit TNT-Lysepuffer +5mM EDTA lysiert. Anschließend wurde nach schon beschriebenem Protokoll die Co-Immunopräzipitation jeweils mit anti-V5-Agarose-Beads und anti-myc-Agarose-Beads durchgeführt. Der Probenpuffer wurde ebenfalls mit 5mM EDTA versetzt. Zusätzlich diente als Kontrolle die Präzipitation der Konstrukte ohne Zugabe von EDTA. Die Analyse erfolgte wie in den vorherigen Versuchen im Western Blot (Abbildung 13).

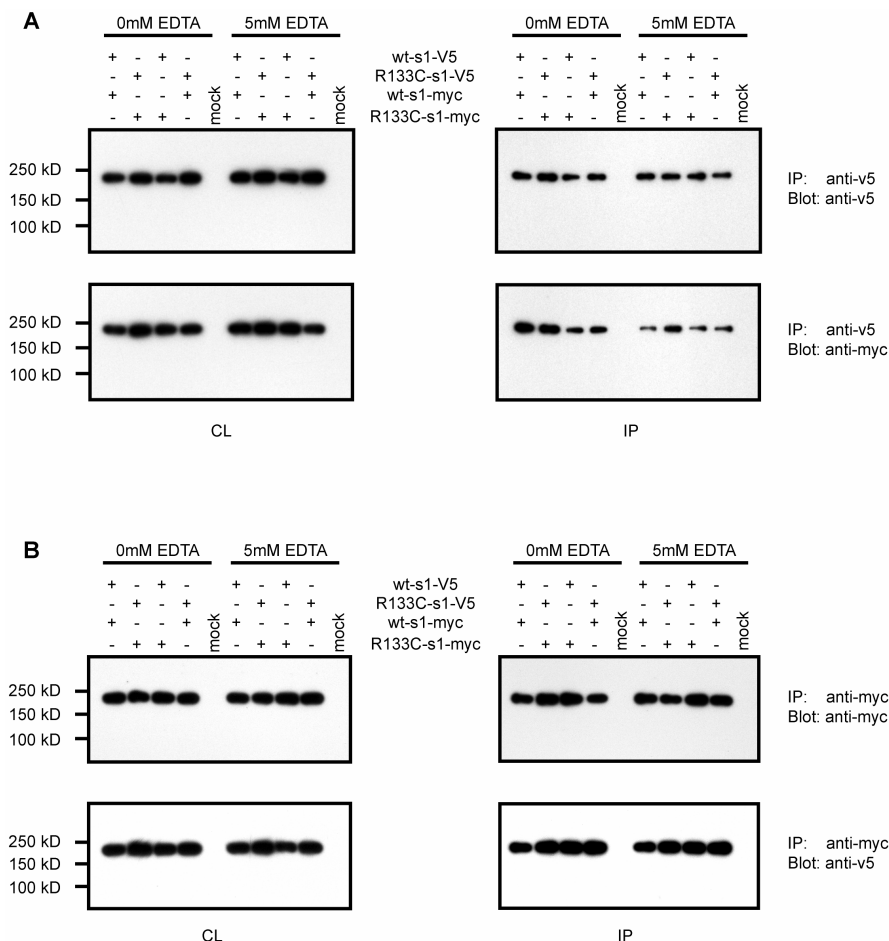


Abbildung 13: Einfluss eines Ca^{2+} Entzugs auf N3^{ECD} Interaktionen

Durchführung der Co-Immunopräzipitation ohne (0mM) und mit (5mM) EDTA als Chelator. Es wurden die Zelllysate (CL) und die Präzipitate (IP) im Western Blot aufgetragen. Präzipitiert wurden wt-s1-v5 und R133C-s1-v5 mit wt-s1-myc und R133c-s1-myc. Als Kontrolle wurden Leervektor transfizierte (mock) Zellen eingesetzt. (A) Immunopräzipitation mit anti-v5 Antikörper; obere Darstellung nach Inkubation mit anti-v5, untere nach Inkubation mit anti-myc Antikörper. (B) Co-IP mit anti-myc Antikörper, Detektion mit anti-myc (oben) und anti-v5 (unten) Antikörper.

Die Eluate nach Immunopräzipitation mit 5mM EDTA zeigten die gleichen Ergebnisse wie die Präzipitate ohne EDTA-Zugabe. Da in diesem Versuchsaufbau Ca^{2+} erst während der Zelllyse, also nach Bildung der Dimere entzogen wurde, lässt sich ein Einfluss auf die Rezeptorinteraktion nicht ausschließen.

3.6 Zeitabhängige Bildung höhermolekularer β -ME resistenter N3^{ECD} Komplexe

Da die biochemischen Mechanismen zur Akkumulation von N3^{ECD} unklar sind, sollte in Analogie zu anderen Proteinablagerungserkrankungen, die Zeitabhängigkeit der Aggregation untersucht werden. Es ist aus *in vitro* Versuchen bekannt, dass das Amyloid Beta ($\text{A}\beta$) Peptid zeitabhängig zu $\text{A}\beta$ -Aggregaten reift (Podlisny et al. 1995; Harper et al. 1997; Kirkitadze et al. 2002; Finder et al. 2007; Haass et al. 2007; Winkelhofer et al. 2008).

Um zu untersuchen, ob dieses Phänomen in der CADASIL Pathogenese auch zum Tragen kommt, wurde ein einfacher Versuchsaufbau gewählt: mit jeweils nur einem N3-Plasmid transient transfizierte HEK293 Zellen wurden in TNT-Puffer mit Proteaseinhibitor lysiert und anschließend 100µl des Lysates (Proteinkonzentration 1µg/µl) bei 4°C im Rotator inkubiert. Im ersten Ansatz wurden folgende Konstrukte der extrazellulären Domäne des N3-Rezeptors überexprimiert:

wt-v5

R133C-v5

C183R-v5

C455R-v5

mock (Leervektor)

Zum Zeitpunkt 0h und 24h wurden 10µl der Proben entnommen, mit 2,5µl 5x Lämmli + 5% β-Mercaptoethanol aufgekocht, im Western Blot aufgetragen und mit dem anti-v5 Primärantikörper markiert.

Es war zu beobachten, dass die höhermolekularen β-Mercaptoethanol resistenten Komplexe, welche schon vor der Inkubation schwach zu sehen waren, nach 24 h deutlich an Intensität zunahmten, was auf eine Art „Reifung“ der Aggregatbildung über die Zeit schließen ließ (Abbildung 14A).

Dieser Versuchsaufbau wurde auch mit den Vollängenrezeptoren in gleicher Weise durchgeführt. HEK293 Zellen wurden mit folgenden N3^{FL} Konstrukten transient transfiziert:

wt

R133C

C183R

C455R

mock (Leervektor)

Hier wurden die Zelllysate der Zeitpunkte 0h und 48h im Western Blot aufgetragen und die Notch3 Rezeptoren nach Detektion mit einem anti-N3 Primärantikörper dargestellt (Abbildung 14b). Auch in diesem Bild zeigte sich eine Zunahme der höhermolekularen Komplexe nach Inkubation.

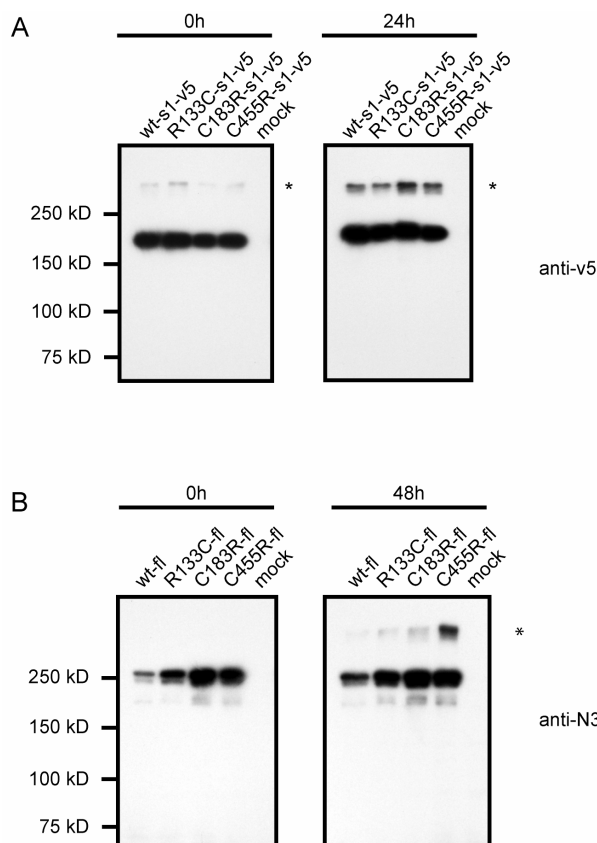


Abbildung 14: zeitabhängige Bildung höhermolekularer β -ME resistenter Komplexe

In beiden Ansätzen wurden Zelllysate nach Zugabe von 5% β -Mercaptoethanol im Western Blot aufgetragen. Als Kontrolle wurden jeweils Leervektor transfizierte (mock) Zellen verwendet.

(A) Hier wurden wt-s1-v5, R133C-s1-v5, C183R-s1-v5 und C455R-s1-v5 zum Zeitpunkt 0h und nach 24h Inkubation bei 4°C mit einem anti-v5 Antikörper untersucht. (B) Im zweiten Versuchsaufbau wurden wt-fl, R133C-fl, C183R-fl und C455R-fl nach 0h und 48h unter Verwendung eines anti-N3 Antikörper betrachtet.

In beiden Abbildungen wurden nicht nur die charakteristischen N3^{EC} Banden bei 210 kDa sichtbar, sondern auch deutlich höher liegende β -Mercaptoethanol resistente Komplexe (*).

Da mit dem anti-v5 Primärantikörper eine sensitivere Detektion möglich ist, als mit dem anti-N3 Primärantikörper, wurde eine zusätzliche „Zeitreihe“ mit den zwei der Arbeitsgruppe zur Verfügung stehenden v5-markierten N3^{FL} Konstrukten gestartet:

wt-v5

R133C-v5

Als Kontrolle wurden wiederum Leervektor (mock) transfizierte Zellen herangezogen.

In diesem Versuch konnten folgende Zeitpunkte in der SDS-Page betrachtet werden: 0h, 6h, 12h, 24h und 48h (Abbildung 15).

Zusätzlich zu einer Zunahme der höhermolekularen Komplexe über die Zeit, war auch eine Tendenz zur deutlicheren Zunahme dieser Komplexe durch den mutierten Rezeptor zu vermerken.

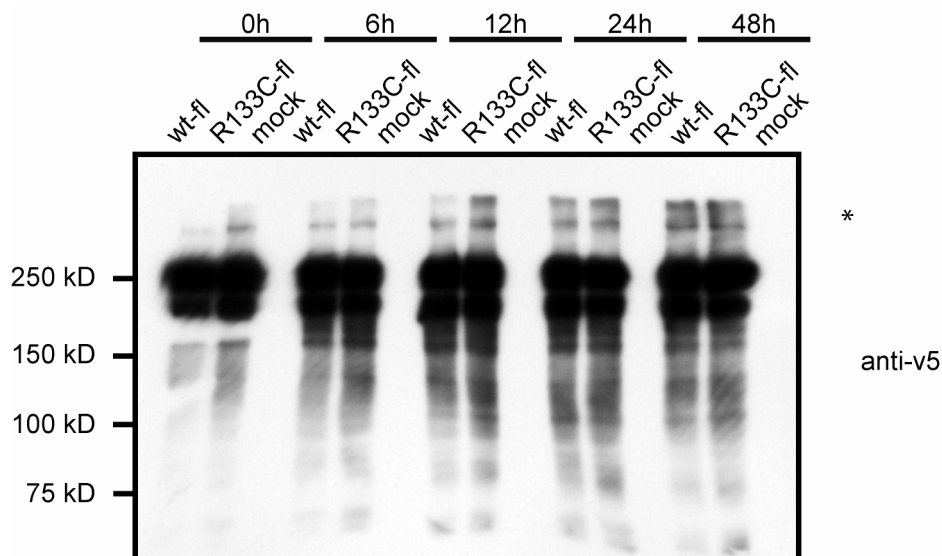


Abbildung 15: Ausbildung der höhermolekularen Komplexe durch die R133C-Mutante

Die Zelllysate von wt-fl-v5 und R133C-fl-v5 exprimierenden HEK293 Zellen wurden nach jeweils 0h, 6h, 12h, 24h, und 48h bei 4°C, im Western Blot aufgetragen und mit einem anti-v5 Antikörper detektiert. Leervektor transfizierte Zellen (mock) dienen als Negativkontrolle. (*) Es zeigte sich nicht nur eine Zunahme der höhermolekularen β -Mercaptoethanol resistenten Komplexe über die Zeit, sondern auch eine vermehrte Bildung dieser Komplexe durch den mutierten Rezeptor.

Somit ließ sich festhalten, dass die Bildung der β -Mercaptoethanol resistenten, höhermolekularen Komplexe zeitabhängig und eine vermehrte Komplexbildung durch den mutierten Notch3 Rezeptor nicht auszuschließen war.

3.7 Untersuchung der N3^{ECD}-Interaktion mittels SIFT

Da der Methode des Western Blotting im Bereich von über 500kD, in dem sich die Untersuchung der Notch3-Aggregate bewegt, technische Grenzen gesetzt sind und möglicherweise nicht alle höhermolekularen Komplexe erfasst werden, wurde eine zu diesen Zwecken aussagekräftigere Methode herangezogen. Das „scanning for intensely fluorescent targets“ (SIFT) wurde ursprünglich aus der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) weiterentwickelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in ersten Schritten versucht, diese Methode für die Untersuchung der Notch3-Aggregation zu modifizieren. Das Ziel der Versuche war, Wildtyp und mutierten Rezeptor mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren und im SIFT zu untersuchen. Zum Einen wollte man eine Größenordnung der entstehenden Aggregate (im Gegensatz zur Immunopräzipitation) erreichen und zum Anderen durch die unterschiedliche Farbausprägung in den Aggregaten eine Charakterisierung dieser vornehmen.

Zunächst wurden folgende N3^{ECD}-Konstrukte transient in HEK293 Zellen transfiziert:

wt-v5

R133C-v5

C183R-v5

C455R-v5

mock (Leervektor)

Anschließend erfolgte die Zellyse in TNT-Lysepuffer mit Proteaseinhibitor und die Inkubation mit Alexa488 konjugiertem (FITC) und Alexa647 konjugiertem (Rhodamin) anti-v5 Antikörper. Unmittelbar danach wurden die Proben im SIFT gescannt. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde der Lysepuffer mit Zugabe der Antikörper gescannt.

Dieser Versuch wurde zweifach angesetzt, da ein Durchgang ohne β -Mercaptoethanol und der zweite mit Zugabe von 5% β -Mercaptoethanol durchgeführt wurde. Zur genaueren Beschreibung des Vorgangs siehe 2.2.3.7. im Methodenteil.

In einem zweiten Versuch wurden Zellysate, die mit denselben Plasmiden transient transfiziert wurden, direkt nach der Zellyse und nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C ohne Zugabe von β -ME im SIFT untersucht (Abbildung 16). Zur Detektion wurden ebenfalls ein Alexa488 konjugierter (FITC) und ein Alexa647 konjugierter (Rhodamin) anti-v5 Antikörper verwendet.

Zur Analyse der Messergebnisse diente ein Intensitätshistogramm, in dem auf der x-Achse die grünen Photonen, auf der y-Achse die roten Photonen und farbkodiert die Häufigkeitsverteilung der Kanäle angegeben wurde. Wenige Kanäle mit einer bestimmten Photonenanzahl wurden mit gelb gekennzeichnet, viele Kanäle mit grün. 1bin entsprach einem Zeitintervall von 40 μ s, in dem die gemessenen Photonen aufsummiert wurden. Je weiter ein Kanal vom Nullpunkt entfernt war, desto höher war seine Lichtintensität, und desto mehr fluoreszenz- markierte Antikörper fanden sich an diesem Punkt des Messvolumens. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass sich dort vermehrt N3^{ECD} befanden.

Als Ergebnis dieser Messungen konnte festgehalten werden, dass schon zum Zeitpunkt 0h eine Multimerbildung der extrazellulären N3-Domänen begann, sich aber kein Unterschied zwischen den Ansätzen des Wildtyprezeptors und der Mutanten zeigte. Des Weiteren wurde bei allen Zellysaten eine Abnahme der Multimerisierung bei Zugabe von 5% β -Mercaptoethanol sichtbar. Dieses Ergebnis passte zur Hypothese, dass unter reduzierenden Bedingungen bestehende Disulfidbrücken gelöst werden und dadurch die Interaktion der

Rezeptoren womöglich gebremst werden könnte. Bei der Messung nach 24h Inkubation zeigte sich im Vergleich zum Zeitpunkt 0h eine insgesamt stärkere Ausbildung der Multimere und auch eine vermehrte Ausbildung der höhermolekularen Komplexe bei den mutierten Rezeptoren. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Wildtyp konnte jedoch nur im Versuch mit der C455R-Mutante nachgewiesen werden ($p < 0,04$ Mann-Whitney-Test).

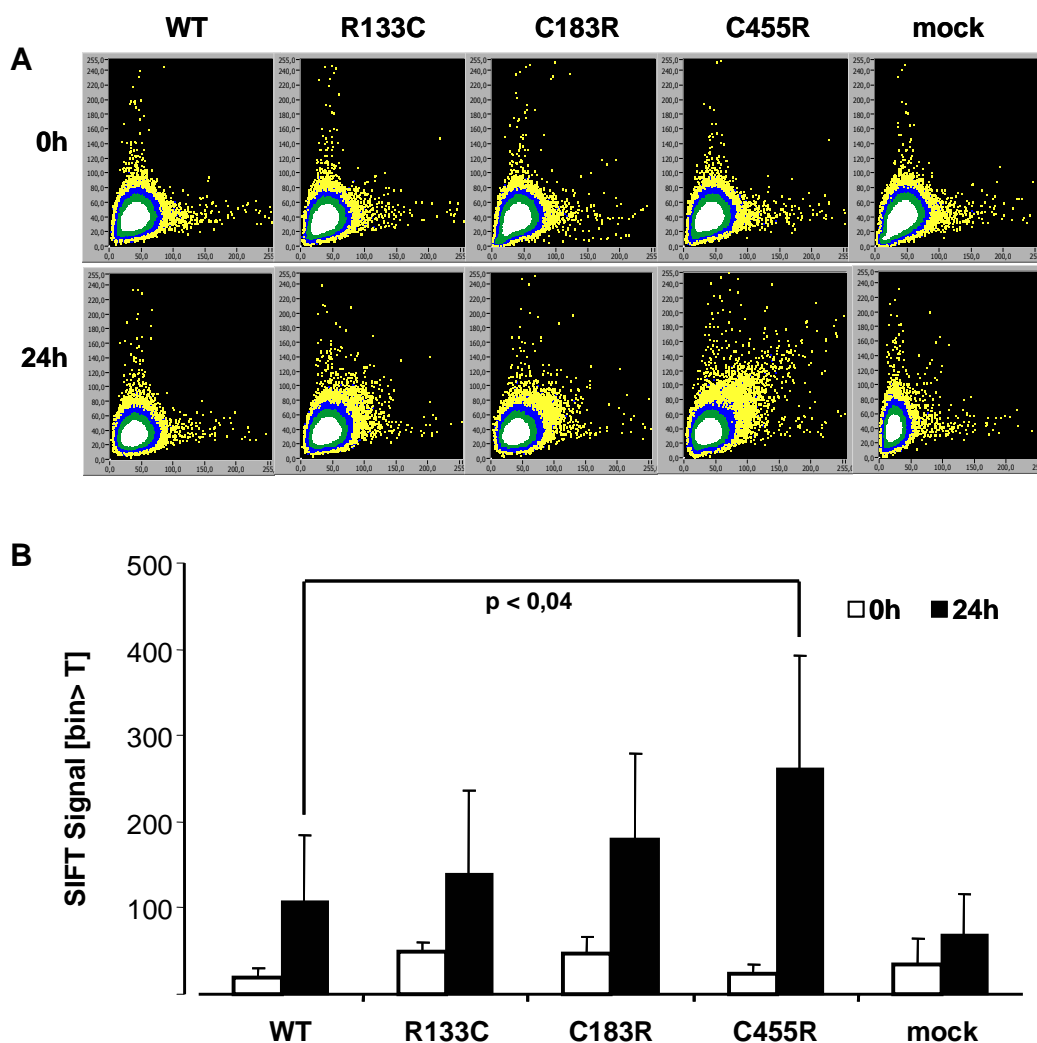


Abbildung 16: N3-Komplexbildung im SIFT und deren Zunahme nach 24h

wt-s1-v5, R133C-s1-v5, C183R-s1-v5 und C455R-s1-v5 exprimierende Zellen wurden lysiert und zum Zeitpunkt 0 und nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C im SIFT gescannt. Als Negativkontrolle angeführt sind hier Leervektor transfizierte Zellen (mock). Für die Untersuchungen wurde Alexa488 konjugierter (FITC) und Alexa647 konjugierter anti-v5 (Rhodamin) Antikörper verwendet. (A) Darstellung der Messergebnisse im Intensitätshistogramm: Die x-Achse entspricht den grünen Photonen, die y-Achse den roten. Die Häufigkeitsverteilung der Kanäle ist farbkodiert (gelb: wenige Kanäle; grün: viele Kanäle). 1 bin entspricht einem Zeitintervall von 40µs, in dem die gemessenen Photonen aufsummiert wurden. (B) Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm. Es zeigte sich eine signifikant stärkere Ausbildung von Multimere im Ansatz der C455R-Mutante nach 24h ($p < 0,04$ Mann-Whitney-Test).

4 Diskussion

Auf dem Hintergrund der bislang vorliegenden Daten zur Krankheitsentstehung von CADASIL sollen nun die erhobenen Ergebnisse hinsichtlich der zentralen Frage dieser Arbeit nach der homophilen Interaktion und der Aggregation der Notch3-Extrazellulärdomänen diskutiert werden.

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.1.1 Co-Immunopräzipitationen

In den Western Blot Analysen zum Expressionsnachweis der N3^{ECD} und N3^{FL} Konstrukte zeigten sich unter reduzierenden Bedingungen deutlich oberhalb des erwarteten Signals liegende, β -ME resistente Banden. Das wies auf eine mögliche Multimerisierung der Notch3-Rezeptoren hin.

Für Notch1 wurden im Western Blot ebenfalls ein höhermolekulares Signal bei 500kDa und eine Dimerisierung der Vollängenrezeptoren beschrieben (Sakamoto et al. 2005). Analog zu den Experimenten mit Notch1, wurden zur weiteren Untersuchung dieser Beobachtungen Co-Immunopräzipitationsversuche mit Notch3 durchgeführt.

In diesen konnten wir zeigen, dass bei transienter Kofransfektion der Rezeptoren in HEK293 Zellen *in vitro* eine homophile Interaktion der Wildtyp- und der mutierten Rezeptoren (R133C) stattfindet. Diese Beobachtung wurde nicht nur in den Versuchen mit der extrazellulären Domäne des Rezeptors, sondern auch mit den Vollängenrezeptoren gemacht. Sowohl Wildtyp- als auch CADASIL-mutierte Rezeptoren konnten in gleicher Weise ohne einen deutlichen quantitativen oder qualitativen Unterschied präzipitiert werden.

In zusätzlichen Immunopräzipitationsversuchen sollten mögliche, die homophile Interaktion beeinflussende, Faktoren untersucht werden. In einigen Experimenten mit Notch1 wurde in der Literatur auf die Rolle von Ca^{2+} in der Heterodimerbildung hingewiesen. Es wird angenommen, dass einige der EGF-like repeats der extrazellulären Domäne Ca^{2+} -bindende EGF-Domänen sind und somit ein Ca^{2+} Entzug bzw. eine Ca^{2+} Zugabe einen Einfluß auf die Interaktionen und Dimerisierungen haben könnte (Rand et al. 2000; Vooijs et al. 2004; Sakamoto et al. 2005).

Deswegen wurden die Co-Immunopräzipitationen unter Zugabe von EDTA als Chelator wiederholt, um eine eventuelle Beteiligung solcher Ca^{2+} -bindender EGF- Domänen an der intermolekularen Interaktion der N3-Rezeptoren zu untersuchen.

Es zeichneten sich zwar keine Unterschiede in der Präzipitation der N3^{ECD} vor und nach Zugabe von EDTA ab. Da Ca^{2+} allerdings erst nach der Ausbildung von Dimeren entzogen wurde, lässt sich ein Ca^{2+} Einfluss nicht sicher ausschließen. Weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe deuten ebenfalls darauf hin, dass Ca^{2+} eine gewisse Rolle in der Interaktion der Rezeptoren einnimmt (unveröffentlichte Daten: Düring, Opherk, AG Neurogenetik).

Da für die Volllängenrezeptoren keine abweichenden Ergebnisse zu erwarten waren, wurde auf die Ausdehnung dieser Versuche auf N3^{FL} verzichtet.

4.1.2 Zeitabhängigkeit der Komplexbildung

Zur weiteren Untersuchung der höhermolekularen Notch3-Komplexe wurden mehrstündige Inkubationen der Zelllysate mit anschließender SDS-Page und Western Blot durchgeführt.

Trotz Zugabe von 5% β -Mercaptoethanol blieben höhermolekulare N3-Komplexe im Western Blot sichtbar. Sowohl unter nicht-reduzierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen nahm die Komplexbildung über die Zeit zu. Dies ließ auf eine Reifung der Multimerbildung schließen. Ein signifikanter Unterschied in der Komplexbildung zwischen Wildtyp und mutierten Rezeptoren im Zeitverlauf konnte in diesen Versuchen noch nicht eindeutig gezeigt werden, es fand sich jedoch ein konsistenter Trend über mehrere Versuche.

Eine bedeutende Limitierung des verwendeten Versuchsdesigns war aber die mangelhafte Größenordnung der Komplexe. Die im Western Blot eingesetzten Marker reichten nur bis in einen Bereich von 500kDa. Die beschriebenen höhermolekularen Komplexe befanden sich jedoch deutlich oberhalb dieses Bereiches. Zudem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass eventuell nicht alle Multimere aufgrund ihrer Größe während der SDS-Page in das Gel eingetreten waren. Es wäre vorstellbar, dass besonders große Komplexe in den Taschen des Sammelgels zurück gehalten wurden. Um diese Probleme zu umgehen, wurde die Methode des „scanning for intensely fluorescent targets“ (SIFT) zur weiteren Untersuchung der Multimere herangezogen.

4.1.3 SIFT - scanning for intensely fluorescent targets

Dieses Verfahren wurde bislang zur Analyse der *de novo* Aggregation von verschiedenen Proteinen wie α -Synuclein oder PrP^{Sc} verwendet (Bieschke et al. 2000; Giese et al. 2005).

Mit dieser Technik ließen sich zusätzlich zur Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) durch die Analyse der Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilung die erhaltenen Signale quantifizieren und daraus die Größe der Multimere, sowie ihre Häufigkeitsverteilung ableiten.

Es wurde das Akkumulationsverhalten von N3^{ECD} im SIFT beobachtet und folgende Ergebnisse erhoben:

Direkt nach Versuchsbeginn kam es schon zur Ausbildung von Multimeren in den Zelllysaten. Diese nahmen jedoch unter reduzierenden Bedingungen (5% β -ME) ab. Nach 24-stündiger Inkubation konnte eine Zunahme der Multimere in allen Ansätzen vermerkt werden - auch im Ansatz mit den Leervektor transfizierten Zellen. Doch im Vergleich zum Wildtyp war für alle mutierten Notch3-Rezeptoren ein stärkeres Signal im SIFT messbar. Signifikant war dieser Unterschied jedoch nur für die C455R-Mutante.

Es kann somit festgehalten werden, dass die im SIFT erhobenen Ergebnisse die bisherigen Annahmen aus den Co-Immunopräzipitationsversuchen und den mehrstündigen Inkubationen der Zelllysate bestätigten. *In vitro* findet eine Interaktion und Multimerisierung der Notch3-Rezeptoren statt.

4.2 Evaluierung der Versuchsbedingungen

Im Rahmen der Diskussion müssen ebenfalls die Versuchsbedingungen, unter denen die Ergebnisse erhoben wurden, evaluiert und Fehlerquellen berücksichtigt werden, die eine Rezeptorinteraktion begünstigen könnten.

4.2.1 Fehlende Proteinaufreinigung

Bei allen verwendeten Proben handelte es sich um nicht aufgereinigte Zelllysate. Dadurch waren die Versuchsbedingungen weniger kontrolliert und es war nicht auszuschließen, dass andere, im Lysat vorkommende Proteine für die Interaktion zwischen den Rezeptoren verantwortlich zu machen oder direkt an der Bindung beteiligt sind. Um dies zu vermeiden, wäre eine Proteinaufreinigung der Notch3-Rezeptoren indiziert gewesen. Eine Aufreinigung von Notch3 mit den gängigen Methoden war jedoch nicht möglich, da die Ausbeute aus HEK293 Zellen sehr gering war. Ferner könnte durch die große numerische (280kDa) und die sterische Größe des Proteins bei einer Aufreinigung über ein Epitop der Zugang zu diesem eingeschränkt werden. Zudem wurde die extrazelluläre Domäne des N3-Rezeptors nicht in das Medium sezerniert (unveröffentlichte Daten: Opherk, Peters, AG Neurogenetik).

4.2.2 Artificielle Überexpression

Ein weiterer, limitierender Faktor ist die artificielle Überexpression der Notch3-Rezeptoren im Zellkulturmodell. Die Überexpression und die dadurch erhöhte Konzentration der Proteine im Zellysate, könnten alleine schon das Akkumulationspotential der Rezeptoren steigern und für die schnelle Komplexbildung innerhalb einiger Stunden verantwortlich sein. Da aber bei gleicher Ausgangsmenge der Notch3-Monomere mehr höhermolekulare Komplexe bei den CADASIL-Mutanten (R133C, C183R, C455R) nachweisbar waren als beim Wildtyprezeptor, kann die Überexpression nicht die entscheidende Ursache für die Multimerisierung sein.

4.2.3 Vorteile des SIFT gegenüber anderen Proteinnachweismethoden

Für die Betrachtung der N3-Rezeptoren und Quantifizierung der Multimere ist SIFT gut geeignet, da es die Untersuchung großer Proteinkomplexe erlaubt und in der Detektion um das 10fache sensitiver ist als der Western Blot. Somit konnten die zu untersuchenden höhermolekularen, β -ME resistenten Komplexe, die zwar wenige, aber deutlich intensivere zeifarbige Signale aussenden, von den schwachen einfarbigen Signalen, die durch Monomere, Dimere oder ungebundene Antikörper erzeugt wurden, unterschieden und deutlich früher erkannt werden.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode gegenüber den anderen verwendeten Techniken war, dass hier das native Protein in seiner natürlichen Form betrachtet werden konnte, da außer einem Zellysepuffer keine Substanzen zugegeben wurden, die die Struktur des Proteins verändern würden.

Da das SIFT ein Hochdurchsatzverfahren ist, könnte in weiteren Experimenten die Interaktion der Notch3-Rezeptoren unter verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht werden. Ebenso können Faktoren, die die Interaktion beeinflussen genauer betrachtet werden und die Charakterisierung der entstehenden Akkumulate durch das SIFT erleichtert werden.

4.2.4 Indirekte Fluoreszenzmarkierung im SIFT

Bei den Messungen im SIFT wurde die indirekte, Antikörper-vermittelte Fluoreszenzmarkierung verwendet. Dem Zellysate wurden gegen das v5-Epitop gerichtete fluoreszenzmarkierte Antikörper zugegeben, die sich an das v5-tag der N3^{ECD} anlagerten und somit die Detektion der Multimere ermöglichten. Es ist aber zu bedenken, dass mit diesem

Verfahren Unsicherheitsfaktoren hinzukommen, die die Aussagekraft der Ergebnisse limitieren. Da es sich bei den Proben um unaufgereinigte Zelllysate handelte, hätte es zur Bindung der Antikörper an andere Proteine oder Zelltrümmer kommen können. Außerdem wäre es vorstellbar, dass die Antikörper untereinander Aggregate bildeten und das starke Signal erzeugten. Um diese zwei Faktoren auszuschalten wurden zunächst nur die Zelllysate vermessen und in einem zweiten Ansatz dann eine Messung des Antikörper-Mix durchgeführt. Somit konnte das Ausmaß des Hintergrundrauschens ermittelt und eine Interaktion der Antikörper untereinander ausgeschlossen werden. Zudem wurden für die SIFT-Analysen nur die zweifarbigen Signale, die Notch3-Multimere repräsentierten, in die Berechnungen miteinbezogen und einfarbige Multimere, die eher Antikörper-Aggregaten entsprachen, nicht beachtet.

Durch den Einsatz aufgereinigter Notch3 und direkter Markierung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoff könnte gewährleistet werden, dass die Lichtsignale wirklich nur von den Notch3-Rezeptoren stammen und die Intensität der Signale mit der Größe der Multimere korreliert. Außerdem könnte über die direkte Fluoreszenzmarkierung der Proteine in weiteren Versuchen eine Unterscheidung zwischen Wildtyp und Mutante in gemischten Ansätzen vorgenommen werden. Doch wie schon erwähnt, ließ sich die Aufreinigung des Notch3-Rezeptors bisher nicht durchführen. In weiteren Arbeiten wurde aber bereits ein Notch3-Konstrukt mit den ersten fünf EGF-like repeats, in denen über 75% aller CADASIL-Mutationen lokalisiert sind, aufgereinigt. Im nächsten Schritt soll das Akkumulationsverhalten dieser Konstrukte im SIFT untersucht werden.

4.3 Relevanz der Ergebnisse hinsichtlich der CADASIL-Pathogenese

In dieser Arbeit konnte mit drei unterschiedlichen Methoden gezeigt werden, dass eine homophile Interaktion der Notch3-Rezeptoren stattfindet und diese durch CADASIL-assoziierte Mutationen beeinflusst wird. An dieser Stelle sollen mögliche Modelle zur CADASIL-Pathogenese diskutiert und die Relevanz der Ergebnisse für die Erkrankung erörtert werden.

4.3.1 Strukturänderungen des N3-Rezeptors

Wie bereits erwähnt, haben nahezu alle bekannten CADASIL-Mutationen einen Verlust oder Gewinn eines Cysteinrestes innerhalb der 34 EGF-like repeats der extrazellulären Notch3-Domäne zur Folge (Joutel et al. 1997). Da jede EGF-Einheit im gesunden Fall sechs

Cysteinreste beinhaltet, führt dies zu einer ungeraden Anzahl an Cysteinresten im mutierten Rezeptor (Peters et al. 2005). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass mutierte Notch3-Rezeptoren über aberrante Disulfidbrückenbindungen mit weiteren Proteinen interagieren. Möglich wären sowohl homophile (mit weiteren Notch3), als auch heterophile (mit anderen Proteinen) Interaktionen, die in einer Multimerisierung der Rezeptoren resultieren könnten.

Die freie SH-Gruppe und die aberranten Disulfidbrückenbindungen könnten eine Änderung der Konformation und Faltung des Rezeptors verursachen. Die möglichen Folgen wären eine Störungen der posttranslationalen Modifikationen, eine verminderte Clearance des Rezeptors von der Zelloberfläche (Harper et al. 2003) oder die Förderung der Akkumulationsbereitschaft des Rezeptors. Dies wiederum könnte zu einer vermehrten Ablagerung der Notch3-Rezeptoren an der Zelloberfläche glatter Gefäßmuskelzellen führen.

4.3.2 Störungen des Notch3-Signalweges

Ein weiterer diskutierter Mechanismus beruht auf der Vorstellung einer Störung der Notch3-Signalübertragung (Winkelhofer et al. 2008). In zahlreichen Studien wurden die Effekte von Notch3-Mutationen auf den RBP-Jk Signalweg untersucht. Initial wurde angenommen, dass die Mutationen eine Abnahme oder Zunahme der Rezeptoraktivität verursachen.

Ein „loss of function“ konnte bislang nicht bestätigt werden. Im Zusammenhang mit Mutationen im Bereich der Ligandenbindungsdomäne (LBD) fand sich *in vitro* eine reduzierte Notch3-Aktivität, doch konnte diese Beobachtung bei Mutationen in anderen EGF-repeats nicht wiederholt werden (Haritunians et al. 2002; Peters et al. 2004; Low et al. 2006). Ebenso wurde im Mausmodell gezeigt, dass Notch3-defiziente knock-out Mäuse zwar charakteristische vaskuläre Defekte entwickelten, weitere phänotypische Abnormitäten, insbesondere ein CADASIL Phänotyp, ausblieben (Ruchoux et al. 2003). Ferner wurde nachgewiesen, dass die Rezeptoraktivität bei Mäusen, die nur mutiertes Notch3 in einem Notch3 knockout background exprimierten, vergleichbar war mit der Aktivität von Wildtyp-Notch3 (Monet et al. 2007). Auch die Vorstellung eines durch die Mutationen verursachten, „gain of function“ der Rezeptoren wird immer öfter abgelehnt (Joutel et al. 2000; Karlstrom et al. 2002; Peters et al. 2004; Monet et al. 2007).

Obwohl die klinische Ausprägung der Erkrankung relativ konsistent bleibt, konnte bisher kein einheitlicher Effekt der Mutationen auf die Rezeptoraktivität herausgearbeitet werden. Zu Bedenken ist aber, dass die Arbeiten auf den RBP-Jk Signalweg beschränkt waren. Andere Notch3-Signalwege könnten dennoch durch CADASIL-assoziierte Mutationen beeinträchtigt werden.

4.3.3 Neomorpher Effekt der CADASIL-Mutationen

Alternativ untermauern viele Arbeiten die Hypothese eines neomorphen Effektes der CADASIL Mutationen auf Notch3. Beispielsweise werden toxische Effekte der Notch3-Akkumulation als Ursache der Muskelzelldegeneration postuliert. Denn sowohl in biochemischen, als auch in immunhistochemischen Untersuchungen finden sich GOM's und N3^{ECD}-Ablagerungen an degenerierten glatten Gefäßmuskelzellen (Joutel et al. 2000; Ruchoux et al. 2003). Unklar blieb bislang, ob die Ablagerungen die Ursache oder die Folge des pathogenetischen Prozesses darstellen (Burlin et al. 2002; Ruchoux et al. 2003).

Zusätzlich wird dem N3-Rezeptor im Rahmen neomorpher Mutationen die Erlangung neuer Funktionen zugesprochen. Es wird spekuliert, dass der Rezeptor durch die Strukturänderungen in Interaktion mit anderen Proteinen treten kann (Monet et al. 2007).

Durch die Bestätigung einer homophilen Interaktion der Notch3-Rezeptoren und dem Einfluss CADASIL-assoziiierter Mutationen auf diese, konnte ein weiteres Indiz für diese Theorie erbracht werden.

4.3.4 Bedeutung der zeitabhängigen Komplexbildung für die Pathogenese

Eine zeitabhängige Reifung der Komplexbildung, wie sie in dieser Arbeit mit Notch3 beobachtet wurde, konnte schon für andere Proteinablagerungserkrankungen beschrieben werden (Kirkitadze et al. 2002; FINDER et al. 2007; Haas et al. 2007). Für den Morbus Alzheimer beispielsweise bestehen zahlreiche Untersuchungen zur Reifung und Toxizität der Oligomere.

Das AmyloidBeta-Peptid (A β) ist der Baustein der extrazellulären Amyloidplaques, die in der Pathogenese der Alzheimererkrankung (AD) von Bedeutung sind. Es wird postuliert, dass sowohl die Amyloidplaques als auch deren Vorstufen verantwortlich sind für die Neurodegeneration im Gehirn (Rochet et al. 2000). Der Nachweis dieser Vorstufen und ihrer Toxizität für Neuronen erfolgte bereits in *in vitro* Versuchen und im Mausmodell (Bucciantini et al. 2002; Kirkitadze et al. 2002). In Zellkulturexperimenten konnten nach Transfektion der Zellen mit A β SDS-stabile, aus trunkiertem A β bestehende Oligomere im Western Blot detektiert werden (Podlisny et al. 1995). In weiteren *in vitro* Experimenten wurde ebenfalls eine Abhängigkeit der A β -Aggregation von der Zeit beschrieben (Harper et al. 1997). Zusätzlich konnte für einige A β -Mutanten, die im Rahmen der familiären AD untersucht wurden, *in vitro* eine erhöhte Aggregationsbereitschaft nachgewiesen werden (Jarrett et al. 1993).

Sowohl bei Aß als auch bei N3 konnte eine Reifung der Komplexbildung nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass möglicherweise gewisse Parallelen in den Pathomechanismen der beiden Erkrankungen bestehen, die bei der weiteren Untersuchung der Notch3- Ablagerungen von Nutzen sein könnten.

Die Ergebnisse der zeitabhängigen Reifung der Notch3 Komplexbildung sind auch mit dem Erkrankungsverlauf von CADASIL gut vereinbar. Denn trotz einer autosomal dominanten Vererbung der Mutationen kommt es in der Regel erst im Erwachsenenalter zu morphologischen Veränderungen im Gehirnparenchym und zu ersten sichtbaren Symptomen. *In vitro* kam es bei Überexpression der Proteine im Zellkultursystem zu einer Komplexbildung und deren Zunahme nach mehrstündiger Inkubation. Es wäre denkbar, dass *in vivo*, bei deutlich geringerer endogener Notch3 Ausgangskonzentration, es einer längeren Periode von mehreren Jahren bedarf bis Notch3-Multimere gebildet werden und akkumulieren.

Um weitere Erkenntnisse hinsichtlich der CADASIL Pathogenese zu erlangen, sollten die Untersuchung der Notch3-Akkumulation und deren Zusammenhang mit der Degeneration glatter Gefäßmuskelzellen fortgeführt werden. Insbesondere im Hinblick auf kausale therapeutische Ansätze, die bislang fehlen, sind weitere molekularbiologische Untersuchungen notwendig.

5 Zusammenfassung

CADASIL (cerebrale autosomal dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie) ist die häufigste monogen vererbte Schlaganfallerkrankung, die mit ischämischen Schlaganfällen und einer vaskulären Demenz einhergeht. Ursächlich für die Erkrankung sind Mutationen im *NOTCH3*-Gen, welches für einen Typ-I Transmembranrezeptor kodiert. Notch3 wird im adulten Organismus in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert, die im Verlauf der Erkrankung über einen unklaren Mechanismus degenerieren. Alle bislang beschriebenen CADASIL-Mutationen führen zu einem Gewinn oder Verlust eines Cysteinrestes innerhalb repetitiver Sequenzen (sog. EGF-like repeats) der extrazellulären Domäne des Rezeptors. Da dies einen ungepaarten Cysteinrest zur Folge hat, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der mutierte Rezeptor über Disulfidbrücken mit anderen Notch3-Rezeptoren (homophil) oder anderen Proteinen (heterophil) interagieren könnte. In der Tat zeigen sich in Arterien betroffener Patienten Ablagerungen der Extrazellulärdomänen von Notch3-Rezeptoren an der Oberfläche glatter Gefäßmuskelzellen. Eine gestörte Rezeptorsignalfunktion („loss of function“- oder „gain of function“-Mechanismus des Notch3-Rezeptors infolge der Mutationen) erscheint als Ursache aufgrund zahlreicher Vorarbeiten unwahrscheinlich. Dagegen gewinnt die Hypothese eines neomorphen Effektes der Mutationen über eine Protein-Protein-Interaktion von Notch3 zunehmend an Bedeutung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die molekulare Basis einer möglichen homophilen Interaktion von Notch3-Rezeptoren und den Einfluss CADASIL-typischer Mutationen zu untersuchen.

Zunächst konnte in Co-Immunopräzipitationsversuchen eine homophile Interaktion des Vollängenrezeptors sowie der extrazellulären Domäne von Notch3 ($N3^{ECD}$) *in vitro* nachgewiesen werden; hierbei war kein Unterschied in der Interaktion der Wildtyp- und mutierten Rezeptoren erkennbar. Passend hierzu zeigten sich in Western Blot Experimenten auch unter reduzierenden Bedingungen höhermolekulare Komplexe, die am ehesten Dimeren und Oligomeren des Rezeptors entsprechen und in Inkubationsversuchen zeitabhängig an Intensität zunahmten. Aufgrund der Limitationen des Western blottings für diese großen Proteinkomplexe wurden weitere Experimente mittels einer Fluoreszenz-basierten Einzelpartikelanalyse („scanning for intensely fluorescent targets“, SIFT) vorgenommen. Hier zeigte sich analog zu den Western Blot Experimenten eine spontane zeitabhängige Ausbildung von Multimeren der $N3$ -Rezeptorfragmente. Erste Ergebnisse

wiesen hierbei für CADASIL-mutierte Konstrukte auf eine erhöhte Neigung zur Multimerisierung hin. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden durch die Arbeitsgruppe weitere Untersuchungen vorgenommen, die zur Bestätigung dieses Befundes führten.

Somit wurden in dieser Arbeit mit unterschiedlichen Methoden Hinweise für eine homophile Interaktion und Multimerbildung von Notch3-Rezeptoren und für eine Zunahme dieser Interaktionen durch CADASIL-assoziierte Mutationen geliefert. Die Daten weisen auf eine spontane, zeitabhängige Multimerisierung des Rezeptors *in vitro* hin und sind gut vereinbar mit Hypothesen eines neomorphen Effekts der CADASIL-Mutationen. Die Ergebnisse liefern die Basis für weiterführende Untersuchungen, welche insbesondere die mögliche Toxizität der entstehenden Komplexe auf glatte Gefäßmuskelzellen untersuchen sollten. Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen in der CADASIL-Pathogenese könnte zur Entwicklung zielgerichteter Therapieansätze beitragen.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Magnet-Resonanz-Tomographie eines CADASIL-Patienten	4
Abbildung 2: schematische Darstellung des Notch3-Transmembranrezeptors.....	4
Abbildung 3: Die proteolytische Spaltung des Notch3-Rezeptors.....	5
Abbildung 4: morphologische Veränderungen bei CADASIL.....	6
Abbildung 5: Funktionsprinzip des Zwei-Farben-SIFT	25
Abbildung 6: SIFT Darstellung im 3D-Diagramm	26
Abbildung 7: schematische Darstellung der in der Arbeit untersuchten N3-Konstrukte	27
Abbildung 8: Expressionsnachweis von N3 ^{EC} in HEK 293 Zellen im Western Blot.....	28
Abbildung 9: homophile Interaktion von N3 ^{EC}	30
Abbildung 10: Ausschluß einer unspezifischen Bindung von N3 ^{EC} an Agarose-Beads.....	31
Abbildung 11: homophile Interaktion von N3 ^{FL}	33
Abbildung 12:Ausschluß einer unspezifischen Bindung von Notch3 ^{FL} an Agarose-Beads	34
Abbildung 13: Ca ²⁺ Unabhängigkeit der N3 ^{EC} Interaktionen.....	36
Abbildung 14: zeitabhängige Bildung höhermolekularer β -ME resistenter Komplexe.....	38
Abbildung 15: Ausbildung der höhermolekularen Komplexe durch die R133C-Mutante.....	39
Abbildung 16: N3-Komplexbildung im SIFT und deren Zunahme nach 24h	41

7 Literaturverzeichnis

- Arboleda-Velasquez JF, Lopera F, Lopez E, Frosch MP, Sepulveda-Falla D, Gutierrez JE, et al. (2002). "C455R notch3 mutation in a Colombian CADASIL kindred with early onset of stroke." **Neurology** **59**: 277-9.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ, (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." **Science** **284**: 770-76.
- Auer DP, Putz B, Gossel C, Elbel GK, Gasser T, Dichgans M, (2001). "Differential lesion patterns in CADASIL and sporadic subcortical arteriosclerotic encephalopathy: MRI imaging study with statistical parametric group comparison." **Radiology** **218**: 443-51.
- Baudrimont M, Dubas F, Joutel A, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. (1993). "Autosomal dominant leukoencephalopathy and subcortical ischaemic stroke: a clinicopathological study." **Stroke** **24**: 122-25.
- Bieschke J., Giese A., Schulz-Schaeffer W., Zerr I., Poser S., Eigen M., Kretzschmar H., (2000). "Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **97**: 5468-73.
- Brunin, P., Godfraind, C., Leteurtre, E. and Ruchoux, M.M. (2002). "Morphometric analysis of ultrastructural vascular changes in CADASIL: analysis of 50 skin biopsy specimens and pathogenic implications." **Acta Neuropathol. (Berl.)** **104**: 241-48.
- Bucciantini, M., E. Giannoni, et al. (2002). "Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases." **Nature** **416**: 507-11.
- Chabriat H, Levy C, Taillia H, Iba-Zizen MT, Vahedi K, Joutel A, Tournier-Lasserre E, Bousser MG (1998). "Patterns of MRI lesions in CADASIL." **Neurology** **51**: 452-57.
- Chabriat H, Vahedi K, Iba-Zizen MT, Joutel A, Nibbio A, Nagy TG, Krebs MO, Julien J, Dubois B, Ducrocq X (1995). "Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families: cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy." **Lancet** **346**: 934-939.
- Dichgans M (2002). "CADASIL: A Monogenic Condition Causing Stroke and Subcortical Vascular Dementia." **Cerebrovasc Dis** **13(suppl 2)**: 37-41.
- Dichgans M (2002). "Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: Phenotypic and mutational spectrum." **Journal of the Neurological Sciences** **203-204**: 77-80.
- Dichgans M, Ludwig H, Müller-Höcker J, Messerschmidt A, Gasser T (2000). "Small in-frame deletions and missense mutations in CADASIL: 3D models predict misfolding of Notch3 EGF-like repeat domains." **European Journal of Human Genetics** **8**: 280-285.
- Dichgans M, Mayer M, Uttner I, Bruning R, Muller-Hocker J, Rungger G, et al. (1998). "The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases." **Ann Neurol** **44**: 731-9.
- Domenga, V., Fardoux, P., Lacombe, P., Monet, M., Maciazek, J., Krebs, L.T., Klonjowski, B., Berrou, E., Mericskay, M., Li, Z. et al. (2004). "Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells." **Genes Dev** **18**: 2730-35.
- Finder V. H., Glockshuber R. (2007). "Amyloid- β Aggregation." **Neurodegenerative Dis** **4**: 13-27.
- Giese A., Bader B., Bieschke J., Schaffar G., Odoy S., Kahle P., Haass Ch., Kretzschmar H., (2005). "Single particle detection and characterization of synuclein co-aggregation." **Biochemical and Biophysical Research Communications** **333**: 1202-10.
- Haass C., Selkoe DJ. (2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide." **Nat Rev Mol Cell Biol** **8**: 101-12.
- Haritunians, T., J. Boulter, et al. (2002). "CADASIL Notch3 mutant proteins localize to the cell surface and bind ligand." **Circ Res** **90**: 506-8.

- Harper J.A., Yuan J.S., Tan J.B., Visan I., Guidos C.J., (2003). "Notch signaling in development and disease." **Clin Genet** **64**: 461-72.
- Harper JD, Lansbury PT Jr (1997). "Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. ." **Annu Rev Biochem** **66**: 385-407.
- Ishiko, A., Shimizu, A., Nagata, E., Takahashi, K., Tabira, T. and Suzuki, N. (2006). "Notch3 ectodomain is a major component of granular osmiophilic material (GOM) in CADASIL." **Acta Neuropathol. (Berl.)** **112**: 333-39.
- Jarrett J.T., Lansbury P.T. Jr. (1993). "Seeding uOne-Dimensional Minireview Crystallization" of Amyloid: A Pathogenic Mechanism in Alzheimer's Disease and Scrapie?" **Cell** **73**: 1055-59.
- Joutel A, Andreux F, Gaulis S, Domenga V, Cecillon M, Battail N, Piga N, Chapon F, Godfrain C, Tournier-Lasserre E (2000). "The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients." **J. Clin. Invest.** **105**: 597-605.
- Joutel A, Corpechot C, Ducros A et al. (1996). "Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia." **Nature** **383**: 707-710.
- Joutel A, Monet M, Domenga V, Riant F, Tournier-Lasserre E (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**: 338-47.
- Joutel A, Vahedi K, Corpechot C, Troesch A, Chabriat H, Vayssiere C, Cruaud C, Maciazek J, Weissenbach J, Bousser MG, Bach JF, Tournier-Lasserre E (1997). "Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients." **Lancet** **350**: 1511-15.
- Karlstrom, H., P. Beatus, et al. (2002). (2002). "A CADASIL-mutated Notch 3 receptor exhibits impaired intracellular trafficking and maturation but normal ligandinduced signaling." **Proc Natl Acad Sci U S A** **99**: 17119-24.
- Kirkitadze M.D., Bitan G., Teplow D.B., (2002). "Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies." **J. Neurosci. Res.** **69**: 567-77.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G. and Israel, A. (1998). "The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase." **Proc. Natl Acad. Sci. USA** **95**: 8108-12.
- Low Wee-Chuang, Santa Yo, Takahashi Keikichi, Tabira Takeshi, Kalaria Raj (2006). "CADASIL-causing mutations do not alter Notch3 receptor processing and activation." **Genetics of Nervous System Diseases** **17**: 945-49.
- Monet M, Domenga V, Lemaire B, Souilhol C, Langa F, Babinet C, Gridley T, Tournier-Lasserre E, Cohen-Tannoudji M, Joutel A (2007). "The archetypal R90C CADASIL-NOTCH3 mutation remains NOTCH3 function *in vivo*." **Human Molecular Genetics** **16**: 982-92.
- Opherk Ch, Peters N, Herzog J, Luedtke R, Dichgans M (2004). "Long-term prognosis and causes of death in CADASIL: a retrospective study in 411 patients." **Brain** **127**: 2533-9.
- Peters N, Herzog J, Opherk C, Dichgans M. (2004). "A two-year clinical follow-up study in 80 CADASIL subjects: Progression patterns and implications for clinical trials." **Stroke** **35**: 1603-8.
- Peters N, Holtmannspötter M, Opherk C, Gschwendtner A, Herzog J, Sämann P, Dichgans M (2006). "Brain volume changes in CADASIL: a serial MRI study in pure subcortical ischemic vascular disease." **Neurology** **66**: 1517-22.
- Peters N, Opherk C, Bergmann T, Castro M, Herzog J, Dichgans M (2005). "Spectrum of mutations in biopsy-proven CADASIL: implications for diagnostic strategies." **Arch Neurol.** **62**: 1091-94.

- Peters N, Opherk C, Zacherle S, Capell A, Gempel P, Dichgans M, (2004). "CADASIL-associated Notch3 mutations have differential effects both on ligand binding and ligand-induced Notch3 receptor signaling through RBP-Jk." **Exp Cell Res** **299**: 454-64.
- Podlisny MB, Ostaszewski BL, Squazzo SL, Koo EH, Rydell RE, Teplow DB, Selkoe DJ (1995). "Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture." **J Biol Chem** **270**: 9564-70.
- Rand M., Grimm L., Artavanis-Tsakonas S., Patriub V., Blacklow S., Sklar J., Aster J. (2000). "Calcium Depletion Dissociates and Activates Heterodimeric Notch Receptors." **Molecular and Cellular Biology** **20**: 1825–35.
- Rochet JC, Lansbury PT, Jr. (2000). "Amyloid fibrillogenesis: themes and variations." **Curr Opin Struct Biol** **10**: 60-68.
- Ruchoux MM, Domenga V, Brulin P, Maciazek J, Limol S, Tournier-Lasserre E, Joutel A (2003). "Transgenic mice expressing mutant Notch3 develop vascular alterations characteristic of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy." **Am J Pathol** **162**: 329-42.
- Ruchoux MM, Guerouaou D, Vandenhautte B, Pruvo JP, Vermersch P, Leys D. (1995). "Systemic vascular smooth muscle cell impairment in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy." **Acta Neuropathol (Berl)** **89**: 500–12.
- Sakamoto Kei, Wang Sheng Chao, Katsube Ken-ichi, Yamaguchi Akira (2005). "Distinct roles of EGF repeats for the Notch signaling system." **Experimental Cell Research** **302**: 281-291.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." **Proc Natl Acad Sci U S A** **74**: 5463-67.
- Schroder, J. M., S. Zuchner, et al. (2005). "Peripheral nerve and skeletal muscle involvement in CADASIL." **Acta Neuropathol (Berl)** **110**: 587-99.
- Stevens DL, Hewlett RH, Brownell B (1977). "Chronic familial vascular encephalopathy." **Lancet** **1**: 1364–65.
- Tournier-Lasserre E, Joutel A, Melki J, et al. (1993). "Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) maps on chromosome 19q12." **Nature Genet** **3**: 256-59.
- Villa, N., Walker, L., Lindsell, C.E., Gasson, J., Iruela-Arispe, M.L. and Weinmaster, G. (2001). "Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels." **Mech. Dev.** **108**: 161-64.
- Viswanathan A, Gschwendtner A, Guichard JP, Buffon F, Cumurciuc R, O'Sullivan M, Holtmannspötter M, Pachai C, Bousser MG, Dichgans M, Chabriat H (2007). "Lacunar lesions are independently associated with disability and cognitive impairment in CADASIL." **Neurology** **69**: 131-32.
- Vooijs, M., E. H. Schroeter, et al. (2004). "Ectodomain shedding and intramembrane cleavage of mammalian Notch proteins is not regulated through oligomerization." **J Biol Chem** **279**: 50864-73.
- Weinmaster G (2000). "Notch signal transduction: a real rip and more." **Curr Opin Genet Dev.** **4**: 363-69.
- Winkelhofer KF., Tatzelt J., Haass C. (2008). "The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases." **EMBO J** **27**: 336–349.

8 Lebenslauf

Personalien:

Name, Vorname: Karpinska, Anna Magdalena
Geburtsdatum: 18.Juli 1982
Geburtsort: Krakau / Polen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Karpinska Lidia
Karpinski Adam

Schulische Ausbildung:

Sept. 1989-Juli 1990: Grundschule der Armen Schulschwestern, München
Sept. 1990-Juli 1993: Arnoldus Grundschule, Gilching
Sept. 1993-Juni 2002: Christoph-Probst Gymnasium, Gilching
28. Juni 2002: Abitur

Berufliche Ausbildung:

Okt. 2002- Nov. 2008: Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
August 2004: Ärztliche Vorprüfung
November 2008: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Dezember 2008: Approbation
Seit Januar 2009: Assistenzärztin an der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der LMU München, Großhadern

