

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

**Expression und Interaktion von humanem Notch3 –
Pathophysiologische Grundlagen der erblichen Mikroangiopathie
CADASIL**

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

Vorgelegt von
Martin Zechmeister
aus München
2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Nils Peters

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Markus J. Schwarz
Prof. Dr. Adelbert Roscher

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

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

Tag der
mündlichen Prüfung: 02.02.2012

Danksagung:

Bedanken für die gute Betreuung und intensive Unterstützung möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Peters, Herrn Dr. Opherk und Herrn Dr. Gschwendtner, sowie Frau Petra Gempel.

Mein Dank gilt insbesondere auch Herrn Prof. Dr. Dichgans (Leiter der Arbeitsgruppe) für seine Unterstützung und kritische Anregung im Verlauf der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau für ihre unendliche Geduld und fortwährenden Beistand.

1. Einleitung	1
1.1 Vaskuläre Demenz	1
1.2 CADASIL	2
1.2.1 Entdeckung und Klassifizierung	2
1.2.2 CADASIL – Klinik	3
1.2.3 Molekulare Grundlagen	4
1.2.4 Pathophysiologie von CADASIL	7
1.3 Ziel dieser Arbeit	8
2. Material und Methoden	10
2.1 Klonierung der Vektoren	10
2.2 Zellkultur	11
2.3 Transfektion	12
2.4 Immunzytochemie	13
2.5 Immunopräzipitation	15
2.6 Western-Blot	17
3. Ergebnisse	18
3.1 Expression von humaner Notch3-ECD	18
3.1.1 Notch3 wird an der Oberfläche exprimiert und zeigt physiologisches Ligandenbindungsverhalten	18
3.1.2 Expression der Notch3-ECD	19
3.1.3 Wildtyp und CADASIL-typische Mutante der Notch3-ECD zeigen keine signifikante Akkumulation innerhalb der Zelle	21
3.2 Homophile Interaktion der Notch3-ECD	24
3.2.1 Homophile Interaktion der ECD unter In-vitro Bedingungen	24
3.2.2 Notch3-ECD lässt sich im Zellkulturmedium nicht nachweisen	25
3.2.3 Notch3-ECD-Aggregate bleiben unter reduzierenden Bedingungen stabil	26
3.2.4 Keine Ex-vitro homophilen Interaktionen der Notch3-ECD	27
3.2.5 Spezifische Interaktionen zwischen humaner Notch3-ECD und Liganden	28
4. Diskussion	30
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	30
4.2 Interpretation der Ergebnisse in Bezug auf CADASIL	31
5. Zusammenfassung und Ausblick	35
6. Abbildungsverzeichnis	37
7. Quellenverzeichnis	38
8. Anhang	44

1. Einleitung

1.1 Vaskuläre Demenz

Dementielle Erkrankungen stellen die Medizin und die Gesellschaft vor große interdisziplinäre Anforderungen und Aufgaben. In erster Linie handelt es sich hierbei um Erkrankungen des Alzheimerstyps. An Bedeutung gewinnt die Grundlagenforschung der Demenzen nicht zuletzt dadurch, dass das Durchschnittsalter unserer Gesellschaft immer weiter zunimmt. Neben der momentan kontrovers diskutierten Bedeutung für die sozialen Sicherungssysteme steigt im medizinischen Bereich natürlich auch die Anzahl an alten und sehr alten Patienten (Abbildung 1). Demenzen stellen in dieser Altersgruppe eine relativ häufige Erkrankung dar.

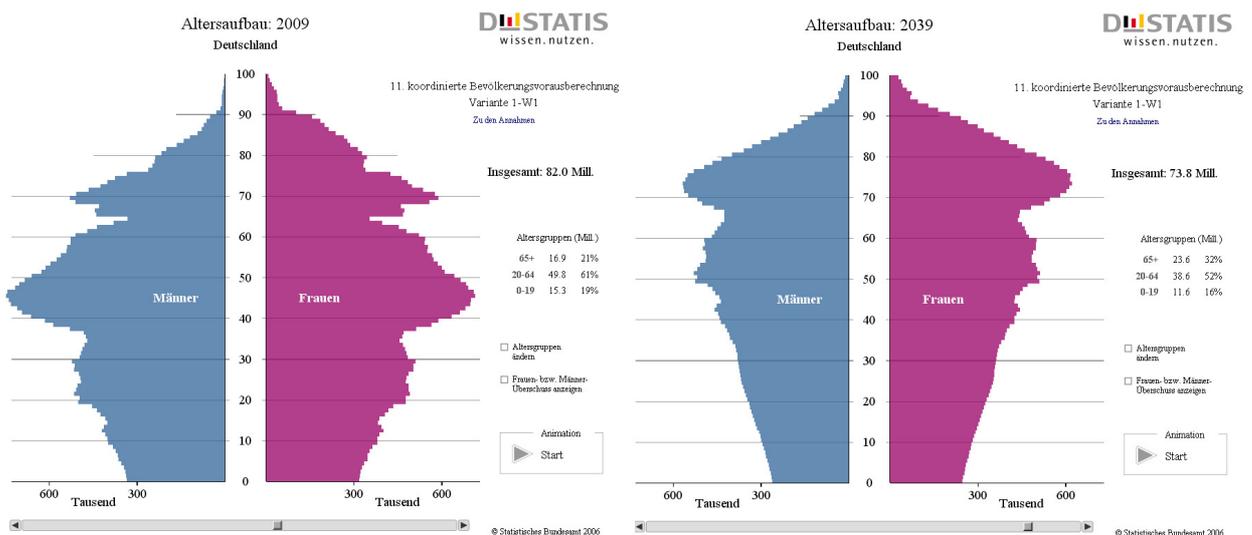


Abbildung 1: Daten des Statistischen Bundesamtes zur Bevölkerungsentwicklung (Quelle: Statistisches Bundesamt 2006)

So sind ca. 1% der 60 bis 64-Jährigen und 30-40% der über 85-Jährigen von Demenzen betroffen (Stern et al. 1994). Auch in Zukunft ist damit zu rechnen, dass der Anteil der Menschen unserer Gesellschaft, die an dementiellen Erkrankungen leiden, zunimmt. Umso mehr rückt die Erforschung dieser Gruppe von Erkrankungen in den Vordergrund. Auf Grund des schleichenden Krankheitsverlaufs und der im Alter häufigen Komorbiditäten gestaltet sich die Suche nach den Ursachen jedoch schwierig.

Ca. 20% der Demenzen haben vaskuläre Ursachen und somit eine sehr heterogene Pathologie. Die häufigste Form der vaskulären Demenzen stellt die subkortikale ischämische vaskuläre Demenz

(SIVD, Subcortical Ischemic Vascular Dementia) dar. Es zeigen sich hier Mikroangiopathie und charakteristischerweise lakunäre Infarkte sowie Leukoencephalopathie. Der wesentliche Risikofaktor der SIVD ist arterieller Hypertonus.

Die Erkrankung CADASIL stellt eine erbliche Form der SIVD dar. CADASIL ist ein Akronym und steht für Cerebral Autosomal Dominant Artheriopathy with Subcortical Infarkts and Leukoencephalopathy, also eine Artheriopathie des Gehirns, die autosomal dominant vererbt wird und mit subcorticalen Infarkten und einer Leukoencephalopathie einhergeht. Um die pathophysiologischen Vorgänge der SIVD zu untersuchen, erscheint CADASIL als erbliche Form der SIVD, obwohl es so selten ist, als gute Modell-Erkrankung, da diese Krankheitsentität eine „reine“ Form der mikroangiopathischen Veränderung im Gehirn darstellt.

1.2 CADASIL

1.2.1 Entdeckung und Klassifizierung

In den 70-er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde erstmals eine selbstständige Krankheitsentität beschrieben, bei welcher eine Demenz familiär gehäuft auftritt. Im weiteren Verlauf bestätigten verschiedene Autoren durch Beschreibung mehrerer Familien die autosomal dominante Vererbung dieses Syndroms (Stevens et al. 1977, Sonninen et al. 1987, Davous et al. 1991, Tournier-Lasserre et al. 1991, Mas et al. 1992).

Im Jahr 1991 wurde durch eine französische Gruppe der Genort der Erkrankung auf dem Chromosom 19p13 entdeckt und die Bezeichnung CADASIL eingeführt (Tournier-Lasserre et al. 1991).

Bei dieser autosomal dominant vererbten Artheriopathie des Gehirns handelt es sich um eine systemische Mikroangiopathie, die weder einer amyloiden noch einer arteriosklerotischen Ätiologie zuzuordnen ist.

1.2.2 CADASIL – Klinik

Hauptsymptome der Erkrankung sind rezidivierende ischämische Schlaganfälle, Migräne mit Aura und kognitiver Abbau. (Chabriat et al. 1995, Dichgans et al. 1998, Dichgans 2002, Amberla et al. 2004, Peters et al. 2004).

Ischämische Ereignisse (TIA oder Schlaganfall) sind die häufigste Symptomgruppe, zeigen sich bei etwa 85% der betroffenen Patienten und manifestieren sich häufig als klassisches lakunäres Syndrom. Das mediane Alter, in dem zum ersten Mal ein Schlaganfall auftritt, liegt am Anfang der fünften Lebensdekade (Dichgans 2002, Opherk et al. 2004).

Im Verlauf kommt es durch die rezidivierenden Ischämien zu kognitiven Defiziten, die bei ca. 60% der betroffenen Individuen auftreten. Anders als bei der Demenz des Alzheimerstyps zeigen sich vor allem Einschränkungen der Exekutivfunktion und der Verarbeitungsgeschwindigkeit, nicht jedoch die Gedächtnisfunktion (Peters et al. 2005). Im Alter von 65 Jahren entwickeln etwa zwei Drittel der Betroffenen eine typische SIVD (Dichgans et al. 1998).

Das Einsetzen von Symptomen beginnt bei CADASIL im Allgemeinen im mittleren Lebensabschnitt, allerdings uneinheitlich mit einer breiten Streuung zwischen dem 25. und 60. Lebensjahr. Die Erkrankung nimmt gewöhnlich einen progressiven Verlauf und führt so oft zu gravierenden Einschränkungen und zu einer deutlich verkürzten Lebenserwartung (Dichgans et al. 1998, Opherk et al. 2004).

1.2.3 Molekulare Grundlagen

Genetische Grundlagen

Als Gen, welches durch Mutationen CADASIL auslöst, wurde 1996 das *NOTCH3*-Gen auf dem Chromosom 19 identifiziert (Joutel et al. 1996). Das *NOTCH3* Gen besteht aus 33 Exons, welche den Notch3-Rezeptor kodieren, ein Transmembran-Rezeptor mit 2321 Aminosäuren (Escary et al. 2000), der zu einer Familie von zum Teil hoch konservierten Genen gehört, die beim Menschen für 4 verschiedene Transmembran-Rezeptoren (Notch1 – 4) kodieren.

Aufbau des Notch3-Rezeptors

Beim humanen Notch3 handelt es sich um einen heterodimeren Rezeptor mit einer ca. 210 kDa großen extrazellulären Domäne (ECD), die nichtkovalent mit der ca. 110-120 kDa großen Transmembran- und gleichzeitig intrazellulären Domäne (ICD) verbunden ist. Die extrazelluläre Domäne enthält 34 EGFRs (epidermal growth factor-like repeats, Wiederholungen, die dem Epidermalen Wachstumsfaktor entsprechen), sowie drei für diese Rezeptorfamilie typische LIN/Notch Wiederholungen (Wharton et al. 1985). Ein EGFR enthält immer eine unveränderliche Anzahl von 6 Cysteinen (Joutel et al. 1997). Die EGFRs 10 und 11 sind an der Ligandenbindung beteiligt (Peters et al. 2004, Joutel et al. 2004). Das intrazelluläre Fragment ist ca. 97 kDa groß und besteht aus einer RAM-Region, sechs cdc10/Ankyrin Wiederholungen, Kern-Lokalisierungssignalen und einer PEST-Sequenz (Mizutani et al. 2001). Die RAM-Region scheint die direkte Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor RBP-J / CBF1 zu vermitteln (Tamura et al. 1995). Die PEST-Sequenz vermittelt die Ubiquitinierung des Notch und spielt aus diesem Grund eine Rolle für die Proteinstabilität.

Der humane Notch3-Rezeptor wird vor der Präsentation auf der Zelloberfläche als 280 kDa großes Vorläuferprotein gebildet und während der Proteinreifung am Trans-Golgi-Netzwerk des ER durch eine Furin-artige Protease gespalten (Logeat et al. 1998, Mizutani et al. 2001). (Siehe Abbildung 2 Schnittstelle S1). Im Anschluss wird der Rezeptor als heteromeres Protein auf der Zelloberfläche präsentiert.

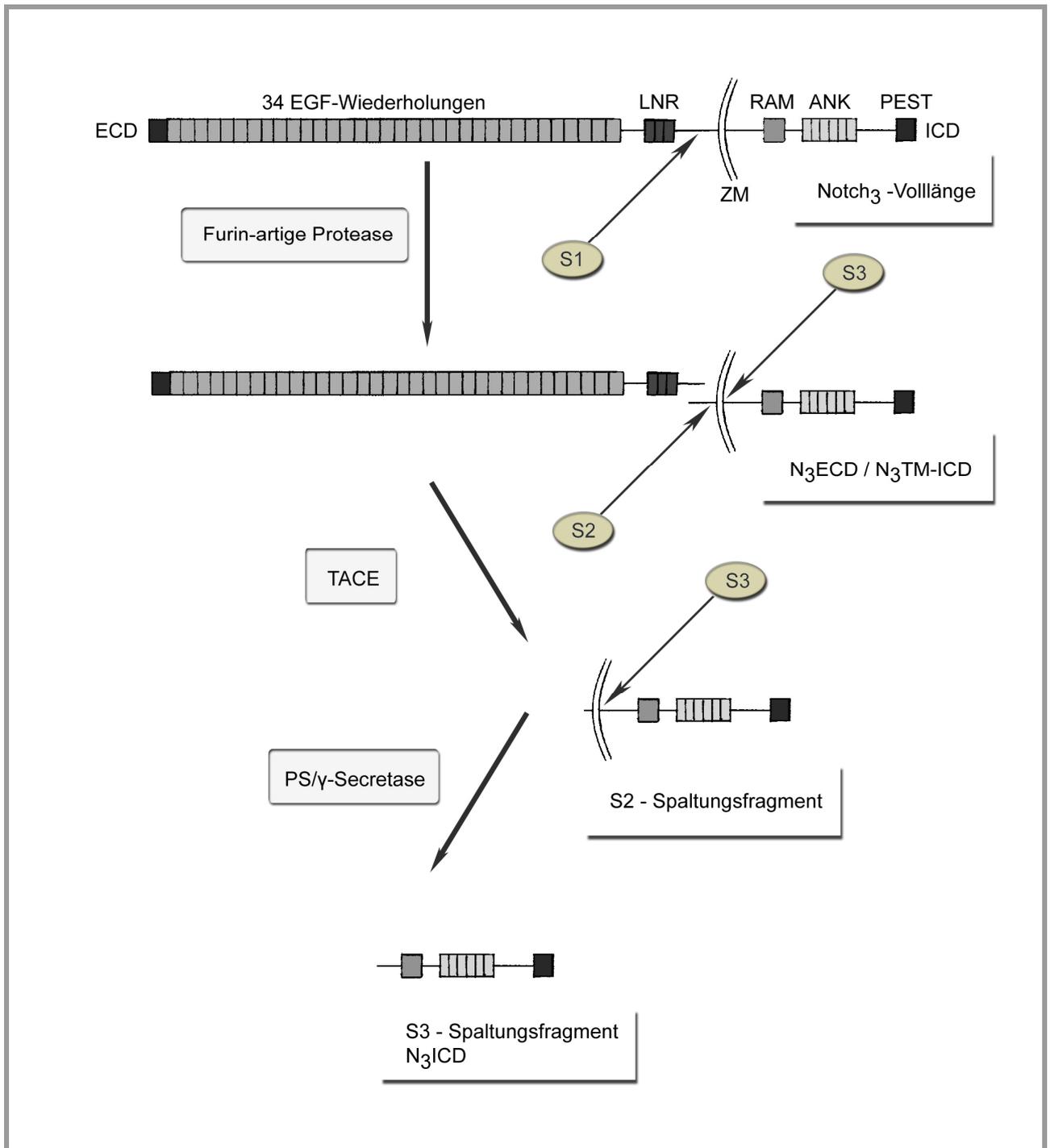


Abbildung 2: Physiologische Prozessierung des Notch3-Rezeptors

Notch3 wird durch Transmembran-Liganden der Delta- bzw. Serrate/Jagged Familie aktiviert (Artavanis-Tsakonas et al. 1999, Bray 2006). Sie binden an die ECD des Notch3 und lösen das Abschneiden der ECD durch eine ADAM Protease (A Disintegrin And Metalloproteinase) aus. Es handelt sich dabei um das Tumor necrosis factor α -converting Enzym (TACE) (Brou et al. 2000) (Abbildung 2 Schnittstelle S2). Nach einem weiteren Schnitt innerhalb der Membran durch eine γ -Sekretase (Abbildung 2 Schnittstelle S3), die Presenilin1-abhängig arbeitet (Mizutani et al. 2001,

De Strooper et al. 1999, Struhl et al. 2001, Taniguchi et al. 2002), transloziert die ICD zum Kern der Zelle und bindet dort direkt an den Transkriptionsfaktor RBP-J κ / CSL (Fortini et al. 1994 Struhl et al. 1998) (Abbildung 3). Dadurch wird der Suppressor RBP-J κ / CBF1 zu einem Verstärker (Enhancer) z.B. für die Gene HES 1 und HES5 (Artavanis-Tsakonas et al. 1999, Weinmaster 1997, 2000).

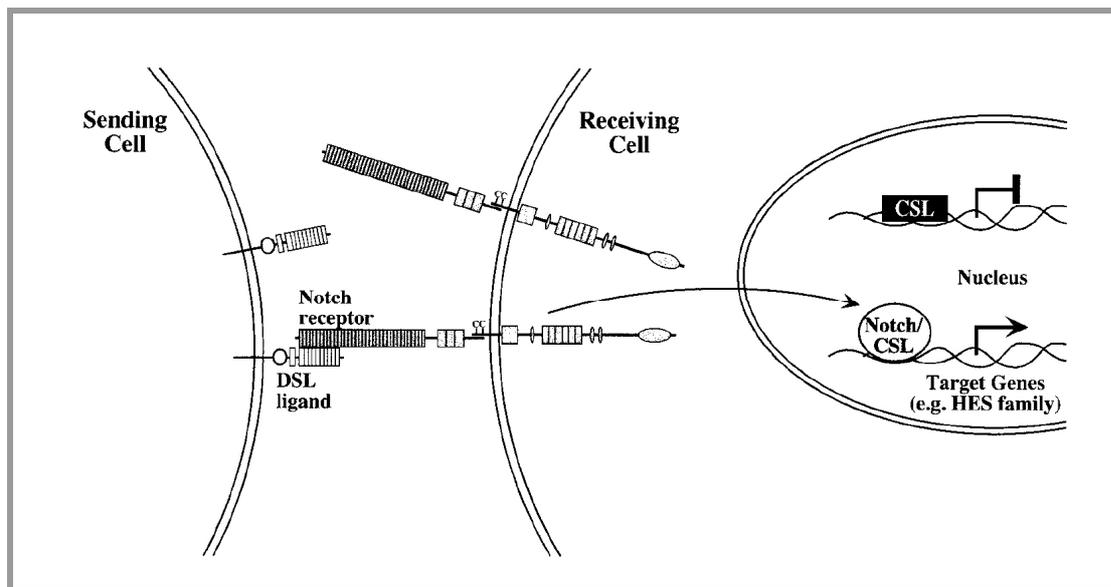


Abbildung 3: Notch Signalkaskade über CSL (Mumm et al. 2000)

Funktion von Notch3

Es konnte in diversen Studien gezeigt werden, dass die Gene des Signalwegs der Notchrezeptoren während der Entwicklung von Blutgefäßen aktiviert werden (Rossant et al. 2002, Beckers et al. 1999; del Amo et al. 1992; Jones et al. 2000; Leimeister et al. 2000, Post et al., 2000; Shutter et al. 2000, Uyttendaele et al. 1996, Vargesson et al. 1998).

Speziell der Notch3-Rezeptor wird während der Entwicklung ubiquitär und im adulten Gewebe in arteriellen Gefäßen, genauer in glatten Muskelzellen, exprimiert (Joutel et al. 2000, Joutel et al. 2004, Villa et al. 2001). Der Notchsignalweg scheint hier der zellulären Spezifikation, Differenzierung und Proliferation, sowie der Homöostase (Artavanis-Tsakonas et al. 1999) zu dienen. Das Gen ist notwendig für die Entstehung von funktionellen peripheren Arteriolen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es bei Notch3-defizienten Mäusen zu strukturellen Defekten der Tunica Media kommt. Weiterhin scheint Notch3 eine wichtige Rolle für die arterielle Spezialisierung von glatten Gefäßmuskelzellen zu spielen (Domenga et al. 2004).

1.2.4 Pathophysiologie von CADASIL

CADASIL wird in der Regel durch heterozygote Punktmutationen in den EGF –Wiederholungen (EGFR) der ECD ausgelöst. Es handelt sich meist um den Austausch oder die Substitution einer einzelnen Aminosäure. Es kommt fast immer zu einem Verlust oder Zugewinn eines Cysteins und dadurch zu einem EGFR mit einer abnormalen Zahl von entweder 5 oder 7 Cysteinen (Joutel et al. 1997, Oberstein et al. 1999, Dichgans et al. 2000, Joutel et al. 2000, Dichgans et al. 2001, Markus et al. 2002). Veränderungen dieser Cysteinanzahl könnten über eine Störung der Bildung von Disulfidbrücken zu einer Veränderung der dreidimensionalen Struktur des Moleküls führen (Dichgans et al. 2000). Der bei weitem größte Anteil (ca. 90%) dieser bisher berichteten Mutationen liegt in den Exons 2 bis 6, die für die EGFs 1 bis 9 kodieren (Donahue et al. 2004, Peters et al. 2005). Diese liegen weit von der Bindungsstelle des Liganden entfernt und beeinflussen die Signalkaskade des Notch3 nicht (Joutel et al. 1997, Peters et al. 2004, Karlström et al. 2002, Haritunians et al. 2002). Es wurden aber auch Mutationen im Bereich der Ligandenbindungsstelle gefunden, die im Bereich der EGFs 10/11 liegen, die sich jedoch im klinischen Phänotyp nicht wesentlich unterscheiden. Das Ligandenbindungsverhalten bei Mutationen im Bereich der EGFs 10/11 ist verändert (Joutel et al. 2004, Peters et al. 2004, Karlström et al. 2004).

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen sich granuläre osmiophile Ablagerungen (GOM) im Bereich der glatten Gefäßmuskelzellen (Baudrimont et al. 1993, Ruchoux et al. 1995, Joutel et al. 2000). Ob diese GOMs auch die mutierte ECD enthalten ist unklar. Vergleichbare Veränderungen zeigten sich auch in einem transgenen Mausmodell (Ruchoux et al. 2003). Ob diese Ablagerungen pathogenetische Bedeutung besitzen oder nur als Begleiterscheinung auftreten, ist bisher unklar.

Die 210 kDa große, extrazelluläre Domäne akkumuliert bei typischer CADASIL-Mutation innerhalb der Tunica media von Arterien. Histologisch zeigen sich eine Degeneration der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC, vascular smooth muscle cell) der Media und deren Ersatz mit Bindegewebe. Dies führt schlussendlich zu Fibrose und zur Einengung des Gefäßlumens (Chabriat H et al. 1995). Die Ursache dieser Degeneration, sowie die Rolle, welche die Proteinakkumulationen auf der Oberfläche der VSMCs dabei spielen, sind bis heute unbekannt.

1.3 Ziel dieser Arbeit

Die Mechanismen, auf Grund derer die Mutation des Notch3-Rezeptors zu einer Degeneration der VSMC und der konsekutiven zerebralen Ischämie führt, sind bisher nicht bekannt.

Es konnte bisher gezeigt werden, dass die CADASIL-typischen Mutation des *NOTCH3*-Gens die Ligandenbindung und die Signaltransduktion unbeeinflusst lassen (Joutel et al. 2004, Peters et al. 2004). In Notch3-Knock-out-Mäusen konnte der Phänotyp von CADASIL nicht erzeugt werden, wenngleich die Tiere eine Veränderung der Gefäßdifferenzierung aufweisen (Ruchoux et al. 2003, Domenga et al. 2004). Ein Funktionsverlust des Rezeptors oder eine Überfunktion des Selben (loss of function oder gain of function Mechanismus) sind daher nicht anzunehmen.

Ein toxischer Effekt des veränderten Rezeptors ist wahrscheinlich. Basierend auf den histologischen und molekularbiologischen Ergebnissen, die eine Aggregation bzw. Akkumulation der ECD des Notch3-Rezeptors auf VSMCs und deren konsekutive Degeneration zeigen, scheint ein toxischer Effekt dieser Aggregate wahrscheinlich (Joutel et al. 2000).

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, ob es in vitro und ex vitro zu Aggregationen der ECD des humanen Notch3-Rezeptors kommt und ob es zu einer Verstärkung dieser Aggregation durch eine gängige CADASIL-typische Mutation kommt. Die ECD des humanen Notch3-Rezeptors wurde als Zielprotein gewählt, da es sich bei den in der Literatur (Joutel et al. 2000) bisher beschriebenen Ablagerungen an VSMCs ebenfalls um die ECD des Rezeptors handelt. Die gewählte Mutation R133C gehört zu den häufigsten Mutationen im Rahmen von CADASIL (Peters et al. 2005).

Um diese Fragen zu klären, wurden zwei Wege beschritten:

1. Es sollte gezeigt werden, dass das humane Notch3 sowohl als Volllängenrezeptor als auch als transmembranengebundene Extrazellulärdomäne (TM-ECD) normal exprimiert werden kann. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob die ECD sowohl als Wildtyp als auch als Mutante funktionell ist und den physiologischen Liganden Jagged1 binden kann. Mittels Immunzytochemie sollte untersucht werden, ob es bei einer Expression der ECD des humanen Notch3 zu einer regionalen Akkumulation der ECD in der Zelle kommt und ob dieser Effekt durch die Mutation verstärkt wird.

2. Da die Akkumulation der mutierten ECD an VSMCs nach bisherigen Untersuchungen eine mögliche Rolle in der Pathologie von CADASIL zu spielen scheint, sollte gezeigt werden, ob homophile Interaktionen des Notch3 als Grundlage der Akkumulation nachvollziehbar sind. Zu

diesem Zweck wurde eine Immunopräzipitation durchgeführt. Dadurch sollte die Frage geklärt werden, ob die ECD des humanen Notch3-Rezeptors zur Ausbildung von höhermolekularen Aggregationen neigt und ob diese durch die Veränderung der Proteinsequenz im Rahmen der Mutation R133C verstärkt auftreten.

Zusätzlich soll in den Immunopräzipitationsversuchen gezeigt werden, ob ein Ligand des Notch3-Rezeptors Einfluss auf eine etwaige Aggregation hat.

2. Material und Methoden

2.1 Klonierung der Vektoren

Als Mutation wurde das Basenpaar 475 des Exons 4 gewählt. Hier führt der Austausch von Cytosin zu Thymin in der DNS-Abfolge zu einem Wechsel von Arginin zu Cystein an Position 133 der Proteinsequenz. Die betreffende Stelle liegt in der EGF-Wiederholung 3 und gehört zu den häufigsten Mutationen im Rahmen von CADASIL (Peters et al 2005). Basierend auf einer schon vorhandenen, trunkeierten Variante des extrazellulären Notch3, die sowohl als Wildtyp und als typische Mutation (R133C) in einem pcDNA 3.1(-)Vektor mit Protein-Tag (Myc/V5) (Fa, Invitrogen) vorhanden war, wurde ein kompletter Vektor der extrazellulären Domäne des Notch-3-Rezeptors kloniert. Hierzu wurde über zielgerichtete Mutagenese (Quickchange XL, Fa. Stratagene) eine weitere XhoI-Schnittstelle an Position 4780 eingeführt. Bisher war die kodierende Sequenz über HindIII und die schon existierende XhoI-Schnittstelle an Position 3043 der Vollängen-cDNA von humanem Notch3 in einen pcDNA 3.1(-)Vektor kloniert worden (Enzyme HindIII, ClaI und XhoI, Fa. New England Biolabs). Durch einen Partialverdau mit ClaI (Schnittstelle an Position 1021) und XhoI konnte die noch fehlende Sequenz gewonnen werden. Diese wurde aufgereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit, Fa. Quiagen). Aus dem vorhandenen Vektor wurde über die Schnittstellen ClaI (Position 1021) und XhoI (Position 3043) die Sequenz ausgeschnitten und das aufgereinigte Fragment (Position 1021 bis 4780) einkloniert. Das Insert wurde sowohl für den Wildtyp als auch für R133C-Mutante kloniert (Abbildung 4). Die Vektoren wurden nach der orientierenden Größenkontrolle komplett durchsequenziert (ABI 310, Automatischer Sequenzer). Hier zeigten sich keine Mutationen, welche die Proteinsequenz verändert hätten.

Zusätzlich wurden weitere, in der Arbeitsgruppe bereits vorhandene Vektoren verwendet (Peters et al 2004). So wurde für die Immunzytochemie ein Vektor verwendet, welcher die extrazelluläre und die Transmembrandomäne des Notch3-Rezeptors (hN3^{ECTM}) kodiert, sowie ein Vollängenkonstrukt des Notch3-Rezeptors (Wildtyp (hN3^{VL}) und Mutante R133C (hN3^{VL R133C})) (Abbildung 4).

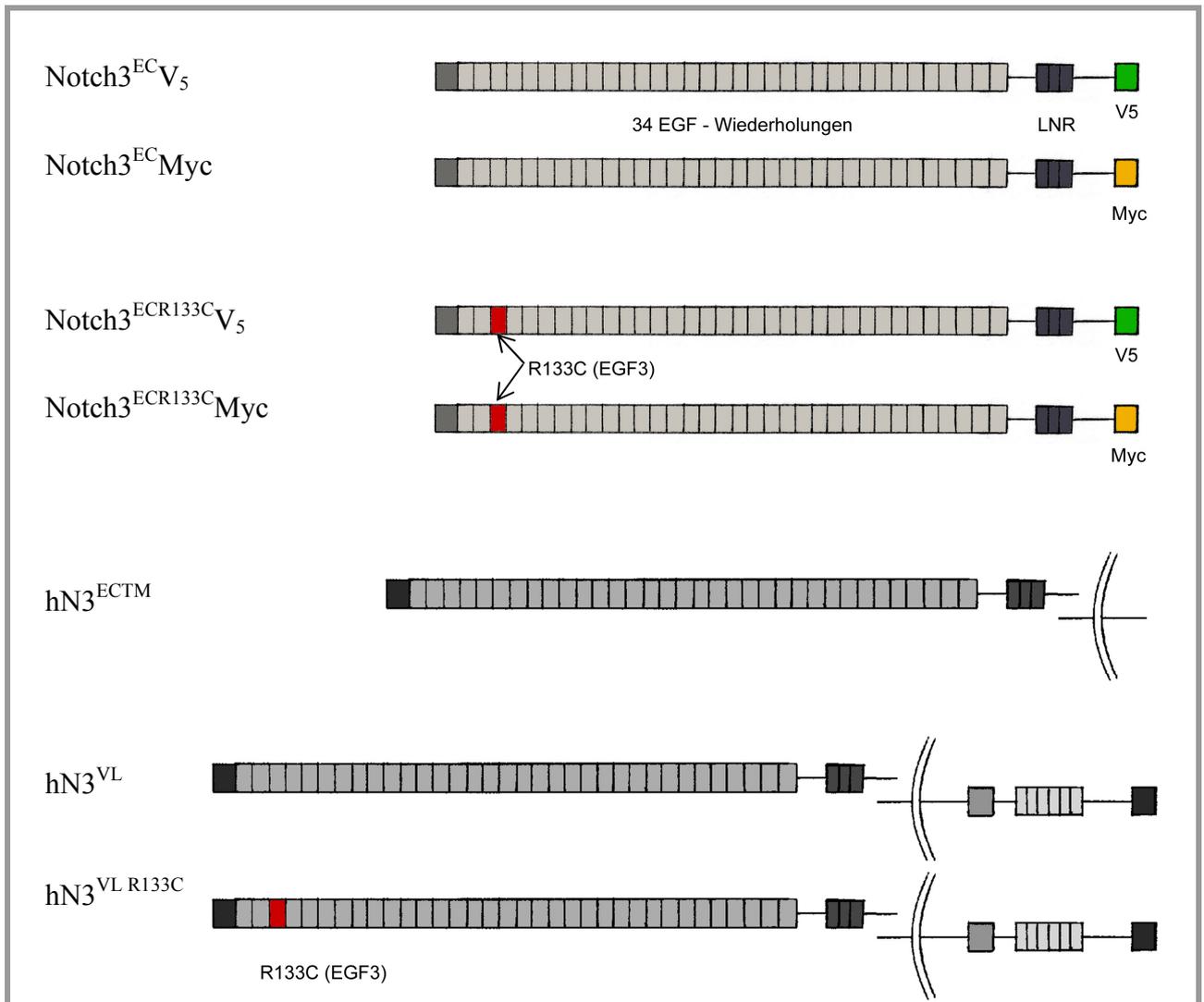


Abbildung 4: Schematische Darstellung der verwendeten Notch3-Vektoren:

Schematisch dargestellt sind jeweils die Inserts des PC-DNA 3.1 (-)Vektors mit oder ohne des entsprechenden Protein-Tags. Es handelt sich bei allen Vektoren um Teile des humanen *NOTCH3*-Gens.

2.2 Zellkultur

293-Zellen und NIH3T3- Zellen (DSMZ , Deutschland) wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% PS in einem Brutschrank (Hera Cell, Fa.Kendor Laboratory products) in einer 5%-igen CO₂ – Atmosphäre gehalten.

2.3 Transfektion

293-Zellen wurden auf 6-Well-Schalen ausgesät (5×10^5 pro Well) und über Nacht mit Vollmedium inkubiert. Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamine und Plus Reagent und den Vektoren (pcDNA 3.1(-)V5 Notch3^{EC} / Notch3^{ECR133C}, pcDNA3.1(-)Myc Notch3^{EC} / Notch3^{ECR133C}, Notch3^{ECTM}, Notch3^{ECTM R133C}). Für jedes einzelne Well wurde folgende Formulierung verwendet: 6 µl Plus Reagent mit einem µg DNS pro Vektor und 100µl Optimem; 15 Minuten Inkubationszeit; Zugabe von weiteren 100 µl Optimem und 8 µl Lipofectamine Reagent und weitere 15 Minuten Inkubationszeit; Vorbereitung der Zellen mit serumfreiem Optimem.

Das Transfektionsgemisch wurde unter Zugabe von weiteren 800µl Optimem auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubationsphase im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) von drei Stunden, im Anschluss wurde das Transfektionsmedium durch Vollmedium ersetzt.

Nach 36 – 48 Stunden Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurden die Zellen bei transienter Transfektion geerntet und lysiert.

Um zur Etablierung der Immunopräzipitation ausreichende Mengen Protein zur Verfügung zu haben, wurden 293-Zellen mit den Vektoren (pcDNA 3.1(-)V5 Notch3^{EC} / Notch3^{ECR133C}, pcDNA3.1(-)Myc Notch3^{EC} / Notch3^{ECR133C}) stabil transfiziert. Die eigentlichen Immunopräzipitationsversuche wurden zur besseren Standardisierung der Proteinnengen mit transient transfizierten Zellen durchgeführt.

Für stabil zu transfizierende Linien wurden die Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei gleichen Bedingungen (37°C, 5% CO₂) auf eine 10cm Petrischale mit Vollmedium ausgesät. Als Selektionsantibiotika wurden 1 mg G 418/ml Vollmedium und 6 µg Blasticidin/ml Vollmedium zugegeben. Unter aufrecht erhaltenem Selektionsdruck konnten nach ca. 2-4 Wochen Zellklone selektioniert werden. Diese wurden dann durch Western Blot-Analyse auf Größe, Spezifität und produzierte Menge des entsprechenden Proteins untersucht.

2.4 Immunzytochemie

Doppelfärbung

Deckgläschen wurden in 6-Well-Platten mit Poly-L-Lysin für 15 Min. bedeckt und im Anschluss zweimal mit PBS gespült.

Auf diese mit Deckgläschen bestückten 6-Well-Platten wurden 293 – bzw. NIH3T3 - Zellen ($3,2 \times 10^5$ / well) ausgesät. Die Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert.

Nach einer Inkubationszeit von 36 bis 40 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 15 Min. mit 4% PFA in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Die Permeabilisation zur Erkennung intrazellulärer Proteine erfolgte durch Inkubation mit 0,2% TritonX-100 in PBS. Nach einem Waschschriff mit PBS wurden die Zellen mit 5% Ziegen Serum (NGS) in PBS inkubiert (1 Std. bei Raumtemperatur).

Über Nacht wurden die Zellen dann mit dem Erstantikörper (Anti-V₅, polyklonaler Antikörper aus der Ziege, Anti-Myc 1:10 monoklonal Antikörper aus der Maus) in 5% Ziegen Serum/PBS bei 4°C inkubiert.

Nach 3-fachem Waschen mit PBS (je 10 Min.) wurden die Zellen am darauf folgenden Tag mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (Rhodamine oder FITC gekoppelt, Anti-Maus- bzw. Anti-Ziege-Antikörper, Fa. Molecular Probes) in 5% NGS/PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur gefärbt. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (1µg/ml) in PBS 15 Min. bei Raumtemperatur.

Nach fünfmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Immunomounting Medium auf Objektträger aufgebracht.

Einfachfärbung ECD

Für die Einfachfärbung wurde das Protokoll analog der Doppelfärbung durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Vektor mit dem V₅-Tag transfiziert. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler Anti-V₅-Antikörper aus der Maus und als Sekundär-Antikörper ein Rhodamine-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper verwendet.

Analyse der Einfachfärbung

Aus fünf Färbedurchgängen wurde aus jeder Färbung ein repräsentatives Gesichtsfeld (Übersichtsvergrößerungen 200-fach) systematisch ausgewertet. Die Gesamtzellzahl wurde anhand der Zellkerne bestimmt. Die Intensität der Anfärbung wurde in 3 Stufen eingeteilt (1 – minimale Färbung bis 3 – maximale Färbung) und zusätzlich die Zellen mit Aggregaten bestimmt. Als solche wurden Bereiche der Zellen definiert, an denen sich ein sehr intensives und gut abgrenzbares Färbungssignal zeigte. Hierzu wurden die positiven Zellen bei 400-facher Vergrößerung genauer betrachtet.

Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen V₅, da sich bei der Verwendung von Antikörpern gegen Myc unvermeidbar ein Hintergrundrauschen durch das endogene Myc ergeben hätte.

Die Rohdaten aus der Mikroskopie wurden mit einem zweiseitigen T-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Auch wenn ein zweiseitiger T-Test bei dieser geringen Fallzahl eine zu geringe Power hat, wurde er durchgeführt, um das visuell nicht unterschiedliche Ergebnis auch statistisch zu untermauern.

Einfachfärbung Volllängenkonstrukt / ECD mit Transmembrandomäne

Es wurden für diesen Ansatz NIH3T3-Zellen verwendet. Diese wurden mit den Vektoren hN3^{ECTM} bzw. hN3^{VL} / hN3^{VL R133C} wie oben beschrieben transient transfiziert und die Zellen im Anschluss gefärbt. Hier wurde ein monoklonaler Anti-Notch3-Antikörper verwendet. Als Sekundär-Antikörper diente ein FITC-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper. Auf eine Permeabilisierung mit Triton wurde verzichtet.

Ligandenbindungs-Assay

293-Zellen wurden mit rekombinantem Jagged1-Fc (J1Fc, R&D systems, Wiesbaden) mit Lipofectamine wie oben beschrieben transfiziert. Die Zellen wurden in serumfreiem Medium (DMEM) kultiviert und die Überstände mit dem J1Fc-Protein nach 5 Tagen asserviert. Zum Preclustering des Proteins wurde der J1Fc-haltige Überstand mit Block-Lösung (DMEM, 10% normales Ziegenerum, 1% BSA) inkubiert. Die endgültige Konzentration von 2µg/ml J1Fc wurde in einer Verdünnung von 1:50 mit einem Rhodamine-konjugierten Maus anti humanes IgG-Fc-Antikörper (Dianova) für eine Stunde bei 4 Grad konjugiert. Die mit unterschiedlichen Notch3-Vektoren transfizierten NIH3T3-Zellen (s.o.) wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im

Anschluss wurden die Zellen wie oben beschrieben mit einem monoklonalen Anti-Notch3-Antikörper gefärbt. Die Auswertung erfolgte durch Fluoreszenz-Mikroskopie.

2.5 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation wurde mit den stabilen Linien etabliert. Die stabil transfizierten Zell-Linien wurden durch Westernblotanalyse auf Größe, Menge und Spezifität der Proteine überprüft. Je zwei Zell-Linien (wt/mut) die gleichwertige Ergebnisse für V5 und Myc zeigten, wurden zur Etablierung der Immunopräzipitation ausgewählt.

Um annähernd gleiche Proteinmengen zu erreichen, wurden die Zellen für die eigentlichen IP-Versuche transient transfiziert. Die verwendeten Agarosekugeln wurden mit einem Antikörper gegen V₅ bestückt. Die mit Anti-Myc bestückten Agarosekugeln dienten nur der Kontrolle, da sich hier eine gleichzeitige Präzipitation des endogenen Mycs nicht verhindern ließ. Dieses endogene Myc stellte allerdings bei den Anti-V₅-Kugeln eine Möglichkeit zur Kontrolle der Waschstringenz dar.

Transfizierte Zellen (293, 5×10^5) wurden einfach mit PBS gewaschen und abgespült. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets mit TNT-Lyse-Puffer resuspendiert und auf Eis inkubiert (15min). Nach dieser Ruhephase wurden die Lysate abzentrifugiert und die Überstände auf Eis asserviert.

Die mit Antikörpern beschickten Agarosekugeln (Anti-V₅, polyklonaler AK aus der Ziege, Fa. Novus; Anti-Myc, monoklonaler AK aus der Maus, Fa. BD) wurden mit PBS gewaschen und dann wieder abzentrifugiert (3 x).

Nach Zugabe des Lysats wurde für vier Stunden bei 4°C auf einem Drehrad ständig durchmischt. Im Anschluss wurde das Gemisch zentrifugiert und der Überstand asserviert. Die abzentrifugierten Agarosekugeln wurden mit PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert (3 x). Der Überstand wurde verworfen. Der 3. Waschschrift wurde asserviert und als Kontrolle für die Stringenz der Waschung auf den Western Blot aufgetragen.

Die Agarosekugeln, der Überstand und der 3. Waschschrift wurden bei – 70°C eingefroren um zu einem beliebigen Zeitpunkt für die Analyse per Western Blot bereitzustehen.

Reduzierende Bedingungen mit β -Mercaptoethanol

Die stereotypen Mutationen bei CADASIL im *NOTCH3*-Gen verursachen in aller Regel unpaarige Cysteine. Diese Tatsache legt nahe, dass Disulfidbrücken für die Pathologie eine Rolle spielen.

Um zu prüfen, ob sich die ECD unter reduzierenden Bedingungen anders verhält, also die Störung von Disulfidbrücken die Aggregation beeinflusst, wurden bei einem weiteren Versuch die Lysate vor der IP mit β -Mercaptoethanol versetzt und bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Das Mischverhältnis war hier 10 μ l β -Mercaptoethanol und 90 μ l Voll-Lysat. Nach der Inkubation wurde das Volumen mit 900 μ l PBS aufgefüllt und die Agarosekugeln zugegeben. Der weitere Verlauf der IP lief wie oben beschrieben ab.

Ex-Vitro Bedingungen

Um zu klären, ob die ECD auch aggregiert, wenn sie in unterschiedlichen Zellen exprimiert wird und die Proteine ausschließlich ex vitro miteinander in Berührung kommen, wurden die Zellen für diesen Versuchsansatz getrennt mit den Vektoren Notch3^{ECR133C} myc, Notch3^{ECR133C} V₅, Notch3^{EC} myc, und Notch3^{EC} V₅ transfiziert. Das Protokoll wurde im Weiteren wie oben beschrieben durchgeführt. Die Lysate der Zellen wurden vor der Immunopräzipitation gepoolt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das normale Protokoll der IP weiter durchgeführt.

2. 6 Western-Blot

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und abgespült. Nach Zentrifugation erfolgte die Lyse in 600µl TNT-Puffer mit Protease-Inhibitor. Inkubation für 15 Minuten auf Eis mit anschließender Zentrifugation. Die Überstände wurden asserviert.

Als Auftragspuffer wurde 3 x Lämmli-Puffer mit 10% β-Mercaptoethanol verwendet.

Neben den Lysaten wurden auch Überstände aus der Immunopräzipitation und der 3. Waschschrift als Kontrolle mit auf die Gele aufgetragen. Die Proben setzten sich aus einem Teil Auftragspuffer und zwei Teilen Probe (Lysat, Überstand, 3. Waschschrift) zusammen und wurden bei 95°C für 6 Minuten aufgekocht.

Inkubierte Agarosekugeln wurden mit einem Gemisch aus einem Teil Auftragspuffer und 2 Teilen TNT-Puffer resuspendiert und bei 95°C für 6 Minuten aufgekocht. Nach Zentrifugation wurden die Überstände auf das Gel aufgetragen.

Als Längenstandard wurde Precision Plus Protein Standards, All Blue verwendet. Nach Auftragen der lysierten Proben wurde eine Spannung von 80V bis zum Eintreten der Lauffront in das Trenngel angelegt. Die Spannung wurde auf 150 Volt erhöht, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

Nach Inkubation der Membran (Immobilon-P) in Methanol (45s) und Trans-Blot-Puffer (20 Min.) wurden die Proteine in einer Semi-dry-Kammer vom Gel auf die Membran geblottet. Die für eine Stunde angelegte Maximalstromstärke betrug 500 mA, bei einer maximalen Spannung von 25V und einer Maximalleistung von 50 W.

Die Membran wurde mit einer 4%-igen Milchpulver-TBST-Lösung für eine Stunde geblockt. Im Anschluss wurde die Membran über Nacht mit 4%-igen Milchpulver-TBST-Lösung und entsprechendem Primärantikörper (Anti-V₅ 1:2000, Invitrogen, Anti-Myc 1:10, Anti-hJagged (c20) 1:2000, Santa Cruz) inkubiert.

Nach Waschen mit TBST (6 x 10 Min.) wurde die Membran für eine Stunde mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Goat-Anti-Mouse 1:2000, Fa. Dako, Rabbit-Anti-Goat 1:10000, Fa. Jackson Immuno Research) in 4% Milchpulver/TBST inkubiert. Die Entwicklung erfolgte nach weiteren Waschsritten mit TBST (5 x 10 Min.) und PBS (2 x 10 Min.) mit Lumi-Light (Lumi-Light Western Blotting Substrate). Die Membran wurde auf Kodak Bio MAX MR Filme belichtet (10s, 1 Min. 5 Min. und bei Bedarf 45 Min.) und in einem Entwickler der Fa. Kodak entwickelt.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von humaner Notch3-ECD

3.1.1 Notch3 wird an der Oberfläche exprimiert und zeigt physiologisches Ligandenbindungsverhalten

Da sich im Rahmen der CADASIL-Pathologie die ECD im Bereich der Zelloberfläche von VSMCs ablagert, sollte untersucht werden, ob und wie sich die ECD in Zellen exprimieren lässt. Nach transienter Transfektion mit dem Vollängenkonstrukt des Notch3-Rezeptors (hN3^{VL} / hN3^{VL}^{R133C}) in NIH3T3-Zellen zeigte sich sowohl für den Wildtyp, als auch für die Mutante R133C eine gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilte Expression (Abbildung 5).

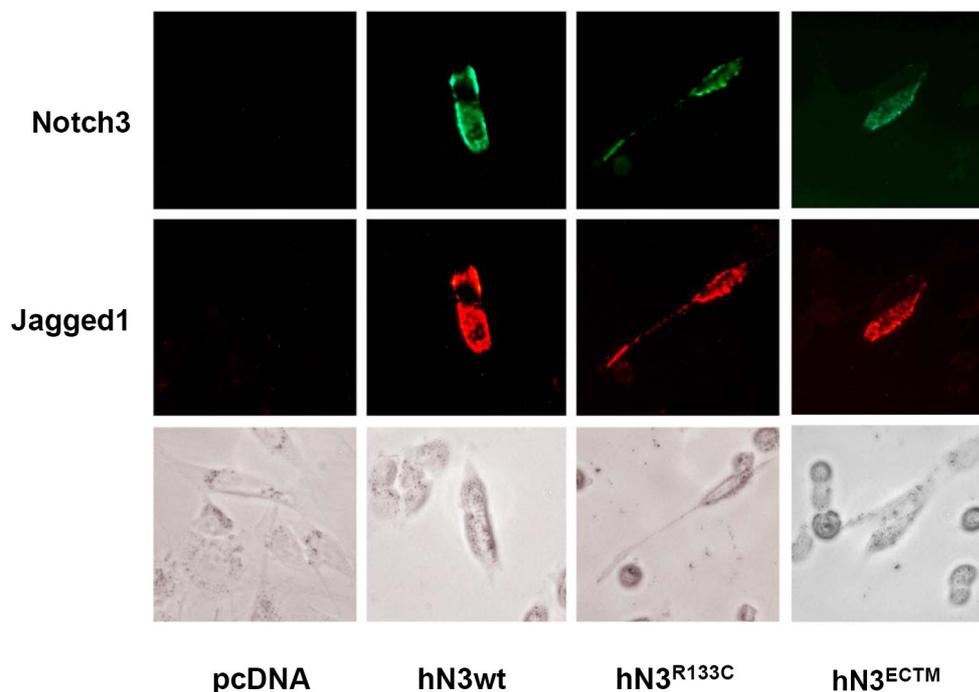


Abbildung 5: Der Vollängenrezeptor und die TM-ECD zeigen sich auf der Zelloberfläche und binden den Liganden Jagged1 (nach Peters et al. Exp Cell Resp 2004)

Repräsentative Ausschnitte transient transfizierter und mit monoklonalem Anti-Notch3-Antikörper gefärbte NIH3T3-Zellen zeigen eine gleichmäßige Expression des Rezeptors an der Oberfläche der Zellen (grün, obere Reihe). Der Ligand Jagged 1 bindet sowohl das Vollängen-Protein (wt/R133C) als auch die TM-ECD (rot, mittlere Reihe).

Ebenso wird die membrangebundene ECD (TM-ECD) an der Zelloberfläche exprimiert.

Der Ligand Jagged1 zeigte physiologisches Bindungsverhalten sowohl an das Volllängenkonstrukt des Notch3-Rezeptors als auch an das trunkierte Transmembrankonstrukt. Von Bedeutung für die weiteren Versuche ist, dass der Ligand keinen Unterschied im Bezug auf das Bindungsvermögen zwischen Wildtyp und Mutante R133C zeigte (Abbildung 5).

3.1.2 Expression der Notch3-ECD

Durch Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass die mit Wildtyp und Mutante R133C der ECD (Notch3^{EC} Myc / Notch3^{EC R133C} Myc und Notch3^{EC} V₅ / Notch3^{EC R133C} V₅) doppelt transient transfizierten 293 Zellen Proteine der erwarteten Größe exprimieren (Abbildung 6).

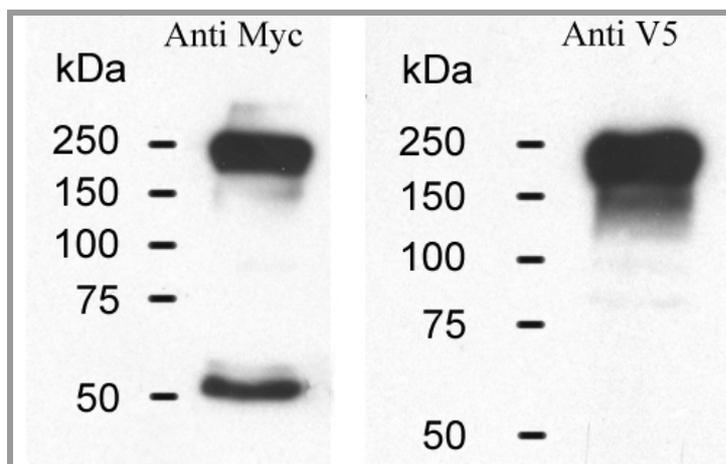


Abbildung 6: 293-Zellen exprimieren die ECD des humanen Notch3

Die linke Spur zeigt die 210 kDa große Bande der Myc-gekoppelten ECD, sowie die 50kDa große Bande des endogenen Myc (Swiss-Prot Eintrag P01106). Die rechte Spur zeigt die 210 kDa große Bande der V5-gekoppelten ECD.

Eine Überprüfung der mit dem ECD-Konstrukt transient transfizierten 293-Zellen durch Immunzytochemie ergab eine gleichmäßige Verteilung des Proteins. Es zeigten sich keine intrazellulären Akkumulationen in bestimmten Kompartimenten der Zellen.

Die Zellen zeigten eine deutliche Co-Lokalisation der unterschiedlich mit Myc/V₅-Tags markierten ECD, auch die Mutation R133C beeinflusst die Expression und die Lokalisation der ECD nicht (Abbildung 7).

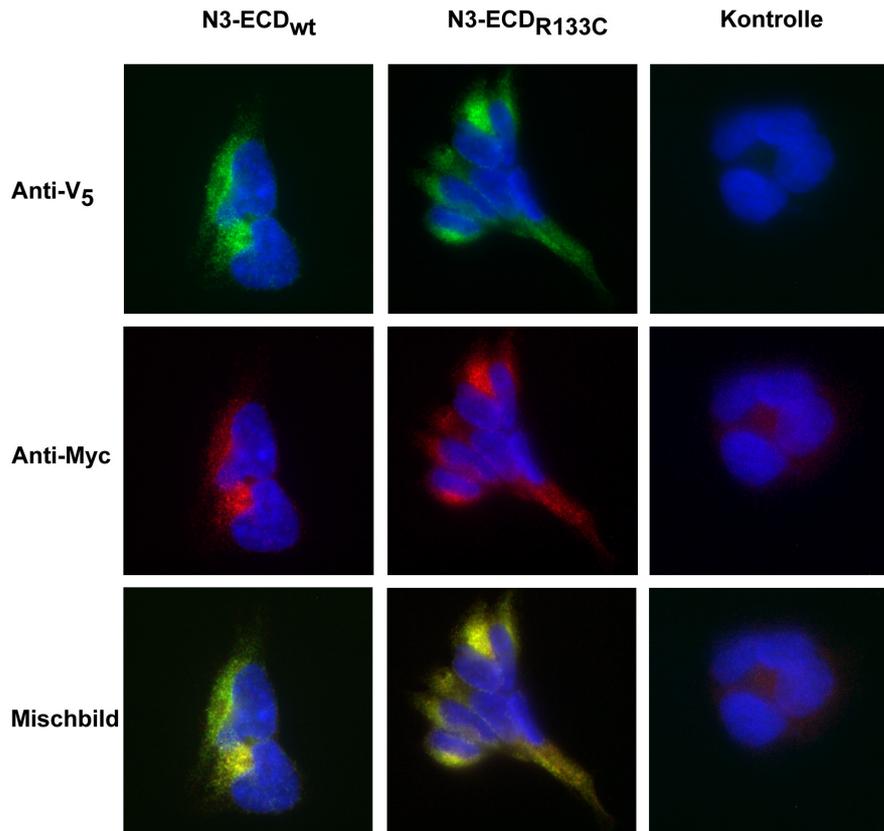


Abbildung 7: Expression der ECD von humanem Notch3 in 293-Zellen

293-Zellen, transient mit Notch3^{EC} Myc/Notch3^{EC} V₅ (N3-ECD_{wt}), bzw. Notch3^{EC R133C} Myc/Notch3^{EC R133C} V₅ (N3-ECD_{R133C}) transfiziert, Doppelfärbung gegen V₅ und Myc

Obere Reihe (grün): Ziege-Anti-V₅-AK, Sekundär AK Anti-Ziege, FITC-gekoppelt, Kernfärbung mit DAPI

Mittlere Reihe (rot): Maus-Anti-Myc-AK, Sekundär AK Anti-Maus Rhodamine-gekoppelt, Kernfärbung mit DAPI

Untere Reihe: Mischbild

3.1.3 Wildtyp und CADASIL-typische Mutante der Notch3-ECD zeigen keine signifikante Akkumulation innerhalb der Zelle

Die gegen V₅ gefärbten Zellen zeigten keine Unterschiede in der Proteinverteilung der ECD (Wt/R133C) über das Zytoplasma (Abbildung 8).

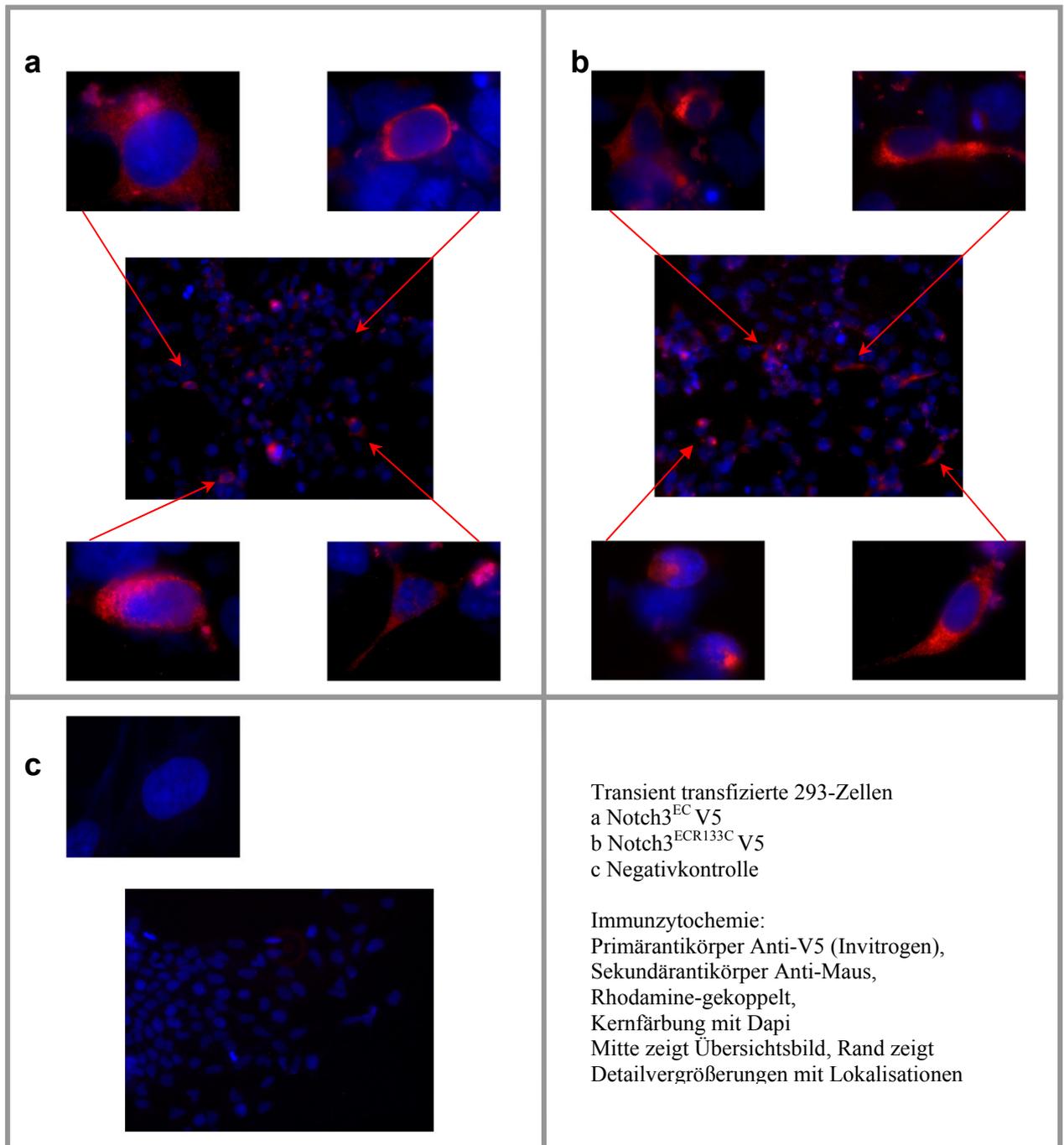


Abbildung 8: Die N3-ECD zeigt nach Expression als Wildtyp und Mutante (R133C) keine Akkumulationen innerhalb der Zelle

Um mögliche Akkumulationen zu detektieren, wurde die Färbung statistisch ausgewertet und dabei die Intensität der Färbung als ein indirektes Maß einer möglichen Akkumulation der ECD in der Zelle bewertet (siehe Methoden). Es wurden 3 Intensitätsstufen klassifiziert und außerdem wurden intrazelluläre Bereiche mit sehr starker und gut abgrenzbarer Färbungsintensität als lokale Akkumulationen (sog. „Aggregationen“) bewertet (Details siehe Methoden). Die Anzahl der Intensitätsstufen war normal verteilt. Es ergaben sich für keine der drei Stufen signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante. Die p-Werte des zweiseitigen t-Tests lagen zwischen 0,18 und 1. Ein eindeutiger Trend hin zu stärkerer Akkumulation der ECD für eine der beiden Gruppen ließ sich nicht erkennen (Tabelle 1, Abbildung 9).

Rohdaten / zweiseitiger T-Test Mikroskopie						
Mikroskop-Übersicht		Zellzahl gesamt	Stufe 1	Stufe 2	Stufe 3	Aggregate
Wt	Nr.					
	1	119	25	27	4	3
	2	99	11	13	3	2
	3	204	23	25	6	2
	4	175	5	18	3	2
	5	229	28	25	2	4
	Summe	826	92	108	18	13
Mikroskop-Übersicht		Zellzahl gesamt	Stufe 1	Stufe 2	Stufe 3	Aggregate
Mut	Nr.					
	1	160	16	26	1	4
	2	178	10	12	2	2
	3	146	20	33	3	1
	4	165	21	30	3	4
	5	171	15	21	3	2
	Summe	820	82	122	12	13
			Stufe 1 Wt vs Mut	Stufe 2 Wt vs Mut	Stufe 3 Wt vs Mut	Aggregate Wt vs Mut
p-Wert zweiseitiger T-Test			0,69	0,47	0,18	1

Tabelle 1: Rohdaten und 2-seitiger T-Test der Statistischen Auswertung der Einfachfärbung:

Der obere Teil der Tabelle zeigt die Rohdaten der Auswertung der Immunzytochemie. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf die Menge und Verteilung von N3-ECD bei der Expression von N3-ECD als Wildtyp und der Mutante R133C.

Es zeigte sich nur eine geringe Anzahl an Aggregaten innerhalb der Zellen. Diese Aggregate zeigten sich genauso häufig bei der Mutante wie beim Wildtyp (Tabelle 1, Abbildung 9).

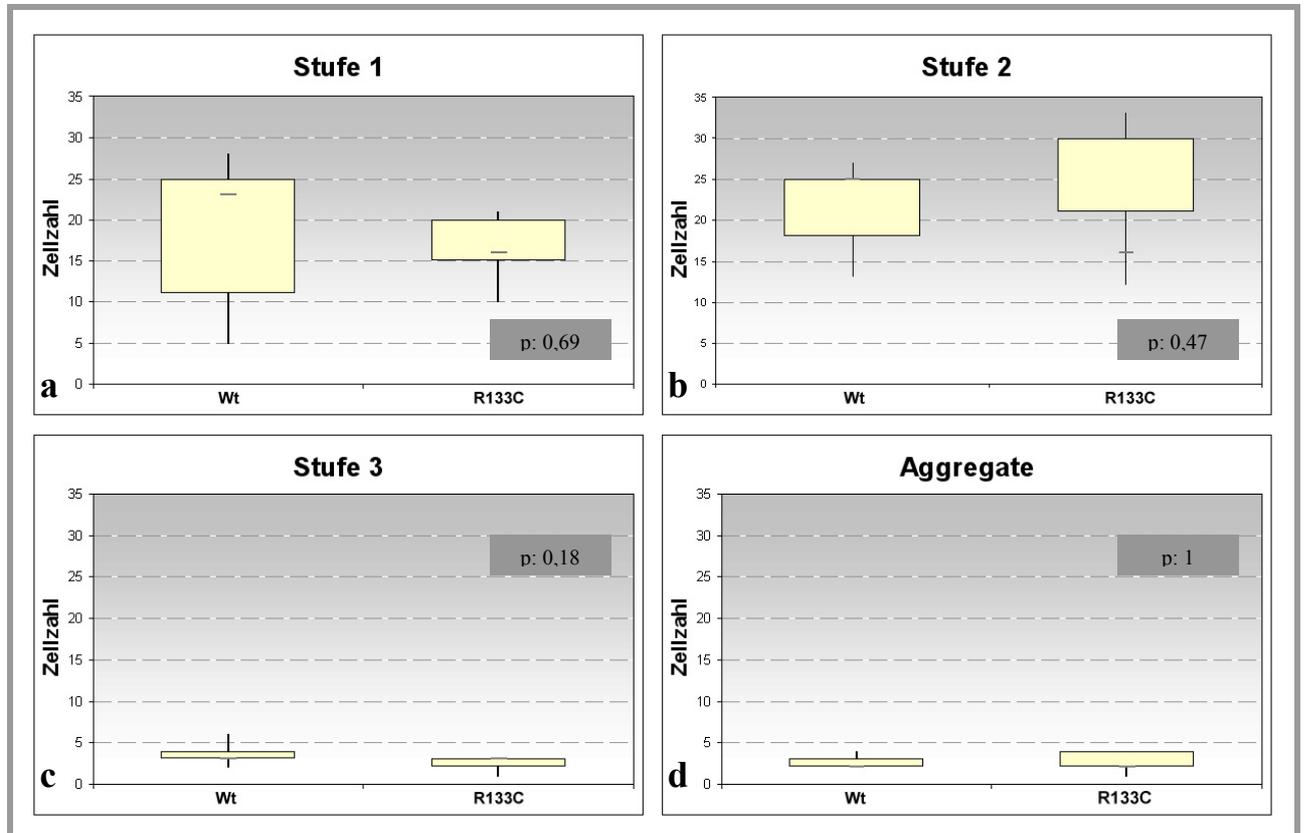


Abbildung 9: Expression von N3-ECD zeigt quantitativ keine statistischen Unterschiede zwischen Wt und Mut

- a-c:** Die Boxplots zeigen die Streuung der Expressionsintensitäten (Stufe 1 bis 3) über alle ausgewerteten Mikroskopübersichten. Gezeigt sind jeweils die 25- und 75%-Quartile, der Median, sowie Minima und Maxima jeweils für den Wildtyp und die Mutante R133C. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Notch3-ECD wenn der Wildtyp mit der Mutante R133C verglichen wird.
- d:** Die Boxplots dieser Grafik zeigen die Verteilung von Zellen mit sog. „Aggregaten“, welche als Zeichen besonders starker Akkumulation von Notch3-ECD bewertet wurden. Hier zeigte sich keinerlei statistischer Unterschied in der Ausprägung dieser Maximalvariante der Expression der ECD bei Wt und Mut.

3.2 Homophile Interaktion der Notch3-ECD

3.2.1 Homophile Interaktion der ECD unter In-vitro Bedingungen

Nachdem sich eine gleichmäßige Expression und Co-Lokalisation der ECD in der Immunzytologie (siehe 3.1.2) nachweisen ließ, wurde eine Immunopräzipitation durchgeführt, um eine mögliche homophile Interaktion der ECD zu untersuchen.

Sowohl der Wildtyp als auch die Mutante R133C der ECD des Notch3-Rezeptors mit V₅-Tag ließen sich in der Immunopräzipitation gegen V₅ präzipitieren und in der Westernblot-Analyse mit V₅-Primantikörper nachweisen (Abbildung 10b, Spur 6, 7, Abbildung 10c). Aus dem Material der IP konnte jedoch auch Myc-getaggte ECD nachgewiesen werden und somit gezeigt werden, dass die ECD kopräzipitiert wird. (Abbildung 10a Spur 6, 7).

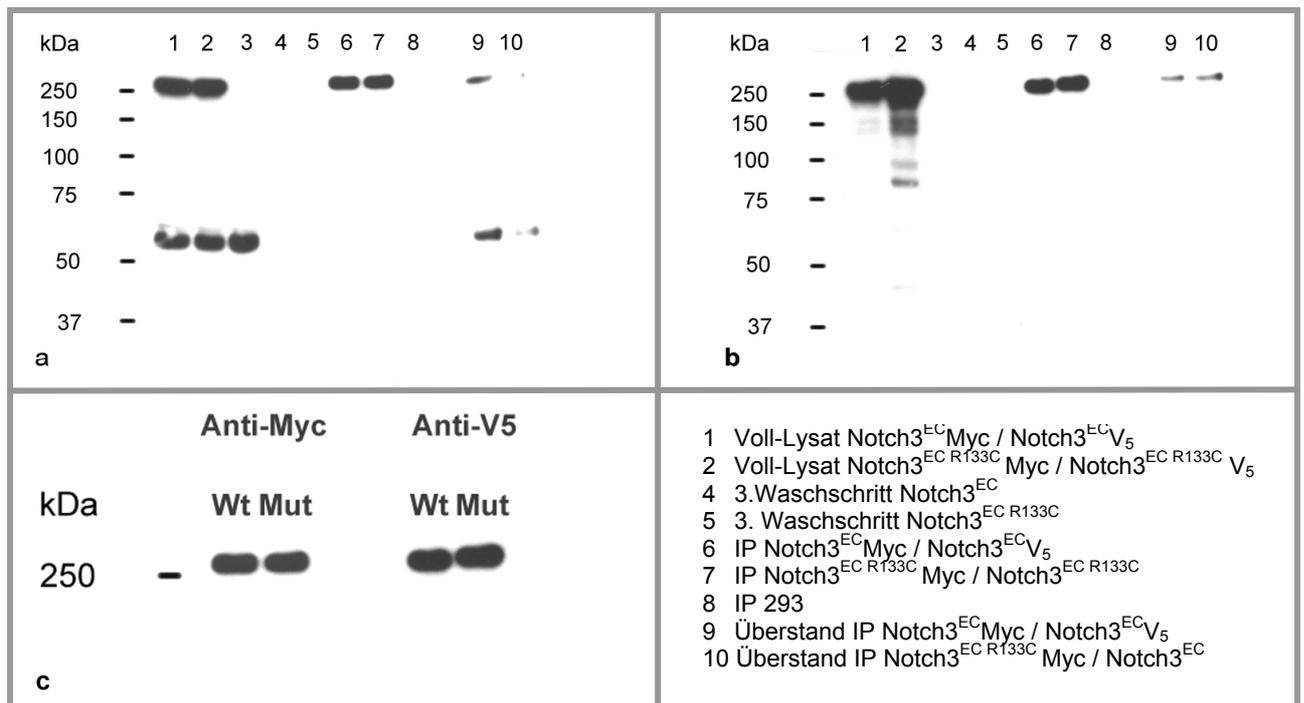


Abbildung 10: Nachweis homophiler Interaktion der ECD des humanen Notch3-Rezeptors

- a: Primärantikörper gegen Myc: Die Spuren 6 (Wt) und 7 (Mut) zeigen die kopräzipitierte ECD des Notch3-Rezeptors.
b: Primärantikörper gegen V₅: Die Spuren 6 (Wt) und 7 (Mut) zeigen die primär über die Agarosebeads präzipitierte ECD des Notch3-Rezeptors.

Spuren 1 bis 3 stellen die Positiv- und Negativkontrolle des Blots dar. Anhand der Spur 4 und 5 kann die Stringenz der Waschschriffe der Agarosebeads kontrolliert werden. Eine in diesen Spuren vorhandene Bande hätte auf eine Verunreinigung und damit auf einen etwaigen systemischen Fehler der IP hingedeutet.

- c: Vergrößerung der Spuren 6, 7 aus 10a und 10b: Die linken Banden zeigen die kopräzipitierte ECD.

Kein Unterschied bestand in der Ausprägung der Kopräzipitation bei Wildtyp und der Mutante R133C. Es zeigte sich also eine deutliche homophile Interaktion der ECD unabhängig davon, ob es sich dabei um den Wildtyp oder die Mutante R133C handelte (Abbildung 10a Spur 6, 7).

3.2.2 Notch3-ECD lässt sich im Zellkulturmedium nicht nachweisen

Um zu untersuchen, ob die ECD in den Extrazellulärraum sezerniert wird und detektiert werden kann, sowie eventuell auch vergleichbares Copräzipitationsverhalten wie in 3.2.1 zeigt, wurden die Überstände von stabil transfizierten Zelllinien untersucht, welche die ECD exprimieren.

Die Überstände der Zellkulturen zeigten das transfizierte Protein nicht, obwohl die verwendete trunkierte Variante des Notch3-Rezeptors dem S1-Spaltungsprodukt entspricht und die Transmembran-Domäne nicht enthält. Auch durch eine Trichloressigsäureanreicherung (Daten nicht gezeigt) oder eine IP ließ sich keine gute Anreicherung des Proteins erreichen. Eine nennenswerte Kopräzipitationen zeigte sich bei den Proteinen im Überstand nicht (Abbildung 11, Spur 3, 4).

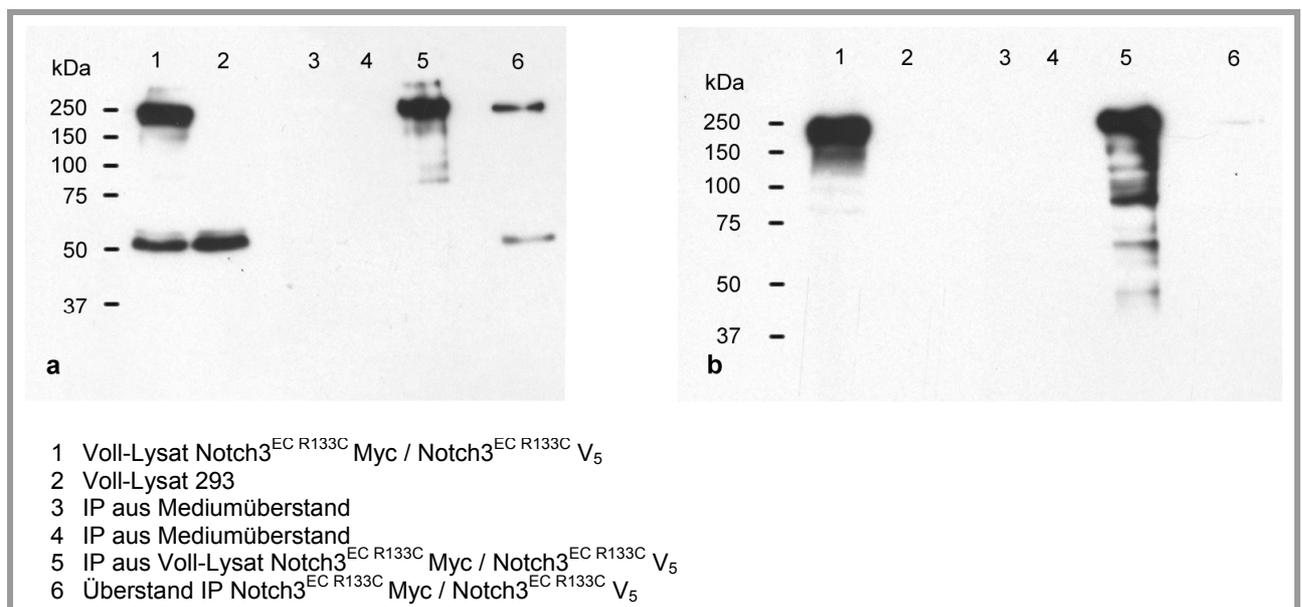


Abbildung 11: Die ECD wird nicht in den Zellüberstand sezerniert

a: Stabil transfizierte Zelllinien, Primärantikörper gegen Myc

b: Stabil transfizierte Zelllinien, Primärantikörper gegen V5

Aus Überständen konnte die ECD nicht präzipitiert werden, eine Kopräzipitation ließ sich hier nicht nachweisen (Spuren 3 und 4). Die Positivkontrolle der IP (Kopräzipitation der Mutante der ECD aus Voll-Lysat) war nachweisbar (Spur 5).

3.2.3 Notch3-ECD-Aggregate bleiben unter reduzierenden Bedingungen stabil

Da die Ausbildung von Disulfidbrücken über unpaarige Cysteine im Rahmen der CADASIL-Mutationen eine Rolle für die homophilen Interaktion der ECD spielen könnte, wurde eine IP unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Nach Zugabe von β -Mercaptoethanol konnten nach Kotransfektion der Vektoren und Immunopräzipitation wie in der nichtreduzierenden Immunopräzipitation N3-ECD-Aggregate nachgewiesen werden. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Zwar zeigte sich die Affinität des Proteins zu den Antikörpern der Agarosekugeln deutlich geringer als bei einer IP unter Standardbedingungen, die Kopräzipitation der Myc-gekoppelten Notch3-ECD ließ sich so jedoch nicht eindeutig verhindern. Auf Grund des weiterhin starken Signals im Westernblot gegen Myc wurden die Proben verdünnt, um etwaige geringere Unterschiede darzustellen.

So zeigte sich nach 1:3-Verdünnung der Immunopräzipitation zwar ein schwächeres Signal im Blot gegen V₅, jedoch weiterhin ein starkes Signal im Blot gegen Myc (Abbildung 12, Spur 6, 7). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante.

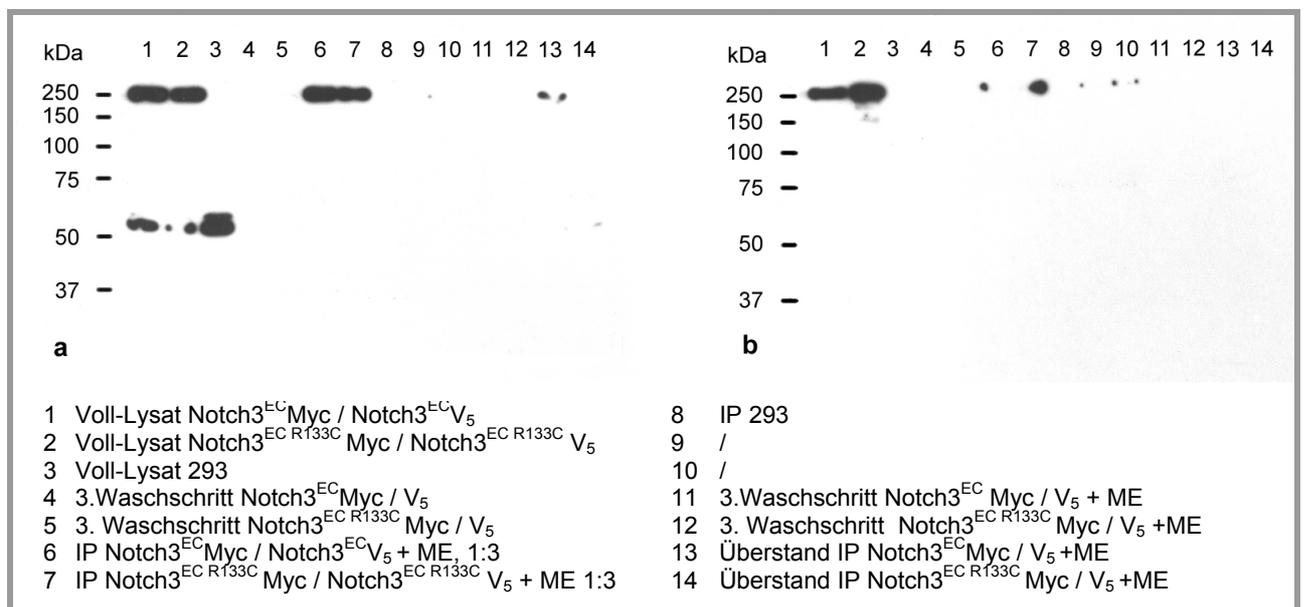


Abbildung 12: Reduzierende Bedingungen können die Kopräzipitation nicht verhindern

a: Primärantikörper gegen Myc

b: Primärantikörper gegen V₅

Unter reduzierenden Bedingungen zeigt sich nach Verdünnung der IP im Westernblot gegen V₅ zwar nur eine schwache ECD-Bande, im korrespondierenden Blot gegen Myc weiterhin ein kräftiges ECD Signal und damit eine vorhandene Kopräzipitation (Spuren 6, 7).

3.2.4 Keine Ex-vitro homophilen Interaktionen der Notch3-ECD

Nachdem In-vitro gezeigt werden konnte, dass es zu homophiler Interaktion der ECD des Notch3-Rezeptors kommt, stellt sich die Frage, ob das Protein auch extrazellulär zu einer relevanten Multimerbildung neigt, oder ob für diesen Vorgang die intakte Zelle notwendig ist. Um dies näher zu beleuchten, wurden die Vektoren getrennt transfiziert. Unter diesen „Ex-vitro“ – Bedingungen, bei denen die Zellen in getrennt jeweils mit Myc- bzw. V₅-gekoppelten Vektoren transfiziert wurden und die unterschiedlich gekoppelten Proteine erst als Lysate die Möglichkeit zur Präzipitation hatten, zeigte sich keine Kopräzipitation (Abbildung 13a, Spur 9, 10). Neben der kompletten ECD zeigten sich auch einige kleinere Banden. Hierbei könnte es sich um Degradationsprodukte der ECD handeln (Abbildung 13b, Spur 9, 10).

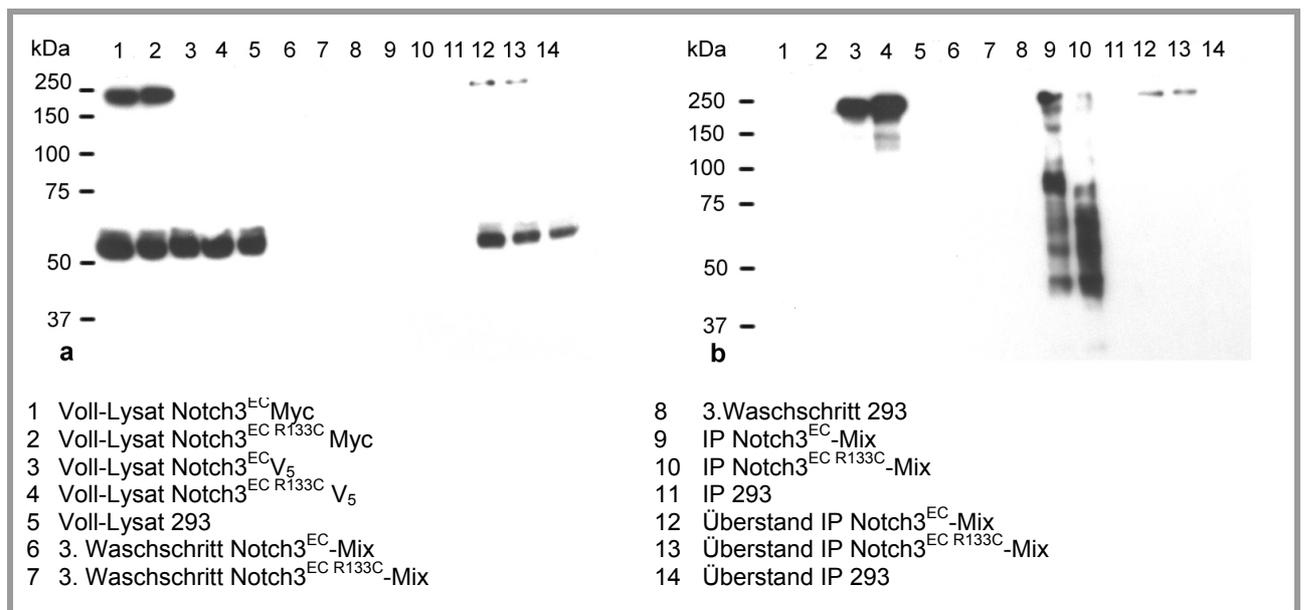


Abbildung 13: Ex-Vitro-Bedingungen verhindern eine Aggregation der ECD

- a: Primärantikörper gegen Myc
 b: Primärantikörper gegen V₅

Werden die Proteine separat exprimiert und „ex-vitro“ in Kontakt gebracht, lässt sich zwar die ECD über V₅ präzipitieren, eine Kopräzipitation bleibt in Abwesenheit der intakten Zelle jedoch aus (Spuren 9, 10).

3.2.5 Spezifische Interaktionen zwischen humaner Notch3-ECD und Liganden

Das Volllängen-Notch3 und die TM-ECD hatten in der Immunzytochemie sowohl als Wildtyp, als auch in der Mutation R133C ein normales Bindungsverhalten des Liganden gezeigt (Abschnitt 3.1.1). Um dies auch für die ECD zu zeigen, wurde in einem weiteren Versuch humanes Jagged, einer der physiologischen Liganden des Notch3-Rezeptors, kotransfiziert. Die Zellen exprimierten also entweder Notch3^{EC R133C} Myc / Notch3^{EC R133C} V₅ / hJagg oder Notch3^{EC} Myc / Notch3^{EC} V₅ / hJagg.

Neben der bisher schon nachgewiesenen Kopräzipitation der ECD konnte auch der Ligand kopräzipitiert werden. (Abbildung 14c Spur 5, 6).

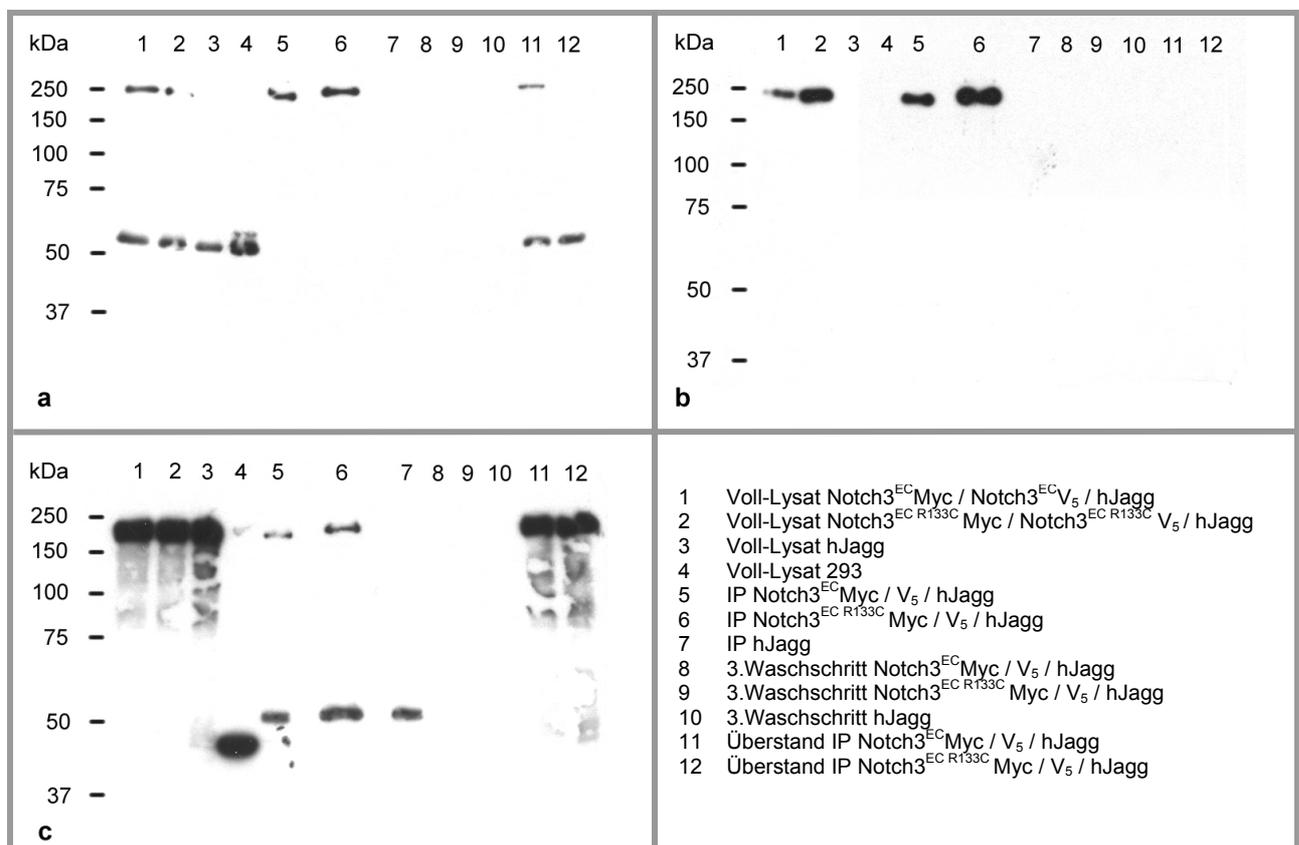


Abbildung 14: h-Jagged lässt sich in der IP kopräzipitieren

a: Primärantikörper gegen Myc

b: Primärantikörper gegen V5

c: Primärantikörper gegen hJagged (physiologischer Ligand von Notch3)

Die ECD kann wie schon gezeigt kopräzipitiert werden (14a Spur 5, 6) und zeigt keinen Unterschied zwischen Wt und Mut. Auch der physiologische Ligand hJagged kann kopräzipitiert werden (14c, Spur 5, 6). Auch hier zeigen sich keine Unterschiede zwischen Wt und Mut. Die Ligandenbindungsdomäne der ECD ist funktionell und wird durch die Mutation R133C nicht beeinträchtigt. Eine unspezifische Präzipitation des Liganden hJagged findet nicht statt (14c, Spur 7).

Auch in der trunkierten Version des Notch3 (ECD ohne Transmembrandomäne) zeigt sich eine Rezeptor-Liganden-Interaktion (Abbildung 14c, Spur 5,6) in Einklang mit der erhaltenen immunzytochemisch nachgewiesenen Ligandenbindung (siehe 3.1.1). Auch in Anwesenheit des Liganden ist die homophile Notch3-Interaktion (V₅/Myc) erhalten (Abbildung 14 a, b, Spur 5, 6).

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl die Vollängenkonstrukte als auch die membrangebundene Extrazellulärdomäne (TM-ECD) des humanen Notch3-Rezeptors an der Zelloberfläche exprimiert werden. Ebenso wies die TM-ECD wie auch der Vollängenrezeptor eine regelrechte Bindung des physiologischen Liganden Jagged1 auf. Bei den Vollängenkonstrukten zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante.

Auch die ECD des humanen Notch3-Rezeptors konnte nach transients Transfektion exprimiert werden und zeigte dabei keine Aggregation innerhalb der Zelle oder auf der Zelloberfläche. Ein qualitativer oder quantitativer Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante R133C zeigte sich in den vorliegenden Experimenten nicht.

Des Weiteren konnte mittels Immunopräzipitation eine homophile Interaktion der ECD des humanen Notch3-Rezeptors nachgewiesen werden. Ein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante R133C war dabei in den vorliegenden Experimenten nicht nachzuweisen. Diese homophile Interaktion fand sich nur *in vitro* bei Expression im Zellkulturmodell. Der Nachweis der Notch3-ECD im Zellkulturüberstand gelang nicht. Die ECD-Aggregate blieben unter reduzierenden Bedingungen stabil. *Ex vitro* war bei separater Expression der Proteine keine homophile Interaktion nachweisbar.

Schließlich konnte, in Analogie zu den immunzytochemischen Experimenten, mittels Immunopräzipitation eine Interaktion der Extrazellulärdomäne des Notch3-Rezeptors mit seinem physiologischen Liganden Jagged-1 nachgewiesen werden.

4.2 Interpretation der Ergebnisse in Bezug auf CADASIL

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine homophile Interaktion der ECD des humanen Notch3-Rezeptors, sowohl des Wildtyp- als auch des mutierten Notch3-Rezeptors. Vor dem Hintergrund der bekannten Akkumulation der ECD bei CADASIL erscheint dieser Proteininteraktion im Sinne einer möglichen Aggregation eine pathophysiologisch relevante Bedeutung zuzukommen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Ligandenbindung des mutierten Rezeptors nicht beeinträchtigt ist. Dieses gilt für das Volllängenprotein wie auch für die ECD. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen vor dem Hintergrund der Pathophysiologie der Erkrankung im Folgenden diskutiert werden.

Sowohl der Volllängenrezeptor als auch die membrangebundene Extrazellulärdomäne wiesen eine regelrechte Ligandenbindung auf. Dieses Bindungsvermögen wird durch die Mutation R133C nicht beeinträchtigt. Entsprechend hierzu zeigte sich eine Interaktion der ECD mit dem Liganden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Störung der Rezeptor-Liganden-Interaktion nicht die wesentliche pathophysiologische Grundlage der Erkrankung darstellt. Bei der verwendeten Mutation R133C handelt es sich um eine sehr häufige krankheitsverursachende Mutation, welche mit dem klassischen Phänotyp von CADASIL assoziiert ist. Die gleichen Ergebnisse konnten durch die Arbeitsgruppe ebenfalls für weitere Mutanten nachgewiesen werden (Peters et al. 2004). Dabei zeigte sich, dass klassische CADASIL-Mutationen nicht nur die Rezeptor-Liganden-Interaktion unbeeinflusst lassen, sondern dass, wie dementsprechend zu erwarten, auch die Liganden-induzierte Rezeptor-Signaltransduktionsaktivität durch die Mutationen keine Unterschiede zur Rezeptoraktivität des Wildtyp-Rezeptors aufweist. Analog konnte auch im Mausmodell eine Normalisierung der Rezeptoraktivität durch Einkreuzen eines mutierten Notch3-Rezeptors in eine Notch3-Knock-out-Maus gezeigt werden (Monet et al 2007). Ein „loss-of-function“ Mechanismus durch eine Störung der Rezeptor-Liganden-Interaktion bzw. konsekutiv der Rezeptoraktivität ist somit unwahrscheinlich. In Einklang dazu zeigte sich in einem Notch3-Knock-out-Maus-Modell als Extremvariante einer Ligandenfehlfunktion kein CADASIL-Phänotyp (Ruchoux et al. 2003).

Ein Charakteristikum der Erkrankung ist die Akkumulation der ECD des humanen Notch3-Rezeptors (Joutel et al 2000). Inwiefern dieser Proteinakkumulation eine pathophysiologisch relevante Rolle zukommt ist unbekannt, sie deutet jedoch auf einen möglichen pathophysiologisch

relevanten toxischen Effekt der Proteinakkumulation im Sinne eines möglichen neomorphen Effektes hin („toxic gain-of-function“).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eben diese bei der Erkrankung akkumulierende ECD des Rezeptors eine homophile Interaktion aufweist, das Protein somit zur Aggregation neigt. Es zeigte sich in der vorliegenden Arbeit zwar eine Interaktion auch des mutierten Rezeptors (Volllängen und ECD) mit seinem physiologischen Liganden, die homophile Interaktion des Rezeptors zeigte sich jedoch in Abwesenheit des Liganden. Die Ligandenbindung erscheint somit keine Voraussetzung für die homophile Proteininteraktion zu sein. Passend hierzu konnten Joutel et al 2004 zeigen, dass eine Akkumulationen der ECD unabhängig von der Lokalisation der Mutationen innerhalb oder außerhalb der Ligandenbindungsdomäne (LBD) nachzuweisen ist. Ebenfalls passend dazu konnte in der Arbeitsgruppe bestätigt werden, dass eine seltene, innerhalb der LBD lokalisierte CADASIL-assoziierte Mutation (C455R) mit der Ligandenbindung interferiert, letztere also, wie auch hier gezeigt, keine Voraussetzung für die Notch3-Akkumulation darstellt (Peters et al. 2004). Insgesamt unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die These, dass der Proteinaggregation und –akkumulation eine für CADASIL pathophysiologisch relevante Bedeutung zukommt.

Die hier nachgewiesene homophile Interaktion scheint einige Zeit in Anspruch zu nehmen bzw. nur in Abhängigkeit der intakten Zelle stattzufinden, da sich bei der Immunopräzipitation mit separat transfizierten Zellen und Inkubation der Lysate keine Kopräzipitation nachweisen ließ. Zwar zeigen die Daten dieser Arbeit keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante, geben jedoch erste Hinweise auf die Entstehung der histologisch nachgewiesenen Akkumulationen der ECD an VSMCs (Joutel et al. 2000). Eine unspezifische Proteininteraktion der ECD konnte durch Kooexpression von APP mit der ECD und konsekutiver IP durch unsere Arbeitsgruppe im weiteren Verlauf ausgeschlossen werden (Opherk et al. 2009).

Ein nachweisbarer quantitativer Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante R133C zeigte sich in der vorliegenden Arbeit nicht. Dieser fehlende Nachweis ist am ehesten methodisch begründet, da eine Westernblot-Analyse die Differenzierung von feinen Unterschieden nicht zulässt. Auch die Immunzytochemie kann sehr feine Unterschiede in der Signalintensität nicht aufzeigen. Zudem wurden durch die Überexpression des Rezeptors supraphysiologische Proteinmengen erzeugt, welche eine Differenzierung möglicherweise nicht zulassen. Aufbauend auf den hier vorliegenden Ergebnissen konnte eine homophile Interaktion von Notch3 jüngst in unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden (Opherk et al. 2009). Durch die hierbei gewählte Methode der SIFT-Analyse

konnte nunmehr ebenfalls eine Zunahme der Proteinakkumulation durch CADASIL-Mutationen bestätigt werden. Dieses untermauert die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und unterstützt die These einer pathophysiologisch relevanten Proteinakkumulation.

Zusätzlich ergaben sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit mögliche Hinweise auf die Art der homophilen Proteininteraktionen. Postuliert man den Verlust eines Cysteins durch die Mutation und eine damit verbundene Konformationsänderung des Proteins als Ursache der Aggregation, sollte diese durch reduzierende Bedingungen verhindert werden. Es zeigte sich jedoch, dass es auch unter reduzierenden Bedingungen zu homophilen Interaktionen der ECD kommt. Somit erscheint es möglich, dass neben der Bildung von aberanten Disulfidbrücken auch Änderungen der tertiären Proteinstruktur eine Rolle spielen können.

Die Proteinakkumulation deckt sich mit Daten zum Notch1-Rezeptor (Sakamoto et al. 2005, Vooijs et al. 2004). Ein Einfluss auf die Prozessierung des Rezeptors und die Signalkaskade konnte beim Notch1-Rezeptor nicht nachgewiesen werden (Vooijs et al. 2004).

Neben den Daten zu Notch1, die die Toxizitätsthese untermauern, lässt sich auch eine hypothetische pathophysiologische Analogie zu einer anderen neurologischen Erkrankung, insbesondere neurodegenerativen Erkrankung, welche ebenfalls mit einer Proteinakkumulation assoziiert sind, aufzeigen. Beim autosomal dominant vererbten Parkinson-Syndrom kommt es z.B. zu spontanen Aggregaten von Alpha-Synuclein. Dieser schon beim Wildtyp nachweisbare Effekt wird durch Mutationen noch deutlich verstärkt (Conway et al. 1998, Narhi et al 1999).

Einige Limitationen der vorliegenden Arbeit sollen im Folgenden noch erörtert werden.

Für einen Großteil der Versuche wurden 293-Zellen verwendet. Es handelt sich hierbei um eine humane Nierenzelllinie. Bei den zum Teil für die Immunzytochemie verwendeten NIH3T3-Zellen handelt es sich um eine Fibroblastenzelllinie aus embryonalen Mauszellen. Im Gegensatz dazu wird der humane Notch3-Rezeptor in vivo in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert. Es zeigte sich, dass verfügbare glatte Gefäßmuskelzellen nach Transfektion eine zu geringe Ausbeute an Protein zeigen, um die Versuche durchzuführen (Daten nicht gezeigt).

Die Immunpräzipitations-Experimente mussten aus Volllysaten der transfizierten Zellen erfolgen. Der Versuch der Aufreinigung bzw. Anreicherung der nach extrazellulär sezernierten ECD aus Zellkulturüberständen gelang vor dem Hintergrund der geringen Proteinmengen (s. Abb. 11) und der Größe des Proteins nicht. Bei der für die Experimente verwendeten ECD kann es dadurch zu einer veränderten Proteinstruktur gekommen sein. Auch eine beeinflussende unspezifische

Interaktion mit anderen Proteinen ist nicht auszuschließen. Eine Lösung für dieses Problem würde die Verwendung kleinerer Notch3-ECD-Fragmente darstellen, welche sezerniert werden und auch aufgereinigt werden könnten. Basierend auf der vorliegenden Arbeit konnte dieser Ansatz aktuell durch die Arbeitsgruppe verfolgt werden (Duering et al. 2011 in Druck)

Schlussendlich ist auch bei der verwendeten immunzytochemischen Untersuchung nicht auszuschließen, dass möglicherweise vorhandene Unterschiede der homophilen Interaktionen zwischen Wildtyp und Mutante auf Grund deren Feinheit nicht zur Darstellung kamen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

CADASIL stellt als monogene erbliche Mikroangiopathie ein ideales Modell einer „reinen“ vaskulären Demenz dar, im Speziellen der häufigen Form einer subkortikalen ischämischen vaskulären Demenz (SIVD). Bei den Betroffenen kommt es im Verlauf zu ischämischen Schlaganfällen und konsekutiv zu kognitiven Störungen bis hin zur Ausbildung einer vaskulären Demenz. Der Erkrankung liegt ein monogener, autosomal dominanter Erbgang mit Mutationen des *NOTCH3*-Gens zu Grunde. Dieses Gen kodiert einen TypI-Transmembranrezeptor, der im adulten Organismus in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird. Diese Zellen degenerieren im Verlauf der Erkrankung aus bisher nicht geklärter Ursache.

Weiterhin ist bekannt, dass alle bisher bekannten CADASIL-Mutationen das stereotype Auftreten eines unpaarigen Cysteins in den EGF-Wiederholungen der extrazellulären Domäne des Notch3-Rezeptors hervorrufen. Diese unpaarige Cysteinreste können über die Bildung von Disulfidbrücken zu einer Konformationsänderung des Rezeptors oder zu Proteininteraktionen führen.

Generell kommen drei verschiedene Hypothesen als Ursache der CADASIL-Pathologie in Frage: ein Gain- oder Loss-of-Function-Effekt, oder ein durch eine Proteinakkumulation bedingter toxischer bzw. neomorpher Effekt. Letzterer erscheint insbesondere vor dem Hintergrund der bei CADASIL bekannten Proteinakkumulation wahrscheinlich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergaben sich weiterführende Hinweise auf die pathophysiologisch relevante Bedeutung der Notch3-Akkumulation, während insbesondere ein loss-of-function Mechanismus sehr unwahrscheinlich ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die bei der Erkrankung akkumulierende ECD des humanen Notch3-Rezeptors zur Bildung höhermolekularer Aggregate neigt und eine homophile Interaktion aufweist. Auch die ECD mit der häufigen CADASIL-Mutation R133C zeigte diese homophile Interaktion. Die Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis auf die Akkumulations- und Aggregationsneigung des Proteins und bildeten die Grundlage für weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe, im Rahmen derer sich die Annahme einer mutationsbedingten Verstärkung der Proteinakkumulation schließlich bestätigte (Opherk et al 2009, Duering et al 2011). Darüber hinaus konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch der mutierte humane Notch3-Rezeptor wie auch seine ECD eine regelrechte Ligandenbindung aufweisen, diese jedoch nicht Voraussetzung für die Proteinakkumulation zu sein scheinen.

Die hier erarbeiteten Ergebnisse können die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Pathophysiologie und möglicherweise konsekutiv auch zur spezifischen Therapie dieser

Erberkrankung darstellen. Offen bleibt, ob bereits niedermolekulare Proteinakkumulate einen möglichen toxischen Effekt haben und zur Zelldegeneration führen können. Die jüngst in der Arbeitsgruppe implementierten SIFT-Analysen können hierfür eine mögliche Grundlage stellen. Zum anderen können basierend auf den erzielten Ergebnissen auch Fragen zu den zeitlichen Aspekten bzw. Kinetik der Proteinakkumulation adressiert werden. So sollte z.B. die Frage geklärt werden, ob der mutierte Rezeptor schneller als der Wildtyp aggregiert.

Die Diagnose CADASIL stellt für die betroffenen Patienten eine Erkrankung ohne kausale und kurative Therapieoptionen dar. Umso mehr sollten Anstrengungen intensiviert werden, die pathophysiologische Basis dieser Erkrankung zu klären. Mit dieser Arbeit wurde ein weiterer Schritt zum Verständnis der Pathomechanismen dieser Erkrankung gemacht. Sollte es gelingen, nachzuweisen, dass die Proteinakkumulation kausal für die Entstehung von CADASIL ist und die genauen Mechanismen dieser Aggregation zu klären, kann an dieser Stelle eventuell therapeutisch eingegriffen werden.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Daten des Statistischen Bundesamtes zur Bevölkerungsentwicklung	1
Abbildung 2: Physiologische Prozessierung des Notch3-Rezeptors	5
Abbildung 3: Notch Signalkaskade über CSL (Mumm et al. 2000)	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung der verwendeten Notch3-Vektoren:	11
Abbildung 5: Der Volllängenrezeptor und die TM-ECD zeigen sich auf der Zelloberfläche und binden den Liganden Jagged1 (nach Peters et al. Exp Cell Resp 2004)	18
Abbildung 6: 293-Zellen exprimieren die ECD des humanen Notch3	19
Abbildung 7: Expression der ECD von humanem Notch3 in 293-Zellen	20
Abbildung 8: Die N3-ECD zeigt nach Expression als Wildtyp und Mutante (R133C) keine Akkumulationen innerhalb der Zelle	21
Abbildung 9: Expression von N3-ECD zeigt quantitativ keine statistischen Unterschiede zwischen Wt und Mut	23
Abbildung 10: Nachweis homophiler Interaktion der ECD des humanen Notch3-Rezeptors	24
Abbildung 11: Die ECD wird nicht in den Zellüberstand sezerniert	25
Abbildung 12: Reduzierende Bedingungen können die Kopräzipitation nicht verhindern	26
Abbildung 13: Ex-Vitro-Bedingungen verhindern eine Aggregation der ECD	27
Abbildung 14: h-Jagged lässt sich in der IP kopräzipitieren	28

7. Quellenverzeichnis

- Amberla K, Wäljas M, Tuominen S, Almkvist O, Pöyhönen M, Tuisku S, Kalimo H, Viitanen M. Insidious cognitive decline in CADASIL. *Stroke*. 2004 Jul;35(7):1598-602.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999 Apr 30;284(5415):770-6.
- Beckers J, Clark A, Wunsch K, Hrabé De Angelis M, Gossler A. Expression of the mouse Delta1 gene during organogenesis and fetal development. *Mech Dev*. 1999 Jun;84(1-2):165-8.
- Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Sep;7(9):678-89.
- Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israël A. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*. 2000 Feb;5(2):207-16.
- Chabriat H, Vahedi K, Iba-Zizen MT, Joutel A, Nibbio A, Nagy TG, Krebs MO, Julien J, Dubois B, Ducrocq X, et al. Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Lancet*. 1995 Oct 7;346(8980):934-9.
- Conway, K.A., Harper, J.D. and Lansbury, P.T. (1998) Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat. Med.*, 4, 1318-1320.
- Davous P, Fallet-Bianco C. Familial subcortical dementia with arteriopathic leukoencephalopathy. A clinico-pathological case *Rev Neurol (Paris)*. 1991;147(5):376-84.
- De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*. 1999 Apr 8;398(6727):518-22.
- Del Amo FF, Smith DE, Swiatek PJ, Gendron-Maguire M, Greenspan RJ, McMahon AP, Gridley T. Expression pattern of Motch, a mouse homolog of Drosophila Notch, suggests an important role in early postimplantation mouse development. *Development*. 1992 Jul;115(3):737-44.
- Dichgans M, Herzog J, Gasser T. NOTCH3 mutation involving three cysteine residues in a family with typical CADASIL. *Neurology*. 2001 Nov 13;57(9):1714-7.

- Dichgans M, Ludwig H, Müller-Höcker J, Messerschmidt A, Gasser T. Small in-frame deletions and missense mutations in CADASIL: 3D models predict misfolding of Notch3 EGF-like repeat domains. *Eur J Hum Genet.* 2000 Apr;8(4):280-5.
- Dichgans M, Mayer M, Uttner I, Brüning R, Müller-Höcker J, Rungger G, Ebke M, Klockgether T, Gasser T. The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases. *Ann Neurol.* 1998 Nov;44(5):731-9.
- Dichgans M. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: phenotypic and mutational spectrum. *J Neurol Sci.* 2002 Nov 15;203-204:77-80.
- Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, Monet M, Maciazek J, Krebs LT, Klonjowski B, Berrou E, Mericskay M, Li Z, Tournier-Lasserre E, Gridley T, Joutel A. Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev.* 2004 Nov 15;18(22):2730-5.
- Donahue CP, Kosik KS. Distribution pattern of Notch3 mutations suggests a gain-of-function mechanism for CADASIL. *Genomics.* 2004 Jan;83(1):59-65.
- Duering M, Karpinska A, Rosner S, Hopfner F, Zechmeister M, Peters N, Kremmer E, Haffner C, Giese A, Dichgans M, Opherk C. Co-aggregate formation of CADASIL-mutant NOTCH3: a single particle analysis. *Human Molecular Genetics* 2011 im Druck
- Escary JL, Cécillon M, Maciazek J, Lathrop M, Tournier-Lasserre E, Joutel A. Evaluation of DHPLC analysis in mutational scanning of Notch3, a gene with a high G-C content. *Hum Mutat.* 2000 Dec;16(6):518-26.
- Fortini ME, Artavanis-Tsakonas S. The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell.* 1994 Oct 21;79(2):273-82.
- Haritunians T, Boulter J, Hicks C, Buhrman J, DiSibio G, Shawber C, Weinmaster G, Nofziger D, Schanen C. CADASIL Notch3 mutant proteins localize to the cell surface and bind ligand. *Circ Res.* 2002 Mar 22;90(5):506-8.
- Jones EA, Clement-Jones M, Wilson DI. JAGGED1 expression in human embryos: correlation with the Alagille syndrome phenotype. *J Med Genet.* 2000 Sep;37(9):658-62.
- Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cécillon M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature.* 1996 Oct 24;383(6602):707-10.

- Joutel A, Chabriat H, Vahedi K, Domenga V, Vayssière C, Ruchoux MM, Lucas C, Leys D, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. Splice site mutation causing a seven amino acid Notch3 in-frame deletion in CADASIL. *Neurology*. 2000 May 9;54(9):1874-5.
- Joutel A, Andreux F, Gaulis S, Domenga V, Cecillon M, Battail N, Piga N, Chapon F, Godfrain C, Tournier-Lasserre E. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J Clin Invest*. 2000 Mar;105(5):597-605.
- Joutel A, Favrole P, Labauge P, Chabriat H, Lescoat C, Andreux F, Domenga V, Cécillon M, Vahedi K, Ducros A, Cave-Riant F, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. Skin biopsy immunostaining with a Notch3 monoclonal antibody for CADASIL diagnosis. *Lancet*. 2001 Dec 15;358(9298):2049-51.
- Joutel A, Monet M, Domenga V, Riant F, Tournier-Lasserre E. 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*. 2004 Feb;74(2):338-47.
- Joutel A, Vahedi K, Corpechot C, Troesch A, Chabriat H, Vayssière C, Cruaud C, Maciazek J, Weissenbach J, Bousser MG, Bach JF, Tournier-Lasserre E. Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet*. 1997 Nov 22;350(9090):1511-5.
- Karlström H, Beatus P, Dannaeus K, Chapman G, Lendahl U, Lundkvist J. A CADASIL-mutated Notch 3 receptor exhibits impaired intracellular trafficking and maturation but normal ligand-induced signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 24;99(26):17119-24.
- Karsan A. The role of notch in modeling and maintaining the vasculature. *Can J Physiol Pharmacol*. 2005 Jan;83(1):14-23.
- Leimeister C, Schumacher N, Steidl C, Gessler M. Analysis of HeyL expression in wild-type and Notch pathway mutant mouse embryos. *Mech Dev*. 2000 Nov;98(1-2):175-8.
- Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israël A. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 7;95(14):8108-12.
- Markus HS, Martin RJ, Simpson MA, Dong YB, Ali N, Crosby AH, Powell JF. Diagnostic strategies in CADASIL. *Neurology*. 2002 Oct 22;59(8):1134-8.
- Mas JL, Dilouya A, de Recondo J. A familial disorder with subcortical ischemic strokes, dementia, and leukoencephalopathy. *Neurology*. 1992 May;42(5):1015-9.

- Monet M, Domenga V, Lemaire B, Souilhol C, Langa F, Babinet C, Gridley T, Tournier-Lasserre E, Cohen-Tannoudji M, Joutel A. The archetypal r90c cadasil-notch3 mutation retains notch3 function in vivo. *Human Molecular Genetics*. 2007;16:982-992
- Mizutani T, Taniguchi Y, Aoki T, Hashimoto N, Honjo T. Conservation of the biochemical mechanisms of signal transduction among mammalian Notch family members. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 31;98(16):9026-31.
- Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R. A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell*. 2000 Feb;5(2):197-206.
- Narhi, L., Wood, S.J., Steavenson, S., Jiang, Y., Wu, G.M., Anafi, D., Kaufman, S.A., Martin, F., Sitney, K., Denis, P. et al. (1999) Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J. Biol. Chem.*, 274, 9843-9846.
- Oberstein SA, Ferrari MD, Bakker E, van Gestel J, Kneppers AL, Frants RR, Breuning MH, Haan J. Diagnostic Notch3 sequence analysis in CADASIL: three new mutations in Dutch patients. Dutch CADASIL Research Group. *Neurology*. 1999 Jun 10;52(9):1913-5.
- Opherck C, Peters N, Herzog J, Luedtke R, Dichgans M. Long-term prognosis and causes of death in CADASIL: a retrospective study in 411 patients. *Brain*. 2004 Nov;127(Pt 11):2533-9.
- Opherck C, Duering M, Peters N, Karpinska A, Rosner S, Schneider E, Bader B, Giese A, Dichgans M. CADASIL mutations enhance spontaneous multimerization of NOTCH3. *Hum Mol Genet*. 2009 Aug 1;18(15):2761-7.
- Peters N, Herzog J, Opherck C, Dichgans M. A two-year clinical follow-up study in 80 CADASIL subjects: progression patterns and implications for clinical trials. *Stroke*. 2004 Jul;35(7):1603-8.
- Peters N, Opherck C, Bergmann T, Castro M, Herzog J, Dichgans M. Spectrum of mutations in biopsy-proven CADASIL: implications for diagnostic strategies. *Arch Neurol*. 2005 Jul;62(7):1091-4.
- Peters N, Opherck C, Danek A, Ballard C, Herzog J, Dichgans M. The pattern of cognitive performance in CADASIL: a monogenic condition leading to subcortical ischemic vascular dementia. *Am J Psychiatry*. 2005 Nov;162(11):2078-85.
- Peters N, Opherck C, Zacherle S, Capell A, Gempel P, Dichgans M. CADASIL-associated Notch3 mutations have differential effects both on ligand binding and ligand-induced Notch3 receptor signaling through RBP-Jk. *Exp Cell Res*. 2004 Oct 1;299(2):454-64.

- Post LC, Ternet M, Hogan BL. Notch/Delta expression in the developing mouse lung. *Mech Dev.* 2000 Nov;98(1-2):95-8.
- Rossant J, Howard L. Signaling pathways in vascular development *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:541-73.
- Ruchoux MM, Domenga V, Brulin P, Maciazek J, Limol S, Tournier-Lasserre E, Joutel A. Transgenic mice expressing mutant Notch3 develop vascular alterations characteristic of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Am J Pathol.* 2003 Jan;162(1):329-42.
- Ruchoux MM, Guerouaou D, Vandenhautte B, Pruvo JP, Vermersch P, Leys D. Systemic vascular smooth muscle cell impairment in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol.* 1995;89(6):500-12.
- Sakamoto K., Chao W.S., Katsube K. and Yamaguchi A. Distinct roles of EGF repeats for the Notch signaling system. *Exp. Cell Res.* 2005, 302, 281-291.
- Shutter JR, Scully S, Fan W, Richards WG, Kitajewski J, Deblandre GA, Kintner CR, Stark KL. Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev.* 2000 Jun 1;14(11):1313-8.
- Sonninen V, Savontaus ML. Hereditary multi-infarct dementia. *Eur Neurol.* 1987;27(4):209-15.
- Sourander P, Wälinder J. Hereditary multi-infarct dementia. *Lancet.* 1977 May 7;1(8019):1015.
- Sourander P, Wälinder J. Hereditary multi-infarct dementia. Morphological and clinical studies of a new disease. *Acta Neuropathol.* 1977 Aug 31;39(3):247-54.
- Stern Y, Gurland B, Tatemichi TK, Tang MX, Wilder D, Mayeux R. Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA.* 1994 Apr 6;271(13):1004-10.
- Stevens DL, Hewlett RH, Brownell B. Chronic familial vascular encephalopathy. *Lancet.* 1977 Jun 25;1(8026):1364-5.
- Struhl G, Adachi A. Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell.* 1998 May 15;93(4):649-60.
- Struhl G, Greenwald I. Presenilin-mediated transmembrane cleavage is required for Notch signal transduction in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 2;98(1):229-34.
- Swiss-Prot Eintrag P01106
- Tamura K, Taniguchi Y, Minoguchi S, Sakai T, Tun T, Furukawa T, Honjo T. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol.* 1995 Dec 1;5(12):1416-23.

- Taniguchi Y, Karlström H, Lundkvist J, Mizutani T, Otaka A, Vestling M, Bernstein A, Donoviel D, Lendahl U, Honjo T. Notch receptor cleavage depends on but is not directly executed by presenilins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19;99(6):4014-9.
- Tournier-Lasserre E, Iba-Zizen MT, Romero N, Bousser MG. Autosomal dominant syndrome with strokelike episodes and leukoencephalopathy. *Stroke*. 1991 Oct;22(10):1297-302.
- Uyttendaele H, Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, Kitajewski J. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development*. 1996 Jul;122(7):2251-9.
- Vargesson N, Patel K, Lewis J, Tickle C. Expression patterns of Notch1, Serrate1, Serrate2 and Delta1 in tissues of the developing chick limb. *Mech Dev*. 1998 Oct;77(2):197-9.
- Villa N, Walker L, Lindsell CE, Gasson J, Iruela-Arispe ML, Weinmaster G. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev*. 2001 Oct;108(1-2):161-4.
- Vooijs, M., Schroeter, E.H., Pan, Y., Blandford, M. and Kopan, R. (2004) Ectodomain shedding and intramembrane cleavage of mammalian Notch proteins is not regulated through oligomerization. *J. Biol. Chem.*, 279, 50864-50873.
- Weinmaster G. Notch signal transduction: a real rip and more. *Curr Opin Genet Dev*. 2000 Aug;10(4):363-9.
- Weinmaster G. The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci*. 1997;9(2):91-102.
- Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis-Tsakonas S. Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell*. 1985 Dec;43(3 Pt 2):567-81.

8. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<u>A</u> <u>D</u> isintegrin <u>A</u> nd <u>M</u> etalloproteinase
AK	Antikörper
CADASIL	<u>C</u> erebral <u>A</u> utosomal <u>D</u> ominant <u>A</u> rteriopathy with <u>S</u> ubcortical <u>I</u> nfarkts and <u>L</u> eukoencephalopathy
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ECD	extrazelluläre Domäne
EGFR	epidermal growth factor-like repeat, Wiederholung, die dem Epidermalen Wachstumsfaktor entsprechen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GOM	granuläres osmiophiles Material
HRP	horse radish peroxydase, Meerrettich-Peroxydase
ICD	intrazelluläre Domäne
IP	Immunopräzipitation
kDa	Kilo-Dalton
LNR	LIN-Notch-Wiederholungen
Mut	Mutante
NGS	Ziegenserum
N3	Notch3
hN3	humanes Notch3
SIVD	Sucortical ischemic vascular dementia, Subkortikale ischämische vaskuläre Demenz
TACE	Tumor necrosis factor α -converting enzyme
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TM-ECD	Trunkierte Version des Notch3-Rezeptors, welcher die ECD und die Transmembrandomäne beinhaltet
VSCM	Glatte Gefäßmuskelzellen
Wt	Wildtyp

Einbuchstabencode der Aminosäuren

A Alanin	K Lysin	T Threonin
C Cystein	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	

Materialien

Reagenzien:

Acrylamid	Carl Roth
APS Ammoniumopersulfat	Sigma Kat.Nr. A 3678
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck Biosciences
Glycerin	Sigma Kat.Nr. G-7893
Glycin	Merck Kat.Nr. K 31750569 328
Methanol	Merck Biosciences
Natriumchlorid NaCl	Merck Biosciences
Naturaflor Magermilchpulver	Töpfer
Nonidet-40	Sigma-Aldrich
Salzsäure HCl 37%	Merck Biosciences
SDS	Natriumdodecylsulfat Sigma Kat.Nr. L-5750
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Sigma Kat.Nr. T-8133
Tris base	Trizma Base, Fa. Sigma Kat.Nr. T-1503
Tris HCl	Trisma Hydrochlorid, Fa.Sigma Kat.Nr.T-3253
Tween 20	Merck Biosciences
β -Mercaptoethanol	Sigma Kat.Nr. M7522-100ML

Pufferlösungen:

4 x Lower Tris	- TRIS-Base: 181,7 g (pH 8,8) - SDS 10% 40,0 ml Mit H ₂ O auf 1 l auffüllen und pH überprüfen
4 x Upper Tris	- TRIS-Base: 60,06 g (pH 6,8) - SDS 10% 40,0 ml Mit H ₂ O auf 1 l auffüllen und pH überprüfen
3 x Lämmli-Puffer	TRIS-HCl: 100mM Glycerol: 25% SDS: 3% Bromphenol-Blau: 0,01%
Laufpuffer	TRIS-Base 30 g 25 mM Glycin 144 g 1,92 M SDS 10 g 1 % Auf einen Liter H ₂ O auffüllen
TNT-Puffer	Tris HCl: 50 mM pH8 NaCl: 200 mM Nonidet-40: 0,5 % Pefablock: 1 mM
Trans-Blot-Puffer	Tris Base: 3,03 g 25 mM Glycin: 14,4 g 192 mM Methanol: 200 ml H ₂ O: 800 ml
TBST	NaCl: 300 ml 5 M Tris HCl: 100 ml pH 8 1 M Tween 20: 10 ml
PBS	Na ₂ HPO ₄ : 1,48 g K ₂ HPO ₄ : 0,25 g NaCl: 9,00 g ph 7,4 Apotheke Klinikum Innenstadt Uni München Art.Nr. P32799

Vektoren:

pcDNA3.1Myc-His	Invitrogen
pcDNA3.1V ₅ -His	Invitrogen
Jagged1-Fc	R&D systems, Wiesbaden

Klonierung:

Quickchange XL	Stratagene
Enzyme: – HindIII – ClaI – XhoI	New England Biolabs
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen
ABI Prism 310, Automatischer Sequenzer	Applied Biosystems

Zellkultur:

DMEM	Duclbeco's MEM mit Glutamax-I mit Natriumpyruvat mit 4500 mg / l Glucose mit Pyridoxin Fa. Invitrogen Kat.Nr. 31966-021
FCS, fötales Kälberserum	Invitrogen Kat.Nr. 10270-106, Lot.Nr. 4ØQ2417K
PS, Penicillin – Streptomycin (10.000 Einheiten / ml)	Fa. Invitrogen Kat.Nr. 15140-122
G 418 Geneticin	Invitrogen
Poly-L-Lysin	Sigma
Optimem:	mit Glutamax Fa. Invitrogen Kat.Nr. 51985-026
Blasticidin S HCl	Fa Invitrogen Kat.Nr. 46-1120
293, humane embryonale Nierenzelllinie	DSMZ
Brutschrank Hera Cell	Kendor Laboratory products
Lipofectamin Plus Reagent	Invitrogen (Kat.Nr. 18324-012 und 11514-015)

Immunopräzipitation:

Agarosekügelchen	Sigma Aldrich
------------------	---------------

Westernblot:

Acrylamid	30% Acrylamid/Bis Solution 29:1 Acrylamid: N,N'-Methylenbisacrylamid
Trenngel 7,5%	4 x Lower Tris: 3,75 ml H ₂ O: 7,35 ml Acrylamid (29/1): 3,75 ml APS 10%: 125 µl Temed: 12,5 µl
Sammelgel	4 x Upper Tris: 1,7 ml H ₂ O: 4,9 ml Acrylamid: 925 µl APS 10%: 75 µl Temed: 7,5 µl
Proteaseinhibitor „Complete mini“	Roche Diagnostic
Precision Plus Protein Standard	BioRad Laboratories, Kat.Nr. 161-0373
Membran Immobilon-P	Millipore Kat.Nr. IPVH00010
Blotkammer Mini Protean 3	BioRad Kat.Nr. 165 3322
Stromquelle	BioRad PowerPac HC
Semi-dry-Kammer	BioRad Transblot SD Semidry Transfer Cell, Kat.Nr. 164 5052
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche, Kat.Nr. 2015 200
Kodak Bio MAX MR Film	Sigma Aldrich Kat.Nr. Z353949-50 EA

Immunzytochemie:

ImmunoHistoMount	Santa Cruz Biotechnology: Kat.Nr. sc-45086
Normal Goat Serum	Invitrogen
DAPI 4',6-Diamidino-2- phenylindol	Merck, Art. Nr. 1.24653
Triton X100	Sigma Aldrich

Antikörper:

Anti-V ₅ , monoklonal, Antikörper aus der Maus	Invitrogen Kat.Nr. 46-070
Anti-Myc, monoklonal Antikörper aus der Maus	BD Kat.Nr.3843-1
Floureszenz- gekoppelten Sekundärantikörper (Rhodamine / FITC) Maus-Antikörper	Molecular Probes
Anti-V ₅ , polyklonaler Antikörper aus der Ziege	Novus Kat.Nr. NB 600-387B
Anti-hJagged (c20)	Santa Cruz Kat.Nr. sc-6011
Maus anti humanes IgG-Fc, Rhodamine gekoppelt)	Dianova
Goat-Anti-Mouse	Dako Kat.Nr. P0447
Rabbit-Anti-Goat	Jackson Immuno Research Kat.Nr. 305-035-003