

Leibniz-Institut für Altersforschung
Fritz-Lipmann-Institut e.V. (FLI)

Analysen zum Kernimport von Notch1

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biochemikerin

Kerstin Hünninger

geboren am 25.10.1981 in Jena

Gutachter:

1. Dr. habil. Christoph Kaether, FLI Jena
2. Dr. habil. Ignacio Rubio, Institut für Molekulare Zellbiologie, FSU Jena
3. Prof. Dr. Stefan Kins, Technische Universität Kaiserslautern

Tag der öffentlichen Disputation: 06.05.2010

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2006 bis Dezember 2009 am Leibniz Institut für Altersforschung - Fritz-Lipmann-Institut (FLI), Jena unter der Betreuung von Dr. habil. Christoph Kaether angefertigt.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur erstellt habe. Weiterhin erkläre ich, dass die in der Arbeit enthaltenen Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernder Bildbearbeitung unterzogen wurden.

Ich versichere, dass diese Dissertation nicht als Diplomarbeit oder ähnliches verwendet und abgesehen von den am Ende angegebenen Teilveröffentlichungen nicht publiziert wurde. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena ist mir bekannt.

Jena, den 15.01.2010

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet

Kurzzusammenfassung

Der Notch Signalweg ist ein wichtiges Regulationssystem für die Entwicklung und Selbsterneuerung verschiedener Gewebe. Eine Besonderheit dieser Signalkaskade stellt die Funktion von Notch als Oberflächen-Rezeptor und direkter Regulator der Genexpression dar. Die Aktivierung und Signalübertragung von Notch erfordert daher die proteolytische Freisetzung der intrazellulären Domäne (NICD), welche nach dem Transport in den Zellkern die Transkription zellspezifischer Gene anschaltet. Bis heute existieren nur wenige Kenntnisse über die Mechanismen, die den Kernimport von NICD vermitteln. Frühere Studien weisen zwar auf den klassischen Importin α/β -Transportweg in diesem Zusammenhang hin, dennoch fehlten bisher eine Charakterisierung der potentiellen Transportsignale sowie die Aufklärung des genauen Kerntransportmechanismus. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Kernimport von NICD im Detail zu analysieren.

Der erste Abschnitt zielte auf die Identifizierung des funktionellen Kernlokalisierungssignals (NLS) sowie der Importrezeptoren, welche dieses Transportsignal erkennen. Anhand vorausgegangener Studien war bereits bekannt, dass die intrazelluläre Domäne von Notch1 vier potentielle klassische Kernlokalisierungssignale (NLS1 - NLS4) enthält. Durch die Anwendung von Mutationsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass ausschließlich das NLS3 für den Transport von NICD in den Zellkern essentiell ist. In Abhängigkeit von dieser Sequenz interagiert NICD mit den Importinen α 3, α 4 und α 7, welche als Adapterproteine für den klassischen Importin α/β -Transportweg agieren. Zudem konnten für die verschiedenen Isoformen unterschiedliche Affinitäten gegenüber NICD dokumentiert werden. So zeigte Importin α 4 die stärkste und Importin α 7 die schwächste Bindung an NICD. Weiterhin wurde mittels Reporter- und immunzytochemischer Analysen demonstriert, dass die Importine α 3, α 4 und α 7 den Kernimport von NICD *in vivo* vermitteln. Allerdings scheinen hierbei vor allem die Importine α 3 und α 4 von Bedeutung zu sein. Importin α 7 spielt in diesem Zusammenhang wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle.

Die gewonnenen Erkenntnisse schlossen eine weitere Lücke zum vollständigen Verständnis der Notch1 Signalübertragung und dienten als Grundlage für den zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit. In diesem sollte die Hypothese untersucht werden, ob Notch1 in distalen Bereichen von hippokampalen Neuronen aktiviert und die freigesetzte intrazelluläre Domäne mit Hilfe eines retrograden Transportsystems in den

Zellkern importiert wird. Mittels einer immunzytochemischen Analyse von primären hippocampalen Neuronen konnte gezeigt werden, dass Notch1 in Dendriten und Axone sortiert und dort vermutlich auch aktiviert wird. Anhand der *in vitro* Interaktion zwischen NICD und den endogenen Importinen $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ aus dem Mausgehirn kommt für den retrograden Kernimport der freigesetzten intrazellulären Domäne von Notch1 ebenso der klassische Importin $\alpha/\beta 1$ -Transportweg in Betracht.

Die vorgelegten Resultate dieser Arbeit dienen als Voraussetzung für die zukünftige Aufklärung von regulatorischen Prozessen, die den Transport von NICD in den Zellkern kontrollieren und somit die Funktionen von Notch1 in Neuronen und anderen Zelltypen beeinflussen könnten.

Abstract

The Notch signalling pathway is an important regulation system for the development and self-renewal of different tissues. A specific feature of this signalling cascade is the function of Notch as a surface receptor and direct regulator of gene expression. Hence, Notch activation and signal transduction requires the proteolytic release of the intracellular domain (NICD) which activates the transcription of cell-specific genes after its transport into the nucleus. To date only little is known about the mechanisms that mediate NICD nuclear import. Previous studies suggested a function for the classical importin α/β 1 transport pathway, however, characterisation of potential transport signals as well as elucidation of the exact nuclear transport mechanism were still missing. Therefore, the aim of this present work was to analyse the nuclear import of NICD in detail.

The first part aimed on the identification of the functional nuclear localisation signal (NLS) as well as import receptors which recognise this transport signal. Previous studies already revealed four potential classical nuclear localisation signals (NLS1 - NLS4) within the intracellular domain of Notch1. By applying a mutagenesis approach it could be proved that exclusively the NLS3 is essential for the transport of NICD into the nucleus. Depending on this sequence NICD interacts with importins α 3, α 4 and α 7 that function as adaptor proteins in the classical importin α/β 1 transport pathway. Besides, various affinities towards NICD have been observed for the different isoforms. Importin α 4 showed the strongest and importin α 7 the weakest binding to NICD. Furthermore, reporter gene and immunocytochemical analyses demonstrated a role for importins α 3, α 4 and α 7 in the nuclear import of NICD *in vivo*. We could show that mainly importins α 3 and α 4 seem to be important for this process. Importin α 7 probably plays a minor role *in vivo*.

Therefore, the obtained findings help to completely understand Notch1 signal transduction and provided the basis for the second part of the present study. There, it was tried to elucidate the hypothesis whether Notch1 is activated in distal areas of hippocampal neurons and whether the released NICD is imported into the nucleus by a retrograde transport system. Immunocytochemical analysis of primary hippocampal neurons revealed that Notch1 is sorted to both dendrites and axons and is presumably activated there. NICD interacts *in vitro* with the endogenous importins α 3, α 4 and α 7 from mouse brain, suggesting that the classical importin α/β 1 transport pathway

mediates nuclear import and maybe retrograde transport of the released NICD in the brain.

This work provides the basis for future analysis of regulatory processes which could control the transport of NICD into the nucleus and therefore influence the functions of Notch1 in neurons and other cell types.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis.....	iii
Tabellenverzeichnis	iv
1. Einleitung.....	1
1.1 Der Notch Signalübertragungsweg.....	1
1.1.1 Der Rezeptor Notch	1
1.1.2 Notch Liganden.....	3
1.1.3 Notch Aktivierung und Signalübertragung.....	3
1.1.4 Notch Zielgene.....	4
1.1.5 Modulation der Notch Signalübertragung	6
1.1.6 Funktionen von Notch am Beispiel des Zentralnervensystems	7
1.2 Der Nukleozytoplasmatische Transport.....	9
1.2.1 Transportrezeptoren	9
1.2.2 Kerntransportsignale	11
1.2.3 Der Ran·GTP-Konzentrationsgradient.....	12
1.2.4 Der klassische Importin α/β 1-Transportweg	13
1.2.5 Die Rolle des klassischen Importin α/β 1-Transportweges in Neuronen.....	15
1.2.6 Der Kerntransport von Notch	16
2. Zielstellung der Arbeit.....	18
3. Material und Methoden.....	19
3.1 Zellkultur	19
3.1.1 Transformierte Zelllinien.....	19
3.1.2 Hippokampale Primärzellkultur.....	19
3.1.2.1 Vorbereitung der Deckgläschen und Gewebekulturschalen.	20
3.1.2.2 Präparation der hippokampalen Neuronen	20
3.1.2.3 Präparation der Astrozyten	21
3.1.3 Transfektion	21
3.1.3.1 Transfektion der Zelllinien	21
3.1.3.2 Kalzium-Phosphat-Transfektion.....	21
3.2 Plasmide und DNA-Manipulationen	22
3.3 SiRNA.....	24
3.4 Immunzytochemie	24
3.5 Mikroskopie	25
3.6 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	25

3.7	<i>In vitro</i> Kernimport-Assay	26
3.8	Proteinanalyse	27
3.8.1	Proteinextraktion.....	27
3.8.2	Methanol / Chloroform Fällung von Proteinen.....	28
3.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
3.8.4	Coomassie-Färbung	28
3.8.5	Western Blot und Immunodetektion von Proteinen	29
3.8.6	GST-Pulldown	30
3.8.7	Immunopräzipitation / Koimmunopräzipitation	30
3.9	Luziferase-Assay	31
3.10	Quantitative Real Time PCR	31
3.11	Statistische Analyse	32
4.	Ergebnisse.....	33
4.1	Identifizierung des Transportsignals von Notch1	33
4.2	Analyse des Kerntransportmechanismus von NICD	35
4.3	Identifikation der NICD-spezifischen α -Importine	38
4.3.1	Nachweis der Interaktion zwischen NICD und α -Importinen <i>in vitro</i> mittels GST-Pulldown.....	38
4.3.2	Nachweis der Interaktion zwischen NICD und Importin α 4 <i>in vitro</i> mittels Koimmunopräzipitation	41
4.4	Untersuchungen zum Kerntransport von NICD <i>in vivo</i>	42
4.4.1	Testung der Wirksamkeit des Notch1 Reporters in C2C12 Myoblasten mittels Immunzytochemie und Western Blot	42
4.4.2	Bedeutung der α -Importine bei der Notch1 Signalübertragung <i>in vivo</i>	45
4.5	Analyse von Notch1 in adulten hippocampalen Neuronen	51
4.5.1	Etablierung einer hippocampalen Primärzellkultur	51
4.5.2	Lokalisation von Notch1 und NICD in adulten hippocampalen Neuronen.....	52
4.5.3	Nachweis der Interaktion zwischen NICD und α -Importinen aus Gehirn und hippocampalen Neuronen der Maus	54
4.5.4	Visualisierung endogener Notch1 Aktivität in hippocampalen Neuronen.....	56
5.	Diskussion	58
5.1	Die intrazelluläre Domäne von Notch1 enthält ein funktionelles klassisches Kernlokalisierungssignal.....	58
5.2	Der klassische Importin α/β 1-Transportweg vermittelt den Kernimport von NICD.....	60

5.3 Die Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ vermitteln die Übertragung von Notch1 Signalen <i>in vivo</i>	62
5.4 Lokalisation von Notch1 in adulten hippocampalen Neuronen	67
5.5 Die Rolle der Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ für den Kernimport von NICD in adulten hippocampalen Neuronen	68
5.6 Bedeutung der vorgestellten Arbeit und Perspektiven	70
Literaturverzeichnis	73
Anhang	82
Danksagung	90
Lebenslauf	91
Publikation, Vorträge und Poster	92

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung / Symbol	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ADAM17	<i>a disintegrin and metalloproteinase 17</i>
Akt	Serin/Threonin-Kinase / Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
BBS	<i>BES buffered saline</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BES	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethansulfonsäure
bp	<i>base pairs</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
CA1 - 3	<i>Cornu Ammonis 1 - 3</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CREB2	<i>cyclic AMP-response element binding protein 2</i>
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DAPT	N-[(3,5-Difluorophenyl)acetyl]-L-alanyl-2-phenyl]glycin-1,1-dimethylethylester
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
E	embryonaler Zeitpunkt; Tage nach der Befruchtung
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Zeit: Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HeLa	abgeleitet von dem Namen der Patientin Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IC	<i>intracellular</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KCM	Kalium-Kalzium-Magnesium
kDa	Kilodalton, Masse: 1 Da = $1,66054 \times 10^{-24}$ g
KPNA	Karyopherin alpha
LB	<i>Lysogeny Broth</i>

Luz	Luziferase
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
min	Zeit: Minute(n)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NBM	<i>NEUROBASAL™ Medium</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription-PCR</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Zeit: Sekunde(n)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
STAT1 / 2	<i>signal transducer and activator of transcription 1 / 2</i>
STE	<i>Sodium-Tris-EDTA</i>
STEN	<i>Sodium-Tris-EDTA-NP40</i>
TBS(-T)	<i>Tris buffered saline (mit Tween 20)</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Abbildungsverzeichnis

1-1	Die Struktur von Notch1	2
1-2	Der Notch Signalübertragungsweg	5
1-3	Die Rolle der Notch Signalübertragung für die Entwicklung und die Funktion des ZNS	8
1-4	Der klassische Importin α/β 1-Transportweg.....	14
1-5	Schematische Darstellung der cNLS Positionen in Notch1	17
4-1	Beschreibung der vier potentiellen cNLS Sequenzen und ihrer Mutationen.....	34
4-2	Immunzytochemischer Nachweis der subzellulären Lokalisation von NICD	35
4-3	Untersuchung des Kernimports von GST-NICD in permeabilisierten HeLa Zellen.....	37
4-4	Quantifizierung des Kernimports von GST-NICD	38
4-5	Untersuchung der Interaktion zwischen GST-Importin α Proteinen und NICD.	39
4-6	Untersuchung der Interaktion zwischen GST-NICD und α -Importinen.....	40
4-7	Koimmunopräzipitation von Importin α 4 und NICD als Nachweis der Interaktion <i>in vitro</i>	41
4-8	Schematische Beschreibung des fluoreszierenden Notch1 Reportersystems	43
4-9	Immunzytochemische Überprüfung der Wirksamkeit des Notch1 Reportersystems	44
4-10	Überprüfung der Wirksamkeit des Notch1 Reportersystems mittels Western Blot	45
4-11	Untersuchung der Bedeutung einzelner Importin α Isoformen bei der Notch1 Signalübertragung mit Hilfe des Luziferase-basierten Reportersystems.....	46
4-12	Western Blot Analyse zur Überprüfung der Spezifität und Effektivität siRNA-vermittelter Herunterregulierung der Importin α Expression.....	48
4-13	Analyse der mRNA-Spiegel von Hey1 in C2C12 Myoblasten mittels qRT-PCR.....	49
4-14	Immunzytochemische Analyse der Lokalisation von NICD in C2C12 Zellen ohne und mit verringerter Expression der Importine α 3, α 4 und α 7	50
4.15	Charakterisierung der primären hippokampalen Neuronen mittels Immunzytochemie.....	52
4-16	Analyse der Lokalisation von Notch1 in primären hippokampalen Neuronen...	53
4-17	Analyse der Lokalisation von NICD in primären hippokampalen Neuronen.....	54
4-18	<i>In vitro</i> Bindungsstudien zum Nachweis der Interaktion zwischen NICD und α -Importinen aus Gehirn und hippokampalen Neuronen.....	55
4-19	Detektion endogener Notch1 Signalübertragung in Neuronen mit zwei verschiedenen Reportersystemen.....	57
5-1	Sequenz-Vergleich des NLS3 von Notch1 verschiedener Säugetierspezies	60
5-2	Schematische Darstellung der gewonnenen Erkenntnisse zum Kernimport von NICD	71

Tabellenverzeichnis

3-1	Transformierte Zelllinien	19
3-2	Zur Verfügung gestellte Expressionsplasmide	22
3-3	Klonierte Expressionsplasmide.....	23
3-4	Primer für <i>in vitro</i> ortsgerichtete Mutagenese	24
3-5	Antikörper für Immunfärbungen.....	25
3-6	Antikörper für Western Blot	29
3-7	Immunglobuline für Immunopräzipitation.....	31
3-8	Primer für die quantitative Real Time PCR.....	32

1. Einleitung

Für die Entwicklung und den Erhalt eines komplexen multizellulären Organismus müssen Zellen in der Lage sein, Signale ihrer Umgebung wahrzunehmen und eine Antwort auf den gegebenen Stimulus zu entwickeln. Zur Übertragung eines Signals von seinem Ursprung außerhalb der Zelle über die Zellmembran sind Oberflächen-Rezeptoren erforderlich. Die meisten dieser Rezeptoren erfahren ihre Aktivierung durch die Bindung eines bestimmten Liganden an deren extrazelluläre Domäne. Anschließend kommt es durch das Anschalten intrazellulärer Signalkaskaden zum Auslösen einer passenden Antwort innerhalb der Zelle, indem die Expression zellspezifischer Gene stimuliert beziehungsweise unterdrückt wird. Tatsächlich sind nur wenige Signalwege für die Steuerung der Entwicklung von Lebewesen und damit für die Entstehung der Vielfaltigkeit zwischen den verschiedenen Spezies und Zelltypen verantwortlich [1].

1.1 Der Notch Signalübertragungsweg

Ein Regulationssystem mit essentieller Bedeutung für eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen sowie die Selbsterneuerung von Geweben ist der evolutionär hoch konservierte Notch Signalweg. Dabei erfordert die Übertragung von Notch Signalen in den meisten Fällen einen physikalischen Kontakt zwischen Zellen, was eine Kommunikation auf kurzer Distanz ermöglicht. Daher ist es nicht verwunderlich, dass sowohl Rezeptoren als auch Liganden dieser Signalkaskade integrale Membranproteine sind.

1.1.1 Der Rezeptor Notch

Das *Notch*-Gen wurde erstmals im Jahr 1919 von O. L. Mohr in der Taufliege *Drosophila melongaster* beschrieben, bei der ein partieller Funktionsverlust zu Kerben (englisch: *notches*) an den Flügelrändern führt [2]. Seit der Charakterisierung des *Notch*-Gens im Jahr 1985 wurden in vielen Organismen Notch Proteine identifiziert [3]. Während in *Drosophila melongaster* ein Rezeptor existiert, verfügen Säugetiere über vier Notch Isoformen (Notch1 - 4) mit sowohl überlappender als auch unterschiedlicher Expressionsverteilung.

Die Mitglieder der Notch-Familie sind Typ I Transmembranproteine, die einen hohen Grad an struktureller Homologie zwischen den Mitgliedern sowie verschiedenen Spezies aufweisen [4].

Ein charakteristisches Merkmal der großen extrazellulären Domäne ist eine je nach Notch Isoform unterschiedliche Anzahl an EGF-ähnlichen repetitiven Sequenzen, von denen einige die Interaktion mit dem Ligand vermitteln [5]. Darauf folgt innerhalb der Ektodomäne eine negativ regulatorische Region, die sich aus drei Cystein-reichen Lin12/Notch-Wiederholungen und einer Heterodimerisierungsdomäne zusammensetzt. Es wird angenommen, dass dieser Bereich eine Aktivierung des Rezeptors in Abwesenheit eines Liganden verhindert [6]. An die Transmembrandomäne schließen sich intrazellulär die RAM (*RBPjk association module*)-Domäne und sieben Ankyrin-Wiederholungen an. Beide Abschnitte vermitteln die Interaktion mit dem DNA-bindenden Transkriptionsfaktor CSL (benannt nach CBF1 in Säugetieren, Su(H) in *Drosophila melongaster*, LAG-1 in *Caenorhabditis elegans*). Zudem fungiert die Ankyrin-Domäne als Bindestelle für Modulatoren der Notch Signalübertragung [7]. Die nahe dem Carboxy-Terminus gelegene PEST-Domäne, welche mit den Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) angereichert ist, enthält Degradierungssignale und wird daher mit der Destabilisierung der freigesetzten intrazellulären Domäne von Notch in Verbindung gebracht.

In Abbildung 1-1 ist beispielhaft die Struktur von Notch1 dargestellt.

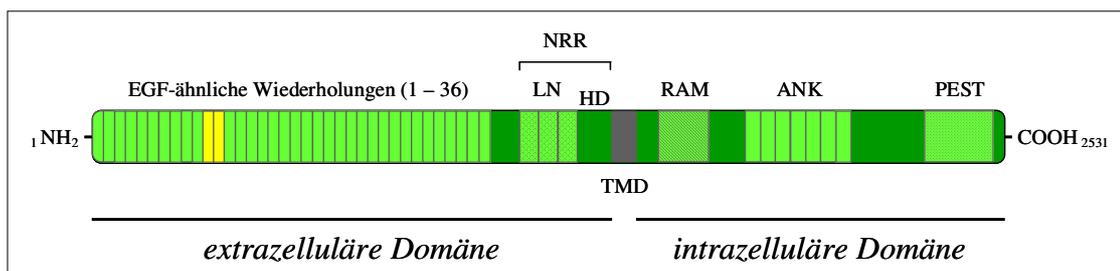


Abb. 1-1: Die Struktur von Notch1.

Notch ist ein Typ I Transmembranprotein. Die extrazelluläre Domäne enthält im Fall von Notch1 36 EGF-ähnliche Wiederholungen und eine negativ regulatorische Region (NRR), die sich aus drei Lin12/Notch (LN)-Wiederholungen und einer Heterodimerisierungsdomäne (HD) zusammensetzt. Die Wiederholungen EGF11 und EGF12 (gelb) vermitteln die Interaktion mit dem Ligand. TMD kennzeichnet die Transmembrandomäne. Der zytoplasmatische Abschnitt besteht aus einer RAM-Domäne, sieben Ankyrin-Wiederholungen (ANK) und einem Prolin (P) / Glutaminsäure (E) / Serin (S) / Threonin (T)-reichen Motiv (PEST).

(Bild verändert nach [8])

1.1.2 Notch Liganden

Notch wird von den Liganden der DSL-Familie (benannt nach Delta und Serrate in *Drosophila melongaster*, LAG-2 in *Caenorhabditis elegans*) aktiviert. In Säugetieren wurden die fünf Isoformen Dll (*Delta-like*) 1, 3 und 4 sowie Jagged1 und 2 identifiziert. Bei diesen handelt es sich um Typ I Transmembranproteine, die über mehrere EGF-ähnliche Wiederholungen und ein charakteristisches DSL-Motiv in der extrazellulären Domäne verfügen. Beide Bereiche sind für die Interaktion mit dem Rezeptor notwendig [9]. Die intrazelluläre Domäne ist im Gegensatz zu Notch weniger konserviert. Dennoch scheint sie wichtige Funktionen auszuüben, da die Entfernung in einem dominant-negativen Phänotyp resultiert [10]. Sun und Artavanis-Tsakonas konnten darüber hinaus zeigen, dass sezernierte Formen der Liganden eine antagonistische Wirkung auf die Notch Signalübertragung ausüben. Daraus lässt sich schließen, dass der Ligand zur Aktivierung des Rezeptors membrangebunden sein muss [11].

1.1.3 Notch Aktivierung und Signalübertragung

Notch fungiert gleichzeitig als Oberflächen-Rezeptor und direkter Regulator der Genexpression. Daher sind zur Aktivierung und Signalübertragung des Rezeptors drei proteolytische Prozessierungsschritte erforderlich (zusammengefasst in Abbildung 1-2). Während der Reifung im sekretorischen Weg wird Notch im trans-Golgi-Netzwerk konstitutiv durch eine Furin-ähnliche Konvertase innerhalb der extrazellulären Domäne an der als S1 bezeichneten Stelle geschnitten. Dabei entstehen ein extrazelluläres und ein transmembran-intrazelluläres Fragment, die durch nicht-kovalente Bindung zusammengehalten werden und den funktionellen Rezeptor formen [12;13]. In dieser heterodimeren Form wird Notch an der Plasmamembran präsentiert und kann von einem Ligand der DSL-Familie auf der Oberfläche einer benachbarten Zelle aktiviert werden. Die Interaktion macht den Rezeptor aufgrund einer Konformationsänderung empfindlich für ein zweites Spaltereignis an der Stelle S2. Dieser Prozessierungsschritt wird in Vertebraten durch die Metalloprotease TACE (*TNFalpha converting enzyme* oder ADAM17) vermittelt und führt zur Abspaltung der Ektodomäne von Notch [14]. Das resultierende Fragment, Notch Δ E, ist Substrat für die γ -Sekretase, welche das Protein an der Stelle S3 innerhalb der Transmembrandomäne spaltet [15]. Als Konsequenz wird die Notch intrazelluläre Domäne (*Notch intracellular domain* oder

NICD) ins Zytoplasma freigesetzt. Dieser Schritt wird auch als regulierte intramembrane Proteolyse (RIP) bezeichnet und kann durch pharmakologische Unterdrückung der γ -Sekretase Aktivität blockiert werden [16]. Nach dem Transport in den Zellkern interagiert NICD mit dem Transkriptionsfaktor CSL. Durch die Rekrutierung von Koaktivatoren wird CSL von einem transkriptionellen Repressor zum Aktivator umgewandelt, infolge dessen die Notch-abhängigen Zielgene exprimiert werden. Dieser CSL-abhängige Signalweg wird auch als kanonische Notch Signalübertragung bezeichnet [17].

1.1.4 Notch Zielgene

In Säugetieren stellen die *Hes*-Gene das bekannteste primäre Ziel der Notch Signalübertragung dar. Diese sind homolog den *Hairy* und *Enhancer of split* Genen in *Drosophila melongaster* und kodieren für Transkriptionsfaktoren mit einem basischen Helix-Schleife-Helix (*basic Helix-Loop-Helix* oder bHLH)-Motiv. Der basische Abschnitt ermöglicht die Wechselwirkung mit der DNA, während die HLH-Domäne als Dimerisierungsdomäne die Interaktion mit anderen bHLH-Faktoren vermittelt. Von den sieben Mitgliedern der Hes-Familie konnte für Hes1, 5 und 7 eine Beteiligung an der Notch Signalübertragung gezeigt werden [18;19]. Dabei fungieren sie als transkriptionelle Repressoren und unterdrücken die Expression nachgeschalteter Zielgene, die für gewebespezifische Transkriptionsaktivatoren kodieren.

Als weitere primäre Zielgene von Notch wurden die bHLH-Transkriptionsrepressoren der Hey (*Hairy and Enhancer of split-related with YRPW*)-Familie identifiziert. Bekannt sind in Säugetieren die drei Isoformen Hey1, Hey2 und HeyL [20], deren Sequenzen und charakteristischen Domänen eine nahe Verwandtschaft mit den Mitgliedern der Hes-Familie zeigen. Allerdings ist in der basischen Domäne der Hey Proteine ein konservierter Prolin-Rest durch Glycin ersetzt. Diese Abweichung wird im Zusammenhang mit der Spezifität der DNA-Bindung diskutiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die beiden Familien unterschiedliche Mechanismen nutzen, um die Expression der nachgeschalteten Zielgene zu verhindern [21].

Die Funktionen der bHLH-Transkriptionsfaktoren sind zellspezifisch. Die unterschiedliche Expression von Hes und Hey in bestimmten Geweben zeigt, dass diese unabhängig voneinander durch Ausbildung der entsprechenden Homodimere in verschiedenen Zelltypen wirken. Allerdings gibt es Gewebe, in denen Hes und Hey

gleichzeitig exprimiert werden. In diesen werden bevorzugt Heterodimere ausgebildet, die effektiver mit der DNA interagieren und einen anderen Mechanismus der Repression auslösen. Dieser quantitative Unterschied in der Affinität vom Heterodimer gegenüber dem Zielgen verglichen mit den entsprechenden Homodimeren könnte die Ursache für die Ausbildung verschiedener Phänotypen sein.

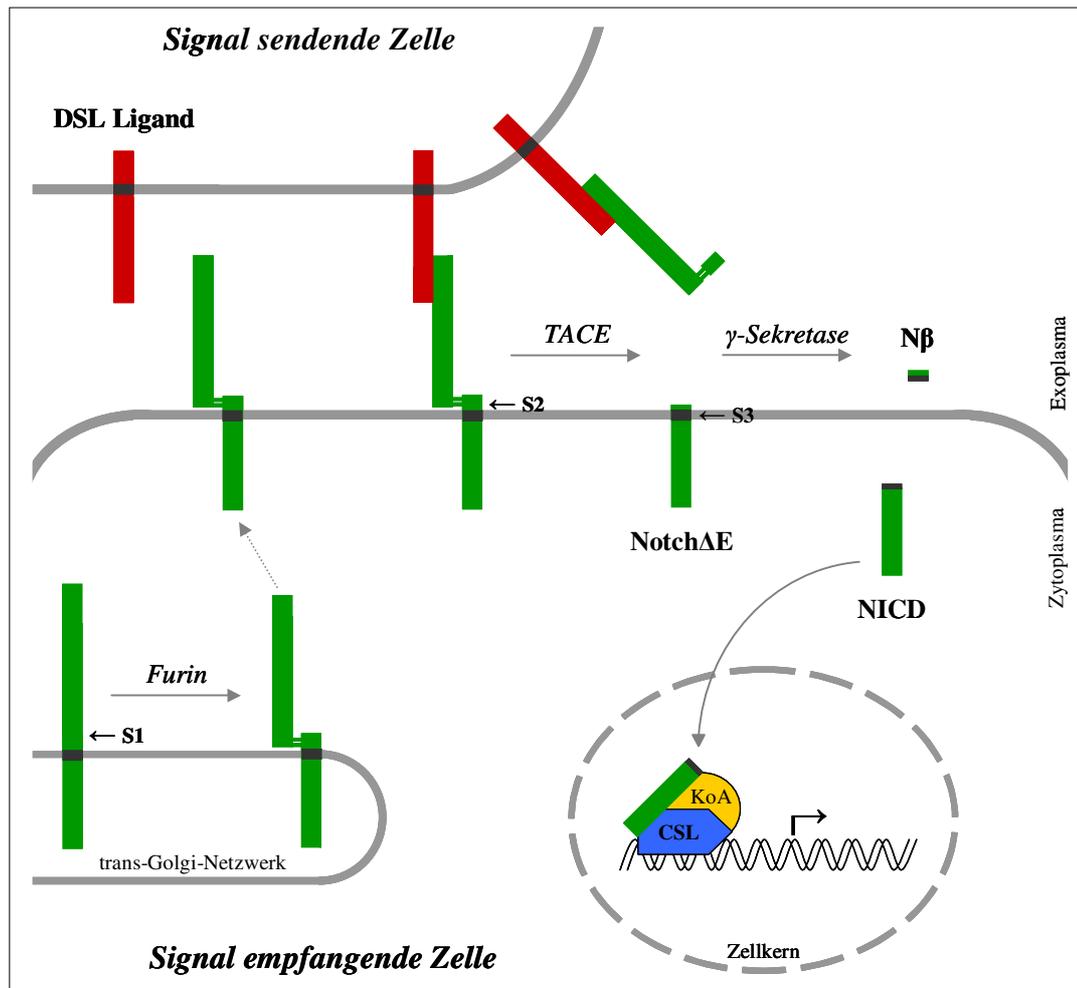


Abb. 1-2: Der Notch Signalübertragungsweg.

Das neu synthetisierte Notch Polypeptid wird im trans-Golgi-Netzwerk durch eine Furin-ähnliche Konvertase an der Stelle S1 proteolytisch gespalten. Dabei entstehen ein extrazelluläres und ein transmembran-intrazelluläres Fragment, die miteinander verbunden bleiben und als Heterodimer den reifen Rezeptor an der Plasmamembran bilden. Nach Liganden-Bindung wird die Ektodomäne von Notch durch den Schnitt S2 der Metalloprotease TACE entfernt. NotchΔE ist Substrat für die γ-Sekretase, welche die Spaltung an der Stelle S3 innerhalb der TMD vermittelt. NICD wird ins Zytoplasma freigesetzt, in den Zellkern transportiert und interagiert dort mit dem DNA-bindenden Transkriptionsfaktor CSL. Durch die Rekrutierung von Koaktivatoren (KoA) wird die Expression der Zielgene angeschaltet. Nβ ist das freigesetzte extrazelluläre Fragment von NotchΔE nach der γ-Sekretase-Spaltung. (Bild verändert nach [8])

Aufgrund der stetig steigenden Anzahl von identifizierten Isoformen der Komponenten des Notch Signalweges erhöht sich die Komplexität der Signalübertragung. Daher wird vermutet, dass bestimmte Isoformen von Ligand, Rezeptor und Transkriptionsrepressor zelltypspezifische Subformen der Notch Signalübertragung erzeugen, wodurch unterschiedliche Gruppen nachgeschalteter Zielgene reguliert werden. Diese Hypothese wird durch die gewebespezifische Verteilung der Komponenten unterstützt. Zudem konnten mittels der Inaktivierung von Genen, die für verschiedene Notch Isoformen oder Liganden kodierten, individuelle Funktionen der einzelnen Proteine demonstriert werden [22-24].

1.1.5 Modulation der Notch Signalübertragung

Neben der Liganden-induzierten Proteolyse wird die Aktivierung von Notch durch posttranslationale Modifikationen und endozytotische Vorgänge beeinflusst.

Viele EGF-ähnliche Wiederholungen der extrazellulären Domäne von Notch enthalten Glykosylierungsstellen, die nach der Translation im Endoplasmatischen Retikulum durch die Protein-O-Fukosyltransferase (Pofut1 in Säugetieren) modifiziert werden. Daraufhin können die Glykosyltransferasen der Fringe-Familie weitere Zuckerreste an die O-Fukose anfügen. Anhand der Mannigfaltigkeit der potentiellen Modulationen ergibt sich eine große Auswahl an unterschiedlich veränderten Rezeptoren. Die Untersuchungen von Xu *et al.* zeigen, dass diese Modifikationen die Sensitivität von Notch gegenüber den verschiedenen DSL Liganden beeinflussen können [25].

Darüber hinaus wird die Signalübertragung von Notch durch das zytoplasmatische Protein Numb moduliert. Zum einen verursacht dieser negative Regulator die Endozytose von Notch und kontrolliert somit die Menge des Rezeptors an der Zelloberfläche [26]. Weiter deuten die Studien von McGill und McGlade darauf hin, dass Numb aufgrund der Wechselwirkung mit NICD die Ubiquitinylierung und den Proteasom-abhängigen Abbau des Proteins fördert, wodurch der Kernimport und somit die Übertragung des Notch Signals verringert wird [27]. Innerhalb des Zellkerns beeinflusst die nukleäre Ubiquitin-Ligase SEL-10 die Stabilität von NICD. Aufgrund der Modifikation wird NICD für den proteasomalen Abbau markiert und die Notch Signalisierung beendet [28].

Die zytoplasmatische und nukleäre Entfernung könnte der Grund dafür sein, dass NICD im Zellkern praktisch nicht detektierbar ist.

Phosphorylierung scheint ebenfalls einen wichtigen Schritt bei der Regulation von Notch darzustellen. Studien führten zur Charakterisierung von stimulatorischen und inhibitorischen Phosphorylierungsereignissen. Foltz *et al.* konnten zeigen, dass es sich bei der Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) um einen positiven Modulator der Notch Signalübertragung handelt [29]. Die Phosphorylierung schützt NICD vor dem Proteasom-abhängigen Abbau und erhöht somit dessen Stabilität. Letztendlich führt dies zu einer Hochregulierung der transkriptionellen Aktivität von NICD. Phosphoryliert und dabei negativ reguliert wird NICD durch die Serin/Threonin-Kinase Akt. Hierbei verhindert eine Phosphorylierung die Translokation von NICD in den Zellkern, wodurch die nachgelagerte Signalweiterleitung verringert wird [30].

1.1.6 Funktionen von Notch am Beispiel des Zentralnervensystems

Die Entwicklung des Nervensystems wird maßgeblich durch den Notch Signalweg mitbestimmt. Dabei kontrolliert die Signalübertragung mittels Notch Rezeptoren das Schicksal von Zellen durch Regulation grundlegender Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose [31;32]. Ein wichtiges Beispiel ist die Kontrolle der Bildung von Vorläuferzellen für das zentrale Nervensystem (ZNS) aus dem Neuroektoderm. Bei dem als laterale Inhibierung beziehungsweise Spezifizierung bezeichneten Prozess werden durch die Aktivierung von Notch molekulare Unterschiede zwischen zwei zunächst identischen benachbarten Zellen etabliert, die daraufhin zu unterschiedlichen Zelltypen differenzieren. Bereits 1937 zeigten die Untersuchungen von Poulson, dass der homozygote Funktionsverlust des *Notch*-Gens in *Drosophila melongaster* in einem letalen neurogenen Phänotyp resultiert, da sämtliche Zellen zu neuronalen Zellen werden und sich keine der Zellen zu einer Epidermis entwickelt [33]. Während der Neurogenese reguliert der Notch Signalweg die Entscheidung zwischen verschiedenen Schicksalen für die neuronalen Vorläuferzellen. Neben der Hemmung der neuronalen Differenzierung und damit dem Erhalt des Vorläuferstatus kann die Aktivierung von Notch unter bestimmten Umständen die Differenzierung zur Gliazelle fördern [34]. Darüber hinaus beeinflusst Notch die Entwicklung und Funktion von postmitotischen Nervenzellen. Die Notch

Signalübertragung hemmt das Wachstum der neuronalen Fortsätze und fördert gleichzeitig die Verzweigung von Dendriten [35;36]. Außerdem konnte in *Drosophila melongaster* die Lokalisation des Rezeptors im Wachstumskegel von Axonen festgestellt werden. Dort vermittelt die Aktivierung von Notch die axonale Wegleitung zum Zielort [37]. Die Analysen verschiedener Funktionsverlust-Mutationen konnten zudem eine Rolle von Notch im adulten Gehirn *in vivo* nachweisen. Zum Beispiel zeigten Mäuse mit heterozygoter Mutation des *Notch1*-Gens Defizite im Lernen und Gedächtnis [38]. In Übereinstimmung hiermit demonstrierten Wang *et al.* durch die Anwendung einer transgenen Antisense-Strategie die Beteiligung von Notch an synaptischer Plastizität [39].

Die Abbildung 1-3 zeigt eine Zusammenfassung der Funktionen von Notch im sich entwickelnden und im adulten ZNS.

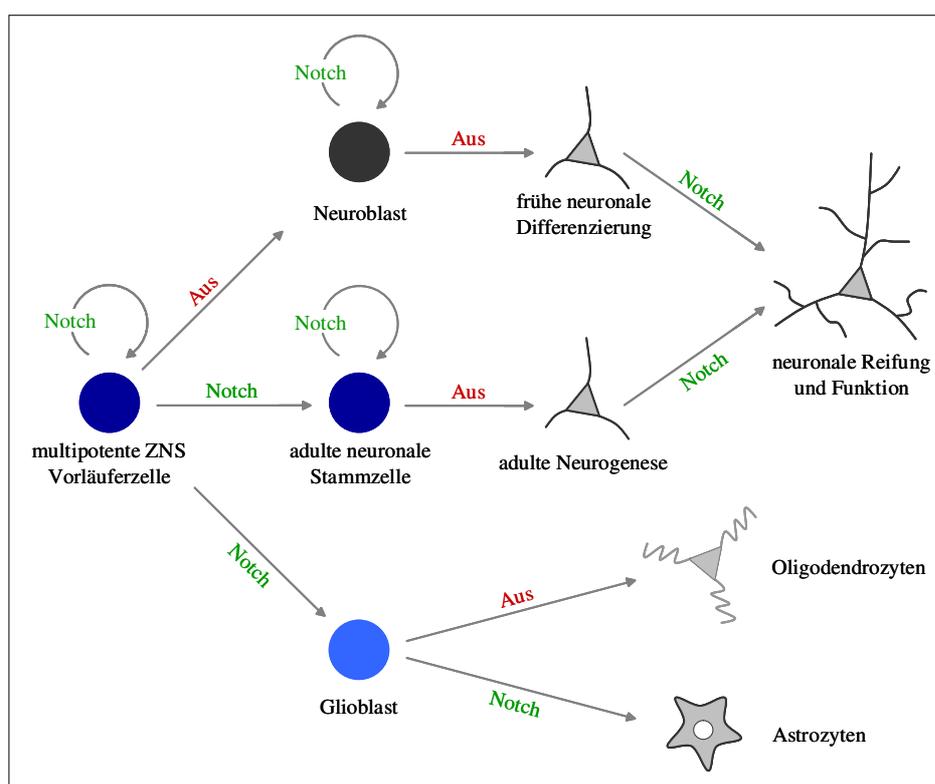


Abb. 1-3: Die Rolle der Notch Signalübertragung für die Entwicklung und die Funktion des ZNS. Prozesse, die eine Aktivierung der Notch Signalübertragung erfordern, sind mit "Notch" (grün) gekennzeichnet bzw. die eine Herunterregulierung von Notch voraussetzen, sind mit "Aus" (rot) markiert. (Bild verändert nach [24])

1.2 Der Nukleozytoplasmatische Transport

Ein charakteristisches Merkmal eukaryotischer Zellen ist ihre Unterteilung in verschiedene Reaktionsräume. Diese so genannten Kompartimente sind durch Membranen begrenzt, die wegen ihrer steuerbaren Durchlässigkeit eine selektive Permeabilität ermöglichen. In den Reaktionsräumen können zelluläre Prozesse getrennt voneinander ablaufen, was eine strikte Kontrolle des Stoffwechsels mit höherer Flexibilität bewirkt.

Aufgrund der Kompartimentierung finden die beiden elementaren Prozesse Transkription und Translation räumlich und zeitlich getrennt im Zellkern beziehungsweise Zytoplasma statt. Für den intrazellulären Austausch von Proteinen und RNA sind die beiden Kompartimente durch Kernporenkomplexe (*nuclear pore complexe* oder NPC), welche in die Doppelmembran der Kernhülle eingebettet sind, miteinander verbunden [40]. Diese ermöglichen eine passive Diffusion von kleinen Molekülen sowie Ionen und beschränken den Durchtritt von Makromolekülen, die eine Größe von 40 - 60 kDa überschreiten und aktiv transportiert werden müssen [41].

Bei dem nukleozytoplasmatischen Transport handelt es sich um einen selektiven Vorgang, der durch lösliche Transportrezeptoren vermittelt wird. Diese erkennen spezifische Signale innerhalb der zu befördernden Proteine und ermöglichen den Austausch zwischen Zellkern und Zytoplasma. Aufgrund der Anreicherung von Molekülen entgegen ihres Konzentrationsgradienten findet dieser Prozess unter Energiezufuhr statt. Die mittels GTP-Hydrolyse bereitgestellte Energie wird jedoch nicht für den eigentlichen Transport durch die Kernpore benötigt. Sie dient zur Regulation der unterschiedlichen Bindung der Transportrezeptoren an das kleine Guaninnukleotid-bindende Protein Ran, wodurch letztendlich die Richtung des Transports bestimmt wird.

1.2.1 Transportrezeptoren

Die umfangreichste Gruppe an Transportrezeptoren bildet die Importin β -Superfamilie, deren Mitglieder auch als Karyopherine bekannt und für den Großteil des Substratflusses durch die Kernporenkomplexe verantwortlich sind. Diese Proteine vermitteln entweder den Transport von Substraten in oder aus dem Zellkern und werden

daher je nach Transportrichtung als Importine oder Exportine bezeichnet (zusammengefasst in [42]). Bis heute sind über 20 Mitglieder der Importin β -Superfamilie in höheren Eukaryoten bekannt, von denen zehn als Importine (Importin β 1, Transportin 1 und 2, Transportin SR, Importin 4, 5, 7 - 9 und 11) und sieben als Exportine (Exportin 1/Crm1, CAS, Exportin-t, Exportin 4 - 7) identifiziert wurden. Aufgrund des strukturell ähnlichen Aufbaus wird angenommen, dass sie einen gemeinsamen evolutionären Ursprung haben. Allgemein sind die Transportrezeptoren dieser Superfamilie durch drei gemeinsame Merkmale charakterisiert: (1) Die Substrat-Bindung erfolgt über einen weiten carboxyterminalen Bereich. (2) Die Interaktion mit Ran·GTP über eine aminoternale Domäne kontrolliert die Substrat-Bindung sowie die Richtung des Transports und (3) der Übergang in den Zellkern wird durch die Wechselwirkung mit speziellen Komponenten der Kernporenkomplexe vermittelt [43]. Verglichen mit der großen Anzahl von Proteinen, die in und aus dem Zellkern transportiert werden, gibt es nur wenige Transportrezeptoren. Daher erkennen die meisten von ihnen vermutlich viele verschiedene Substrate. Darüber hinaus binden einige Importine und Exportine nicht direkt an bestimmte zu befördernde Proteine, sondern nutzen Adaptermoleküle für die Substrat-Erkennung. Von diesen ist Importin α , das Adapterprotein von Importin β 1, am besten untersucht.

Während es nur eine Importin β Isoform gibt, wurden fünf mausspezifische α -Importine identifiziert. Diese können basierend auf Sequenzhomologien in die drei Unterklassen α -P, α -Q und α -S eingeteilt werden. Hiervon bildet Importin α 1 die α -P-Gruppe. Die Importine α 3 und α 4 gehören zur α -Q-Gruppe und die Importine α 5 und α 7 sind Mitglieder der α -S-Gruppe [44]. Zusätzlich existiert im Mensch mit Importin α 6 eine weitere Isoform, die der zuletzt genannten Unterklasse zugeordnet wird. Für die Interaktionen mit dem Substrat enthalten die α -Importine eine zentrale Domäne aus zehn repetitiven Armadillo-Sequenzen (Arm). Von diesen bilden die Wiederholungen Arm2 - 4 eine aminoternale Hauptbindungsstelle und Arm7 und 8 eine carboxyterminale Nebenbindungsstelle für das Substrat [45]. Der Amino-Terminus von Importin α besteht aus einer flexiblen, basischen Importin β -Bindedomäne (IBB-Domäne), die neben der Interaktion mit Importin β 1 auch die Autoinhibierung von Importin α in Abwesenheit des Transportrezeptors vermittelt, indem ein Teil der IBB-Domäne mit der Substrat-Hauptbindungsstelle wechselwirkt [46;47].

Die verschiedenen Importin α Isoformen besitzen unterschiedliche Bindungseigenschaften, was eine zusätzliche Regulation des Kernimportsystems ermöglicht. Dabei spielen die zelltyp- und gewebespezifische Expression der α -Importine sowie die Interaktion von verschiedenen Isoformen mit einem Substrat beziehungsweise von verschiedenen Substraten mit dem gleichen α -Importin eine Rolle [48;49]. Mehrere *in vitro* Studien führten zur Identifizierung von Proteinen, die nur von bestimmten Importin α Isoformen in den Zellkern importiert werden. Hierzu gehören die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2, deren Kerntransport durch Importin $\alpha 5$ erfolgt sowie NF- κ B, der spezifisch von den Importinen $\alpha 3$ und $\alpha 4$ gebunden wird [50;51]. Zudem wurde für den Guaninnukleotid-Austauschfaktor RCC1 ein bevorzugter Transport durch Importin $\alpha 3$ gezeigt [52]. Erste Analysen deuten darauf hin, dass die beobachteten Importin α Spezifitäten neben dem Transportsignal von weiteren strukturellen Eigenschaften innerhalb des Substrats abhängen [53].

1.2.2 Kerntransportsignale

Der nukleozytoplasmatische Transport von Proteinen ist ein signalvermittelter Prozess. Dabei unterscheidet man zwei Arten von Signalen, die von den entsprechenden Transportrezeptoren erkannt werden und somit das Substrat für einen der Transportwege festlegen. Proteine mit einem Kernexportsignal (*nuclear export signal* oder NES) werden von Exportinen registriert und aus dem Zellkern transportiert. Dahingegen sind Proteine, die ein Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal* oder NLS) tragen, für den Kernimport gekennzeichnet [54]. Das NLS kann abhängig von der Art der Substrat-Rezeptor-Interaktion als klassisch (*classical* NLS oder cNLS) oder nicht-klassisch (*non-classical* NLS oder ncNLS) eingestuft werden. Der Kernimport von Proteinen mit einem cNLS wird ausschließlich von Importin $\beta 1$ vermittelt. Hierbei erfolgt die Substrat-Bindung durch das Adapterprotein Importin α [55]. Im Gegensatz dazu werden Proteine, die ein ncNLS besitzen, direkt von den Importrezeptoren der Importin β -Superfamilie erkannt [56].

Klassische NLS sind durch kurze Sequenzen der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin charakterisiert und werden als einteilig (monopartit) oder zweiteilig (bipartit) bezeichnet. Bei dem monopartiten cNLS handelt es sich um eine Ansammlung positiv geladener Aminosäuren mit der Konsensussequenz K-(K/R)-X-(K/R), die erstmals im großen T-Antigen des Simian Virus 40 identifiziert wurde [57;58]. Bipartite cNLS

bestehen aus zwei basischen Regionen, welche durch 10 - 12 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Dieses cNLS wurde ursprünglich in Nukleoplasmin beschrieben und folgt dem Konsensus $(K/R)_2-X_{10-12}-(K/R)_3$ [59;60]. Allerdings sind Abweichungen in Form von verlängerten Verbindungssequenzen möglich [61].

Viele Transportsignale passen jedoch nicht zu einer dieser definierten Konsensussequenzen, weshalb deren Vorhersage mittels Computerprogrammen nicht immer eindeutig ist.

1.2.3 Der Ran·GTP-Konzentrationsgradient

Beim Kerntransport spielt ein starker Konzentrationsgradient von Ran·GTP mit hoher Konzentration im Zellkern und niedriger Konzentration im Zytoplasma eine wichtige Rolle. Dieser Gradient ist für die Festlegung der Transportrichtung notwendig.

Ran gehört zur Ras-Superfamilie der kleinen Guaninnukleotid-bindenden Proteine (auch: kleine GTPasen). Das Protein ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert und wird daher auch als Ras-verwandtes Kernprotein (*Ras-related nuclear protein*) bezeichnet. Wie für die kleinen GTPasen typisch fungiert Ran als molekularer Schalter und zirkuliert zwischen einer GTP- und einer GDP-gebundenen Form. Der Wechsel zwischen diesen beiden Nukleotid-gebundenen Zuständen wird durch den Guaninnukleotid-Austauschfaktor RCC1 (*regulator of chromosome condensation 1*) und das GTPase-aktivierende Protein RanGAP1 unterstützt. Deren räumliche Trennung ist für die asymmetrische Verteilung von Ran·GTP verantwortlich.

RCC1 fördert die Dissoziation des an Ran gebundenen Nukleotids (GDP oder GTP) sowie die anschließende Austauschreaktion durch Stabilisierung der Nukleotid-freien Form. Hierbei bindet Ran *in vivo* bevorzugt GTP, das in der Zelle in hoher Konzentration vorhanden ist [62]. Wie für die Aufrechterhaltung der asymmetrischen Verteilung von Ran·GTP erforderlich, konnte die Lokalisation von RCC1 ausschließlich im Zellkern nachgewiesen werden [63]. Im Gegensatz dazu ist RanGAP1 in Eukaryoten durch die Interaktion mit RanBP2 (*Ran binding protein 2*) an die zytoplasmatische Seite der Kernporenkomplexe gebunden und somit vom Zellkern ausgeschlossen. RanGAP1 katalysiert die Hydrolyse des an Ran gebundenen GTP zu GDP, was zu einer Verringerung der Konzentration von Ran·GTP im Zytoplasma führt.

Da Importine und Exportine wahrscheinlich den gleichen Mechanismus verwenden, um die Kernporenkomplexe zu passieren, erfolgt die Festlegung der Transportrichtung durch die unterschiedliche Interaktion der Transportrezeptoren mit Ran-GTP. Importine können das Substrat nur in der Ran-GTP-freien Umgebung des Zytoplasmas binden. Bei der hohen Konzentration von Ran-GTP im Zellkern führt die Interaktion der kleinen GTPase mit den Importinen zur Entlassung des Substrats. Umgekehrt binden Exportine das Substrat nur in Gegenwart von Ran-GTP. Im Zytoplasma, wo das Ran-gebundene GTP zu GDP hydrolysiert wird, zerfällt der Exportkomplex und das Substrat wird freigesetzt.

1.2.4 Der klassische Importin α/β 1-Transportweg

Der Importin α/β 1-abhängige Kernimport gilt als das klassische Beispiel für den Kerntransport (zusammengefasst in Abbildung 1-4).

In diesem Fall tragen die Substrate ein cNLS, das nicht direkt von Importin β 1, sondern von dem Adapterprotein Importin α erkannt wird. Der gebildete Importin α /Substrat-Komplex assoziiert über die IBB-Domäne von Importin α mit Importin β 1 und es entsteht ein trimerer Komplex [46]. Der Transportrezeptor vermittelt anschließend die Interaktion mit dem Kernporenkomplex und somit den Transport in den Zellkern [64]. Im Nukleoplasma bewirkt die Bindung von Ran-GTP an Importin β 1 eine konformationelle Änderung des Transportrezeptors, die zur Dissoziation von dem Importin α /Substrat-Komplex führt [65]. Sobald die IBB-Domäne von Importin α frei ist, konkurriert sie mit dem NLS des Substrats um dessen Bindung an die Arm-Wiederholungen. Durch diesen autoinhibitorischen Mechanismus wird das Substrat in den Zellkern entlassen [47].

Anschließend müssen Importin α und β 1 in das Zytoplasma zurückkehren, um für einen weiteren Kernimport zur Verfügung zu stehen. Der Komplex aus Ran-GTP und Importin β 1 kann den Zellkern direkt verlassen. Der Transport von Importin α ins Zytoplasma wird durch das Exportin CAS (*cellular apoptosis susceptibility*) ermöglicht. Dieses besitzt in Gegenwart von Ran-GTP eine hohe Affinität gegenüber dem Adapterprotein und bildet den Exportkomplex CAS/Importin α /Ran-GTP [66]. Im Zytoplasma stimuliert RanGAP1 zusammen mit RanBP1 die GTPase-Aktivität von Ran. Nach der GTP-Hydrolyse dissoziiert Importin β 1 von Ran und der CAS/Importin α /Ran-GTP-Komplex löst sich auf [67].

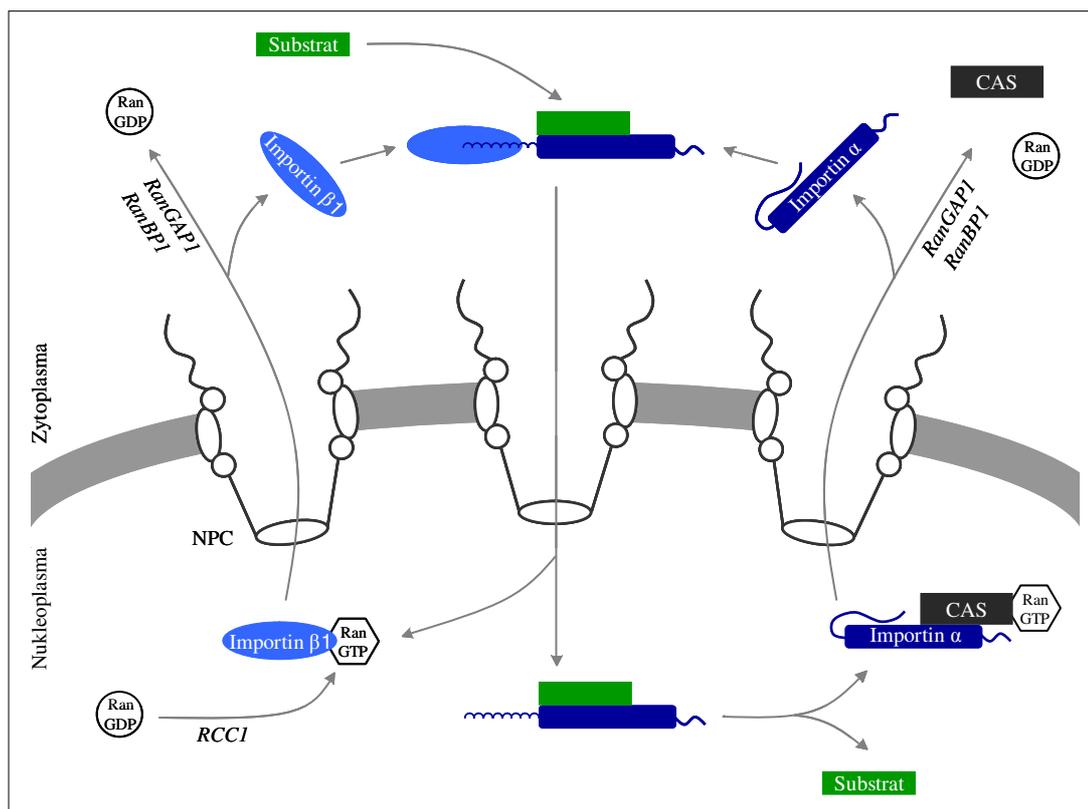


Abb. 1-4: Der klassische Importin $\alpha/\beta1$ -Transportweg.

Die Richtung des nukleozytoplasmatischen Transports wird durch die asymmetrische Verteilung von Ran-GTP mit der hohen Konzentration im Zellkern und der geringen Konzentration im Zytoplasma festgelegt. Im Zytoplasma, das heißt in Abwesenheit von Ran-GTP, bindet Importin α an ein Substrat mit cNLS und Importin $\beta1$. Die Translokation des trimeren Komplexes in den Zellkern wird durch die Interaktion von Importin $\beta1$ mit dem Kernporenkomplex (NPC) vermittelt. Im Nukleoplasma bindet Ran-GTP an Importin $\beta1$, wodurch der Importkomplex aufgelöst und das Substrat freigesetzt wird. Daraufhin bindet das Exportin CAS in der Gegenwart von Ran-GTP an Importin α und fördert dessen Export aus dem Zellkern. Der Importin $\beta1$ /Ran-GTP-Komplex durchquert den NPC direkt. Im Zytoplasma stimuliert RanGAP1 zusammen mit RanBP1 die GTP-Hydrolyse, wodurch Importin $\beta1$ freigesetzt und Importin α von CAS entlassen wird. Somit stehen die freien Importine α und $\beta1$ für einen weiteren Transportzyklus zur Verfügung.

(Bild verändert nach der Dissertation von Beate Friedrich, 2007 und [68])

Um den Kerntransport dauerhaft aufrecht zu erhalten, muss Ran-GDP wieder in den Zellkern befördert werden. Hierfür existiert der spezifische Transportrezeptor NTF2, der keine Verwandtschaft mit der Importin β -Superfamilie zeigt und nur mit der GDP-gebundenen Form von Ran interagiert [69;70]. Nach dem Transport in den Zellkern stimuliert RCC1 die Auflösung des NTF2/Ran-GDP-Komplexes sowie die Beladung von Ran mit GTP.

1.2.5 Die Rolle des klassischen Importin α/β -Transportweges in Neuronen

Die polarisierte Morphologie von Neuronen stellt eine besondere Herausforderung für die intrazelluläre Signalübertragung dar. In distalen Bereichen aktivierte Signalmoleküle müssen retrograd zum Zellkern transportiert werden, wo sie die Genexpression beeinflussen und damit Änderungen innerhalb der Neuronen auslösen. Eine solche Übertragung von Signalen zwischen distalen Kompartimenten und dem Zellkern spielt während der Entwicklung beispielhaft bei der axonalen Wegleitung und der Entstehung von Synapsen eine essentielle Rolle [71]. Weiter ist diese im adulten Gehirn zur Ausbildung synaptischer Plastizität und für die axonale Neubildung nach einer Verletzung erforderlich [72;73]. Für lösliche Signalmoleküle, die in neuronalen Fortsätzen aktiviert werden, existieren zwei Möglichkeiten um den Zellkern zu erreichen: passive Diffusion und der aktive Transport. Studien zeigen jedoch, dass die passive Diffusion für eine effiziente Übertragung von Signalen durch das Zytoplasma nicht ausreicht [74]. Daher gelangen Proteine, die ein NLS tragen, wahrscheinlich über den Importin-vermittelten Transportweg in den Zellkern. Allerdings existieren nur wenige Kenntnisse über dessen Funktion in Neuronen. Zum Beispiel deuten die immunhistochemischen Analysen von Kamei *et al.* darauf hin, dass die Importine α und β 1 sowohl im Soma als auch in den Dendriten von hippokampalen sowie cerebellaren Neuronen lokalisiert sind [49]. Darüber hinaus konnte mittels Mikroinjektion von Rhodamin-markierten Serumalbumin in den Wachstumskegel von kultivierten *Aplysia* Neuronen ein retrograder Transport in den Zellkern gezeigt werden, wenn das Albumin zusätzlich mit einem cNLS gekoppelt war. Im Gegensatz dazu verharnte das Protein ohne cNLS im Wachstumskegel. Somit scheinen die Komponenten der Kernimportmaschinerie im Wachstumskegel von *Aplysia* Neuronen vorhanden und funktionell zu sein [75]. Auch für endogene Proteine mit einem cNLS, wie den Transkriptionsfaktoren NF- κ B und CREB2, die in Neuronen lokal aktiviert werden, konnte die Existenz retrograder Transportsysteme in Axonen und Dendriten gezeigt werden [76-78]. Zudem gibt es Signalmoleküle, die durch regulierte intramembrane Proteolyse (RIP) von integralen Membranproteinen in das Zytoplasma freigesetzt werden. Viele dieser Transmembranproteine spielen bei der neuronalen Entwicklung oder Degeneration eine wichtige Rolle und sind in distalen Bereichen der Neuronen lokalisiert. Beispiel für ein Protein mit regulatorischer Bedeutung für verschiedene Entwicklungsprozesse von postmitotischen Neuronen ist Notch (siehe 1.1.6). Es wird

hierbei vermutet, dass der retrograde Transport von NICD nach der Aktivierung des Rezeptors durch den Importin-vermittelten Transportweg erfolgen könnte [68;79].

1.2.6 Der Kerntransport von Notch

Das allgemein anerkannte Modell der kanonischen Notch Signalübertragung schließt die Translokation des aktiven Rezeptors in den Zellkern ein. Der Prozess sowie Proteine, die den Kernimport von NICD regulieren sind unbekannt [8]. Aufgrund von identifizierten potentiellen Kernlokalisierungssignalen wird eine Beteiligung des klassischen Importin α/β 1-Transportweges in diesem Zusammenhang diskutiert. Jedoch ist weder das funktionelle Transportsignal von NICD eindeutig charakterisiert noch existieren genaue Untersuchungen zum Kerntransportmechanismus.

Im Fall von Notch1 sind vier potentielle cNLS Sequenzen bekannt (Abbildung 1-5). Deren Bedeutung für den Kerntransport von NICD wurde von verschiedenen Gruppen gezeigt. Allerdings sind die jeweiligen Ergebnisse sehr unterschiedlich. Zum Beispiel beschreiben Kopan *et al.* zwei potentielle cNLS, von denen das erste monopartit und zwischen der RAM- und Ankyrin-Domäne lokalisiert ist. Bei dem zweiten handelt es sich um ein bipartites cNLS, das zwischen der Ankyrin- und PEST-Domäne liegt. Die parallele Entfernung beider cNLS Sequenzen resultierte in einem verringerten Kerntransport von NICD [79]. Ebenso demonstrierten Aster *et al.*, dass die Mutation dieser beiden cNLS zu einer erhöhten zytoplasmatischen Lokalisation von NICD führt. Darüber hinaus identifizierten sie innerhalb der RAM-Domäne das dritte potentielle cNLS, dessen Entfernung jedoch keinen zusätzlichen Einfluss auf den Kerntransport von NICD hatte [80]. Im Gegensatz dazu deuten die veröffentlichten Arbeiten von Jeffries *et al.* darauf hin, dass das funktionelle Transportsignal aminoterminal der Ankyrin-Domäne liegt. Die Resultate dieser Studie veranschaulichen, dass die Entfernung der zwei NLS Sequenzen in diesem Bereich, das heißt innerhalb der RAM-Domäne sowie zwischen RAM- und Ankyrin-Domäne, bereits für einen verringerten Kerntransport ausreicht [81]. Weiter beschreiben LaVoie *et al.* das vierte potentielle NLS, welches sich innerhalb der RAM-Domäne befindet und dem zuvor beschriebenen Konsensus eines monopartiten cNLS folgt [82]. Hierzu liegen allerdings keine Untersuchungen zur Bedeutung als mögliches Transportsignal vor.

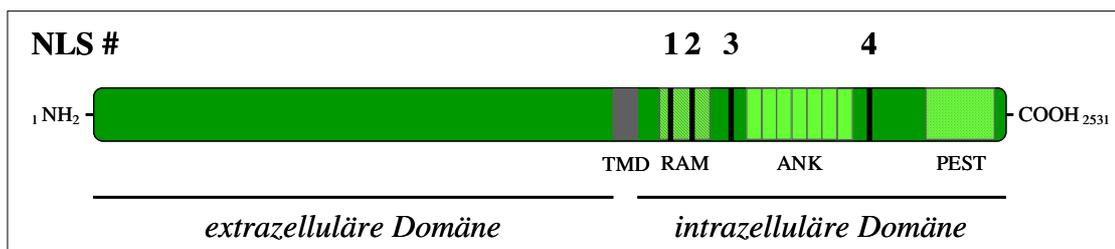


Abb. 1-5: Schematische Darstellung der cNLS Positionen in Notch1.

Notch1 enthält vier potentielle klassische Kernlokalisierungssignale, die mit NLS1 bis NLS4 benannt wurden. Deren Positionen innerhalb der intrazellulären Domäne sind als schwarze Balken eingezeichnet. Dargestellt sind zudem die Transmembrandomäne (TMD) sowie die RAM-Domäne, sieben Ankyrin-Wiederholungen (ANK) und die PEST-Domäne des zytoplasmatischen Abschnitts von Notch1.

2. Zielstellung der Arbeit

Aufgrund der wichtigen Bedeutung des Notch Signalweges für die Entwicklung und Selbsterneuerung zahlreicher Gewebe wird seit der Entdeckung vor 90 Jahren intensiv an dieser intrazellulären Signalkaskade geforscht. Dies führte zu einem umfangreichen Wissen über die Liganden-abhängige Aktivierung und Proteolyse des Rezeptors, die Modulation der Signalübertragung sowie die Auswahl der Zielgene.

Allerdings existieren nur unzureichende Erkenntnisse über einen weiteren wichtigen Schritt der Notch Funktion: dem Import von NICD in den Zellkern. Frühere Studien deuten zwar auf eine Rolle des Importin-vermittelten Transportweges in diesem Zusammenhang hin, dennoch fehlten bisher eine detaillierte Charakterisierung der potentiellen Transportsignale sowie die Aufklärung des genauen Kernimport-mechanismus. Deshalb sollten als erster Schwerpunkt in dieser Promotionsarbeit das funktionelle Kernlokalisierungssignal der intrazellulären Domäne von Notch aufgeklärt und die Importrezeptoren, welche dieses Transportsignal erkennen, ermittelt werden.

Den zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten die Analysen von Notch in hippokampalen Neuronen. Die Notch Signalübertragung spielt sowohl bei der Entwicklung als auch den Funktionen dieser Zellen, wie synaptische Plastizität und Gedächtnisbildung, eine wichtige Rolle. Daher sollte die Hypothese untersucht werden, ob Notch in distalen Bereichen aktiviert und die freigesetzte intrazelluläre Domäne mit Hilfe eines retrograden Transportsystems in den Zellkern importiert wird. Zu klärende Fragestellungen waren hierbei die intrazelluläre Lokalisation von Notch in den Nervenzellen sowie wo der Rezeptor aktiviert und daraufhin von der γ -Sekretase prozessiert wird. Da sämtliche Funktionen von Notch eine Kerntranslokation erfordern, sollte zudem untersucht werden, ob Importine ebenfalls den Kernimport von NICD in Neuronen vermitteln und somit ein Teil des retrograden Transportsystems sind.

Die meisten Vorkenntnisse für die Durchführung dieser Promotionsarbeit stammten von Notch1. Aus diesem Grund wurde zur Aufklärung der zuvor genannten Fragestellungen ebenfalls nur diese Isoform der Notch-Familie betrachtet.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden innerhalb der sterilen Atmosphäre einer Laminarbox durchgeführt.

3.1.1 Transformierte Zelllinien

Die Kultivierung transformierter Zelllinien erfolgte in DMEM mit GlutaMAX™ I (Gibco, #61965), 10 % fötales Rinderserum (FBS, Invitrogen, #10270) und 1 % Penicillin / Streptomycin (PAA, #P11-010). Zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert, um eine konstante subkonfluente Kultur (60 - 70 % Zelldichte) zu erhalten. Verwendete Zelllinien sind in Tabelle 3-1 aufgelistet und näher erläutert.

Tabelle 3-1: Transformierte Zelllinien

Zelllinie	Erläuterung
C2C12	mausspezifische Myoblasten [83]; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Rüdiger Rudolf (Forschungszentrum Karlsruhe, Eggenstein-Leopoldshafen)
HEK293E	mit DNA von Adenovirus 5 (Gene E1A/E1B) sowie Epstein-Barr-Virus (EBNA-1-Gen) transformierte humane, embryonale Nierenfibroblasten
HeLa	HPV 18 transformierte humane, epitheliale Zervixkarzinom-Zellen

3.1.2 Hippokampale Primärzellkultur

Im Zuge dieser Arbeit kamen zwei verschiedene Kulturen hippokampaler Neuronen zur Anwendung, die sich in der Dichte der ausplattierten neuronalen Zellen unterschieden. Die Kultur niedriger Dichte (*Low Density*- oder LD-Kultur genannt) basierte auf einer Kokultivierung von Astrozyten und Neuronen. Dabei werden von den Astrozyten Wachstumsfaktoren sezerniert, die für das Überleben der Neuronen über einen längeren Zeitraum essentiell sind [84]. Zunächst wurden Astrozyten aus embryonalen Ratten-

gehirnen isoliert, in Gewebekulturschalen (BD Biosciences) ausgesät und bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden hippocampale Neuronen isoliert und auf Deckgläschen (Marienfeld, #01 115 50) ausplattiert. Nach dem Anhaften der neuronalen Zellen erfolgte ein Transfer der Deckgläschen in die Gewebekulturschalen der Astrozyten. Mit Hilfe dieses Kokultur-Systems war es möglich, Neuronen niedriger Dichte bis zu 4 Wochen zu halten. Für biochemische Studien wurden hippocampale Neuronen in höherer Zelldichte direkt auf Gewebekulturschalen kultiviert. Dabei spricht man von einer *High Density*- oder HD-Kultur.

3.1.2.1 Vorbereitung der Deckgläschen und Gewebekulturschalen

Zunächst wurden die Deckgläschen über Nacht mit konzentrierter Salpetersäure behandelt und anschließend sechsmal für 30 min mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der Deckgläschen im Ofen für 30 min bei 150 °C erfolgte die Trockensterilisation für 6 Stunden bei 240 °C. Um während der Kokultur einen direkten Kontakt zwischen Neuronen und Astrozyten zu verhindern, wurden auf jedes Deckgläschen drei Paraffin-Tropfen aufgebracht. Dann erfolgte die Beschichtung der Deckgläschen sowie der Gewebekulturschalen für HD-Kulturen mit 1 mg / ml Poly-L-Lysin (Sigma, #P2636) in Borat-Puffer (50 mM Borsäure, 12,5 mM Borax, pH 8.5) bei 37 °C. Am darauf folgenden Tag wurde überschüssiges Poly-L-Lysin durch dreimaliges Waschen mit sterilem Wasser entfernt. Abschließend wurden die Deckgläschen in MEM-FBS (1x MEM (Gibco, #31095), 10 mM HEPES (Gibco, #15630), 33 mM D-Glukose, 10 % FBS) beziehungsweise die Gewebekulturschalen in NBM (NEUROBASAL™ Medium (Gibco, #21103), 10 mM HEPES, 1x B27 Supplement (Gibco, #17504)) für mindestens 24 h vorinkubiert.

3.1.2.2 Präparation der hippocampalen Neuronen

Die Herstellung hippocampaler Zellkulturen erfolgte aus den Gehirnen von Rattenföten (E18). Nach Dekapitation wurden die Hippokampi in vorgewärmtem HBSS (Gibco, #14175) herauspräpariert. Dabei war es wichtig, die Meningen zu entfernen, um Kontaminationen durch Fibroblasten zu vermeiden. Die gesammelten Hippokampi wurden 15 min bei 37 °C in Trypsin (Gibco, #25300) inkubiert, dreimal mit warmem

HBSS gewaschen und anschließend durch Titrieren homogenisiert. Die Zellen wurden gezählt und in der gewünschten Zelldichte (LD-Kultur: 2.500 Zellen pro cm², HD-Kultur: 25.000 Zellen pro cm²) ausgesät.

3.1.2.3 Präparation der Astrozyten

Die Isolierung der Astrozyten erfolgte aus den Kortizes fötaler Rattengehirne. Im Wesentlichen wurde dabei auf dieselbe Weise wie bei Neuronen vorgegangen. Die Zellen wurden in der gewünschten Dichte (25.000 Zellen pro cm²) auf eine vorbeschichtete Gewebekulturschale in MEM-FBS ausgesät. Nach Anhaften der Astrozyten erfolgte ein Austausch des Mediums, um die Trümmer abgestorbener Zellen zu entfernen. Nach circa 3 bis 4 Wochen erreichten die Astrozyten vollständige Konfluenz. Für eine Verwendung im Kokultur-System wurden die Zellen abgelöst und in fünffach geringerer Dichte auf Gewebekulturschalen in MEM-FBS ausgesät. Vor dem Transfer der Deckgläschen erfolgte ein Mediumwechsel zu serumfreiem MEM II (1x MEM (Gibco, #21430), 10 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 33 mM D-Glukose, 26 mM NaHCO₃, 1 mM Natriumpyruvat, 1x B27 Supplement), um das Wachstum der Astrozyten zu reduzieren.

3.1.3 Transfektion

3.1.3.1 Transfektion der Zelllinien

Für die stabile Transfektion von HEK293E Zellen wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen) streng nach Herstellerprotokoll verwendet.

Die transiente Transfektion von C2C12 Zellen erfolgte mit einem 1 : 2 Verhältnis (µg / µl) von Plasmid-DNA zu Lipofectamine 2000 beziehungsweise einem Verhältnis von 200 pmol siRNA zu 10 µl Lipofectamine 2000 direkt nach dem Aussäen frisch trypsiniertes Zellen [85].

3.1.3.2 Kalzium-Phosphat-Transfektion

Die Transfektion primärer Neuronen erfolgte mittels einer angepassten DNA / Kalzium-Phosphat-Präzipitation [86]. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Kopräzipitation

von Plasmid-DNA mit Kalzium-Phosphat-Kristallen, die von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden. Änderungen des pH-Wertes können dabei einen Einfluss auf die Größe der Präzipitate und somit auf die Transfektionseffizienz und das Überleben der Zellen haben. Deshalb wurde die Transfektion in Carbonat-unabhängigem NMEM-B27 (1x MEM, 15 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 10 mM D-Glukose, 1mM Natriumpyruvat, 1x B27 Supplement, pH 7.50) durchgeführt. Zunächst wurden die Neuronen auf Deckgläschen in Gewebekulturschalen (10 cm²) mit 2 ml NMEM-B27 für 30 min bei 37 °C / 0 % CO₂ vorinkubiert. Diese Zeit diente außerdem zum Ansetzen der Transfektionslösung. Hierfür wurden 3 µg Gesamt-DNA in 60 µl 250 mM CaCl₂ gelöst und anschließend unter ständigem Mischen zu 60 µl 2x BBS (50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7.00) gegeben. Danach erfolgte die tropfenweise Applikation der Transfektionslösung auf die Neuronen und Inkubation für 1 bis 2 Stunden bei 37 °C ohne CO₂. Die Reaktion wurde durch Waschen mit HBS (20 mM HEPES, 135 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM Na₂HPO₄, 10 mM D-Glukose, pH 7.30) für 15 min bei 37 °C / 0 % CO₂ gestoppt, der Waschpuffer abgesaugt und durch Astrozyten-konditioniertes MEM II ersetzt. Die Zellen wurden dann unter Standardbedingungen weiterkultiviert.

3.2 Plasmide und DNA-Manipulationen

Tabelle 3-2 zeigt eine Auflistung freundlicherweise zur Verfügung gestellter Plasmide.

Tabelle 3-2: Zur Verfügung gestellte Expressionsplasmide

Bezeichnung	Quelle
NICD-myc	Incheol Shin, Hanyang University, Seoul [30]
12xCSL-DsRed	Urban Lendahl, Karolinska Institute, Stockholm [87]
12xCSL-Luz	Malle Soom, Fritz-Lipmann-Institut, Jena
pGL4.74	Cornelis Calkhoven, Fritz-Lipmann-Institut, Jena

Zielgene für die im Verlauf dieser Arbeit hergestellten Plasmide (siehe Tabelle 3-3) wurden entweder mittels PCR nach Standardprotokoll amplifiziert oder durch Restriktionsverdau aus anderen Plasmiden gewonnen. Die Klonierung der Fragmente in kommerzielle Vektor-Systeme erfolgte nach Isolation aus dem Agarosegel und

Reinigung über Säulen des NucleoSpin® Extract II Kits (MACHERY-NAGEL). Die Plasmidkarten für die klonierten Expressionsplasmide sind im Anhang der Arbeit angefügt.

Tabelle 3-3: Klonierte Expressionsplasmide

Bezeichnung	cDNA (NCBI-Nr)	Quelle der cDNA	Zielvektor	Markierung
Lokalisierungsstudien				
NotchΔE	NotchΔE	Raphael Kopan, Washington University	pcDNA3.1/Hygro	-
NotchΔE-EGFP	NotchΔE	Raphael Kopan, Washington University	pcDNA3.1/Hygro	EGFP
Notch1-myc	Notch1	Raphael Kopan, Washington University	pcDNA3.1/Hygro	6x myc
Delta1	Delta1	Falk Fahrenholz, Universität Mainz	pcDNA3.1/Hygro	HA
Rekombinante Expression				
GST-NICD	NICD (NM_008714)	C2C12 cDNA	pGEX-5X-1	GST
GST-Importin α1	Importin α1 = Kpna2 (NM_010655)	C2C12 cDNA	pGEX-5X-1	GST
GST-Importin α3	Importin α3 = Kpna4 (NM_008467)	C2C12 cDNA	pGEX-5X-1	GST
GST-Importin α4	Importin α4 = Kpna3 (NM_008466)	C2C12 cDNA	pGEX-5X-1	GST
GST-Importin α5	Importin α5 = Kpna1 (NM_008465)	C2C12 cDNA	pGEX-5X-1	GST
GST-Importin α7	Importin α7 = Kpna6 (NM_008468)	C2C12 cDNA	pGEX-5X-1	GST

Mutation der potentiellen NLS Sequenzen in NotchΔE oder GST-gekoppelten NICD erfolgte durch *in vitro* ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe des QuikChange™ site-directed mutagenesis Kits (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers. Dafür verwendete Primer sind in Tabelle 3-4 aufgelistet.

Tabelle 3-4: Primer für in vitro ortsgerichtete Mutagenese

Name	Primer (5' - 3')
mNLS3	GGAGACGAAGACCTGGAGACCGCCGCATTCGCCTTTGAGGAGCCAGTAGTTCTCC
mNLS4a	CTCAAGTCTGCCACACAGGGCGCCGCTGCCGCCGACCCAGCACCAAAGGGCTGGC
mNLS4b	GCAAGGAAGCTAAGGACCTCGCCGACCCGCTGCCGCCTCCCAGGATGGCAAGGGCTGC

3.3 SiRNA

Für siRNA-Experimente zur Herunterregulierung der mausspezifischen α -Importine wurden die folgenden ON-TARGET^{plus} siRNAs der Firma Dharmacon käuflich erworben: non-targeting siRNA pool, D-001810-10; Importin α 1, L-041791-00; Importin α 3, L-058423-01; Importin α 4, L-058757-01; Importin α 7, L-047028-01.

3.4 Immunzytochemie

Um die subzelluläre Lokalisation eines Proteins in kultivierten Zellen nachweisen zu können, wurden diese mit dem entsprechenden Antikörper immunzytochemisch gefärbt. Dafür wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und gegebenenfalls mit einem bestimmten Expressionsplasmid transfiziert. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 4 % Paraformaldehyd in PBS für 20 min. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen, die Zellmembran mit 0,2 % Triton X-100 in PBS für 5 min permeabilisiert und für 10 min geblockt (Blockmedium: 1 % FBS, 1 % BSA, 0,1 % Fischgelatine in PBS). Dann wurden die Zellen nacheinander mit dem Primärantikörper und dem entsprechenden Alexa Fluor[®]-gekoppelten Sekundärantikörper für jeweils 30 min inkubiert. Die anschließende Zugabe von DAPI diente dem Anfärben der Zellkerne. Nach allen Inkubationsschritten erfolgte zweimaliges Waschen mit PBS. Die Deckgläschen wurden unter Verwendung von Einbettmedium (Mowiol, Roth, #0713) auf Objektträger aufgezogen. Nach dem Trocknen konnten die gefärbten Zellen mikroskopisch ausgewertet werden.

Alle eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper wurden in Blockmedium verdünnt und sind in Tabelle 3-5 dargestellt.

Tabelle 3-5: Antikörper für Immunfärbungen

Antikörper	Wirt	Quelle	Verdünnung
Primärantikörper			
anti-cleaved Notch 1 (Val1744)	Kaninchen	Cell Signaling	1:50
anti-GFP	Kaninchen	Molecular Probes	1:500
anti-DsRed	Kaninchen	Clontech	1:500
anti-myc (9E10)	Maus	Santa Cruz	1:500
anti-HA (HA-7)	Maus	Sigma	1:1.000
anti-GST	Ziege	Amersham	1:1.000
anti-MAP2 (HM-2)	Maus	Sigma	1:1.000
anti-MAP2 (H-300)	Kaninchen	Santa Cruz	1:500
anti-Synaptophysin	Maus	Chemicon	1:1.000
anti-Tau-1 (PC1C6)	Maus	Chemicon	1:1.000
Sekundärantikörper			
anti-Kaninchen-Alexa Fluor [®] 488 / 555	Ziege	Molecular Probes	1:500
anti-Maus-Alexa Fluor [®] 488 / 555	Ziege	Molecular Probes	1:500
anti-Ziege-Alexa Fluor [®] 488	Esel	Molecular Probes	1:500

3.5 Mikroskopie

Für die mikroskopische Auswertung der durchgeführten Experimente wurde ein Zeiss Axiovert 200 Mikroskop mit Kamera AxioCam Mrm und der Software AxioVision verwendet. Für einige Aufnahmen kam das Einschub-Modul ApoTome zum Einsatz. Die aufgenommenen Bilder wurden mit Adobe Photoshop CS2 zusammengefügt und bearbeitet.

3.6 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Glutathion-S-Transferase (GST) beziehungsweise GST-Fusionsproteine wurden mit Hilfe von Glutathion-Sepharose (GE Healthcare) aus bakteriellem Extrakt aufgereinigt. Zunächst erfolgte die Transformation der in Tabelle 3-3 beschriebenen Expressionsplasmide in dem *Escherichia coli*-Stamm Rosetta(DE3). Nach dem Lösen

von 500 ng Plasmid-DNA in 100 µl KCM-Puffer (100 mM KCl, 30 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂) wurde diese DNA-Lösung mit 100 µl kompetenten Bakterien versetzt, anschließend 30 min auf Eis und noch einmal für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auf die Zugabe von 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) folgte Schütteln der Bakterien für 60 min bei 37 °C. Die Bakteriensuspension wurde zur Selektion transformierter Bakterien auf LB-Platten mit Ampicillin sowie Chloramphenicol ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde in einer Übernachtkultur in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika bis zur stationären Wachstumsphase bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Am Folgetag diente diese Übernachtkultur zum Animpfen von LB-Medium im Verhältnis 1 : 100, welches unter identischen Bedingungen wie zuvor bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,7 inkubiert wurde. Die Expression der Proteine erfolgte durch Induktion mit 100 nM IPTG für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation (15 min, 4.000 rpm, 4 °C) zum Sedimentieren der Bakterien wurde das Zellpellet in PBS mit Protease-Inhibitor-Mix (PI-Mix, Sigma) resuspendiert. Auf Lyse der Zellen mit Hilfe von Ultraschall (15 x 10 sec) folgte die Pelletierung der entstandenen Zelltrümmer durch Zentrifugation (15 min, 13.000 rpm, 4 °C). Danach wurde Glutathion-Sepharose dreimal mit PBS gewaschen, mit dem Überstand versetzt und 60 min bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Dadurch erfolgte die Anreicherung von GST beziehungsweise GST-Fusionsproteinen aus dem Überstand. Die Glutathion-Sepharose wurde dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in vierfachem Volumen PBS mit PI-Mix aufgenommen.

3.7 *In vitro* Kernimport-Assay

Für die *in vitro* Analyse des Kernimports von NICD wurde GST-NICD verwendet, was eine Elution des rekombinanten Proteins von der Glutathion-Sepharose voraussetzte. Hierzu wurde die Sepharose dreimal mit kaltem 50 mM Tris, pH 8.0 gewaschen und anschließend mit 20 mM reduzierten Glutathion (Merck) in 50 mM Tris, pH 8.0 für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zentrifugation erfolgte jeweils für 5 min bei 2.000 rpm und 4 °C. Eine Weiterarbeit mit dem aufgereinigten Protein erforderte die Dialyse gegen den Transport-Puffer (20 mM HEPES, pH 7.3, 110 mM Koac, 2 mM Mg(OAc)₂, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, PI-Mix) sowie die anschließende Einengung der Proteinlösung mittels eines Konzentrators (Amicon[®] Ultra-0.5, Ultracel-50 Membrane, Millipore) auf eine Konzentration von 0,5 µg GST-NICD pro

µl Puffer. Für den Kernimport-Assay wurden HeLa Zellen auf Deckgläschen ausgesät [88]. Am Folgetag wurden die Zellen zweimal gewaschen und mit 0,015 % Digitonin (Calbiochem) in Transport-Puffer für 5 min auf Eis permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen für je 3 min zum Entfernen des Zytoplasmas erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Importansätzen für 30 min bei 30 °C in einer feuchten Kammer oder bei 4 °C. Die Importansätze enthielten 20 ng/µl GST-NICD, 2 µg/µl BSA, ein ATP-regenerierendes System (1 mM ATP, 5 mM Kreatinphosphat, 20 U/ml Kreatinphosphatkinase), 4 µM Ran und abhängig vom jeweiligen Ansatz 500 nM His-markierte Importine [43;89] beziehungsweise His-Transportin [90] in Transport-Puffer. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 3 min gewaschen, fixiert und immunzytochemisch gefärbt.

Sämtliche Waschschriffe erfolgten mit kaltem Transport-Puffer auf Eis.

Mit Ausnahme von GST-NICD wurden alle für die Importansätze benötigten Komponenten freundlicherweise von Ralph Kehlenbach, Universität Göttingen zur Verfügung gestellt.

3.8 Proteinanalyse

3.8.1 Proteinextraktion

Die Homogenisierung der Gehirne erfolgte in 1 ml STEN-Lysepuffer (50 mM Tris·HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % NP40, PI-Mix) pro 100 mg Gewebe durch mehrmaliges Ziehen durch eine enge Einmal-Injektions-Kanüle. Abgeerntete Zellen wurden für die Gewinnung von Proteinlysaten ebenfalls in STEN-Lysepuffer aufgenommen. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation (15 min, 13.000 rpm, 4 °C) pelletiert. Proteinlysate für GST-Pulldown-Experimente oder Koimmunopräzipitation wurden mit 1x STE (50 mM Tris·HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, PI-Mix) verdünnt, um eine Konzentration von 0,5 % NP40 zu erreichen.

Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte durch BCA-Messung (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce).

3.8.2 Methanol / Chloroform Fällung von Proteinen

Die Proteine primärer Zellkulturen von hippokampalen Neuronen und Astrozyten wurden mittels Methanol / Chloroform Extraktion quantitativ präzipitiert [91]. Abgeerntete Zellen wurden in 0,1 % SDS homogenisiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Proteinlösung wurde zur Fällung der Proteine nacheinander mit vierfachem Volumen Methanol und einfachem Volumen Chloroform versetzt und gemischt. Auf die Zugabe von dreifachem Volumen Wasser folgte 1 min lang intensives Mischen und zweiminütige Zentrifugation bei 12.000 rpm, 4 °C. Danach wurde die obere Phase verworfen und die restliche Probe (untere Phase und Interphase) mit dreifachem Volumen Methanol versetzt. Im letzten Zentrifugationsschritt (2 min, 12.000 rpm, 4 °C) verblieben die gefällten Proteine im Pellet, welches getrocknet und für die SDS-PAGE verwendet wurde. Alle eingesetzten Lösungen waren auf 4 °C vorgekühlt.

3.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Standardprotokoll im elektrischen Feld nach Größe aufgetrennt. Abhängig von dem zu untersuchenden Protein wurden Gele mit unterschiedlicher Acrylamid-Konzentration verwendet (6 % bis 12 %). Als Größenmarker diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, #SM1811).

3.8.4 Coomassie-Färbung

Für die Visualisierung aufgetrennter Proteine wurde das Polyacrylamid-Gel für 60 min in Coomassie-Lösung (30 % Ethanol, 6 % Essigsäure, 0,15 % Coomassie Brilliant Blue R-250) geschwenkt. Eine anschließende Inkubation in Entfärber-Lösung (45 % Ethanol, 2 % Essigsäure) führte zur Entfernung des nicht gebundenen Farbstoffes aus dem Gel, wodurch die Proteinbanden sichtbar wurden. Für einen besseren Kontrast erfolgte eine weitere Entfärbung über Nacht in Wasser.

3.8.5 Western Blot und Immunodetektion von Proteinen

Der Transfer von Proteinen aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) erfolgte mit Hilfe des Tank-Blot-Verfahrens. Danach wurde die Membran für 1 h geblockt (0,2 % I-Block (Applied Biosystems), 0,1 % Tween 20 in PBS) und über Nacht mit dem Primärantikörper bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit TBS-T (100 mM Tris-HCl, pH 7.6, 300 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) gewaschen, gefolgt von der Behandlung mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran für 1 min mit frisch angesetztem ECL-Reagenz inkubiert. Dabei handelte es sich um eine selbst hergestellte Lösung aus drei Komponenten (1 ml 0,025 % Luminol in 100 mM Tris-HCl, pH 8.6, 100 µl 0,11 % para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO, 0,3 µl 35 % H₂O₂). Die durch Luminol-Oxidation hervorgerufene Lichtemission wird von der am Sekundärantikörper gebundenen HRP katalysiert und konnte mit einem Super-RX Röntgenfilm (Fuji) detektiert werden.

Zum Einsatz kamen die in Tabelle 3-6 aufgelisteten Antikörper, welche in Blockierungspuffer verdünnt wurden.

Tabelle 3-6: Antikörper für Western Blot

Primärantikörper	Wirt	Quelle	Verdünnung
anti-cleaved Notch 1 (Val1744)	Kaninchen	Cell Signaling	1:1.000
anti-Importin α1 (1A6)	Ratte	Sigma	1:10.000
anti-Importin α3	Ziege	Everest Biotech	1:1.000
anti-Importin α4	Ziege	Everest Biotech	1:1.000
anti-Importin α7	Kaninchen	R. Depping / Lübeck	1:5.000
anti-DsRed	Kaninchen	Clontech	1:1.000
anti-HA (HA-7)	Maus	Sigma	1:3.000
anti-myc (9E10)	Maus	Santa Cruz	1:1.000
anti-β-Aktin (ab8227)	Kaninchen	Abcam	1:5.000
anti-AChRα	Maus	BD Transduction	1:500

Fortsetzung Tabelle 3-6: Antikörper für Western Blot

Sekundärantikörper	Wirt	Quelle	Verdünnung
anti-Maus-HRP	Ziege	Promega	1:5.000
anti-Kaninchen-HRP	Ziege	Promega	1:5.000
anti-Ziege-HRP	Esel	Santa Cruz	1:2.000
anti-Ratte-HRP	Ziege	Jackson ImmunoResearch	1:10.000

3.8.6 GST-Pulldown

Um nachzuweisen, welche Importin α Isoformen mit NICD interagieren, wurde eine Bindungsstudie durchgeführt. Hierzu wurde Glutathion-Sepharose allein oder beladen mit GST beziehungsweise GST-Fusionsproteinen dreimal mit 0,5 % NP40-haltigem STEN-Lysepuffer gewaschen, mit dem Lysat (je 800 μ g) versetzt und 2 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Darauf folgte dreimaliges Waschen mit 1x STEN (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,2 % NP40, PI-Mix). Die gebundenen Proteine wurden anschließend mit 2x Laemmli Protein-Ladepuffer für 5 min bei 95 °C eluiert und denaturiert. Die Sepharose wurde abzentrifugiert und das Eluat mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Alle Inkubationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zentrifugation erfolgte jeweils für 5 min bei 2.000 rpm und 4 °C.

3.8.7 Immunopräzipitation / Koimmunopräzipitation

Zur Untersuchung der Interaktion von Importin α 4 und NICD wurden C2C12 Zellen mit dem Expressionsplasmid NICD-myc transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen geerntet und in STEN-Lysepuffer homogenisiert.

Jeweils 10 μ l Protein-G-SepharoseTM (GE Healthcare) und 30 μ l Sepharose[®] CL-4B (Sigma) wurden pro Probe dreimal mit 0,5 % NP40-haltigen STEN-Lysepuffer gewaschen. Zunächst wurde das Proteinlysate für 1 h mit dem Sepharose-Mix behandelt, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Auf diese Inkubationszeit folgte Abzentrifugieren und Verwerfen der Sepharose. Anschließend wurde 1 μ g des entsprechenden Immunoglobulins (siehe Tabelle 3-7) zugegeben und das Lysat für 2 h auf einem Drehrad inkubiert. Das Lysat-Immunoglobulin-Gemisch wurde danach erneut mit dem Sepharose-Mix versetzt und die Inkubation über Nacht fortgesetzt. Am darauf

folgenden Tag wurde die Sepharose dreimal mit 1x STEN gewaschen. Danach erfolgte die Elution und Denaturierung der gebundenen Immunglobuline und Proteine mit 2x Laemmli Protein-Ladepuffer für 5 min bei 95 °C. Nach dem Abzentrifugieren der Sepharose wurde das Eluat mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Alle Inkubationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zentrifugation erfolgte jeweils für 3 min bei 10.000 rpm und 4 °C.

Tabelle 3-7: Immunglobuline für Immunopräzipitation

IP #1		IP #2	
Immunglobulin	Quelle	Immunglobulin	Quelle
anti-Importin α 4	Everest Biotech	anti-myc (9E10)	Santa Cruz
normales Ziegen-IgG	Santa Cruz	normales Maus-IgG	Santa Cruz

3.9 Luziferase-Assay

C2C12 Zellen wurden in Gewebekulturschalen (20 cm²) ausgesät und zunächst mit 200 pmol der entsprechenden ON-TARGET^{plus} siRNAs transfiziert. Nach 24 h erfolgte erneutes Trypsinieren, Aussäen und Transfizieren der Zellen mit 4 μ g Gesamt-DNA zusammengesetzt aus 2 μ g Notch1 Reporter (12xCSL-Luz), 2 μ g Delta1 und 40 ng pGL4.74 als Expressionskontrolle. Nach weiteren 24 h wurden die Proben mittels Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) gemäß dem Herstellerprotokoll ausgewertet.

3.10 Quantitative Real Time PCR

Hierfür wurden C2C12 Zellen jeweils nach dem Aussäen auf Gewebekulturschalen (20 cm²) erst mit 200 pmol der entsprechenden ON-TARGET^{plus} siRNAs und 24 h später mit 2 μ g Delta1 transfiziert. Am Folgetag wurde Gesamt-RNA mit dem NucleoSpin[®] RNA II Kit (MACHEREY-NAGEL) aus den Zellen isoliert. Die Synthese der cDNA erfolgte mit Hilfe des Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kits (Roche Diagnostics) unter Verwendung der Oligo(dT)₁₈-Primer nach Angaben des Herstellers. Bei der anschließenden quantitativen Real Time PCR (RT-qPCR) in einem iCycler (Bio-Rad Laboratories) wurden die Zielgene mit dem SYBR[®] Green I

SensiMix™ dT (Quantace) und den in Tabelle 3-8 aufgelisteten Primern amplifiziert. Das Haushaltsgen Cyclophilin diente als Standard für die Normalisierung der erhaltenen Messwerte.

Tabelle 3-8: Primer für die quantitative Real Time PCR

Gen	NCBI Nr.	Primer (5´- 3´)	PCR-Produkt
Cyclophilin	NM_026352	GCAAGGATGGCAAGGATTGA AGCAATTCTGCCTGGATAGC	101 bp
Hey1	NM_010423	TGAGCTGAGAAGGCTGGTAC ACCCCAAACCTCCGATAGTCC	170 bp

3.11 Statistische Analyse

Die dargestellten Mittelwerte wurden aus den Messergebnissen unabhängiger Experimente berechnet. Der angegebene Fehlerbalken spiegelt die Standardabweichung als Maß für die Streuung der jeweiligen Werte um den Mittelwert wider. Zur statistischen Analyse der Messwerte (Mittelwertvergleich) wurde der zweiseitige Student´s t-Test angewendet. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p kleiner als 5 % ($p < 0.05$) wird das Ergebnis als signifikant betrachtet. Wurde dieses Niveau erreicht, sind die Werte in den Graphiken durch Sterne gekennzeichnet: $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0,001$ ***.

4. Ergebnisse

Bei der Aktivierung von Notch1 führen drei proteolytische Spaltungen zur Freisetzung der Notch intrazellulären Domäne (NICD), die in den Zellkern transportiert wird und dort die Expression bestimmter Zielgene anschaltet. In der Literatur finden sich detaillierte Kenntnisse zur Stimulierung des Rezeptors, Signalweiterleitung sowie Selektion der nachgeschalteten Gene. Dieses Wissen sollte durch die Untersuchungen zum Kernimport von NICD im ersten Teil der vorliegenden Arbeit komplettiert werden.

4.1 Identifizierung des Transportsignals von Notch1

Proteine, die für den Transport in den Zellkern bestimmt sind, enthalten ein Kernlokalisierungssignal (NLS). Nach eigener Analyse der Primärstruktur von Notch1 und unter Berücksichtigung der veröffentlichten Arbeiten verschiedener Gruppen gibt es vier potentielle klassische NLS Sequenzen innerhalb der zytoplasmatischen Domäne [79-82], die in dieser Arbeit als NLS1 bis NLS4 bezeichnet werden (Abbildung 1-5).

Anhand ihrer in Abbildung 4-1 angegebenen Sequenzen wurde eine Klassifizierung der potentiellen cNLS vorgenommen. NLS1 bis NLS3 sind jeweils durch eine Ansammlung basischer Aminosäuren charakterisiert und werden daher als monopartit bezeichnet. Das NLS4 wurde aufgrund der zwei Ansammlungen basischer Aminosäuren als bipartit eingestuft.

Genaue Kenntnisse zur Bedeutung der einzelnen potentiellen cNLS für den Transport von NICD in den Zellkern waren nicht bekannt. Zuvor durchgeführte Analysen mittels Deletionen beziehungsweise Mutationen der entsprechenden Sequenzen zeigten untereinander verschiedene Ergebnisse. Daher wurden zu Beginn dieser Arbeit eigene Untersuchungen zur Funktion der einzelnen Kernlokalisierungssignale angestellt. Für diese Experimente wurde Notch Δ E verwendet, das nach der Sortierung an die Plasmamembran konstitutiv durch die γ -Sekretase unter Freisetzung von NICD gespalten wird. Das Konstrukt zeichnete sich zudem durch eine Deletion der RAM-Domäne aus, was der funktionellen Inaktivierung von NICD diente. Somit konnten mögliche Nebeneffekte durch die Stimulation von Notch1 Zielgenen in transient transfizierten Zellen verhindert werden. Da NLS1 und NLS2 innerhalb der RAM-

Domäne liegen, wurden diese Sequenzen ebenfalls entfernt. Ein Austausch der charakteristischen basischen Aminosäuren zu Alanin-Resten erfolgte daher nur innerhalb der NLS3 und NLS4 Sequenzen. Es wurden drei verschiedene Konstrukte mit NLS4 Mutationen hergestellt, um den Einfluss der beiden Ansammlungen basischer Aminosäuren einzeln und zusammen zu analysieren. Zur besseren Erklärung sind die eingeführten Mutationen in Abbildung 4-1 näher beschrieben.

NLS1:	1749 KRRR ₁₇₅₂	durch Deletion der RAM-Domäne entfernt
NLS2:	1770 KKRR ₁₇₇₄	
NLS3:	1811 KKFR ₁₈₁₄	
mNLS3:	1811 AAFA ₁₈₁₄	
NLS4:	2146 KKARKPSTKGLACGSKEAKDLKARRKK ₂₁₇₂	
mNLS4a:	2146 AAAA PSTKGLACGSKEAKDLKARRKK ₂₁₇₂	
mNLS4b:	2146 KKARKPSTKGLACGSKEAKDLAAAA ₂₁₇₂	
mNLS4a+b:	2146 AAAA PSTKGLACGSKEAKDL AAAA ₂₁₇₂	

Abb. 4-1: Beschreibung der vier potentiellen cNLS Sequenzen und ihrer Mutationen.

Die basischen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) der vier potentiellen cNLS sind in fett gedruckt dargestellt. Das verwendete NotchΔE Konstrukt enthielt eine Deletion der RAM-Domäne, wodurch auch NLS1 und NLS2 fehlten. Innerhalb der NLS3 und NLS4 Sequenzen wurden die basischen Aminosäuren durch Alanin (A) ausgetauscht. Die eingeführten Mutationen sind mit roten Buchstaben gekennzeichnet.

Die Bedeutung der veränderten cNLS Sequenzen für den nukleären Transport von NICD sollte *in vitro* mittels Immunzytochemie gezeigt werden. Dafür wurden C2C12 Myoblasten mit Plasmiden transfiziert, die für NotchΔE entweder ohne oder mit den entsprechenden Mutationen kodierte. Nach 16 h wurden die Zellen fixiert, immunzytochemisch mit NICD-spezifischem Antikörper gefärbt und die Lokalisation der Signale mikroskopisch ausgewertet. Die Gegenfärbung mit DAPI diente der Darstellung der Zellkerne. Repräsentative Resultate dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 4-2 gezeigt.

NICD ohne zusätzliche Mutation konnte im Zellkern detektiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die potentiellen NLS1 und NLS2 Sequenzen keine Bedeutung für den Transport des Proteins besitzen. Im Gegensatz dazu führte die Mutation der NLS3 Sequenz (mNLS3) zu einem verhinderten Kernimport von NICD. Das Protein ließ sich hauptsächlich im Zytoplasma der transfizierten Zellen nachweisen. Keine der drei

verschiedenen Kombinationen an Mutationen innerhalb des potentiellen bipartiten NLS4 (mNLS4a, b, a+b) hatte einen Einfluss auf den Transport von NICD in den Zellkern. Diese Daten zeigen, dass NLS3 das funktionelle Kernlokalisierungssignal innerhalb von NICD darstellt.

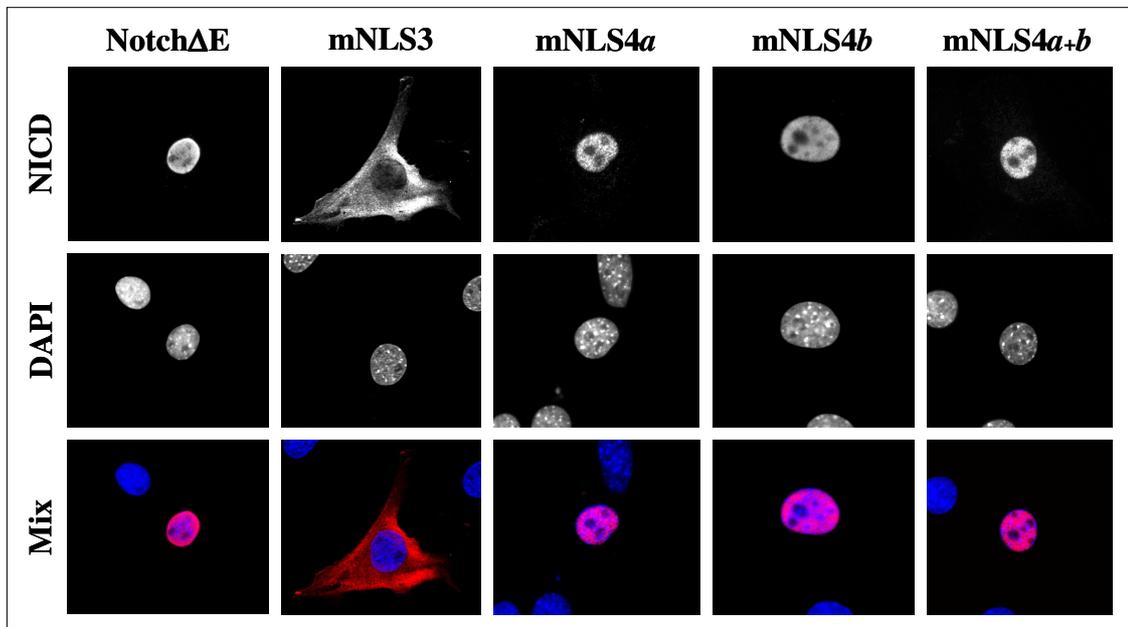


Abb. 4-2: Immunzytochemischer Nachweis der subzellulären Lokalisation von NICD.

Notch ΔE ohne oder mit Mutationen innerhalb des NLS3 (mNLS3) beziehungsweise NLS4 (mNLS4a, b und a+b) wurde in C2C12 Zellen transfiziert. Die immunzytochemische Analyse der Zellen erfolgte durch Färbung gegen NICD (rot). Die Zellkerne wurden mittels des Farbstoffes DAPI (blau) sichtbar gemacht.

4.2 Analyse des Kerntransportmechanismus von NICD

Die Identifikation eines kanonischen Kernlokalisierungssignals in Notch1 deutete darauf hin, dass NICD durch den klassischen Importin α/β 1-Transportweg in den Zellkern gelangt. Bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit lag jedoch keine genaue Charakterisierung des Kerntransportmechanismus vor [8].

Um zu analysieren, welche Importrezeptoren den Transport von NICD in den Zellkern vermitteln, wurde ein *in vitro* Kernimport-Assay durchgeführt [88]. Hierfür wurde die Plasmamembran von HeLa Zellen selektiv durch Digitonin permeabilisiert und das Zytoplasma ausgewaschen. Die Kernmembran blieb dabei intakt. Durch die externe Applikation von rekombinanten Importrezeptoren und weiteren Komponenten des Transportsystems konnte anschließend der Kernimport von NICD untersucht werden.

Als Imports substrat für dieses Experiment kam aufgereinigtes GST-NICD zur Anwendung, das nach dem Fixieren der Zellen durch immunzytochemische Färbung mit GST-spezifischem Antikörper visualisiert wurde. Repräsentative Resultate der mikroskopischen Auswertung sind in Abbildung 4-3 gezeigt. Zusätzlich erfolgte eine Quantifizierung des Kernimports von GST-NICD. Für die automatische Bildauswertung kam das Programm *CellProfiler* zum Einsatz. Hierbei erfolgte nach Erkennung der Zellkerne anhand des DAPI-Signals eine Messung der GST-Immunoreaktivität in diesem Bereich. Die ermittelten Werte sind in Abbildung 4-4 als Diagramm dargestellt. Alle darin gezeigten Daten entsprechen Mittelwerten der Fluoreszenz-Signale von 250 bis 300 gemessenen Zellen eines Experiments. Die Ergebnisse dieser Quantifizierung spiegeln die Resultate der mikroskopischen Auswertung wider.

Anhand der Abbildung 4-3 ist gut zu erkennen, dass der Kerntransport von GST-NICD durch die Importine α und $\beta 1$ zusammen vermittelt wird. In den Zellkernen dieser Zellen konnte das stärkste Fluoreszenz-Signal festgestellt werden. Als Kontrolle für die Spezifität des nukleären Transports erfolgte die Inkubation der HeLa Zellen mit dem gleichen Importansatz auch bei 4 °C. Die Temperatursenkung führte zu einem verringerten Kernimport sowie einer Anreicherung des rekombinanten Proteins um die Zellkerne herum. Deshalb konnte davon ausgegangen werden, dass es sich beim Transport von GST-NICD in den Zellkern um einen aktiven Prozess handelt. Gleichzeitig wurde hiermit die Integrität der Kernmembran demonstriert. Auch in Zellen, die nur mit Importin α behandelt wurden, ließ sich GST-NICD in Zellkernen detektieren. Aus früheren Studien war bekannt, dass an den Kernporenkomplexen haftende Importin $\beta 1$ Proteine beim Auswaschen des Zytoplasmas nicht vollständig entfernt werden [64]. Dies ermöglichte wahrscheinlich einen geringen, aber nachweisbaren Kernimport von GST-NICD. Anhand der in Abbildung 4-4 dargestellten Quantifizierung des Imports ist jedoch erkennbar, dass nach Applikation der Importine α und $\beta 1$ zusammen im Importansatz über 70 % mehr GST-NICD Proteine in die Zellkerne transportiert wurden. Weiter sollte festgestellt werden, ob GST-NICD außerdem über einen der alternativen Transportwege in den Zellkern gelangt. Hierfür erfolgte eine Inkubation der HeLa Zellen entweder mit Importin $\beta 1$ allein oder mit Transportin. Für beide Ansätze konnte kein spezifischer Kernimport von GST-NICD beobachtet werden. Die Quantifizierung ergab jeweils einen Wert von unter 10 %. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit Ran ohne Importrezeptoren inkubiert. Hierbei ließen sich wie erwartet keine GST-Proteine in Zellkernen nachweisen.

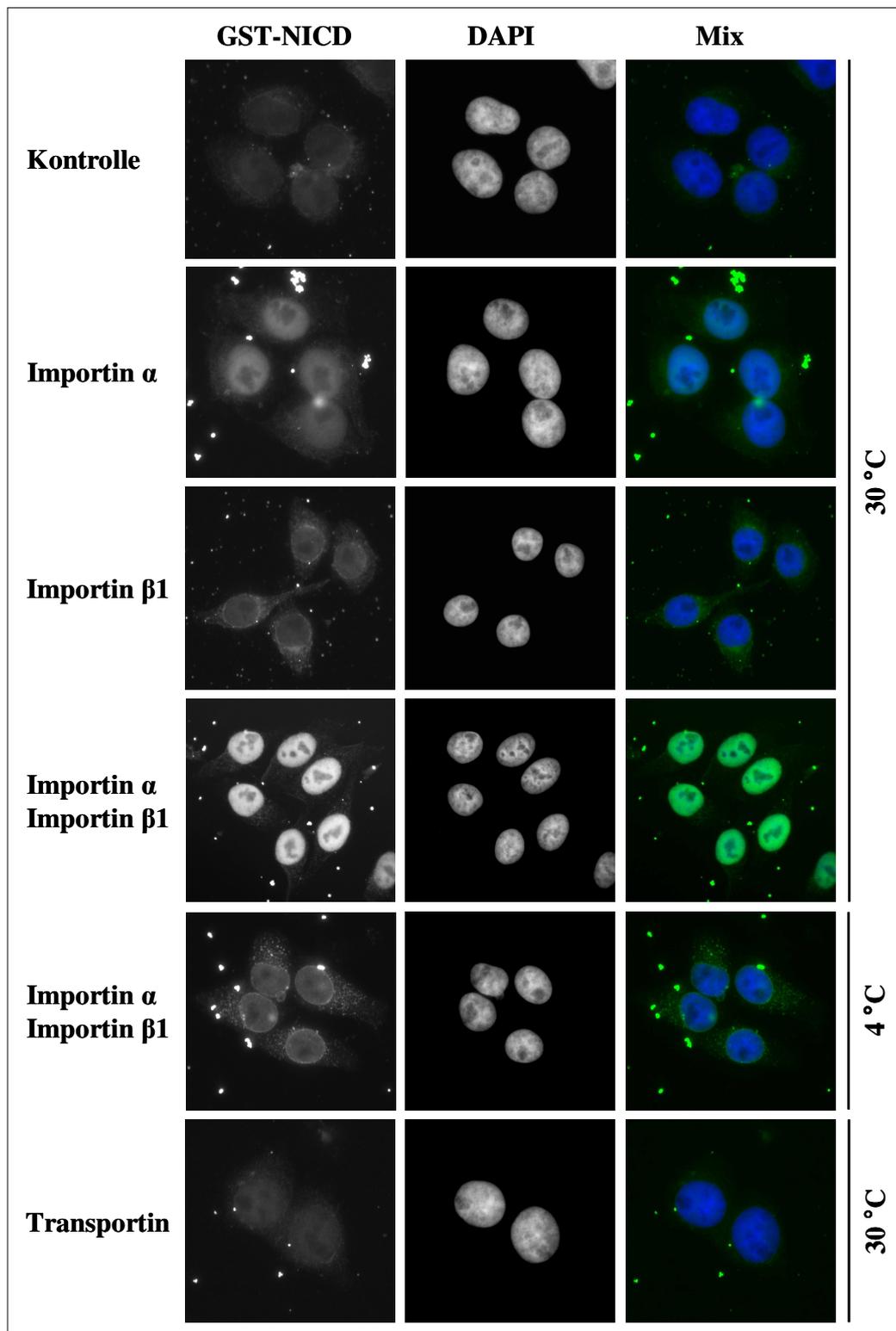


Abb. 4-3: *Untersuchung des Kernimports von GST-NICD in permeabilisierten HeLa Zellen.*

Permeabilisierte HeLa Zellen wurden mit dem Imports substrat GST-NICD und verschiedenen Importansätzen aus Importin α , Importin β 1 oder Transportin (wie angegeben) bei 30 °C beziehungsweise als Kontrolle bei 4 °C inkubiert. Die Analyse der Zellen erfolgte mittels immunzytochemischer Markierung von GST (grün). Zellkerne wurden durch den Farbstoff DAPI sichtbar gemacht (blau).

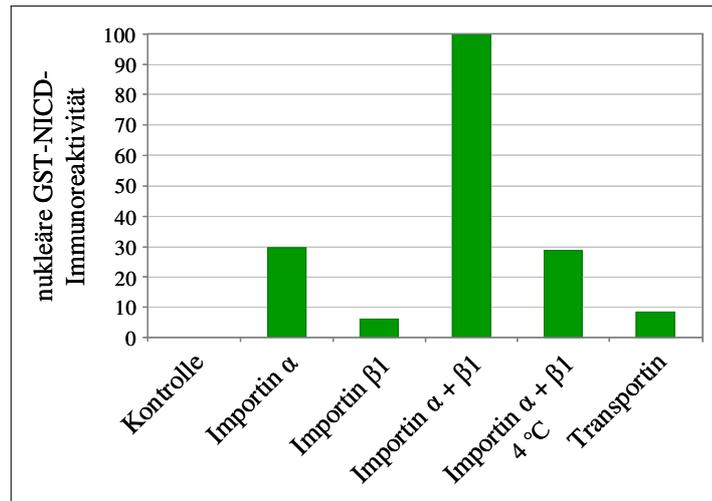


Abb. 4-4: Quantifizierung des Kernimports von GST-NICD.

Die Messung der nukleären Fluoreszenz von jeweils 250 bis 300 Zellen erfolgte automatisch mittels des Programms *CellProfiler*. Der ermittelte Fluoreszenzwert der Kontrolle (ohne Importrezeptoren) wurde als Hintergrund definiert und von den Messwerten der anderen Ansätze abgezogen. Die ermittelte GST-Immunoreaktivität in Gegenwart von Importin α und $\beta 1$ wurde als 100 % festgelegt. Die anderen Messergebnisse wurden dementsprechend in Beziehung gesetzt. Die Daten entsprechen einem Experiment und enthalten daher keine Fehlerbalken.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse die aufgrund des identifizierten funktionellen NLS3 aufgestellte Vermutung, dass die Importine α und $\beta 1$ den Kernimport von NICD vermitteln.

4.3 Identifikation der NICD-spezifischen α -Importine

Im vorhergehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass der Kerntransport von NICD abhängig von den Importinen α und $\beta 1$ ist. Während nur eine Importin β Isoform für die Interaktion mit Importin α existiert, sind jedoch fünf α -Importine der Maus bekannt. Daher stellte sich die Frage, welche der Importin α Isoformen mit NICD interagieren.

4.3.1 Nachweis der Interaktion zwischen NICD und α -Importinen *in vitro* mittels GST-Pulldown

Hierfür wurden *in vitro* Bindungsstudien mittels GST-Pulldown-Experimenten durchgeführt. Expressionsvektoren, welche für die fünf mausspezifischen α -Importine ($\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$) als GST-Fusionsprotein kodierten, wurden in *Escherichia coli*

überexprimiert. Nach Aufreinigung der rekombinanten Proteine konnten diese für Interaktionsstudien eingesetzt werden. In diesen wurde der Proteinextrakt von HEK293E Zellen, die stabil Notch Δ E exprimierten, als Bezugsquelle für NICD genutzt. Anhand der Western Blot Analyse in Abbildung 4-5 wird sichtbar, dass NICD *in vitro* mit den Importinen α 3, α 4 und α 7 interagiert. Im Gegensatz dazu zeigten die Importine α 1 und α 5 keine Bindung von NICD. Ein Teil des Gels wurde zudem mit Coomassie angefärbt. Dadurch wurden die verwendeten GST-Importine sichtbar. Dies diente als Ladekontrolle für die eingesetzten Mengen der rekombinanten Proteine in den jeweiligen GST-Pulldown-Experimenten. Obwohl von GST-Importin α 4 nur geringe Mengen exprimiert wurden, konnte in der entsprechenden Pulldown-Probe ein starkes Signal von NICD detektiert werden. Dieses Ergebnis deutete auf eine hohe Affinität von Importin α 4 gegenüber NICD hin. Im Gegensatz dazu weist das niedrige Signal von NICD im Versuch mit GST-Importin α 7, das in großen Mengen vorlag, auf eine schwache Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen hin.

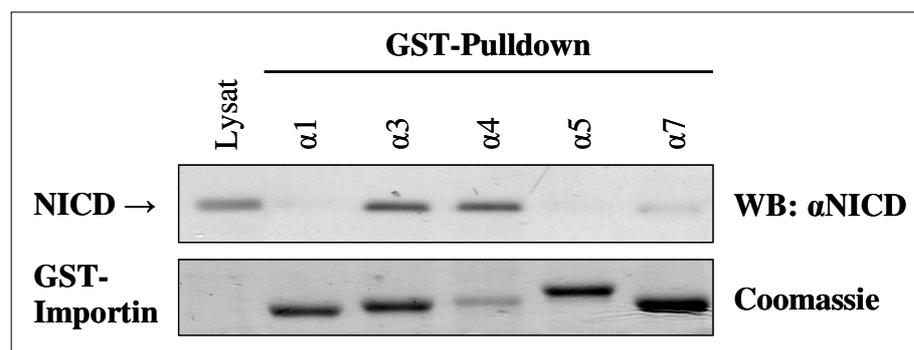


Abb. 4-5: Untersuchung der Interaktion zwischen GST-Importin α Proteinen und NICD.

Rekombinant exprimierte GST-Importine α 1, α 3, α 4, α 5 und α 7 wurden an Glutathion-Sephadex immobilisiert und mit dem Proteinextrakt von stabil mit Notch Δ E transfizierten HEK293E Zellen inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und entweder mit Coomassie angefärbt (unten) oder nach dem Transfer auf eine Membran mit einem anti-NICD Antikörper markiert (WB, oben).

Außerdem erfolgte die Untersuchung der Interaktion zwischen den α -Importinen und NICD in umgekehrter Richtung. Hierfür wurde ein Expressionsplasmid verwendet, das für mausspezifisches NICD als GST-Fusionsprotein kodierte. Der Zellextrakt von C2C12 Myoblasten wurde mit Sephadex-immobilisierten GST-NICD inkubiert. Die Analyse der gebundenen endogenen Proteine erfolgte mittels Western Blot und einer anschließenden immunochemischen Detektion der α -Importine. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-6 dargestellt.

Wieder konnte eine Bindung der Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ an NICD nachgewiesen werden. Importin $\alpha 1$ zeigte erneut keine Interaktion mit NICD. Da spezifisch gegen Importin $\alpha 5$ gerichtete Antikörper nicht verfügbar waren, musste auf die Detektion dieser Isoform verzichtet werden. Betrachtet man das Verhältnis von Lysat zu GST-NICD-Pulldown bei den jeweiligen Importin-Signalen, wurde im Einklang mit dem vorhergehenden Ergebnis (Abbildung 4-5) die stärkste Affinität zwischen Importin $\alpha 4$ und NICD festgestellt. Um die Spezifität der Interaktion zu überprüfen, wurde ein GST-gekoppeltes NICD generiert, das eine Mutation des kanonischen NLS3 enthielt (GST-NICD-mNLS3). Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Bindung der α -Importine an NICD durch das Kernlokalisierungssignal NLS3 vermittelt wird. Weder Importin $\alpha 3$, $\alpha 4$ oder $\alpha 7$ ließen sich in diesen Pulldown-Proben detektieren. GST ohne Fusionsprotein diente als Kontrolle für unspezifische Bindungen von Proteinen.

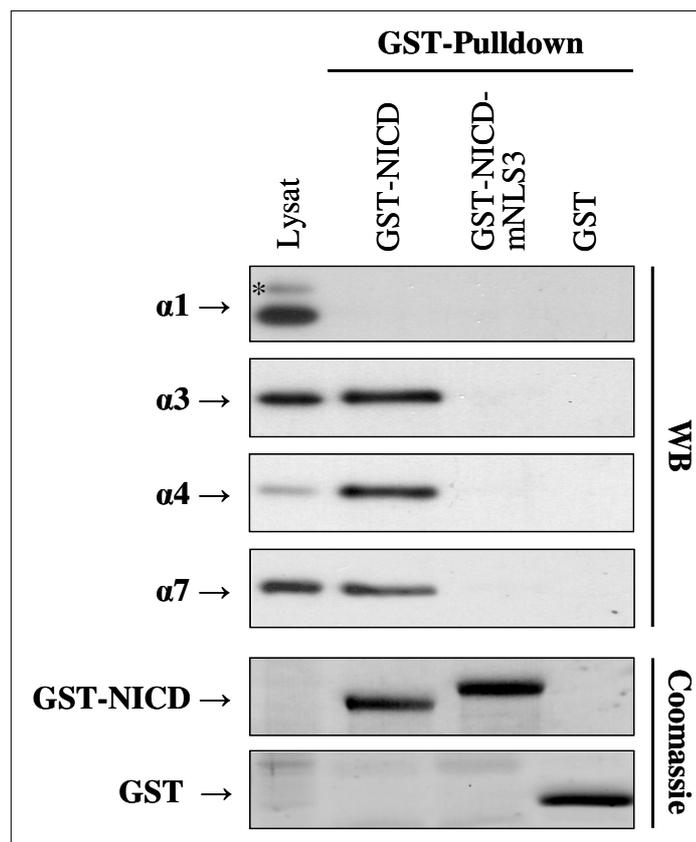


Abb. 4-6: *Untersuchung der Interaktion zwischen GST-NICD und α -Importinen.*

Aufgereinigtes GST-NICD, GST-NICD-mNLS3 oder GST wurde für Bindungsstudien mit endogenen α -Importinen aus dem Zellextrakt von C2C12 Myoblasten verwendet. Die Interaktion ließ sich mittels spezifischer Importin α -Antikörper im Western Blot (WB) detektieren (oben). Rekombinante Proteine wurden im Polyacrylamid-Gel mittels Coomassie angefärbt (unten). Der Stern markiert ein unspezifisches Signal (*).

Mit Hilfe der GST-Pulldown-Experimente konnte festgestellt werden, dass die Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ mit unterschiedlicher Affinität an NICD binden und diese Interaktion abhängig von der NLS3 Sequenz ist.

4.3.2 Nachweis der Interaktion zwischen NICD und Importin $\alpha 4$ *in vitro* mittels Koimmunopräzipitation

Als weiterer Beweis für eine Protein-Protein-Interaktion zwischen NICD und α -Importinen wurde eine Koimmunopräzipitation durchgeführt. Beispielhaft wurde Importin $\alpha 4$ betrachtet, da diese Isoform die höchste Affinität gegenüber NICD aufwies. Die Koimmunopräzipitation erfolgte mit einem Importin $\alpha 4$ -spezifischen Antikörper aus lysierten C2C12 Myoblasten, die ektopisch NICD-myc exprimierten. Um nachzuweisen, dass beide Proteine nicht unspezifisch an den konstanten Teil des polyklonalen anti-Importin $\alpha 4$ Antikörpers binden, wurde eine entsprechende Ziegen-IgG Kontrolle im Experiment mitgeführt. Die Immunopräzipitation zeigte die spezifische Fällung der endogenen Importin $\alpha 4$ Proteine aus den C2C12 Myoblasten. Zusätzlich kopräzipitierte der Antikörper auch das an Importin $\alpha 4$ gebundene NICD-myc (Abbildung 4-7 A).

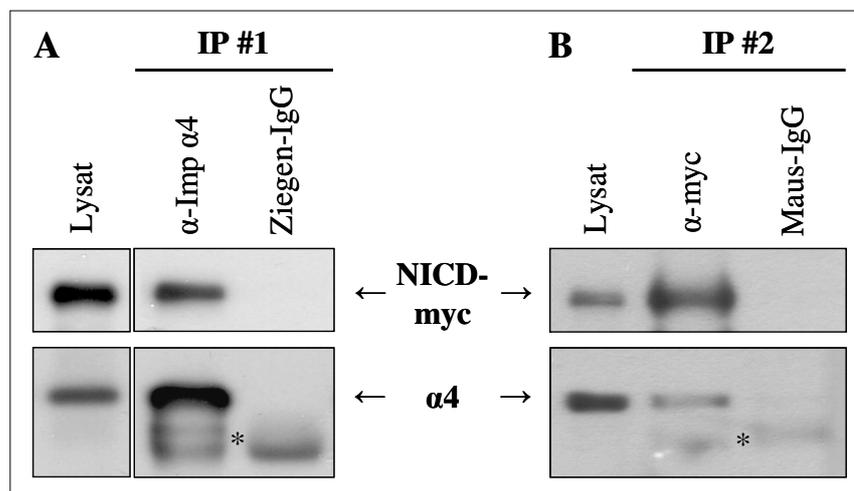


Abb. 4-7: Koimmunopräzipitation von Importin $\alpha 4$ und NICD als Nachweis der Interaktion *in vitro*. Immunopräzipitation (IP) mit anti-Importin $\alpha 4$ (A) bzw. anti-myc Antikörper (B) oder den entsprechenden Immunglobulinen (IgG) als Kontrollen aus dem Zellextrakt von C2C12 Myoblasten, die NICD-myc überexprimierten. Signale der schweren Ketten der Immunglobuline sind mit Sternen (*) gekennzeichnet.

In einer zweiten Koimmunopräzipitation wurde ein monoklonaler myc-spezifischer Antikörper zur Fällung von NICD-myc aus dem Proteinextrakt der zuvor beschriebenen Zellen verwendet. Als Kontrolle diente hierbei der Einsatz eines Maus-IgG. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-7 B dargestellt. Auch in diesem Versuch konnten interagierende NICD-myc und Importin $\alpha 4$ Proteine kopräzipitiert und mittels Western Blot nachgewiesen werden.

Zusammenfassend stimmt das Resultat der Koimmunopräzipitation mit den Ergebnissen der GST-Pulldown-Experimente (Abbildung 4-5 und 4-6) überein und zeigte ebenfalls, dass die beiden Proteine *in vitro* miteinander interagieren.

4.4 Untersuchungen zum Kerntransport von NICD *in vivo*

Durch die im vorherigen Kapitel beschriebenen Versuche konnte erstmalig eine Interaktion der Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ mit der intrazellulären Domäne von Notch1 *in vitro* gezeigt werden. Daher stand in den nachfolgenden Experimenten die Frage im Mittelpunkt, ob diese Isoformen *in vivo* den Import von NICD in den Zellkern und somit die Notch1 Signalübertragung vermitteln. Als Zellsystem wurden maus-spezifische C2C12 Myoblasten verwendet, die neben allen Importin α Isoformen und Importin $\beta 1$ auch endogen Notch1 exprimierten.

4.4.1 Testung der Wirksamkeit des Notch1 Reporters in C2C12 Myoblasten mittels Immunzytochemie und Western Blot

Die durch Aktivierung von Notch1 freigesetzte intrazelluläre Domäne wird nur in äußerst niedrigen Konzentrationen im Zellkern aufrechterhalten [92;93] und ist daher schwer mittels Immunzytochemie oder Western Blot nachweisbar. Aus diesem Grund sollte der Kernimport von NICD indirekt über den Nachweis endogener Notch1 Signalübertragung mittels eines spezifischen Reporters untersucht werden. Das verwendete Konstrukt war durch 12 CSL-Bindestellen in Verbindung mit dem fluoreszierenden Reporter-Protein DsRed charakterisiert und wird nachfolgend als 12xCSL-DsRed bezeichnet. Die Funktionsweise des Notch1 Reporters ist in Abbildung 4-8 schematisch dargestellt.

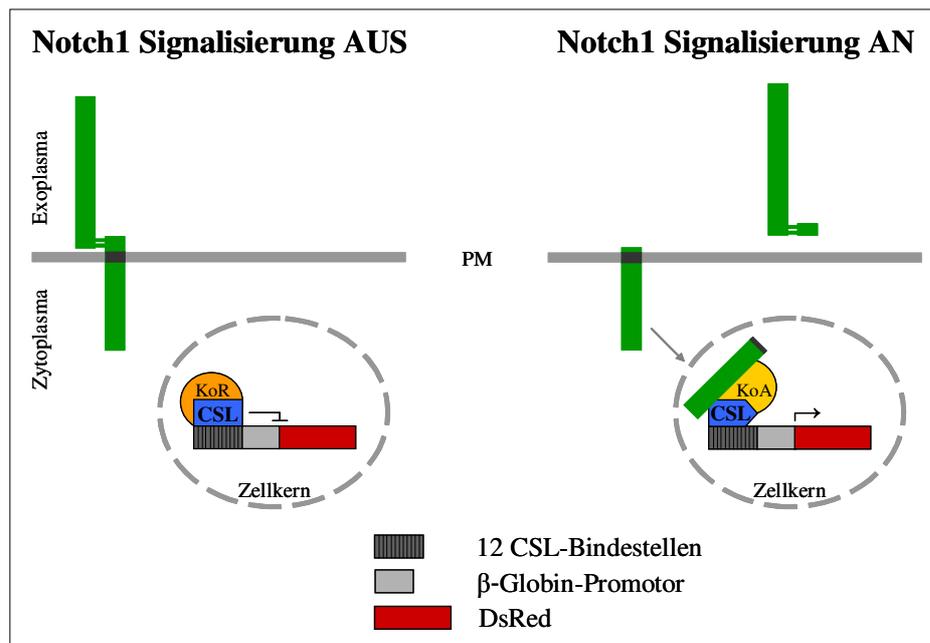


Abb. 4-8: *Schematische Beschreibung des fluoreszierenden Notch1 Reportersystems.*

Das Reporterkonstrukt enthält einen synthetischen Promotor bestehend aus 12 CSL-Bindestellen in Verbindung mit DsRed als Reporter gen. Auf molekularer Ebene bewirkt die Aktivierung der Notch1 Signalübertragung eine Veränderung der Zusammensetzung von Proteinkomplexen am DNA-bindenden CSL Protein. Die Interaktion von NICD mit CSL führt zum Entfernen von Korepressoren (KoR) und Rekrutieren von Koaktivatoren (KoA), wodurch die Expression des Reporter gens DsRed angeschaltet wird. PM kennzeichnet die Plasmamembran der Zelle.

(Bild verändert nach [87])

Zunächst sollte die Wirksamkeit des fluoreszierenden Reportersystems mittels Immunzytochemie gezeigt werden. Hierfür wurden C2C12 Myoblasten mit dem Reporterplasmid transfiziert und, um endogenes Notch1 zu aktivieren, mit HEK293E Zellen kokultiviert, die Delta1 exprimierten. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch mit gegen die genannten Proteine gerichteten Antikörpern gefärbt. Das Ergebnis der mikroskopischen Auswertung ist in Abbildung 4-9 dargestellt.

Ein starkes Signal des fluoreszierenden Reporter-Proteins konnte in C2C12 Myoblasten visualisiert werden, die in einem engen Kontakt mit Delta1-exprimierenden Zellen standen. Im Gegensatz dazu zeigten C2C12 Myoblasten, die allein kultiviert worden, keine Expression von DsRed (Ergebnis nicht dargestellt). Delta1 ließ sich hauptsächlich an der Plasmamembran der HEK293E Zellen nachweisen. Daher war eine Transaktivierung endogener Notch1 Rezeptoren der Myoblasten durch die Liganden benachbarter HEK293E Zellen möglich. Als Kontrolle erfolgte die Behandlung der Zellen mit DAPT. Die γ -Sekretase-Hemmung verhinderte die Freisetzung von NICD

während der Notch1 Aktivierung. Unter diesen Bedingungen konnten keine DsRed-Signale in C2C12 Myoblasten festgestellt werden, was auf eine hohe Spezifität des Notch1 Reporters hinweist.

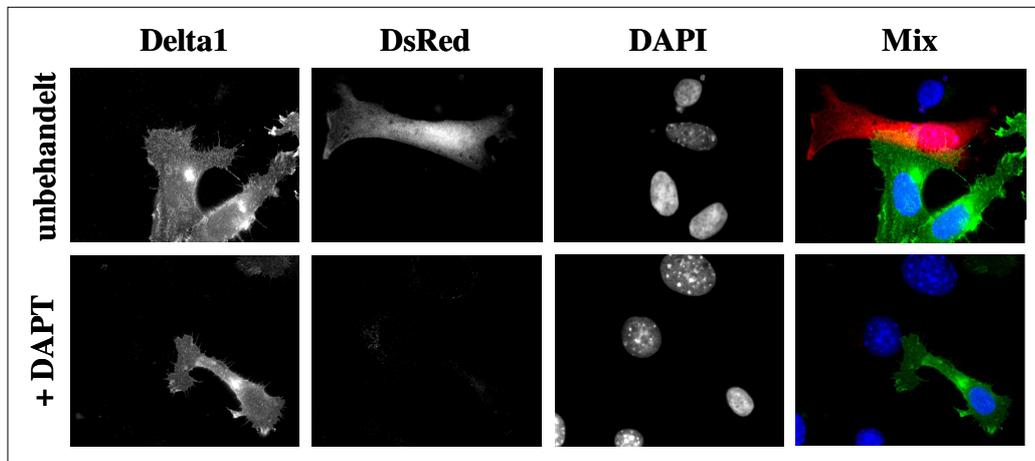


Abb. 4-9: Immunocytochemische Überprüfung der Wirksamkeit des Notch1 Reportersystems.

C2C12 Myoblasten wurden mit 12xCSL-DsRed transfiziert und zur Aktivierung endogener Notch1 Rezeptoren zusammen mit HEK293E Zellen kultiviert, die Delta1 exprimierten. Als Negativkontrolle diente die Behandlung der Kokultur mit DAPT. Die Darstellung der HEK293E Zellen erfolgte mittels immunocytochemischer Färbung gegen die HA-Markierung von Delta1 (grün). Zellkerne wurden durch den Farbstoff DAPI (blau) sichtbar gemacht. Endogene Notch1 Aktivität in C2C12 Myoblasten konnte in Form des fluoreszierenden Reporter-Proteins (rot) nachgewiesen werden.

Außerdem sollte der Notch1 Reporter mittels Western Blot getestet werden. Hierfür wurden die C2C12 Myoblasten mit dem Reporterplasmid transfiziert und entweder allein oder zusammen mit HEK293E Zellen, die Delta1 exprimierten, kultiviert. Als Kontrolle erfolgte die Behandlung der Kokultur mit DAPT. Die verschiedenen Zellextrakte wurden anschließend im Western Blot analysiert.

Die Abbildung 4-10 zeigt im Vergleich zu den beiden Kontrollen einen Anstieg der DsRed Proteinmenge, wenn Notch1 durch Delta1 kokultivierter HEK293E Zellen aktiviert wurde. Die Zugabe von DAPT führte zu einer Senkung der Expression von DsRed auf ein Niveau, das auch in C2C12 Myoblasten allein nachweisbar war und somit der basalen Expression des Reporters ohne Stimulation entspricht.

Die immunochemische Detektion der Acetylcholinrezeptor α -Untereinheiten diente als Ladekontrolle. Mittels eines HA-spezifischen Antikörpers wurden ähnliche Proteinmengen von Delta1 in den Kokulturen detektiert.

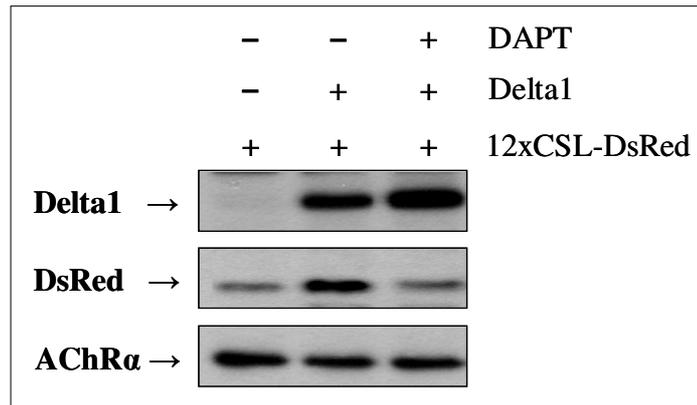


Abb. 4-10: Überprüfung der Wirksamkeit des Notch1 Reportersystems mittels Western Blot.

Nach der Transfektion mit 12xCSL-DsRed wurden C2C12 Myoblasten entweder allein oder zusammen mit Delta1-exprimierenden HEK293E Zellen kultiviert. Eine DAPT-Behandlung der Kokultur diente als Negativkontrolle. Die Analyse der Reporter Aktivität in den verschiedenen Zellextrakten erfolgte nach dem Transfer auf eine Membran mit DsRed-spezifischem Antikörper. Nachweis der Acetylcholinrezeptor α -Untereinheiten (AChR α) und der HA-Markierung von Delta1 diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Fluoreszenz-basierte Notch1 Reporter für die spezifische Detektion endogener Notch1 Signalübertragung einsetzbar ist. Bei nachfolgenden Analysen zum Einfluss der α -Importine auf den Transport von NICD in den Zellkern stellte sich jedoch eine ungenügende Sensitivität des Reporters heraus. Auf eine Darstellung der hierzu durchgeführten Experimente und deren Ergebnisse wurde verzichtet.

Als Lösung für dieses Problem erfolgte die Herstellung eines Luziferase-basierten Notch1 Reporters. Hierfür wurden die 12 CSL-Bindestellen in den Vektor pGL4.20 eingefügt, dessen Reportergen für das Enzym Luziferase aus dem Leuchtkäfer (*Firefly*-Luziferase) kodierte (Abbildung 4-11 A). Damit wurde eine bessere Reproduzierbarkeit und höhere Sensitivität für die Quantifizierung der durch NICD stimulierten Genexpression erreicht. Dieses Konstrukt wird nachfolgend als 12xCSL-Luz bezeichnet.

4.4.2 Bedeutung der α -Importine bei der Notch1 Signalübertragung *in vivo*

Um die Bedeutung einzelner α -Importine bei der Notch1 Signalübertragung zu ermitteln, wurde deren Expression in C2C12 Myoblasten durch RNA-Interferenz mittels spezifischer siRNAs verringert. Nach 24 h wurden die Zellen mit dem Reporter

12xCSL-Luz und einem *Renilla*-Luziferase-Plasmid (pGL4.74) als interne Kontrolle transfiziert. Die zur Aktivierung endogener Notch1 Rezeptoren benötigten Liganden stammten von einem weiteren kotransfizierten Expressionsplasmid, das für Delta1 kodierte. Am Folgetag wurde die Reporter Aktivität in den einzelnen Proben mittels des Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Systems (Promega) ausgewertet. Das Ergebnis dieser Studie ist in Abbildung 4-11 B zu sehen.

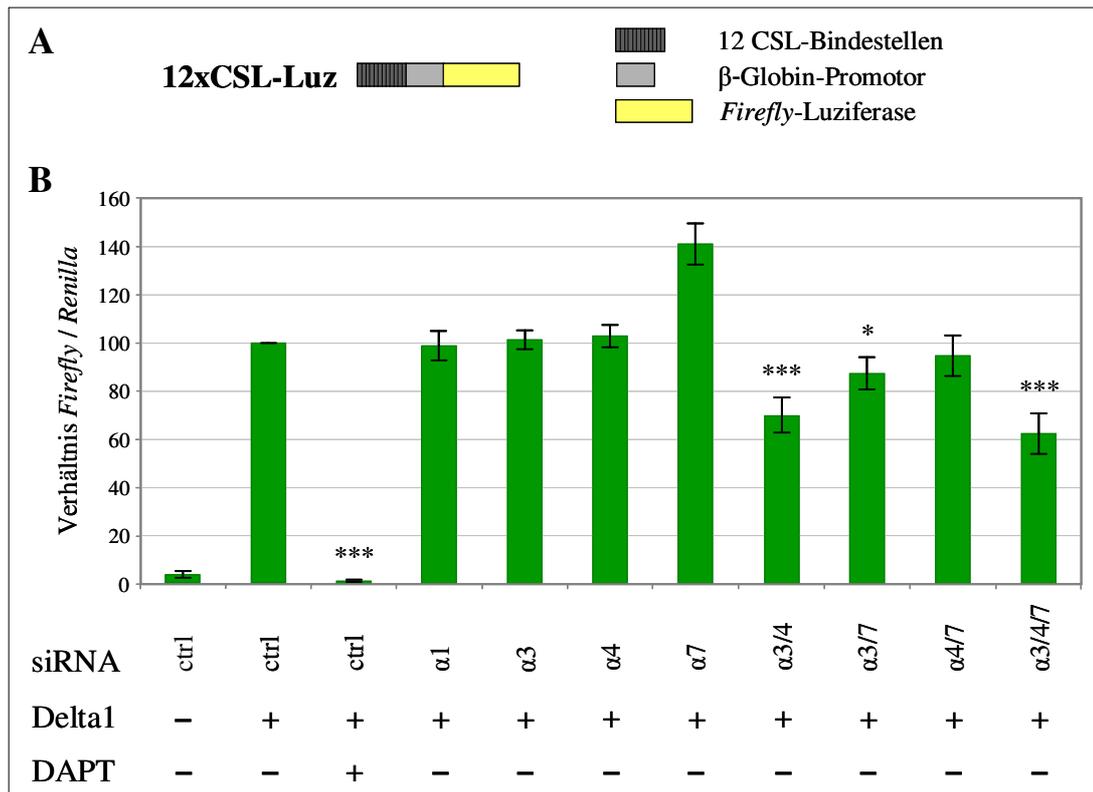


Abb. 4-11: Untersuchung der Bedeutung einzelner Importin α Isoformen bei der Notch1 Signalübertragung mit Hilfe des Luziferase-basierten Reportersystems.

(A) Schematische Darstellung des Notch1 Luziferase-basierten Reporters (12xCSL-Luz).

(B) Validierung der von α -Importinen abhängigen Notch1 Signalübertragung mittels Luziferase-Assay. C2C12 Myoblasten wurden zunächst mit Kontroll-siRNA (ctrl) bzw. siRNAs gegen die α -Importine (wie angegeben) und 24 h später mit Reporter 12xCSL-Luz, *Renilla*-Luziferase-Plasmid sowie Delta1 transfiziert. DAPT-behandelte Zellen dienen als Kontrolle. Nach weiteren 24 h erfolgte die Messung der Luziferase Aktivität in den Proteinextrakten. Die erhaltenen Werte wurden auf die ermittelte *Renilla*-Luziferase Aktivität normalisiert. Alle Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD von fünf unabhängigen Experimenten ($n = 5$). Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: $p < 0.05$ *, $p < 0.001$ ***.

In C2C12 Myoblasten, die ektopisch Delta1 exprimierten, konnte eine 25-fache Stimulierung des Reporters festgestellt werden, was die gegenseitige Aktivierung der endogenen Notch1 Rezeptoren benachbarter Zellen widerspiegelt. Als Beweis für die Spezifität des Reporters wurden die C2C12 Myoblasten mit dem γ -Sekretase-Hemmer DAPT behandelt. Unter diesen Bedingungen konnte die Notch1 Signalübertragung nahezu vollständig unterdrückt werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Verringerung der Importin $\alpha 1$ Expression keine Änderung der Notch1 Aktivität. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der GST-Pulldown-Experimente (Abbildung 4-5 und 4-6), in denen keine Interaktion zwischen Importin $\alpha 1$ und NICD ermittelt wurde. Auch nach Senkung der Proteinmengen von Importin $\alpha 3$ oder $\alpha 4$ blieb die Notch1 Signalübertragung unverändert, was auf eine redundante Funktion der beiden Isoformen beim Transport von NICD in den Zellkern hindeutete. Bei verringerter Importin $\alpha 7$ Expression konnte sogar eine Erhöhung der Notch1 Aktivität beobachtet werden. Wahrscheinlich besitzt diese Isoform eine weitere Funktion bei der Regulation der Notch1 Signalübertragung, wie zum Beispiel dem Kernimport eines Korepressors oder negativen Modulators. Wurden in C2C12 Myoblasten allerdings die Importine $\alpha 3$ und $\alpha 4$ zusammen herunterreguliert, ergab sich eine verringerte Stimulierung des Reporters. Diese konnte durch zusätzlich reduzierte Importin $\alpha 7$ Proteinmengen weiter geschwächt werden. Außerdem zeigte auch die kombinierte Senkung der Importine $\alpha 3$ und $\alpha 7$ eine geringe, aber dennoch signifikante Verringerung der Notch1 Aktivität. Dahingegen hatten verminderte Proteinmengen der Importine $\alpha 4$ und $\alpha 7$ zusammen keine Auswirkung.

Zusammenfassend wurde bei diesem Experiment hauptsächlich die Beteiligung der Importine $\alpha 3$ und $\alpha 4$ an der endogenen Notch1 Signalübertragung in C2C12 Myoblasten festgestellt. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass vor allem diese beiden Importin α Isoformen den Kernimport von NICD *in vivo* vermitteln.

Spezifität und Effizienz der verwendeten siRNAs wurde mittels Western Blot und anschließender immunochemischer Detektion überprüft. In Abbildung 4-12 ist repräsentativ das Ergebnis von einem der fünf unabhängig durchgeführten Experimente, die jeweils das gleiche Resultat zeigten, dargestellt. Jede siRNA verringerte selektiv die Expression einer bestimmten Importin α Isoform, auch wenn zwei beziehungsweise drei verschiedene siRNAs in Kombination zur Anwendung kamen. Jedoch ließ sich in keiner Probe die vollständige Abwesenheit des entsprechenden Proteins feststellen. Das

könnte erklären, warum nach einer gleichzeitigen Senkung der Importin $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ Proteinmengen immer noch eine Stimulierung des Reporters von 60 % nachweisbar war. Zudem wurde eine schlechte Effizienz der siRNA gegen Importin $\alpha 7$ in Kombination mit Importin $\alpha 4$ -siRNA nachgewiesen, was eine mögliche Ursache für den fehlenden Effekt auf die Notch1 Signalübertragung bei der Reporter-gen-Analyse sein könnte.

Als Ladekontrolle diente die immunochemische Detektion von β -Aktin.

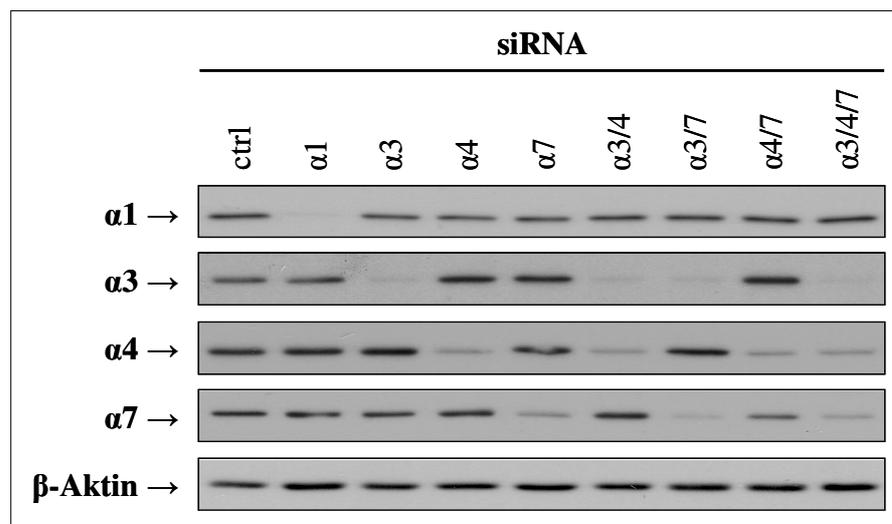


Abb. 4-12: *Western Blot Analyse zur Überprüfung der Spezifität und Effektivität siRNA-vermittelter Herunterregulierung der Importin α Expression.*

Proteine der verschiedenen C2C12 Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Membran mit Importin α -spezifischen Antikörpern markiert. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

Einen weiteren Beweis für die Beteiligung der Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ an der endogenen Notch1 Signalübertragung lieferten Analysen der Expression des *Hey1*-Gens in C2C12 Myoblasten. Dieses Notch1 Zielgen wird durch NICD positiv reguliert [20;94]. Zunächst wurden C2C12 Myoblasten entweder mit Kontroll-siRNA oder einer Kombination der siRNAs gegen die Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ transfiziert. Um die Expression von Hey1 zu induzieren, erfolgte nach 24 h die Transfektion der Zellen mit dem Delta1-kodierenden Expressionsplasmid. Zur Bestimmung der Hey1-Transkriptmengen wurde eine quantitative Real Time PCR durchgeführt. Die Messwerte sind in Abbildung 4-13 als Diagramm dargestellt. Alle darin gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Resultate dieser Messungen spiegeln die Ergebnisse der Reporter-gen-Analyse wider (Abbildung 4-11 B).

Die Stimulierung von Notch1 aufgrund der ektopischen Expression von Delta1 in den C2C12 Myoblasten führte zu erhöhten Hey1-Transkriptmengen. Im Vergleich dazu sank die Expression von Hey1 nach einer Behandlung der Zellen mit dem γ -Sekretase-Hemmer DAPT auf 20 %. Diese Negativkontrolle verdeutlichte erneut die Notch1-Abhängigkeit des Versuchs. Wurden die Proteinmengen der drei Importin α Isoformen herunterreguliert, zeigte sich ebenfalls eine reduzierte Expression von Hey1. Dies deutete darauf hin, dass der Transport von NICD in den Zellkern verringert war und somit einen negativen Einfluss auf die Transkription dieses Notch1 Zielgens hatte.

Zudem ist im unteren Teil der Abbildung 4-13 eine RT-PCR zur Visualisierung der Expression von Hey1 in den verschiedenen Proben dargestellt. Als Kontrolle diente die Amplifikation des Haushaltsgens Cyclophilin (Cyp).

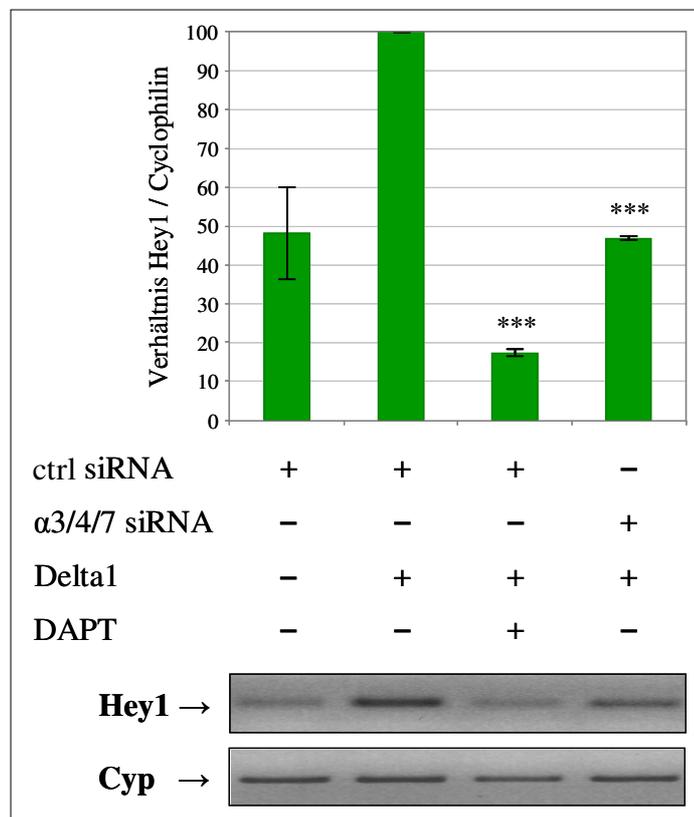


Abb. 4-13: Analyse der mRNA-Spiegel von Hey1 in C2C12 Myoblasten mittels qRT-PCR.

C2C12 Myoblasten wurden zunächst mit Kontroll-siRNA (ctrl) bzw. einem Gemisch der siRNAs gegen die Importine α 3, α 4, α 7 und anschließend mit Delta1 transfiziert (wie angegeben). Als Kontrolle erfolgte die Behandlung der Zellen mit DAPT. Hey1-Transkriptmengen wurden nach RNA Isolation mittels quantitativer Real Time PCR bestimmt. Alle Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD von drei unabhängigen Experimenten (n = 3). Signifikanz nach zweiseitigem Student's t-Test: p < 0.001 ***.

Abschließend sollte die Bedeutung der Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ für den Transport von NICD in den Zellkern mittels Immunzytochemie gezeigt werden. Hierfür wurden C2C12 Myoblasten erst mit siRNAs gegen die drei Importin α Isoformen und anschließend mit einem Expressionsplasmid, das für Notch Δ E-EGFP kodierte, transfiziert. Als Vergleich dienten Zellen mit eingebrachter Kontroll-siRNA. Am Folgetag wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation der EGFP-Signale mikroskopisch bestimmt. Repräsentative Resultate sind in Abbildung 4-14 dargestellt. In C2C12 Myoblasten, transfiziert mit Kontroll-siRNA, war die Fluoreszenz von NICD-EGFP hauptsächlich im Zellkern detektierbar. Im Gegensatz dazu ließ sich NICD-EGFP in Zellen, transfiziert mit siRNAs gegen die Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$, überwiegend im Zytoplasma der Zellen nachweisen. Somit konnte *in vivo* eine Beeinträchtigung des Kernimports von NICD aufgrund fehlender Importin α Proteine visualisiert werden.

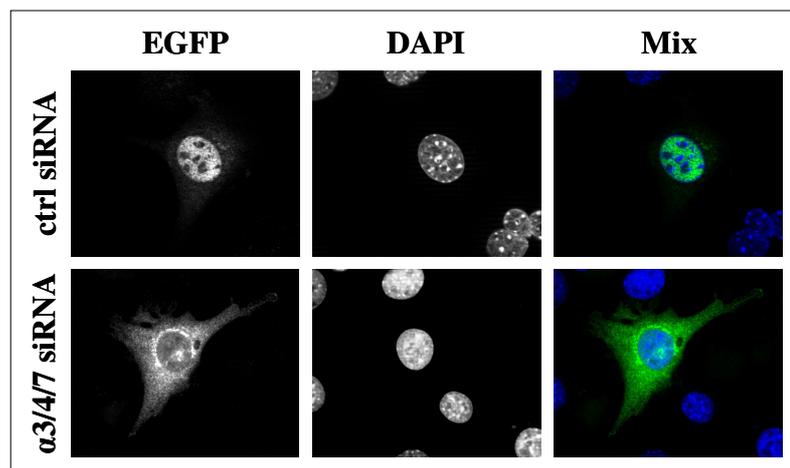


Abb. 4-14: Immunzytochemische Analyse der Lokalisation von NICD in C2C12 Zellen ohne und mit verringerter Expression der Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$.

C2C12 Myoblasten, die ektopisch Notch Δ E-EGFP exprimierten, waren entweder mit Kontroll-siRNA (ctrl) oder einem Gemisch der siRNAs gegen die Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ transfiziert. Die immunzytochemische Analyse der Zellen erfolgte durch Färbung gegen EGFP (grün). Die Zellkerne wurden mittels des Farbstoffes DAPI (blau) sichtbar gemacht.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse in diesem Kapitel, dass in C2C12 Myoblasten die Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ den Transport von NICD in den Zellkern vermitteln. Zudem wurde festgestellt, dass ein reduzierter Kernimport von NICD physiologische Auswirkungen hat, da eine Behinderung der nachgelagerten Notch1 Signalweiterleitung gezeigt werden konnte.

4.5 Analyse von Notch1 in adulten hippocampalen Neuronen

Das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Erweiterung der Kenntnisse über Notch1 in Nervenzellen. Als Ausgangspunkt hierfür dienten Studien, die eine Funktion des Rezeptors bei der Gedächtnisbildung und synaptischer Plastizität zeigten [38;39]. Daher wurde postuliert, dass Notch1 an der Synapse prozessiert und freigesetztes NICD retrograd zum Zellkern transportiert wird. Um diese Vermutungen zu untermauern, sollte analysiert werden, wo Notch1 in Neuronen lokalisiert ist, wo die Aktivierung stattfindet und ob der klassische Importin α/β 1-Transportweg auch in Neuronen den Kernimport von NICD vermittelt.

4.5.1 Etablierung einer hippocampalen Primärzellkultur

Für die angestrebten Experimente musste eine primäre Neuronenkultur etabliert werden. Hierzu wurden hippocampale Neuronen verwendet, da bereits aus der Literatur bekannt war, dass diese Zellen endogen Notch1 exprimieren [95]. Je nach Notwendigkeit kamen Kulturen niederer und höherer Dichte der Neuronen zur Anwendung.

Die Entwicklung der Nervenzellen zeichnete sich durch sukzessive Entwicklungs- und Polarisierungsphasen aus [96]. Dabei ausgebildete Nervenfortsätze unterschieden sich morphologisch und biochemisch als Dendriten und Axone. Eine Charakterisierung der Neuronen erfolgte nach 7 Tagen in Kultur (7 *days in vitro* oder 7 DIV) durch immunzytochemische Färbungen mit gegen die neuronalen Proteine MAP2, Tau-1 und Synaptophysin gerichteten Antikörpern. Dabei konnte das Mikrotubuli-assoziierte Protein MAP2 spezifisch im Zellkörper und in Dendriten der Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4-15 A und B). Im Gegensatz dazu sollte die Markierung von Tau-1 zur Identifizierung der Axone dienen. Leider wurde die spezifische subzelluläre Verteilung *in vivo* in kultivierten Neuronen nicht aufrechterhalten. Da neben den Axonen ebenso Dendriten angefärbt wurden (Abbildung 4-15 A), musste nachfolgend auf die Verwendung von Tau-1 als axonalen Marker verzichtet werden. Mittels der Lokalisation von Synaptophysin konnte in Neuronen nach 7 DIV eine intensive Ausbildung von synaptischen Zellkontakten gezeigt werden. Diese ließen sich jeweils entlang der gesamten Zelle nachweisen (Abbildung 4-15 B). Das beobachtete punktförmige Muster der Synaptophysin-Immunoreaktivität ist dabei typisch für kultivierte hippocampale Nervenzellen [97].

Insgesamt deutete diese Analyse auf eine normale Entwicklung der Neuronen und somit auf eine Verwendbarkeit der Zellen für die nachfolgenden Untersuchungen hin.

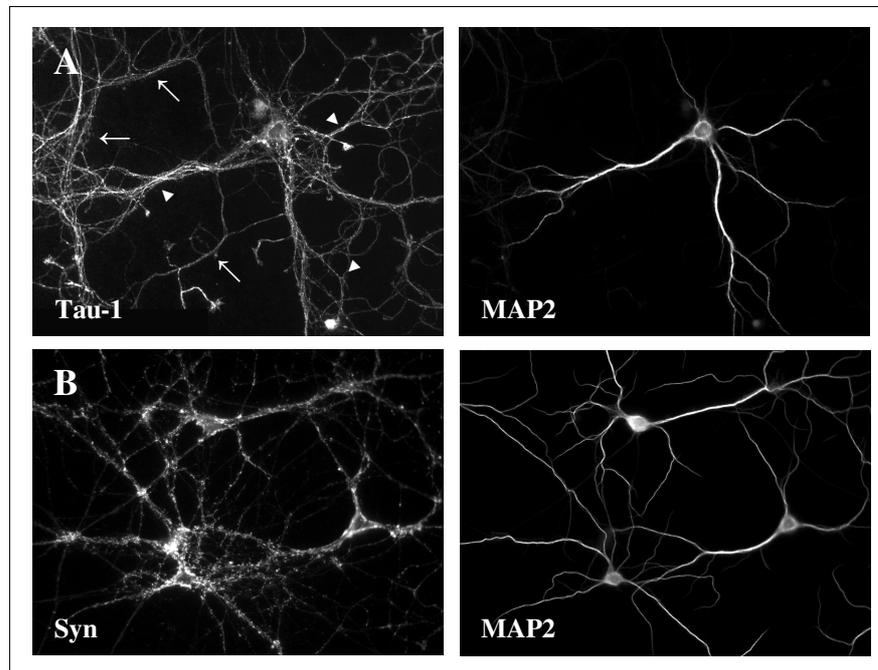


Abb. 4.15: *Charakterisierung der primären hippocampalen Neuronen mittels Immunzytochemie.*

Immunzytochemische Analyse von primären hippocampalen Neuronen einer LD-Kultur nach 7 DIV durch die Färbungen gegen Tau-1 und MAP2 (A) bzw. Synaptophysin (Syn) und MAP2 (B). Anhand der Signale von MAP2 konnten Dendriten (Pfeilköpfe) und Axone (Pfeile) der Neuronen definiert werden.

4.5.2 Lokalisation von Notch1 und NICD in adulten hippocampalen Neuronen

Die Frage, wo Notch1 in Neuronen lokalisiert ist, sollte mittels Immunzytochemie geklärt werden. Hierfür wurden zunächst Antikörper verschiedener Firmen getestet, von denen jedoch keiner endogenes Notch1 spezifisch detektieren konnte. Aus diesem Grund erfolgte in unserem Auftrag die Immunisierung eines Kaninchens mit zwei selbst ausgewählten Peptiden. Deren Sequenzen entsprachen Bereichen der intrazellulären Domäne des Rezeptors, die konserviert zwischen den Notch1 Proteinen verschiedener Spezies und im Vergleich zu anderen Notch Isoformen unterschiedlich waren. Das erhaltene polyklonale Notch1-Antiserum wurde nachfolgend gegen die Peptide affinitätsgereinigt. Die Überprüfung des Antikörpers zeigte allerdings nicht genügend Spezifität für immunzytochemische Färbungen (Resultate nicht dargestellt).

Daher war die Bestimmung der subzellulären Lokalisation lediglich in hippocampalen Neuronen mit ektopischer Expression von Notch1 möglich. Dafür wurden die Zellen

nach 7 DIV mit einem Plasmid transfiziert, welches für das Fusionsprotein Notch1-myc kodierte. Nach 16 h wurden die Neuronen mit Antikörpern gegen myc und MAP2 als dendritischen Marker immunzytochemisch gefärbt. Wie in der repräsentativ dargestellten Nervenzelle in Abbildung 4-16 A konnten die Signale von Notch1-myc in Dendriten sowie im Axon festgestellt werden.

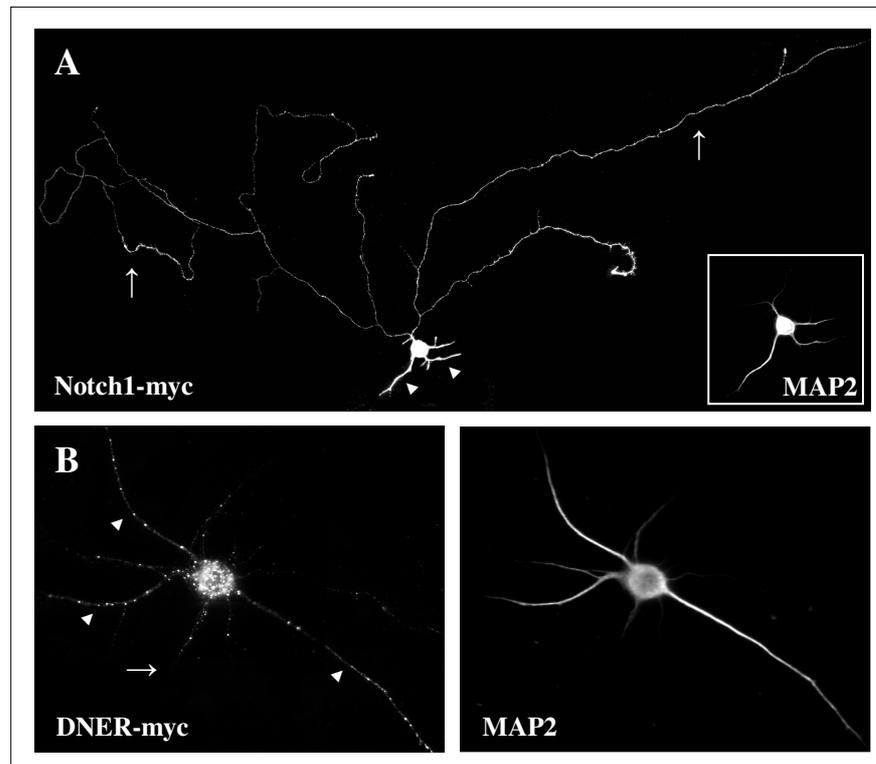


Abb. 4-16: Analyse der Lokalisation von Notch1 in primären hippocampalen Neuronen.

Polarisierte Neuronen (7 DIV) wurden mit Notch1-myc (A) oder DNER-myc (B) cDNA transfiziert. Nach 16 h erfolgte die immunzytochemische Färbung der Zellen mit Antikörpern gegen myc sowie MAP2. Anhand der Signale von MAP2 konnten Dendriten (Pfeilköpfe) und das Axon (Pfeile) der Neuronen definiert werden.

Als Kontrolle dienten hippocampale Neuronen, die mit DNER-myc (*Delta/Notch-like EGF-related receptor*) cDNA transfiziert waren. Dabei handelt es sich um ein Protein, das in neuronalen Zellen spezifisch an der Plasmamembran sowie in Endosomen im somatodendritischen Bereich lokalisiert ist [98]. Nach immunzytochemischer Markierung konnte exogenes DNER-myc nur in Dendriten und im Zellkörper festgestellt werden (Abbildung 4-16 B). Im Axon der Nervenzelle, das durch die fehlende MAP2-Färbung definiert wurde, war keine Fluoreszenz nachweisbar. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die ektopische Expression der Proteine in diesem Fall nicht zur Sättigung der Sortiermaschine führte und daher aussagekräftig ist.

Außerdem erfolgte eine Untersuchung der Lokalisation von NICD in hippocampalen Neuronen. Nach Transfektion der Zellen mit dem Expressionsplasmid, das für Notch Δ E kodierte, wurden die Zellen immunzytochemisch gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-17 gezeigt.

Wie erwartet konnte NICD hauptsächlich im Zellkern detektiert werden. Darüber hinaus ließ sich eine Lokalisation des Proteins in distalen Neuriten und hierbei besonders an der Spitze des wachsenden Axons feststellen. Dieses Vorkommen deutete auf die Aktivität von γ -Sekretase in diesem Bereich hin.

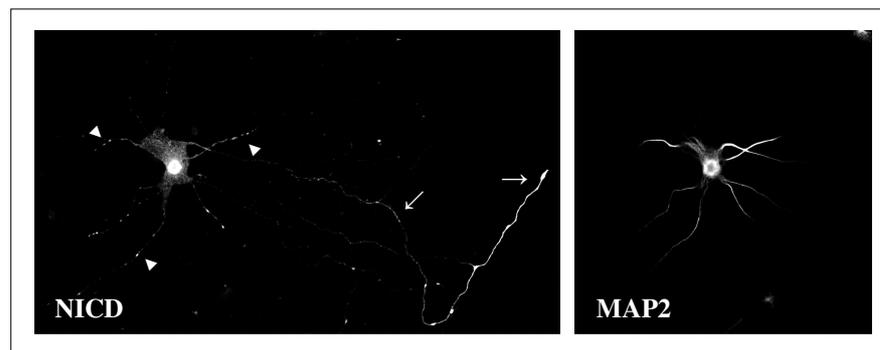


Abb. 4-17: Analyse der Lokalisation von NICD in primären hippocampalen Neuronen.

Polarisierte Neuronen (7 DIV) wurden mit einem Plasmid, das für Notch Δ E kodierte, transfiziert und 16 h später mit Antikörpern gegen NICD sowie MAP2 immunzytochemisch markiert. Anhand der Signale von MAP2 konnten Dendriten (Pfeilköpfe) und das Axon (Pfeile) des Neurons unterschieden werden.

Zusammenfassend scheint Notch1 in die Dendriten und Axone hippocampaler Neuronen transportiert und dort auch prozessiert zu werden. Da bereits für andere Proteine mit klassischem NLS ein retrograder Transport zum Zellkern in Neuriten gezeigt werden konnte [76], sollte nachfolgend diese Möglichkeit für NICD untersucht und eine Beteiligung des klassischen Importin α/β 1-Transportweges überprüft werden.

4.5.3 Nachweis der Interaktion zwischen NICD und α -Importinen aus Gehirn und hippocampalen Neuronen der Maus

Um die Fragestellung beantworten zu können, ob auch in Neuronen die Importine α 3, α 4 und α 7 den Kernimport von NICD vermitteln, waren zunächst *in vitro* Bindungsstudien zum Nachweis der Interaktion zwischen den Proteinen erforderlich. Hierfür wurde aufgereinigtes GST-NICD mit Gehirn-Proteinlysat der Maus inkubiert.

Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte mit Importin α -spezifischen Antikörpern.

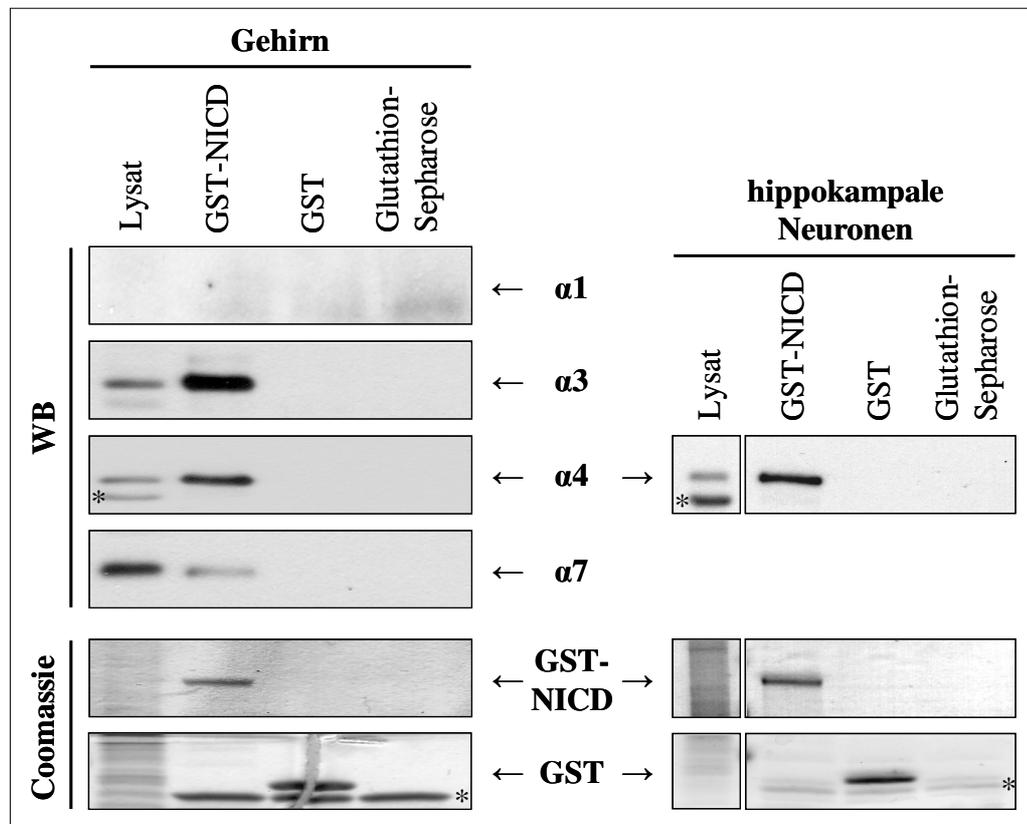


Abb. 4-18: *In vitro* Bindungsstudien zum Nachweis der Interaktion zwischen NICD und α -Importinen aus Gehirn und hippocampalen Neuronen.

Rekombinant exprimiertes GST-NICD und GST wurde an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit Proteinextrakt von Mausgehirn bzw. hippocampalen Neuronen inkubiert. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und entweder nach dem Transfer auf eine Membran mit Antikörpern gegen α -Importine markiert (WB, oben) oder mit Coomassie angefärbt (unten). Sterne markieren unspezifische Signale (*).

Wie in der Abbildung 4-18, links deutlich zu sehen ist, konnte eine direkte Bindung der endogen exprimierten Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ aus dem Mausgehirn an NICD bestätigt werden. Darüber hinaus waren unterschiedliche Affinitäten dieser Isoformen gegenüber NICD erkennbar. Aus dem Verhältnis von Lysat zu GST-NICD-Pulldown der jeweiligen Importin-Signale ergab sich für die Importine $\alpha 3$ und $\alpha 4$ eine starke beziehungsweise für Importin $\alpha 7$ eine schwache Interaktion mit NICD. GST und Glutathion-Sepharose wurden in jedem Experiment als Negativkontrollen mitgeführt. In keiner dieser Proben war auf der Membran ein Signal detektierbar. Der Nachweis von Importin $\alpha 1$ ergab weder im Lysat noch in der GST-Pulldown-Probe eine Bande. Das Ergebnis wurde durch frühere Studien unterstützt, in denen ebenfalls keine Expression

von Importin $\alpha 1$ im Gehirn mittels Northern Blot sowie immunzytochemischen Analysen nachweisbar war [49;99]. Auf die Untersuchung von Importin $\alpha 5$ musste aufgrund fehlender Antikörper wieder verzichtet werden.

Zudem wurde beispielhaft die *in vitro* Interaktion zwischen GST-gekoppelten NICD und Importin $\alpha 4$ aus dem Zellextrakt von hippocampalen Neuronen gezeigt (Abbildung 4-18, rechts). Aufgrund der hohen Mengen an benötigten Neuronen für einen GST-Pulldown mit den entsprechenden Kontrollen ($2 \cdot 10^7$ Zellen) war eine Analyse der anderen Importin α Proteine nicht möglich.

Zusammenfassend konnten die Resultate der GST-Pulldown-Experimente in C2C12 Myoblasten auch für die α -Importine aus dem Gehirn der Maus wiederholt werden. Die Bindung der Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ an NICD *in vitro* deutete somit ebenfalls auf eine Rolle dieser Isoformen für den Kernimport von NICD in Neuronen hin.

4.5.4 Visualisierung endogener Notch1 Aktivität in hippocampalen Neuronen

Als Vorbereitung für künftige Untersuchungen zum Einfluss der α -Importine auf die Notch1 Signalübertragung in Neuronen sollte ein geeigneter Reporter zur Detektion der endogenen Notch1 Aktivität gefunden werden. Hierfür wurden das Fluoreszenz- sowie das Luziferase-basierte Reportersystem getestet (siehe Abbildung 4-8 und 4-11 A). Nach 3 DIV wurden die Neuronen mit dem entsprechenden Reporterkonstrukt transfiziert und, um endogenes Notch1 zu aktivieren, mit Delta1-exprimierenden HEK293E Zellen in hoher Dichte kokultiviert. Nach 24 h erfolgte entweder die immunzytochemische Färbung der Zellen oder Messung der Reporter Aktivität mittels Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System.

Das Ergebnis der mikroskopischen Auswertung ist in Abbildung 4-19 A dargestellt. Eine Expression des fluoreszierenden Reporter-Proteins ließ sich in Neuronen feststellen, die im engen Kontakt mit HEK293E Zellen standen. Somit konnte die Aktivierung von endogenem Notch1 durch Liganden benachbarter HEK293E Zellen nachgewiesen werden. Ob in Neuronen die Sensitivität des Fluoreszenz-basierten Reportersystems zur Analyse der Bedeutung einzelner α -Importine für die Notch1 Signalübertragung ausreicht, ist in weiteren Experimenten zu klären.

Abbildung 4-19 B zeigt die graphische Darstellung der mittels Luziferase-Reporter gemessenen Notch1 Aktivität in Neuronen. Mit Hilfe dieser Methode konnte ebenfalls

eine Stimulierung des Reporters nach Kokultivierung der Nervenzellen mit Delta1-exprimierenden HEK293E Zellen detektiert werden. Als Negativkontrolle diente die Behandlung der Zellen mit DAPT. Zwar wurde durch den γ -Sekretase-Hemmer die Notch1 Signalübertragung verringert, aber nicht vollständig unterdrückt. Das Niveau der Reporter Aktivität in Abwesenheit von Delta1 wurde hierbei nicht erreicht. Insgesamt scheint das Luziferase-basierte Reportersystem in Neuronen anwendbar, jedoch weniger sensitiv als in C2C12 Myoblasten zu sein (Abbildung 4-11 B).

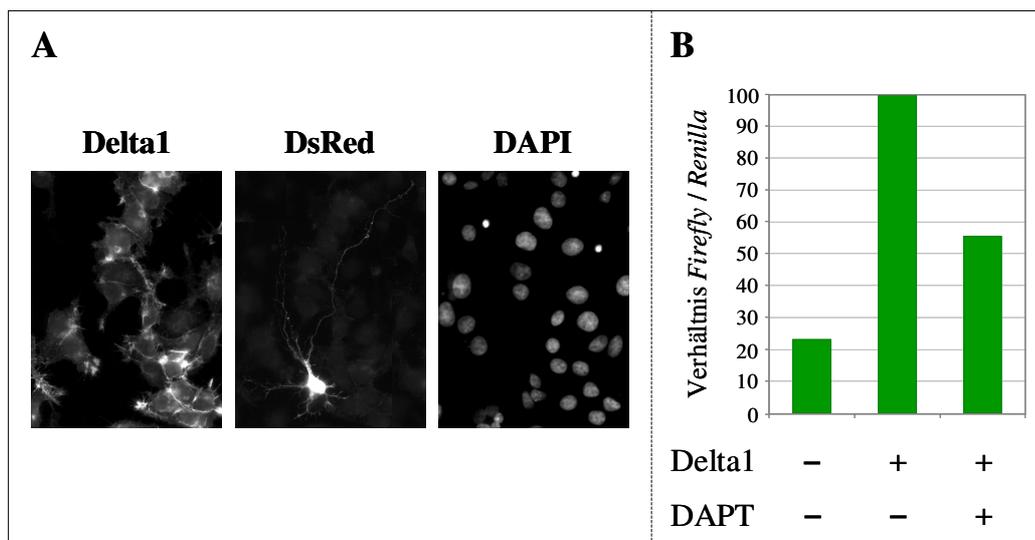


Abb. 4-19: Detektion endogener Notch1 Signalübertragung in Neuronen mit zwei verschiedenen Reportersystemen.

Neuronen wurden nach 3 DIV entweder mit dem Fluoreszenz-Reporter 12xCSL-DsRed oder dem Luziferase-Reporter 12xCSL-Luz und *Renilla*-Luziferase-Plasmid transfiziert. Zur Aktivierung von endogenem Notch1 erfolgte die Kultivierung zusammen mit HEK293E Zellen, die Delta1 exprimierten. (A) Immunzytochemische Färbung der Zellen mit anti-HA Antikörper zur Markierung von Delta1 und DAPI zur Visualisierung der Zellkerne. Die Expression von DsRed in Neuronen zeigt die Aktivierung von Notch1 durch Delta1-exprimierende Zellen. (B) Validierung der Notch1 Aktivität mittels Luziferase-Assay. Hierfür erfolgte nach 24 h die Messung der Luziferase Aktivität in den Proteinextrakten. Die erhaltenen Werte wurden auf die ermittelte *Renilla*-Luziferase Aktivität normalisiert. Die Daten entsprechen einem Experiment und enthalten daher keine Fehlerbalken.

Zusammenfassend wurde mit Hilfe der Reporter-Gen-Analysen gezeigt, dass endogenes Notch1 der Neuronen mittels Delta1 kokultivierter HEK293E Zellen aktiviert werden kann. Somit ist ein Einsatz der beschriebenen Reportersysteme zur Detektion der neuronalen Notch1 Signalübertragung möglich. Zum Nachweis von Unterschieden in der Notch1 Aktivität nach spezifischer Verringerung der α -Importin Expression sind jedoch im Hinblick auf die Empfindlichkeit noch Optimierungen der Experimente nötig.

5. Diskussion

Der Notch Signalweg ist sowohl für Entwicklungs- als auch für Differenzierungsprozesse von essentieller Bedeutung. Reguliert werden Vorgänge in einer Vielzahl wichtiger Organe, wobei speziell das Gehirn ein bedeutendes und interessantes Beispiel darstellt [24]. Dementsprechend ist es nicht überraschend, dass Mutationen in Genen, die für Komponenten dieser Signalkaskade kodieren, verschiedene Entwicklungsstörungen und Krankheiten zur Folge haben (zusammengefasst in [100]).

Eine Besonderheit des Signalweges ist die Funktion von Notch als Oberflächenrezeptor und direkter Regulator der Genexpression. Die Übertragung von Notch Signalen erfordert die proteolytische Freisetzung der intrazellulären Domäne, welche anschließend in den Zellkern transportiert wird und dort die Transkription zellspezifischer Gene anschaltet. Somit stellt der Kernimport von NICD eine Schlüsselrolle für die Ausübung der biologischen Funktion von Notch dar.

5.1 Die intrazelluläre Domäne von Notch1 enthält ein funktionelles klassisches Kernlokalisierungssignal

Proteine, die aktiv in den Zellkern transportiert werden, besitzen ein Kernlokalisierungssignal. Bereits im Jahr 1992 beschrieben Stifani *et al.* ein potentielles bipartites cNLS innerhalb des zytoplasmatischen Abschnitts von Notch1. Dabei handelte es sich um eine unerwartete Erkenntnis, da zu diesem Zeitpunkt keinerlei Hinweise für eine Kernlokalisierung von Notch1 *in vivo* existierten [101]. Im Zuge weiterer Untersuchungen konnten der Transport von NICD in den Zellkern gezeigt und darüber hinaus drei weitere potentielle cNLS identifiziert werden, die allesamt monopartit sind [79;82;102].

Die eigene Analyse der Primärstruktur von Notch1 erfolgte mittels der Programme *PredictNLS* sowie *PSORT II* und bestätigte die Existenz der vier potentiellen cNLS, welche in dieser Arbeit als NLS1 bis NLS4 bezeichnet werden. Genaue Kenntnisse zur Bedeutung der einzelnen Sequenzen für den Kerntransport von NICD waren bisher nicht bekannt. Zuvor durchgeführte Untersuchungen lieferten zwar erste Hinweise hierfür, zeigten jedoch untereinander verschiedene Resultate. Daher stellte die Identifizierung des funktionellen Transportsignals in NICD das erste Ziel der

vorliegenden Arbeit dar. Mit Hilfe von Mutationsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass ausschließlich das NLS3 für den Import von NICD in den Zellkern essentiell ist. Ein Austausch der basischen Aminosäuren zu Alanin-Resten (mNLS3) führte zu einem verringerten Kerntransport, weshalb sich das Protein bevorzugt im Zytoplasma von transfizierten Zellen feststellen ließ. Im Gegensatz dazu hatten Deletion beziehungsweise Mutation der drei weiteren potentiellen cNLS keine Auswirkungen auf die Kernlokalisierung von NICD. In dem verwendeten Notch ΔE Konstrukt dieser Studie fehlten die NLS1 und NLS2 Sequenzen aufgrund der entfernten RAM-Domäne. Die mikroskopische Auswertung ergab dennoch eine ausschließlich nukleäre Verteilung von NICD dieses Konstruktes, weshalb die beiden cNLS als funktionelle Transportsignale ausgeschlossen werden können. Das Resultat wurde teilweise durch die Untersuchungen von Aster *et al.* unterstützt. Auch hierbei war keine Veränderung der intrazellulären Lokalisation von NICD nach der Entfernung des NLS2 feststellbar [80]. Weiter deuten die Mutationsanalysen dieser Gruppe darauf hin, dass NLS3 und NLS4 zusammen als Transportsignal fungieren, was die Ergebnisse der vorliegenden Studie allerdings nicht bestätigten. Keine der eingeführten Mutationen innerhalb des potentiellen bipartiten NLS4 (mNLS4 a , b , $a+b$) hatte Auswirkungen auf die Kernlokalisierung von NICD. Ebenso konnte für keine der NLS4 Veränderungen eine zusätzliche Verstärkung der zytoplasmatischen Verteilung von NICD beobachtet werden, wenn parallel das NLS3 mutiert war (Ergebnis nicht dargestellt). In Übereinstimmung hiermit demonstrierten Jeffries *et al.*, dass die funktionelle NLS Sequenz aminoterminal der Ankyrin-Domäne von Notch1 liegt und das NLS4 keine Bedeutung als Transportsignal hat [81]. Die Unterschiede in den Resultaten von Aster *et al.* verglichen mit dieser Studie ergeben sich möglicherweise aus den verschiedenen NLS3 Mutationen. Für die Analysen von Aster *et al.* wurden die beiden Lysin-Reste an den Positionen 1 und 2 ausgetauscht (NLS3 $_{KKFR}$ zu NLS3 $_{LEFR}$). Allerdings ist die basische Aminosäure an Position 4 der monopartiten Konsensussequenz (siehe Abbildung 5-1) ebenfalls für die Interaktion mit dem α -Importin von Bedeutung [103], weshalb das NLS3 $_{LEFR}$ noch teilweise funktionell sein könnte.

Darüber hinaus zeigte ein Vergleich des kanonischen NLS3 von Notch1 verschiedener Säugetierspezies die hohe Konservierung der Sequenz (Abbildung 5-1). Dies lieferte

einen weiteren Hinweis dafür, dass es sich um ein für die Funktion des Rezeptors wichtiges Signal handelt.

Konsensussequenz	K- (K/R) -X- (K/R)
Bos taurus:	²²⁸⁴ GLEA KKFR FE EP ₂₂₉₅
Equus caballus:	¹⁷⁴⁶ DLET KKFR FE ES ₁₇₅₇
Homo sapiens:	¹⁸¹⁷ DLET KKFR FE EP ₁₈₂₈
Mus musculus:	¹⁸⁰⁷ DLET KKFR FE EP ₁₈₁₈
Pan troglodytes:	¹⁸¹⁸ DLET KKFR FE EP ₁₈₂₉
Rattus norvegicus:	¹⁸²⁴ DLET KKFR FE EP ₁₈₃₅

Abb. 5-1: Sequenz-Vergleich des NLS3 von Notch1 verschiedener Säugetierspezies.

Dargestellt ist die Konsensussequenz eines monopartiten cNLS [58] und das NLS3 einschließlich der vier amino- und carboxyterminal flankierenden Aminosäuren von Notch1 verschiedener Säugetierspezies. Die basischen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) der Sequenzen sind fett gedruckt. Erkennbar ist die absolute Konservierung des NLS3.

5.2 Der klassische Importin α/β 1-Transportweg vermittelt den Kernimport von NICD

Der Kernimport von Proteinen, die ein cNLS besitzen, erfolgt durch den klassischen Importin α/β 1-Transportweg. Hierbei fungiert Importin α als Adapterprotein für die Substrat-Bindung und Importin β 1 vermittelt den Transport durch die Kernporenkomplexe in den Zellkern. Da das identifizierte funktionelle NLS3 der Konsensussequenz eines monopartiten cNLS entspricht, wurde diese Möglichkeit ebenso für die intrazelluläre Domäne von Notch1 überprüft.

Um den Kerntransportweg zu charakterisieren, wurde NICD als GST-Fusionsprotein exprimiert und nach der Aufreinigung in einem *in vitro* Kernimport-Assay verwendet [88]. Diese Methode basiert auf einer selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran von HeLa Zellen und dem damit verbundenen Verlust des endogenen Zytoplasmas. Die anschließende Inkubation der Zellen mit dem Imports substrat und potentiellen Importfaktoren ermöglicht die Analyse des Kerntransportmechanismus. Hierbei konnte erstmals bestätigt werden, dass NICD durch die Importine α und β 1 zusammen in den Zellkern importiert wird. Darüber hinaus wurden alternative Transportwege mittels der direkten Bindung durch Transportin oder Importin β 1 ausgeschlossen. Einzig die Inkubation der Zellen mit Importin α allein zeigte eine schwache Kernlokalisation von

GST-NICD. Die Ursache hierfür sind endogene Importin $\beta 1$ Proteine, die aufgrund der Wechselwirkung mit den Kernporenkomplexen beim Auswaschen des Zytoplasmas nicht entfernt wurden. Somit konnten sich im geringen Maße trimere Importkomplexe ausbilden, welche den Transport des Substrats in den Zellkern vermittelten [55].

Für die Interaktion mit Importin $\beta 1$ existieren in der Maus die fünf Adapterproteine Importin $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$. Neben der gewebespezifischen Expression sind die verschiedenen Isoformen durch unterschiedliche Substratspezifitäten bezüglich der zu befördernden Proteine charakterisiert [49;104]. Obwohl einige Substrate, wie Nukleoplasmin, von allen α -Importinen gebunden werden, sind eine Reihe von Proteinen bekannt, deren Kernimport von bestimmten Isoformen vermittelt wird [50-52]. Aus diesem Grund wurden als nächster Schritt dieser Arbeit *in vitro* Bindungsstudien zur Identifizierung der NICD-spezifischen α -Importine durchgeführt. Mit Hilfe von GST-Pulldown-Experimenten konnte die NLS3-abhängige Interaktion zwischen NICD und den Importinen $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ festgestellt werden. Zudem waren unterschiedliche Bindungsintensitäten dokumentierbar, die auf variierende Affinitäten der α -Importine gegenüber dem Substrat hinweisen. So zeigte Importin $\alpha 4$ die stärkste und Importin $\alpha 7$ die schwächste Bindung an NICD. Allerdings kann hieraus nicht gleichzeitig der bevorzugte Kerntransport von NICD durch Importin $\alpha 4$ *in vivo*, wo viele Substrate um die Bindung an die α -Importine konkurrieren, abgeleitet werden. Köhler *et al.* demonstrierten, dass bereits die parallele Applikation von zwei Substraten in einem *in vitro* Kernimport-Assay zu auffallend veränderten Prioritäten der Importin α Isoformen gegenüber den zu befördernden Proteinen führt [52]. Daher scheint die Konkurrenz der Importsubstrate um die Bindung an das bevorzugte α -Importin eine Ebene für die Regulation des Kernimports darzustellen, die jedoch bei den durchgeführten *in vitro* Bindungsstudien nicht von Bedeutung war. Zudem sind die absoluten Expressionsniveaus der verschiedenen Importin α Isoformen in den Zellen nicht bekannt. Wahrscheinlich wird ein α -Importin trotz geringer Affinität bevorzugt für den Kernimport eines Substrats verwendet, wenn dessen Proteinmenge in der Zelle hoch ist.

Im Gegensatz dazu wurde keine Interaktion zwischen den GST-Fusionsproteinen von Importin $\alpha 1$ beziehungsweise $\alpha 5$ und NICD festgestellt. Dieses Resultat konnte allerdings für Importin $\alpha 5$ mangels eines spezifisch gegen die Isoform gerichteten Antikörpers nicht in einem GST-NICD-Pulldown bestätigt werden. Dieser fehlende Nachweis führte zu der Entscheidung, die nachfolgenden Analysen der vorliegenden

Arbeit unter Ausschluss von Importin $\alpha 5$ durchzuführen und nach Herstellung eines spezifischen Antikörpers zu wiederholen. Trotzdem besteht die Annahme, dass Importin $\alpha 5$ keine Bedeutung für den Kernimport von NICD hat.

Einen weiteren Beweis für die Interaktion zwischen den α -Importinen und NICD *in vitro* lieferte eine Koimmunopräzipitation. Allerdings war die Darstellung einer Wechselwirkung zwischen den endogenen Proteinen aufgrund der geringen Konzentration von NICD in den Zellen nicht möglich. Verschiedene Studien demonstrieren, dass im Zytoplasma sowie innerhalb des Zellkerns negative Modulatoren der Notch1 Signalübertragung die Ubiquitylierung und somit den Proteasom-abhängigen Abbau von NICD vermitteln [27;28], woraus sich schwer nachweisbare Proteinmengen an NICD ergeben. Außerdem handelt es sich bei der Interaktion zwischen Adapterprotein und Substrat um eine transiente Protein-Protein-Wechselwirkung, was die Koimmunopräzipitation von endogenem NICD zusätzlich erschwert. Durch die Verwendung von C2C12 Myoblasten, die ektopisch NICD-myc exprimierten, konnte jedoch beispielhaft die Bindung von Importin $\alpha 4$ an NICD bestätigt werden.

5.3 Die Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ vermitteln die Übertragung von Notch1 Signalen *in vivo*

Aufgrund der problematischen Detektion von endogenem NICD mittels Western Blot und Immunzytochemie wurde für die Beantwortung der Frage, ob die Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ den Kernimport von NICD *in vivo* vermitteln, ein spezifisches Notch1 Reportersystem etabliert. Das verwendete Konstrukt war durch einen synthetischen Promotor bestehend aus 12 CSL-Bindestellen in Verbindung mit einem Reporter gen charakterisiert. Der Einsatz eines synthetischen Promotors hat gegenüber einer endogenen Promotorregion, wie der des *Hes1*-Gens, den Vorteil, dass er die Notch1 Signalübertragung genauer widerspiegelt. Zum einen wird die Expression der Notch1 Zielgene wahrscheinlich durch weitere Signalkaskaden beeinflusst, was bei der Verwendung des Reporters ausgeschlossen werden kann [105]. Außerdem gewährleistet ein Promotor bestehend aus mehreren CSL-Bindestellen ein verbessertes Signal-Hintergrund-Verhältnis und ermöglicht die spezifische Aufzeichnung der kanonischen Notch1 Signalübertragung [106]. Gleichzeitig ausgelöste nicht-CSL-abhängige Formen des Signalweges werden nicht nachgewiesen [107]. Die Verwendung des Notch1

Reporters erlaubt somit die indirekte Analyse des Kerntransports von NICD. Zur Beantwortung der aufgestellten Fragen standen ein Fluoreszenz- und ein Luziferase-basiertes Reportersystem zur Verfügung.

Mit Hilfe des Fluoreszenz-basierten Reporters sollte die generelle Durchführbarkeit des Versuchs demonstriert werden. Aufgrund des fluoreszierenden Reporter-Proteins ist ein Nachweis der Notch1 Signalübertragung mit Einzelzell-Auflösung möglich [87]. Hierbei konnte eine Aktivierung der endogenen Notch1 Proteine festgestellt werden, wenn die C2C12 Myoblasten in einem engen Kontakt mit HEK293E Zellen standen, die ektopisch Delta1 exprimierten. Da dieser Ligand einzig Notch1 der Myoblasten stimuliert [108], kann ein unspezifisches Anschalten des Reporters durch andere Notch Isoformen ausgeschlossen werden. Die Behandlung der Kokultur mit dem γ -Sekretase-Hemmer sollte aufgrund der unterdrückten intramembranen Proteolyse die Freisetzung der intrazellulären Domäne von Notch1 verhindern. Unter diesen Bedingungen konnte keine Fluoreszenz nachgewiesen und somit die Spezifität des Reporters für den Nachweis der Notch1 Signalübertragung gezeigt werden.

Um die Bedeutung der verschiedenen ubiquitär exprimierten α -Importine für den Kernimport von NICD zu ermitteln, wurden deren Proteinmengen in den C2C12 Myoblasten mittels spezifischer siRNAs verringert. Hierbei konnten nach der Herunterregulierung einer Isoform keine veränderten Expressionsniveaus, zum Beispiel durch gesteigerte Syntheseraten, der anderen α -Importine beobachtet werden. Daraus lässt sich schließen, dass jedes Mitglied der Importin α -Familie als Bestandteil spezieller zellulärer Signalwege in der Zelle fungiert und daher nicht durch vermehrte Bildung einer anderen Isoform ersetzt wird [109]. Dies war auch der Fall, wenn zwei oder drei α -Importine parallel herunterreguliert wurden. Auf die Senkung der Importin α Proteinmengen folgte die Aktivierung der endogenen Notch1 Signalübertragung und die anschließende Quantifizierung der durch NICD stimulierten Reporter-Expression. Aufgrund der höheren Sensitivität kam hierfür der Luziferase-basierte Reporter zum Einsatz. Die Resultate der *in vitro* Bindungsstudien ließen erwarten, dass eine verringerte Expression von Importin $\alpha 3$, $\alpha 4$ oder $\alpha 7$ den Kernimport von NICD beeinträchtigt und somit die Notch1 Signalübertragung mindert. Tatsächlich hatte eine Senkung der Proteinmengen von Importin $\alpha 3$ oder $\alpha 4$ keinen Einfluss auf die Notch1 Aktivität. Dies deutet darauf hin, dass ihre Funktionen beim Transport von NICD in den Zellkern redundant sind. Entgegen den Erwartungen resultierten reduzierte Proteinmengen von Importin $\alpha 7$ in einer erhöhten Notch1 Aktivität. Ein möglicher

Grund könnte der beeinträchtigte Kernimport eines Repressors oder negativen Modulators des Notch1 Signalweges sein, der stärker von Importin $\alpha 7$ abhängt als NICD. Hierzu existieren kaum Vorkenntnisse und auch im Rahmen dieser Arbeit war die Durchführung von notwendigen Analysen nicht möglich. Immerhin zeigen Beobachtungen anderer Gruppen, dass der unterdrückte Kernimport eines Repressors in einer erhöhten Notch1 Aktivität resultieren kann [110;111]. Unterstützt wird diese These durch die geringe Affinität von Importin $\alpha 7$ gegenüber NICD, woraus vermutlich eine untergeordnete Rolle der Isoform für den Kernimport von NICD resultiert.

Im Gegensatz zu der Reporter-gen-Analyse konnte in Zellen, die ektopisch Notch ΔE -EGFP exprimierten, die Lokalisation des freigesetzten NICD-EGFP direkt mittels Immunzytochemie nachgewiesen werden (Andreas Krämer, unveröffentlichte Daten). Hierbei zeigten verminderte Proteinmengen von Importin $\alpha 3$, $\alpha 4$ oder $\alpha 7$ eine visualisierbare Senkung der nukleären Akkumulation und damit eine erhöhte zytoplasmatische Lokalisation des Proteins. Bei dieser Studie stand einer begrenzten Anzahl von endogenen α -Importinen eine hohe Konzentration von NICD in der Zelle gegenüber, möglicherweise in einem Verhältnis nahe des Sättigungszustandes. Wahrscheinlich war deshalb die Bedeutung der einzelnen Importin α Isoformen für den Kernimport von NICD direkt nachweisbar. Im Vergleich dazu kann bei den Reporter-gen-Analysen aufgrund der geringen Konzentration von endogenem NICD der Kernimport nach der Herunterregulierung einer Isoform wahrscheinlich von der anderen kompensiert werden. Zudem wurde mittels der Visualisierung von NICD-EGFP eine Rolle von Importin $\alpha 1$ als Adapterprotein für die Bindung von NICD ausgeschlossen (Andreas Krämer, unveröffentlichte Daten), was im Einklang mit den Resultaten der *in vitro* Bindungsstudien und Reporter-gen-Analyse der vorliegenden Arbeit steht.

Die Abhängigkeit der endogenen Notch1 Signalübertragung von den Importinen $\alpha 3$ und $\alpha 4$ war erst feststellbar, wenn beide Isoformen zusammen herunterreguliert wurden. Dieser Effekt konnte durch zusätzlich reduzierte Importin $\alpha 7$ Proteinmengen geringfügig verstärkt werden. Die hiermit demonstrierte Redundanz des Importsystems ist wahrscheinlich wegen der Bedeutung der Notch1 Signalübertragung für viele Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse unerlässlich. Die Studien der Arbeitsgruppe um Köhler *et al.* zeigen, dass sich die Expression einiger Importin α Isoformen im Verlauf des Zellzyklus verändert [112]. Daher stellt die Bindung von NICD an mehrere α -Importine sicher, dass die Kerntranslokation kontinuierlich stattfinden kann.

Allerdings war nach der parallelen Herunterregulierung der Importin $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ Proteinmengen immer noch eine Stimulierung des Luziferase-basierten Reporters von 60 % nachweisbar. Jede verwendete siRNA verringerte zwar selektiv die Expression einer bestimmten Importin α Isoform, jedoch konnte in keiner Probe die vollständige Abwesenheit des entsprechenden Proteins festgestellt werden. Die verbleibenden Importin α Moleküle könnten somit ausreichend sein, um den noch messbaren Kerntransport zu vermitteln. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass andere Mechanismen zum Kernimport von NICD beitragen. Es wurde allerdings nicht versucht, die Proteinmengen der einzelnen α -Importine weiter zu reduzieren. Frühere Studien zeigen, dass die Proliferation von Zellen durch die Entfernung bestimmter Importin α Isoformen beeinflusst wird [109]. Bei der Analyse des Kerntransports sollten die Nebeneffekte durch beeinträchtigte Funktionen der verringerten α -Importine minimiert werden.

Die Beteiligung der Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ an der Notch1 Signalübertragung *in vivo* konnte durch zwei weitere Experimente bestätigt werden. Wurden die Proteinmengen der drei α -Importine in den C2C12 Myoblasten herunterreguliert, war (1) die bevorzugte zytoplasmatische Lokalisation von ektopisch exprimierten NICD-EGFP in transfizierten Zellen detektierbar und (2) die verminderte Expression des *Hey1*-Gens, einem Notch1 Zielgen der C2C12 Zellen, feststellbar. Hieraus konnte zudem der Rückschluss gezogen werden, dass ein reduzierter Kernimport von NICD physiologische Auswirkungen hat, da die nachgelagerte Notch1 Signalübertragung beeinträchtigt wird.

Zusammenfassend konnte im ersten Abschnitt dieser Arbeit die NLS3-abhängige Interaktion zwischen NICD und den Importinen $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ gezeigt und mittels verschiedener *in vivo* Analysen eine Rolle dieser Importin α Isoformen für den Kernimport von NICD ermittelt werden.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen über die NICD-spezifischen α -Importine ergibt sich die weiterführende Fragestellung, ob die Notch1 Signalübertragung ebenso auf der Ebene des Kernimports reguliert wird. Allgemein scheint bei der Kontrolle des Importin-vermittelten Kerntransports die posttranslationale Modifikation der Substrate eine wichtige Rolle zu spielen. Zum Beispiel sind die Kernlokalisierungssignale vieler

Proteine von Phosphorylierungsstellen flankiert. Verschiedene Studien zeigen, dass der Modifikationsstatus dieser Stellen einen Einfluss auf die Zugänglichkeit des NLS hat [113]. Zum einen kann die Phosphorylierung eine intramolekulare Konformationsänderung bewirken, wodurch das NLS entweder präsentiert oder maskiert wird. Außerdem ist eine Aufdeckung des NLS aufgrund einer veränderten Protein-Protein-Interaktion möglich. Ein klassisches Beispiel hierfür stellt NF- κ B dar. Die Phosphorylierung von I- κ B (*inhibitor of NF- κ B*) verursacht die Dissoziation des Inhibitors, was zur Freilegung des NLS von NF- κ B führt [114;115].

Wenige Studien weisen auf regulatorische Phosphorylierungsereignisse beim Transport von NICD in den Zellkern hin. Die *in vitro* Analysen von Song *et al.* demonstrieren, dass alle drei Isoformen der Serin/Threonin-Kinase Akt die freigesetzte intrazelluläre Domäne von Notch1 phosphorylieren und dadurch den Kernimport des Proteins verhindern [30]. Jedoch beinhaltet diese Veröffentlichung keinerlei Charakterisierung der genauen Phosphorylierungsstelle, weshalb die Beeinflussung des funktionellen NLS3 von NICD durch diese Modifikation nur spekuliert werden kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht, dieses Resultat mittels eigener Analysen zu bestätigen. Hierfür kamen ebenfalls die von der Arbeitsgruppe um Song *et al.* generierten Konstrukte zum Einsatz. Im Widerspruch zu den publizierten Daten war allerdings kein Einfluss von Akt1 auf die Kernlokalisierung von NICD nachweisbar (Ergebnis nicht dargestellt). Darüber hinaus konnte mit Hilfe des Programms *KinasePhos* keine Phosphorylierungsstelle von Akt1 in der Primärstruktur von NICD ermittelt werden [116]. Aufgrund dieser kontroversen Ergebnisse wird die Regulation des Kernimports von NICD durch Akt unter Vorbehalt betrachtet. Weiter beschrieben Stifani *et al.* ein so genanntes CcN-Motiv innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von Notch1 [101]. Hierbei wird die Funktion des NLS (N) durch flankierende Phosphorylierungsstellen der Casein-Kinase II (C) sowie der Cyclin-abhängigen Kinase 2 (c) reguliert [113]. Der Nachweis, ob diese Sequenzen tatsächlich phosphoryliert werden, steht allerdings noch aus. Zudem schließt dieser potentielle regulatorische Bereich das bipartite NLS4 ein. Da in der vorliegenden Arbeit keine Bedeutung des NLS4 als Transportsignal festgestellt werden konnte, besteht die Vermutung, dass eine mögliche Phosphorylierung dieser Stellen den Kernimport von NICD nicht beeinflusst.

5.4 Lokalisation von Notch1 in adulten hippocampalen Neuronen

Anhand der identifizierten Funktionen von Notch1 in postmitotischen Neuronen wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Rezeptor in Dendriten und Axone der Nervenzellen sortiert und dort auch aktiviert wird. Verschiedene Studien demonstrieren die Bedeutung des Notch1 Signalweges für die axonale Wegleitung zum Zielort sowie die Regulation der Dendritenmorphologie [35;36;117]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung der Notch1 Expression im adulten Gehirn der Maus zu einer Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität und damit zu Defiziten im Langzeitgedächtnis führt [38;39]. Teilweise wurde in den Arbeiten dieser Gruppen bereits eine Lokalisation von Notch1 in Neuriten beschrieben.

Zu Beginn des zweiten Abschnitts der vorliegenden Arbeit sollte die Verteilung von Notch1 und NICD in primären hippocampalen Neuronen genauer analysiert werden. Das Ziel war ursprünglich, die endogenen Proteine der Nervenzellen nachzuweisen. Leider zeigten sowohl verschiedene kommerzielle als auch der eigens für diese Arbeit hergestellte Notch1 Antikörper nicht genügend Spezifität für immunzytochemische Färbungen. Daher erfolgte die Bestimmung der subzellulären Lokalisation in hippocampalen Neuronen mit ektopischer Expression der Proteine. Hierbei konnte eine Verteilung von Notch1 in Dendriten und Axone der Nervenzellen bestätigt werden. Allerdings bestand die Möglichkeit, dass die Überexpression eine Sättigung der Sortiermaschine zur Folge hat und das Protein deshalb in der ganzen Zelle nachweisbar war. Als Kontrolle hierfür erfolgte die Transfektion der hippocampalen Neuronen mit einem Protein, das spezifisch an der Plasmamembran sowie in Endosomen im somatodendritischen Bereich lokalisiert ist [98]. Die korrekte Verteilung von exogenem DNER-myc ist zwar kein Beweis, liefert aber zu mindestens ein unterstützendes Argument dafür, dass auch ektopisch exprimiertes Notch1 richtig sortiert wurde.

Der Nachweis von NICD in primären hippocampalen Neuronen, die mit Notch Δ E cDNA transfiziert wurden, brachte die Lokalisation des Proteins im Zellkern sowie in distalen Neuriten zum Vorschein. Besonders auffallend war die NICD-Immunoreaktivität an der Spitze des wachsenden Axons. Dies lieferte die Grundlage für zwei Rückschlüsse. Zum einen ergibt sich daraus die Lokalisation der γ -Sekretase in diesem Bereich. In Übereinstimmung hiermit konnte die Arbeitsgruppe um Kodam *et al.* mittels Immunhistochemie die γ -Sekretase in Neuriten von Nervenzellen detektieren [118]. Weiter deutet dies auf einen retrograden Transport von NICD entlang

des Axons beziehungsweise der Dendriten zum Zellkern hin. Hierbei ist aufgrund der höheren Effizienz der aktive Transport gegenüber der Diffusion am wahrscheinlichsten. In der Literatur finden sich bereits Hinweise für ein solches Transportsystem, durch das Proteine mit einem Kernlokalisierungssignal, wie NF- κ B oder CREB2, in den Zellkern gelangen [76;78]. Zudem konnte die Arbeitsgruppe um Thompson *et al.* mittels Immunzytochemie und biochemischer Fraktionierung die Lokalisation von Importinen in distalen *Aplysia* sowie hippocampalen Synapsen nachweisen. Durch das Auslösen von Signalen zur Entstehung transkriptionsabhängiger Plastizität wurde weiter die Kerntranslokation der Importine gezeigt [119]. Neben der Verteilung von α -Importinen in Axonen und Dendriten verschiedener Neuronentypen demonstrierten Hanz *et al.*, dass nach einer Verletzung des Axons die mRNA von Importin β 1 lokal translatiert wird. Dieser Mechanismus ermöglicht die Bildung von trimeren Importkomplexen, die anschließend durch die Interaktion mit dem Motorprotein Dynein den retrograden Transport NLS-tragender Reparatursignale in den Zellkern vermitteln [120].

5.5 Die Rolle der Importine α 3, α 4 und α 7 für den Kernimport von NICD in adulten hippocampalen Neuronen

Durch die Anwendung von *in vitro* Bindungsstudien konnte ebenfalls die Interaktion zwischen NICD und den Importinen α 3, α 4 und α 7 aus dem Gehirn der Maus bewiesen werden. Die *In-situ* Hybridisierungsexperimente von Hosokawa *et al.* dokumentieren die Expression von mRNA der drei Isoformen unter anderem in den Pyramidenzellen der CA1, CA2 und CA3 Regionen des Hippokampus [44]. Daher ist eine Bedeutung der Importine α 3, α 4 und α 7 für den Kernimport von NICD in hippocampalen Neuronen sehr wahrscheinlich. Die Arbeitsgruppe um Hosokawa *et al.* stellte auch ein schwaches Signal von Importin α 1 in diesem Bereich fest. Da eine Expression dieser Importin α Isoform im Gehirn bereits von anderen Gruppen ausgeschlossen [99] und ebenso in dieser Studie nicht festgestellt wurde, handelt es sich bei dem nachgewiesenen Signal vermutlich um Hintergrund. Allerdings zeigen die Pyramidenzellen eine hohe Expression der mRNA von Importin α 5. Unsere Ergebnisse deuten zwar darauf hin, dass diese Isoform nicht mit NICD interagiert, dennoch muss in weiteren Studien die Bedeutung von Importin α 5 im Gehirn genauer analysiert werden.

In Übereinstimmung mit den Resultaten der *in vitro* Bindungsstudien in den C2C12 Myoblasten waren unterschiedliche Affinitäten der α -Importine gegenüber NICD

feststellbar. Hierbei ergab sich für Importin $\alpha 7$ erneut die schwächste Bindung an NICD. Allerdings konnten bei dieser Studie keine großen Unterschiede zwischen den Importinen $\alpha 3$ und $\alpha 4$ nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen in C2C12 Myoblasten, wo Importin $\alpha 4$ die stärkste Bindung an NICD zeigte. Somit scheinen in verschiedenen Geweben oder Zelltypen, unterschiedliche Präferenzen der α -Importine gegenüber dem Substrat zu existieren.

Um die Bedeutung der Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ für den Kerntransport von NICD in den hippokampalen Neuronen untersuchen zu können, wurden zunächst die beiden Reporterkonstrukte zum Nachweis der endogenen Notch1 Signalübertragung getestet. Mit dem Reporter transfizierte Neuronen sollten durch Kokultivierung von Delta1-exprimierenden HEK293E Zellen in hoher Dichte aktiviert werden. Anhand des nachgewiesenen Reporter-Proteins, entweder DsRed oder *Firefly*-Luziferase, konnte die prinzipielle Durchführbarkeit des Versuchs demonstriert werden. Im Gegensatz zu den C2C12 Myoblasten war der Einsatz des Luziferase-basierten Reportersystems jedoch weniger erfolgreich. Das Problem sind vermutlich die sehr niedrigen gemessenen Werte, woraus sich ein ungünstiges Signal-Hintergrund-Verhältnis ergibt. Ausschlaggebend hierfür ist die schlechte Transfektionseffizienz der hippokampalen Neuronen. Zudem konnte nach einer Behandlung der Kokultur mit dem γ -Sekretase-Hemmer keine vollständige Unterdrückung der Reporter Aktivität ermittelt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist nicht bekannt. Allerdings scheint es sich um ein generelles Phänomen zu handeln, da ein Nachweis der endogenen Notch1 Signalübertragung in kortikalen Neuronen das gleiche Resultat zeigte (Malle Soom, unveröffentlichte Daten).

Daher sind für die Fortsetzung der Analysen zum Kernimport von NICD in den primären hippokampalen Neuronen weitere Optimierungsschritte notwendig. Zum einen muss die Transfektionseffizienz verbessert werden. Weiter demonstrieren Versuche mit kortikalen Neuronen, dass ein Nachweis der endogenen Notch1 Signalübertragung nach 6 DIV auch ohne zusätzliche Aktivierung mittels Delta1-exprimierender HEK293E Zellen möglich ist (Malle Soom, unveröffentlichte Daten). Dies sollte auch für die hippokampalen Neuronen getestet werden, da sich hieraus eine Vereinfachung des Experiments ergeben würde. Als letzter Schritt muss ebenso die Behandlung der Nervenzellen mit den α -Importin-spezifischen siRNAs etabliert werden.

5.6 Bedeutung der vorgestellten Arbeit und Perspektiven

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen Untersuchungen zum Kernimport von NICD. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse sind in Abbildung 5-2 zusammengefasst. Es konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Domäne von Notch1 über ein funktionelles Kernlokalisierungssignal (NLS3) verfügt, welches die Eigenschaften eines monopartiten cNLS besitzt. In Abhängigkeit von dieser Sequenz interagiert NICD mit den Importinen $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$, die als Adapterproteine für den klassischen Importin $\alpha/\beta 1$ -Transportweg fungieren. Zudem waren unterschiedliche Affinitäten der drei Importin α Isoformen gegenüber NICD dokumentierbar. Weiterhin konnte durch die Anwendung verschiedener *in vivo* Analysen die Bedeutung der Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ für den Kernimport von NICD demonstriert werden. Die Herunterregulierung der α -Importine mittels spezifischer siRNAs führte zu einem beeinträchtigten Transport von NICD in den Zellkern, wodurch die nachgelagerte Notch1 Signalübertragung beeinflusst wurde.

Das erlangte Wissen über den genauen Kerntransportmechanismus schließt eine weitere Lücke zum vollständigen Verständnis der Notch1 Signalübertragung und liefert die Voraussetzung zur Aufklärung von regulatorischen Prozessen, die den Transport von NICD in den Zellkern kontrollieren könnten. Hierzu existieren bis heute nur wenige Kenntnisse [30;101]. Allgemein wird der Kerntransport bevorzugt durch posttranslationale Modifikationen der Substrate beeinflusst [113], jedoch kann er ebenso mittels Azetylierung und Phosphorylierung der α -Importine moduliert werden [121;122]. Zudem gibt es Hinweise, dass die Expression der verschiedenen Importin α Isoformen sowohl gewebespezifisch als auch entwicklungsabhängig kontrolliert wird [123]. Somit ergeben sich eine Vielzahl möglicher Regulationsprozesse für den Import von NICD in den Zellkern. Allerdings muss in fortführenden Studien überprüft werden, welche davon den Notch1 Signalweg tatsächlich beeinflussen.

Die hier vorgelegten Resultate dienen ebenso als Grundlage für die Analysen zum Kernimport von NICD in hippocampalen Neuronen. Aufgrund der Bedeutung von Notch1 für synaptische Plastizität und Gedächtnisbildung wurde von unserer Arbeitsgruppe die Hypothese aufgestellt, dass Notch1 in distalen Neuriten von Nervenzellen aktiviert wird. Daher muss ein retrogrades Transportsystem existieren, welches die freigesetzte intrazelluläre Domäne in den Zellkern importiert. Im zweiten

Abschnitt dieser Arbeit konnten mittels immunzytochemischer Färbungen die Lokalisation von Notch1 und NICD in distalen Dendriten sowie Axonen von primären hippocampalen Neuronen gezeigt werden. Darüber hinaus ist die nachweisbare *in vitro* Interaktion zwischen NICD und den endogenen Importinen $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ aus dem Mausgehirn der erste Schritt zur Bestätigung der These, dass NICD in Nervenzellen ebenfalls durch den klassischen Importin $\alpha/\beta 1$ -Transportweg in den Zellkern importiert wird.

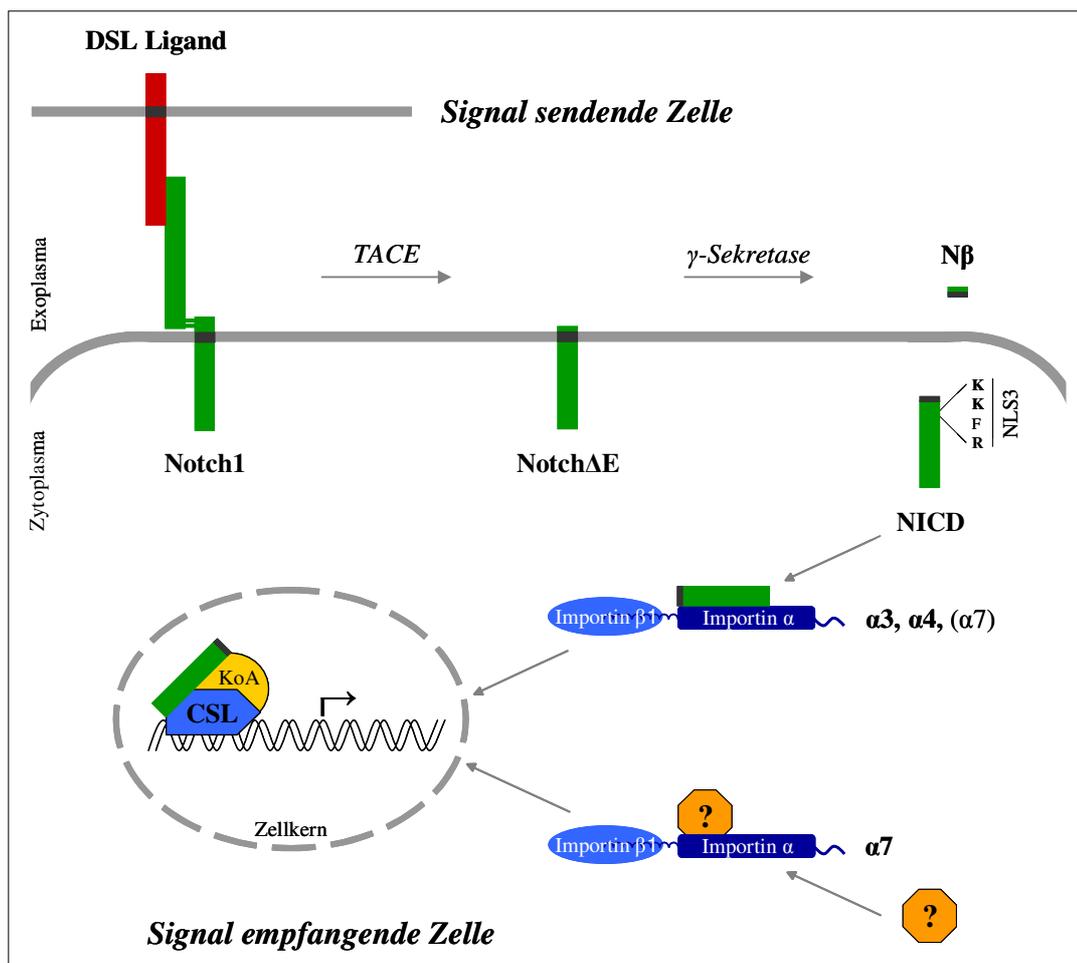


Abb. 5-2: Schematische Darstellung der gewonnenen Erkenntnisse zum Kernimport von NICD.

Die Aktivierung von Notch1 resultiert in einer proteolytischen Freisetzung der intrazellulären Domäne, NICD, welche ein funktionelles cNLS (NLS3) besitzt. Der Kernimport von NICD erfolgt durch den klassischen Importin $\alpha/\beta 1$ -Transportweg. Hierbei sind vor allem die Adapterproteine Importin $\alpha 3$ und $\alpha 4$ für die NLS3-abhängige Interaktion mit NICD von Bedeutung. Importin $\alpha 7$, das ebenfalls eine Bindung an NICD *in vitro* zeigte, scheint für den Kernimport *in vivo* eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es wird vermutet, dass diese Isoform bevorzugt den Transport eines unbekannten Repressors bzw. negativen Modulators der Notch1 Signalübertragung (🔍) in den Zellkern vermittelt.

In fortführenden Studien soll durch die Anwendung von *in vivo* Analysen die Bedeutung der drei α -Importine für den Kernimport von NICD als Teil eines retrograden Transportsystems entlang der Neuriten von hippocampalen Neuronen demonstriert werden.

Literaturverzeichnis

1. Fortini, M.E. (2009) Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev. Cell*, **16**, 633-647.
2. Mohr, O.L. (1919) Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics*, **4**, 275-282.
3. Wharton, K.A., Johansen, K.M., Xu, T., and rtavanis-Tsakonas, S. (1985) Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell*, **43**, 567-581.
4. Fleming, R.J. (1998) Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **9**, 599-607.
5. Rebay, I., Fleming, R.J., Fehon, R.G., Cherbas, L., Cherbas, P., and rtavanis-Tsakonas, S. (1991) Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell*, **67**, 687-699.
6. Gordon, W.R., Vardar-Ulu, D., Histen, G., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2007) Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 295-300.
7. Rebay, I., Fehon, R.G., and rtavanis-Tsakonas, S. (1993) Specific truncations of *Drosophila* Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell*, **74**, 319-329.
8. Kopan, R. and Ilagan, M.X. (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, **137**, 216-233.
9. D'Souza, B., Miyamoto, A., and Weinmaster, G. (2008) The many facets of Notch ligands. *Oncogene*, **27**, 5148-5167.
10. Sun, X. and rtavanis-Tsakonas, S. (1996) The intracellular deletions of Delta and Serrate define dominant negative forms of the *Drosophila* Notch ligands. *Development*, **122**, 2465-2474.
11. Sun, X. and rtavanis-Tsakonas, S. (1997) Secreted forms of DELTA and SERRATE define antagonists of Notch signaling in *Drosophila*. *Development*, **124**, 3439-3448.
12. Blaumueller, C.M., Qi, H., Zagouras, P., and rtavanis-Tsakonas, S. (1997) Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell*, **90**, 281-291.
13. Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., and Israel, A. (1998) The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 8108-8112.

14. Brou,C., Logeat,F., Gupta,N., Bessia,C., LeBail,O., Doedens,J.R., Cumano,A., Roux,P., Black,R.A., and Israel,A. (2000) A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol.Cell*, **5**, 207-216.
15. De,S.B., Annaert,W., Cupers,P., Saftig,P., Craessaerts,K., Mumm,J.S., Schroeter,E.H., Schrijvers,V., Wolfe,M.S., Ray,W.J., Goate,A., and Kopan,R. (1999) A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, **398**, 518-522.
16. Zhang,Z., Nadeau,P., Song,W., Donoviel,D., Yuan,M., Bernstein,A., and Yankner,B.A. (2000) Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat.Cell Biol.*, **2**, 463-465.
17. Kopan,R. (2002) Notch: a membrane-bound transcription factor. *J.Cell Sci.*, **115**, 1095-1097.
18. Bessho,Y., Sakata,R., Komatsu,S., Shiota,K., Yamada,S., and Kageyama,R. (2001) Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes Dev.*, **15**, 2642-2647.
19. Ohtsuka,T., Ishibashi,M., Gradwohl,G., Nakanishi,S., Guillemot,F., and Kageyama,R. (1999) Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J.*, **18**, 2196-2207.
20. Iso,T., Sartorelli,V., Chung,G., Shichinohe,T., Kedes,L., and Hamamori,Y. (2001) HERP, a new primary target of Notch regulated by ligand binding. *Mol.Cell Biol.*, **21**, 6071-6079.
21. Iso,T., Kedes,L., and Hamamori,Y. (2003) HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J.Cell Physiol*, **194**, 237-255.
22. Conlon,R.A., Reaume,A.G., and Rossant,J. (1995) Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development*, **121**, 1533-1545.
23. Hrabe de,A.M., McIntyre,J., and Gossler,A. (1997) Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue DII1. *Nature*, **386**, 717-721.
24. Yoon,K. and Gaiano,N. (2005) Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat.Neurosci.*, **8**, 709-715.
25. Xu,A., Haines,N., Dlugosz,M., Rana,N.A., Takeuchi,H., Haltiwanger,R.S., and Irvine,K.D. (2007) In vitro reconstitution of the modulation of Drosophila Notch-ligand binding by Fringe. *J.Biol.Chem.*, **282**, 35153-35162.
26. Le,B.R., Bardin,A., and Schweisguth,F. (2005) The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development*, **132**, 1751-1762.
27. McGill,M.A. and McGlade,C.J. (2003) Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J.Biol.Chem.*, **278**, 23196-23203.

28. Gupta-Rossi,N., Le,B.O., Gonen,H., Brou,C., Logeat,F., Six,E., Ciechanover,A., and Israel,A. (2001) Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. *J.Biol.Chem.*, **276**, 34371-34378.
29. Foltz,D.R., Santiago,M.C., Berechid,B.E., and Nye,J.S. (2002) Glycogen synthase kinase-3beta modulates notch signaling and stability. *Curr.Biol.*, **12**, 1006-1011.
30. Song,J., Park,S., Kim,M., and Shin,I. (2008) Down-regulation of Notch-dependent transcription by Akt in vitro. *FEBS Lett.*, **582**, 1693-1699.
31. rtavanis-Tsakonas,S., Rand,M.D., and Lake,R.J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, **284**, 770-776.
32. Muskavitch,M.A. (1994) Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice. *Dev.Biol.*, **166**, 415-430.
33. Poulson,D.F. (1937) Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of Drosophila Melanogaster. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **23**, 133-137.
34. Louvi,A. and rtavanis-Tsakonas,S. (2006) Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat.Rev.Neurosci.*, **7**, 93-102.
35. Redmond,L., Oh,S.R., Hicks,C., Weinmaster,G., and Ghosh,A. (2000) Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development. *Nat.Neurosci.*, **3**, 30-40.
36. Sestan,N., rtavanis-Tsakonas,S., and Rakic,P. (1999) Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science*, **286**, 741-746.
37. Giniger,E. (1998) A role for Abl in Notch signaling. *Neuron*, **20**, 667-681.
38. Costa,R.M., Honjo,T., and Silva,A.J. (2003) Learning and memory deficits in Notch mutant mice. *Curr.Biol.*, **13**, 1348-1354.
39. Wang,Y., Chan,S.L., Miele,L., Yao,P.J., Mackes,J., Ingram,D.K., Mattson,M.P., and Furukawa,K. (2004) Involvement of Notch signaling in hippocampal synaptic plasticity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **101**, 9458-9462.
40. Feldherr,C.M., Kallenbach,E., and Schultz,N. (1984) Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. *J.Cell Biol.*, **99**, 2216-2222.
41. Gorlich,D. and Kutay,U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, **15**, 607-660.
42. Weis,K. (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, **112**, 441-451.

43. Chi,N.C. and Adam,S.A. (1997) Functional domains in nuclear import factor p97 for binding the nuclear localization sequence receptor and the nuclear pore. *Mol.Biol.Cell*, **8**, 945-956.
44. Hosokawa,K., Nishi,M., Sakamoto,H., Tanaka,Y., and Kawata,M. (2008) Regional distribution of importin subtype mRNA expression in the nervous system: study of early postnatal and adult mouse. *Neuroscience*, **157**, 864-877.
45. Conti,E. (2002) Structures of importins. *Results Probl.Cell Differ.*, **35**, 93-113.
46. Gorlich,D., Henklein,P., Laskey,R.A., and Hartmann,E. (1996) A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus. *EMBO J.*, **15**, 1810-1817.
47. Kobe,B. (1999) Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat.Struct.Biol.*, **6**, 388-397.
48. Jans,D.A., Xiao,C.Y., and Lam,M.H. (2000) Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays*, **22**, 532-544.
49. Kamei,Y., Yuba,S., Nakayama,T., and Yoneda,Y. (1999) Three distinct classes of the alpha-subunit of the nuclear pore-targeting complex (importin-alpha) are differentially expressed in adult mouse tissues. *J.Histochem.Cytochem.*, **47**, 363-372.
50. Fagerlund,R., Kinnunen,L., Kohler,M., Julkunen,I., and Melen,K. (2005) NF- κ B is transported into the nucleus by importin α 3 and importin α 4. *J.Biol.Chem.*, **280**, 15942-15951.
51. Melen,K., Fagerlund,R., Franke,J., Kohler,M., Kinnunen,L., and Julkunen,I. (2003) Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J.Biol.Chem.*, **278**, 28193-28200.
52. Kohler,M., Speck,C., Christiansen,M., Bischoff,F.R., Prehn,S., Haller,H., Gorlich,D., and Hartmann,E. (1999) Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Mol.Cell Biol.*, **19**, 7782-7791.
53. Friedrich,B., Quensel,C., Sommer,T., Hartmann,E., and Kohler,M. (2006) Nuclear localization signal and protein context both mediate importin alpha specificity of nuclear import substrates. *Mol.Cell Biol.*, **26**, 8697-8709.
54. Fried,H. and Kutay,U. (2003) Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol.Life Sci.*, **60**, 1659-1688.
55. Gorlich,D., Kostka,S., Kraft,R., Dingwall,C., Laskey,R.A., Hartmann,E., and Prehn,S. (1995) Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr.Biol.*, **5**, 383-392.
56. Strom,A.C. and Weis,K. (2001) Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol.*, **2**, REVIEWS3008.

57. Kalderon,D., Richardson,W.D., Markham,A.F., and Smith,A.E. (1984) Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature*, **311**, 33-38.
58. Chelsky,D., Ralph,R., and Jonak,G. (1989) Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Mol.Cell Biol.*, **9**, 2487-2492.
59. Robbins,J., Dilworth,S.M., Laskey,R.A., and Dingwall,C. (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, **64**, 615-623.
60. Fontes,M.R., Teh,T., and Kobe,B. (2000) Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J.Mol.Biol.*, **297**, 1183-1194.
61. Makkerh,J.P., Dingwall,C., and Laskey,R.A. (1996) Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr.Biol.*, **6**, 1025-1027.
62. Klebe,C., Prinz,H., Wittinghofer,A., and Goody,R.S. (1995) The kinetic mechanism of Ran--nucleotide exchange catalyzed by RCC1. *Biochemistry*, **34**, 12543-12552.
63. Nemergut,M.E., Mizzen,C.A., Stukenberg,T., Allis,C.D., and Macara,I.G. (2001) Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science*, **292**, 1540-1543.
64. Gorlich,D., Vogel,F., Mills,A.D., Hartmann,E., and Laskey,R.A. (1995) Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature*, **377**, 246-248.
65. Lee,S.J., Imamoto,N., Sakai,H., Nakagawa,A., Kose,S., Koike,M., Yamamoto,M., Kumasaka,T., Yoneda,Y., and Tsukihara,T. (2000) The adoption of a twisted structure of importin-beta is essential for the protein-protein interaction required for nuclear transport. *J.Mol.Biol.*, **302**, 251-264.
66. Kutay,U., Bischoff,F.R., Kostka,S., Kraft,R., and Gorlich,D. (1997) Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell*, **90**, 1061-1071.
67. Bischoff,F.R. and Gorlich,D. (1997) RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin beta-related nuclear transport factors. *FEBS Lett.*, **419**, 249-254.
68. Otis,K.O., Thompson,K.R., and Martin,K.C. (2006) Importin-mediated nuclear transport in neurons. *Curr.Opin.Neurobiol.*, **16**, 329-335.
69. Ribbeck,K., Lipowsky,G., Kent,H.M., Stewart,M., and Gorlich,D. (1998) NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J.*, **17**, 6587-6598.
70. Smith,A., Brownawell,A., and Macara,I.G. (1998) Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr.Biol.*, **8**, 1403-1406.

71. Hippenmeyer,S., Kramer,I., and Arber,S. (2004) Control of neuronal phenotype: what targets tell the cell bodies. *Trends Neurosci.*, **27**, 482-488.
72. Goldberg,J.L. (2003) How does an axon grow? *Genes Dev.*, **17**, 941-958.
73. Kandel,E.R. (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, **294**, 1030-1038.
74. Howe,C.L. (2005) Modeling the signaling endosome hypothesis: why a drive to the nucleus is better than a (random) walk. *Theor.Biol.Med.Model.*, **2**, 43.
75. Ambron,R.T., Schmied,R., Huang,C.C., and Smedman,M. (1992) A signal sequence mediates the retrograde transport of proteins from the axon periphery to the cell body and then into the nucleus. *J.Neurosci.*, **12**, 2813-2818.
76. Meffert,M.K., Chang,J.M., Wiltgen,B.J., Fanselow,M.S., and Baltimore,D. (2003) NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat.Neurosci.*, **6**, 1072-1078.
77. Cox,L.J., Hengst,U., Gurskaya,N.G., Lukyanov,K.A., and Jaffrey,S.R. (2008) Intra-axonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival. *Nat.Cell Biol.*, **10**, 149-159.
78. Lai,K.O., Zhao,Y., Ch'ng,T.H., and Martin,K.C. (2008) Importin-mediated retrograde transport of CREB2 from distal processes to the nucleus in neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **105**, 17175-17180.
79. Kopan,R., Nye,J.S., and Weintraub,H. (1994) The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development*, **120**, 2385-2396.
80. Aster,J.C., Robertson,E.S., Hasserjian,R.P., Turner,J.R., Kieff,E., and Sklar,J. (1997) Oncogenic forms of NOTCH1 lacking either the primary binding site for RBP-Jkappa or nuclear localization sequences retain the ability to associate with RBP-Jkappa and activate transcription. *J.Biol.Chem.*, **272**, 11336-11343.
81. Jeffries,S. and Capobianco,A.J. (2000) Neoplastic transformation by Notch requires nuclear localization. *Mol.Cell Biol.*, **20**, 3928-3941.
82. LaVoie,M.J. and Selkoe,D.J. (2003) The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. *J.Biol.Chem.*, **278**, 34427-34437.
83. Yaffe,D. and Saxel,O. (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, **270**, 725-727.
84. Banker,G.A. (1980) Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science*, **209**, 809-810.
85. Mercer,S.E., Ewton,D.Z., Deng,X., Lim,S., Mazur,T.R., and Friedman,E. (2005) Mirk/Dyrk1B mediates survival during the differentiation of C2C12 myoblasts. *J.Biol.Chem.*, **280**, 25788-25801.

86. Goetze,B., Grunewald,B., Baldassa,S., and Kiebler,M. (2004) Chemically controlled formation of a DNA/calcium phosphate coprecipitate: application for transfection of mature hippocampal neurons. *J.Neurobiol.*, **60**, 517-525.
87. Hansson,E.M., Teixeira,A.I., Gustafsson,M.V., Dohda,T., Chapman,G., Meletis,K., Muhr,J., and Lendahl,U. (2006) Recording Notch signaling in real time. *Dev.Neurosci.*, **28**, 118-127.
88. Adam,S.A., Marr,R.S., and Gerace,L. (1990) Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J.Cell Biol.*, **111**, 807-816.
89. Hu,T., Guan,T., and Gerace,L. (1996) Molecular and functional characterization of the p62 complex, an assembly of nuclear pore complex glycoproteins. *J.Cell Biol.*, **134**, 589-601.
90. Baake,M., Bauerle,M., Doenecke,D., and Albig,W. (2001) Core histones and linker histones are imported into the nucleus by different pathways. *Eur.J.Cell Biol.*, **80**, 669-677.
91. Wessel,D. and Flugge,U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal.Biochem.*, **138**, 141-143.
92. Mumm,J.S. and Kopan,R. (2000) Notch signaling: from the outside in. *Dev.Biol.*, **228**, 151-165.
93. Schroeter,E.H., Kisslinger,J.A., and Kopan,R. (1998) Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature*, **393**, 382-386.
94. Buas,M.F., Kabak,S., and Kadesch,T. (2009) Inhibition of myogenesis by Notch: evidence for multiple pathways. *J.Cell Physiol*, **218**, 84-93.
95. Salama-Cohen,P., Arevalo,M.A., Grantyn,R., and Rodriguez-Tebar,A. (2006) Notch and NGF/p75NTR control dendrite morphology and the balance of excitatory/inhibitory synaptic input to hippocampal neurones through Neurogenin 3. *J.Neurochem.*, **97**, 1269-1278.
96. Dotti,C.G., Sullivan,C.A., and Banker,G.A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J.Neurosci.*, **8**, 1454-1468.
97. Liao,D., Zhang,X., O'Brien,R., Ehlers,M.D., and Huganir,R.L. (1999) Regulation of morphological postsynaptic silent synapses in developing hippocampal neurons. *Nat.Neurosci.*, **2**, 37-43.
98. Eiraku,M., Hirata,Y., Takeshima,H., Hirano,T., and Kengaku,M. (2002) Delta/notch-like epidermal growth factor (EGF)-related receptor, a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. *J.Biol.Chem.*, **277**, 25400-25407.

99. Tsuji,L., Takumi,T., Imamoto,N., and Yoneda,Y. (1997) Identification of novel homologues of mouse importin alpha, the alpha subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue-specific expression. *FEBS Lett.*, **416**, 30-34.
100. Joutel,A. and Tournier-Lasserre,E. (1998) Notch signalling pathway and human diseases. *Semin.Cell Dev.Biol.*, **9**, 619-625.
101. Stifani,S., Blaumueller,C.M., Redhead,N.J., Hill,R.E., and rtavanis-Tsakonas,S. (1992) Human homologs of a Drosophila Enhancer of split gene product define a novel family of nuclear proteins. *Nat.Genet.*, **2**, 119-127.
102. Lieber,T., Kidd,S., Alcamo,E., Corbin,V., and Young,M.W. (1993) Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev.*, **7**, 1949-1965.
103. Conti,E., Uy,M., Leighton,L., Blobel,G., and Kuriyan,J. (1998) Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell*, **94**, 193-204.
104. Nadler,S.G., Tritschler,D., Haffar,O.K., Blake,J., Bruce,A.G., and Cleaveland,J.S. (1997) Differential expression and sequence-specific interaction of karyopherin alpha with nuclear localization sequences. *J.Biol.Chem.*, **272**, 4310-4315.
105. de la Pompa,J.L., Wakeham,A., Correia,K.M., Samper,E., Brown,S., Aguilera,R.J., Nakano,T., Honjo,T., Mak,T.W., Rossant,J., and Conlon,R.A. (1997) Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development*, **124**, 1139-1148.
106. Dahlqvist,C., Blokzijl,A., Chapman,G., Falk,A., Dannaeus,K., Ibanez,C.F., and Lendahl,U. (2003) Functional Notch signaling is required for BMP4-induced inhibition of myogenic differentiation. *Development*, **130**, 6089-6099.
107. Martinez,A.A., Zecchini,V., and Brennan,K. (2002) CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development? *Curr.Opin.Genet.Dev.*, **12**, 524-533.
108. Weinmaster,G. (1998) Notch signaling: direct or what? *Curr.Opin.Genet.Dev.*, **8**, 436-442.
109. Quensel,C., Friedrich,B., Sommer,T., Hartmann,E., and Kohler,M. (2004) In vivo analysis of importin alpha proteins reveals cellular proliferation inhibition and substrate specificity. *Mol.Cell Biol.*, **24**, 10246-10255.
110. Tekotte,H., Berdnik,D., Torok,T., Buszczak,M., Jones,L.M., Cooley,L., Knoblich,J.A., and Davis,I. (2002) Dcas is required for importin-alpha3 nuclear export and mechano-sensory organ cell fate specification in Drosophila. *Dev.Biol.*, **244**, 396-406.
111. Mummery-Widmer,J.L., Yamazaki,M., Stoeger,T., Novatchkova,M., Bhalerao,S., Chen,D., Dietzl,G., Dickson,B.J., and Knoblich,J.A. (2009)

- Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature*, **458**, 987-992.
112. Kohler,M., Fiebler,A., Hartwig,M., Thiel,S., Prehn,S., Kettritz,R., Luft,F.C., and Hartmann,E. (2002) Differential expression of classical nuclear transport factors during cellular proliferation and differentiation. *Cell Physiol Biochem.*, **12**, 335-344.
113. Jans,D.A. and Hubner,S. (1996) Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol Rev.*, **76**, 651-685.
114. Karin,M. and Ben-Neriah,Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu.Rev.Immunol.*, **18**, 621-663.
115. Beg,A.A., Ruben,S.M., Scheinman,R.I., Haskill,S., Rosen,C.A., and Baldwin,A.S., Jr. (1992) I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev.*, **6**, 1899-1913.
116. Huang,H.D., Lee,T.Y., Tzeng,S.W., and Horng,J.T. (2005) KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Res.*, **33**, W226-W229.
117. Crowner,D., Le,G.M., Gates,M.A., and Giniger,E. (2003) Notch steers *Drosophila* ISNb motor axons by regulating the Abl signaling pathway. *Curr.Biol.*, **13**, 967-972.
118. Kodam,A., Vetrivel,K.S., Thinakaran,G., and Kar,S. (2008) Cellular distribution of gamma-secretase subunit nicastrin in the developing and adult rat brains. *Neurobiol.Aging*, **29**, 724-738.
119. Thompson,K.R., Otis,K.O., Chen,D.Y., Zhao,Y., O'Dell,T.J., and Martin,K.C. (2004) Synapse to nucleus signaling during long-term synaptic plasticity; a role for the classical active nuclear import pathway. *Neuron*, **44**, 997-1009.
120. Hanz,S., Perlson,E., Willis,D., Zheng,J.Q., Massarwa,R., Huerta,J.J., Koltzenburg,M., Kohler,M., van-Minnen,J., Twiss,J.L., and Fainzilber,M. (2003) Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron*, **40**, 1095-1104.
121. Bannister,A.J., Miska,E.A., Gorlich,D., and Kouzarides,T. (2000) Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. *Curr.Biol.*, **10**, 467-470.
122. Wang,W., Yang,X., Kawai,T., Lopez,d.S., I, Mazan-Mamczarz,K., Chen,P., Chook,Y.M., Quensel,C., Kohler,M., and Gorospe,M. (2004) AMP-activated protein kinase-regulated phosphorylation and acetylation of importin alpha1: involvement in the nuclear import of RNA-binding protein HuR. *J.Biol.Chem.*, **279**, 48376-48388.
123. Hogarth,C.A., Calanni,S., Jans,D.A., and Loveland,K.L. (2006) Importin alpha mRNAs have distinct expression profiles during spermatogenesis. *Dev.Dyn.*, **235**, 253-262.

Anhang

Im Folgenden sind die Plasmidkarten für die klonierten Expressionsplasmide der vorliegenden Arbeit angefügt:

1. pcDNA3.1/Hygro(+) + Notch Δ E
2. pcDNA3.1/Hygro(+) + Notch Δ E-EGFP
3. pcDNA3.1/Hygro(+) + Notch1-myc
4. pcDNA3.1/Hygro(+) + Delta1
5. pGEX-5X-1 + NICD
6. pGEX-5X-1 + Importin α

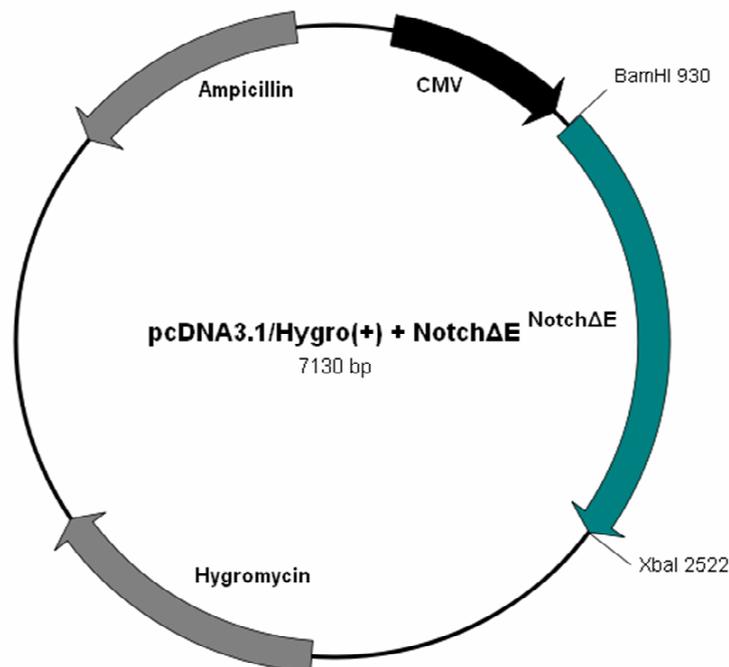


Leibniz Institute for Age Research
Fritz Lipmann Institute (FLI)

Dr. habil. Christoph Kaether
Group "Membrane Trafficking of Proteins
involved in Alzheimer's Disease"
Beutenbergstraße 11, 07745 Jena
Phone: +49 3641 656230
Email: ckaether@fli-leibniz.de

Plasmid:

pcDNA3.1/Hygro(+) + NotchΔE



Comments: NotchΔE without the RAM and PEST domain tagged C-terminally with 6 myc-tags (derived from mouse Notch1; see Schroeter et al., 1998) was obtained from Raphael Kopan (Washington University, St. Louis, USA). NotchΔE gene was amplified using forward primer 5'-**GGATCC**ACTAGTAACGGCCG-3' and reverse primer 5'-**TCTAGAT**TACTCGAGCTGTCCAACAGGCAG-3' and subsequently cloned into BamHI / XbaI sites of pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen). Restriction sites in primers are in bold.

Constructed by: Kerstin Hünninger

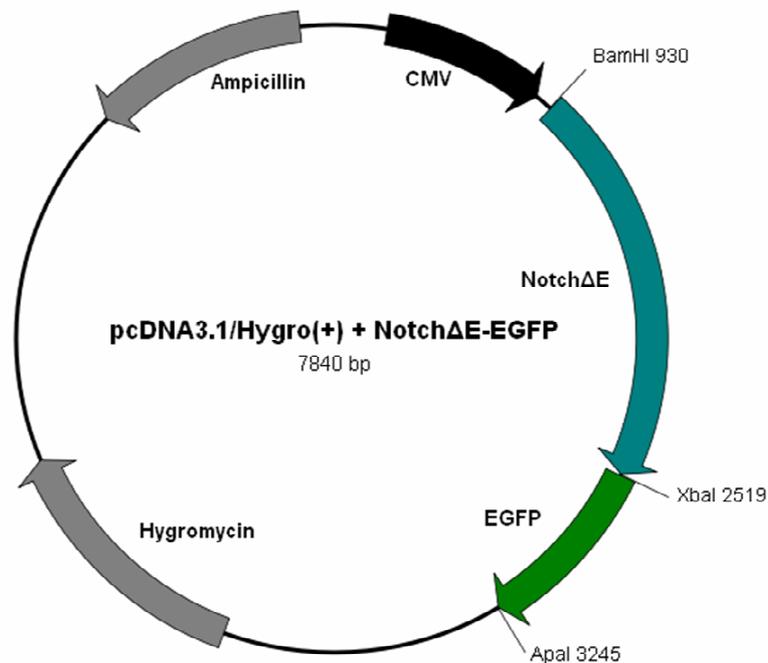


Leibniz Institute for Age Research
Fritz Lipmann Institute (FLI)

Dr. habil. Christoph Kaether
Group "Membrane Trafficking of Proteins
involved in Alzheimer's Disease"
Beutenbergstraße 11, 07745 Jena
Phone: +49 3641 656230
Email: ckaether@fli-leibniz.de

Plasmid:

pcDNA3.1/Hygro(+)+ NotchΔE-EGFP



Comments: NotchΔE without the RAM and PEST domain tagged C-terminally with 6 myc-tags (derived from mouse Notch1; see Schroeter et al., 1998) was obtained from Raphael Kopan (Washington University, St. Louis, USA). NotchΔE gene was amplified using forward primer 5'-**GGATCC**ACTAGTAACGGCCG-3' and reverse primer 5'-**TCTAG**ACTCGAGCTGTCCAACAGGCAG-3' and subsequently cloned into BamHI / XbaI sites of pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen). EGFP gene was amplified using forward primer 5'-**TCTAG**ACATGGTGAGCAAGGGC-3' and reverse primer 5'-**GGGCC**CTTACTTGTACAGCTCGTC-3' from pEGFP-N1 (Clontech) and cloned C-terminally of NotchΔE into XbaI / ApaI sites. Restriction sites in primers are in bold.

Constructed by: Kerstin Hünninger

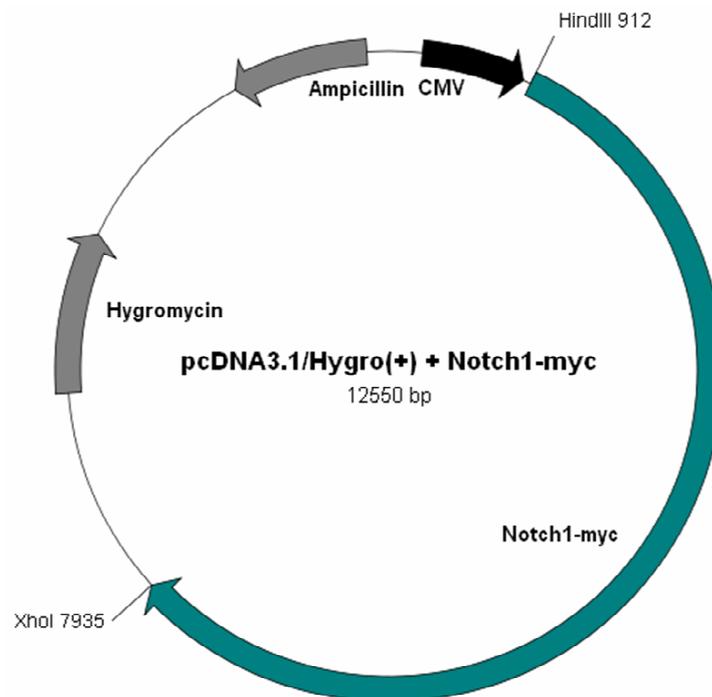


Leibniz Institute for Age Research
Fritz Lipmann Institute (FLI)

Dr. habil. Christoph Kaether
Group "Membrane Trafficking of Proteins
involved in Alzheimer's Disease"
Beutenbergstraße 11, 07745 Jena
Phone: +49 3641 656230
Email: ckaether@fli-leibniz.de

Plasmid:

pcDNA3.1/Hygro(+) + Notch1-myc



Comments: Notch1 without the PEST domain tagged C-terminally with 6 myc-tags (derived from mouse Notch1; see Schroeter et al., 1998) was obtained from Raphael Kopan (Washington University, St. Louis, USA). Notch1-myc gene was cut out from pCS2 + Notch1-myc construct using HindIII / XhoI and subsequently cloned into HindIII / XhoI sites of pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen).

Constructed by: Kerstin Hünninger

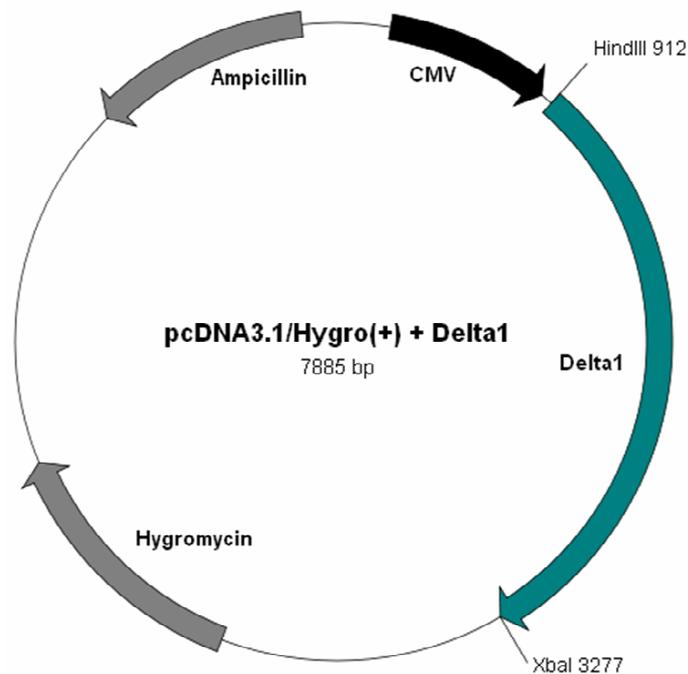


Leibniz Institute for Age Research
Fritz Lipmann Institute (FLI)

Dr. habil. Christoph Kaether
Group "Membrane Trafficking of Proteins
involved in Alzheimer's Disease"
Beutenbergstraße 11, 07745 Jena
Phone: +49 3641 656230
Email: ckaether@fli-leibniz.de

Plasmid:

pcDNA3.1/Hygro(+) + Delta1



Comments: Human Delta1 tagged C-terminally with HA-tag was obtained from Falk Fahrenholz (Universität Mainz). Delta1-HA gene was cut out from pcDNA3 + Delta1-HA construct using HindIII / XbaI and subsequently cloned into HindIII / XbaI sites of pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen).

Constructed by: Kerstin Hünninger

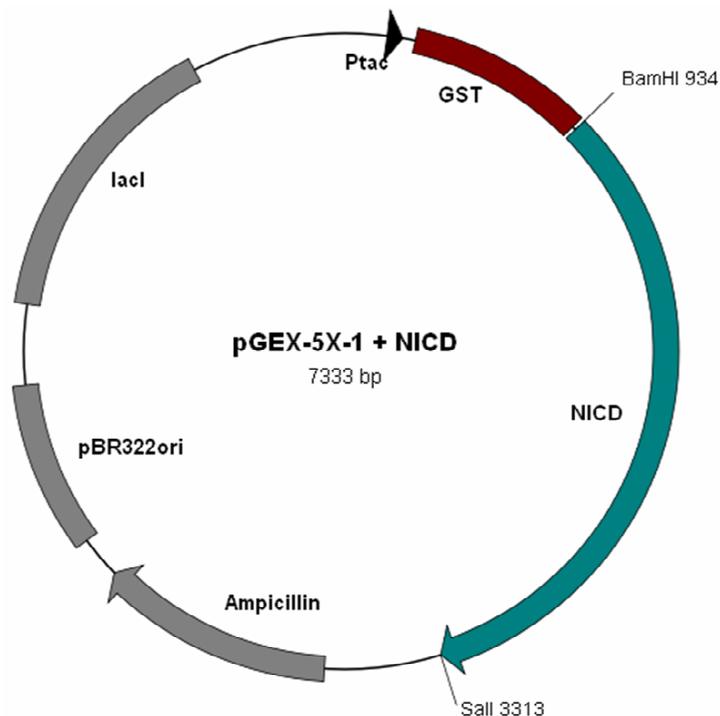


Leibniz Institute for Age Research
Fritz Lipmann Institute (FLI)

Dr. habil. Christoph Kaether
Group "Membrane Trafficking of Proteins
involved in Alzheimer's Disease"
Beutenbergstraße 11, 07745 Jena
Phone: +49 3641 656230
Email: ckaether@fli-leibniz.de

Plasmid:

pGEX-5X-1 + NICD



Comments: Mouse NICD gene (NCBI number NM_008714) was amplified from cDNA of C2C12 myoblasts using forward primer 5'-**GGATCC**AGGTGCTGCTGTCC CGCAAGCG-3' and reverse primer 5'-**GTCGACTT**ATTTAAATGCCTCTGGAATG TGGGTG-3' and subsequently cloned into BamHI / SalI sites of pGEX-5X-1 (Amersham Biosciences). Restriction sites in primers are in bold.

Constructed by: Kerstin Hünninger

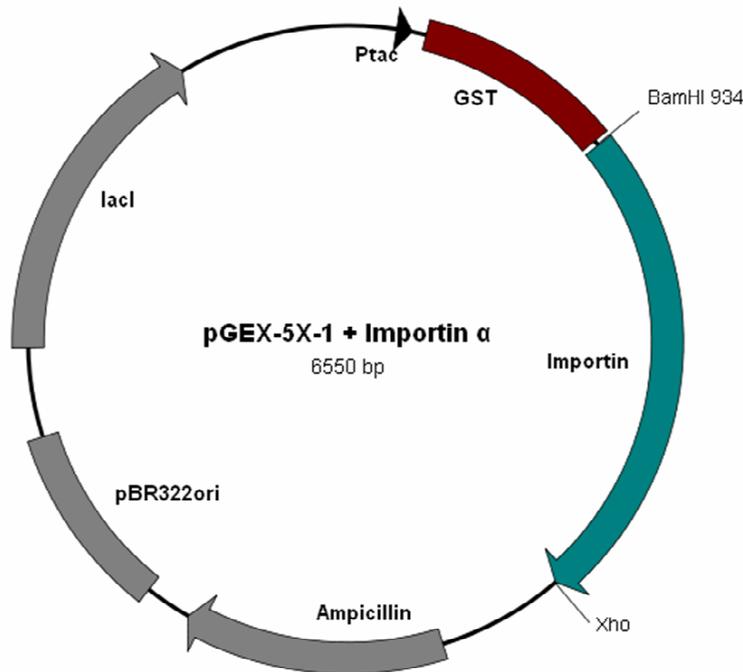


Leibniz Institute for Age Research
Fritz Lipmann Institute (FLI)

Dr. habil. Christoph Kaether
Group "Membrane Trafficking of Proteins
involved in Alzheimer's Disease"
Beutenbergstraße 11, 07745 Jena
Phone: +49 3641 656230
Email: ckaether@fli-leibniz.de

Plasmid:

pGEX-5X-1 + Importin α



Comments: Mouse importin $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ and $\alpha 7$ genes were amplified from cDNA of C2C12 myoblasts (for respective forward and reverse primers, see table below) and subsequently cloned into BamHI / XhoI sites of pGEX-5X-1 (Amersham Biosciences). Restriction sites in primers are in bold.

Constructed by: Kerstin Hänniger

Gen	NCBI Nr.	Primer (5' - 3')	PCR-Produkt
Importin α 1 = KPNA5	NM_010655	GGATCCAGATGTCCACGAACGAGAATGCTAA CTCGAGTTAGAAGTTAAAGGTCCCAGGAGCTCC	1604 bp
Importin α 3 = KPNA4	NM_008467	GGATCCAGATGGCGGACAACGAGAAATTGGAC CTCGAGCTAAAACCTGGAACCCCTCTGTTGGTAC	1580 bp
Importin α 4 = KPNA3	NM_008466	GGATCCAGATGGCCGAGAACCCCGGCTTG CTCGAGTTAGAAATTAAATTCTTTTGTTG	1586 bp
Importin α 5 = KPNA1	NM_008465	GGATCCAGATGTCCACACCAGGAAAAGAG CTCGAGTCAAAGCTGGAAACCTTCCATAG	1631 bp
Importin α 7 = KPNA6	NM_008468	GGATCCAGATGGAGACCATGGCAAGCCC CTCGAGCTATTATAGCTGGAAGCCCTC	1628 bp

Danksagung

Auf dieser Seite möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Bewältigung dieser Promotionsarbeit immer hilfreich und unterstützend zur Seite standen:

Zuerst möchte ich meinen Betreuer Dr. habil. Christoph Kaether für die Bereitstellung des interessanten und abwechslungsreichen Themas für meine Dissertation danken. Er hat mir über den gesamten Zeitraum hinweg mit viel fachlicher Unterstützung, wertvoller Diskussion und Kritik sowie viel Motivation zur Seite gestanden. Ebenso hatte er immer ein offenes Ohr für neue Ideen.

Den Mitgliedern meines Thesis Committees - Dr. Heike Heuer, Prof. Dr. Frank Böhmer und Dr. habil. Christoph Kaether - danke ich für das Interesse an meiner Arbeit, die anregenden Diskussionen und die vielen hilfreichen Vorschläge zum Projekt.

Dr. Reinhard Depping sowie Dr. Ralph Kehlenbach danke ich für die Hilfe bei wichtigen Experimenten zur Vervollständigung dieser Promotionsarbeit und die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitsgruppen.

Ein besonderes Dankeschön gebührt auch Dr. Enrico Jandt und Dr. habil. Ignacio Rubio, welche diese Arbeit gelesen und durch ihre Vorschläge verbessert haben.

Den Gutachtern der Arbeit danke ich herzlich für die Bereitschaft zur Übernahme dieser Aufgabe.

Besonders möchte ich allen Mitarbeitern aus der AG Kaether und AG Heuer für die gute Zusammenarbeit und die positive Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors danken. Für diese gute Zeit bedanke ich mich speziell bei Dani, Matze, Christina und Sigrun. Dankeschön für viele gute Ideen, wertvolle Ratschläge und aufbauende Worte. Vor allem ohne die Hilfe von Dani wäre so manches Problem ungelöst geblieben.

Meinen Freunden, die mir trotz akutem Zeitmangel die Treue gehalten haben, danke ich für viele motivierende Worte und entspannende gemeinsame Unternehmungen. Besonders Katja Seider und Michael Graf hatten immer ein offenes Ohr, wenn es mal nicht so gut lief.

Die wichtigste Unterstützung bei diesem Projekt kam aber von meiner Familie. Meinem Freund Christian danke ich für seine fortwährende Unterstützung und für die Kraft, die er mir gibt. Er hat mich immer aufgerichtet, wenn es Probleme gab und meinen Blick wieder auf das Ziel gelenkt. Meinen Eltern danke ich für den Rückhalt während der gesamten Zeit meines Studiums und dieser Arbeit. Ohne euch wäre ich nicht hier. Zuletzt möchte ich noch Elisabeth und Gunter Wolf danken, die mich beim Schreiben dieser Promotionsarbeit durch die Bereitstellung eines "Büros", viel Süßem und aufbauenden Worten immer unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kerstin Hünninger
Geburtstag: 25. Oktober 1981
Geburtsort: Jena
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1992 - 2000 **Staatliches Gymnasium "Leuchtenburg", Kahla**

06/2000 Abitur (1.3)

10/2000 - 12/2005 **Studium der Biochemie und Molekularbiologie (D)**
Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Studienschwerpunkt: Molekulare Medizin

09/2002 Vordiplom

10/2004 - 12/2005 Diplomarbeit mit dem Thema:
"Biochemische Analyse der B-Raf-enthaltenen Komplexe in der
U937-Leukämie-Zelllinie"

Institut für Molekulare Zellbiologie / FSU Jena

Arbeitsgruppe: "Kompartimentierung der Ras Aktivität in
Tumorzellen"

Betreuer: Dr. habil. Ignacio Rubio

02/2006 Diplom (1.2)

Promotion

seit 01/2006 **Doktorand am Leibniz Institut für Altersforschung -**
Fritz-Lipmann-Institut (FLI), Jena

Arbeitsgruppe: "Membrane Trafficking of Proteins involved in
Alzheimer's Disease"

Betreuer: Dr. habil. Christoph Kaether

Publikation, Vorträge und Poster

Publikation

Peer-reviewed journal:

Huenniger, K.; Krämer, A.; Soom, M.; Köhler, M.; Depping, R.; Kehlenbach, R. and Kaether, C.: *Notch1 signaling is mediated by importins alpha 3, 4 and 7.* submitted November 2009 to Cellular and Molecular Life Sciences, *currently under revision*

Vorträge

Huenniger, K.: *Flash talk: Notch signaling in neurons.*, EMBO/FEBS/ISF workshop on Systems Dynamics of Intracellular Communication: Overcoming Distance in Signalling Networks, Jerusalem Hills, Israel, März 2007

Huenniger, K.: *Notch1 signaling is mediated by importins alpha 3, 4 and 7.*, The Notch Meeting, Athen, Griechenland, September 2009

Poster-Präsentationen

Huenniger, K.; Reichenbach, D. and Kaether, C.: *Notch signaling in neurons.*, EMBO/FEBS/ISF workshop on Systems Dynamics of Intracellular Communication: Overcoming Distance in Signalling Networks, Jerusalem Hills, Israel, März 2007

Huenniger, K.; Reichenbach, D. and Kaether, C.: *Notch signaling in neurons.*, ELSO 2007, Dresden, September 2007