

Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des humanen CCM3-Proteins

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Katrin Voß

aus Berlin

Würzburg 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender:

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. med. Ute Felbor

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. med. Ricardo Benavente

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für Papa

INHALTSVERZEICHNIS:

SUMMARY	2
ZUSAMMENFASSUNG	3
1. EINLEITUNG.....	4
1.1 EIGENSCHAFTEN ZEREBRALER KAVERNÖSER GEFÄßMALFORMATIONEN (CCM).....	4
1.2 PATIENTEN MIT ZEREBRALEN KAVERNÖSEN MALFORMATIONEN ZEIGEN MUTATIONEN IN DREI GENEN ...	5
1.3 DIE CCM-PROTEINE - EIGENSCHAFTEN UND INTERAKTIONEN	7
1.3.1 CCM1 – ein vielseitiger Interaktor und Modulator β 1-Integrin-vermittelter Prozesse.....	7
1.3.2 CCM2 – ein Gerüstprotein mit regulatorischer Funktion	10
1.3.3 CCM3 - „A Known Gene of Unknown Function“	12
1.4 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	13
2. ERGEBNISSE	14
2.1 CCM3 INTERAGIERT MIT CCM2 UND WIRD VON DER SERIN/THREONIN-KINASE STK25 PHOSPHORYLIERT (VOSS ET AL., 2007)	14
2.2 CCM3 BILDET ZUSAMMEN MIT CCM2 UND CCM1 EINEN TERNÄREN KOMPLEX (STAHL ET AL., 2008).	15
2.3 CCM3 WIRD DURCH OXIDATIVEN STRESS HERUNTERREGULIERT (MANUSKRIFT IN VORBEREITUNG)...	16
2.4 DIE ETABLIERUNG DER <i>TANDEM-AFFINITY-PURIFICATION</i> (TAP)-METHODE	24
3. DISKUSSION	26
3.1 CCM3 BILDET MIT CCM1 UND CCM2 EINEN TERNÄREN PROTEINKOMPLEX.....	26
3.2 DEPHOSPHORYLIERTES CCM3 IST BESTANDTEIL DES TERNÄREN CCM1/CCM2/CCM3- PROTEINKOMPLEXES	29
3.3 OXIDATIVER STRESS MODULIERT DIE CCM3-EXPRESSION.....	31
4. KOOPERATIONSPROJEKT: KLONIERUNG UND EXPRESSION DES G-PROTEIN GEKOPPELTEN P2Y5- REZEPTORS (PASTERNAK ET AL., 2008)	34
5. REFERENZEN	35
CURRICULUM VITAE	41
ERKLÄRUNG	43
DANKSAGUNG	44
ANLAGE 1-3	45

Summary

Cerebral cavernous malformations (CCMs) are vascular lesions in the brain which are characterized by greatly dilated blood-filled vessels without intervening brain parenchyma. The vessels are lined by a monolayer of endothelial cells (EC) and lack characteristics of matured vessels. The clinical symptoms can vary from headaches to hemorrhagic stroke. The clinical progression is unpredictable and therapeutic interventions are limited to neurosurgical resection. The molecular mechanisms which lead to CCM formation are unknown. CCM lesions occur sporadically or in a familial form following autosomal-dominant inheritance. Three genes have been associated with familial CCMs: *CCM1/KRIT1*, *CCM2/MGC4607* und *CCM3/PDCD10*. Patients carrying a mutation in one of the three *CCM* genes are phenotypically indistinguishable. Therefore, it was suggested that the three CCM proteins (CCM1, CCM2, and CCM3) are part of one molecular pathway. In this study, we first show that CCM3 interacts with CCM2 and is part of a ternary CCM1/CCM2/CCM3 complex. Studies with the only known human in-frame deletion of exon 2 of the *CCM2* gene, which lacks 58 amino acids (CCM2:p.P11_K68del), revealed that CCM2 is the linker molecule between CCM1 and CCM3 and scaffolds the ternary complex. Additionally, it is shown that CCM3 binds to serine/threonine kinase STK25 and to Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1). STK25 phosphorylates CCM3 at serine 39 and threonine 43. The catalytic domain of FAP-1 dephosphorylates CCM3. With the help of the human mutant *CCM3:c.97_150del* which carries an in-frame deletion of exon 5 of *CCM3* and therefore lacks the 18 amino acids (CCM3:p.L33_K50del), we were able to reveal that dephosphorylated CCM3 is part of the ternary CCM complex *in vitro*. This mutant lacks the STK25 binding and phosphorylation sites but is still able to form a ternary protein complex with CCM1 and CCM2. Therefore, STK25 and FAP-1 could regulate CCM3 function due to their catalytic activities. Finally, it has been proven that induction of oxidative stress by H₂O₂ down-regulates CCM3 expression in human dermal microvascular endothelial cells. Combined the results link CCM3 to molecules and regulatory processes, which are part of signalling pathways important for angiogenesis and vascular development. Further characterization of CCM3 interactions and their regulatory mechanisms could help to unmask the molecular pathways underlying CCM formation and offer the possibility for an alternative therapeutic treatment other than surgery, which contains multiple risks for patients.

Zusammenfassung

Zerebrale kavernöse Malformationen (CCM) sind vaskuläre Fehlbildungen im Gehirn. Sie sind gekennzeichnet durch stark dilatierte, blutgefüllte Gefäße mit einschichtigem Endothel, denen Merkmale ausgereifter Blutgefäße fehlen. Die klinischen Symptome reichen von Kopfschmerz bis hin zu hämorrhagischem Schlaganfall. Eine genaue Vorhersage des Krankheitsverlaufs ist nicht möglich und die neurochirurgische Dissektion ist in der Regel die Therapieform der Wahl. Die genauen molekularen Mechanismen der CCM-Pathogenese sind unbekannt. CCMs treten sporadisch oder familiär gehäuft auf und folgen einem autosomal-dominanten Erbgang. Drei krankheitsverursachende Gene wurden in familiären CCMs identifiziert: *CCM1/KRIT1*, *CCM2/MGC4607* und *CCM3/PDCD10*. Da Patienten mit einer Mutation in einem der drei *CCM*-Gene denselben klinischen Phänotyp aufweisen, wurde angenommen, dass die CCM-Proteine (CCM1, CCM2 und CCM3) Bestandteile eines molekularen Signalwegs sind. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass CCM3 mit CCM2 interagiert und zusammen mit CCM1 einen ternären Proteinkomplex bildet. Untersuchungen mit der humanen *in-frame* CCM2-Deletionsmutante CCM2:p.P11_K68del belegten, dass CCM2 das zentrale Gerüstprotein des CCM1/CCM2/CCM3-Proteinkomplexes ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CCM3 an die Serin/Threonin-Kinase STK25 und an die Fas-assoziierte Phosphatase-1 (FAP-1) bindet. STK25 phosphoryliert CCM3 am Serin 39 und am Threonin 43. Die katalytische Domäne von FAP-1 dephosphoryliert CCM3. Untersuchungen mit der einzig bekannten humanen CCM3-Deletionsmutante, der aufgrund einer *in-frame* Deletion von Exon 5 im *CCM3*-Gen 18 Aminosäuren (CCM3:p.L33_K50del) fehlen, belegten zudem, dass *in vitro* dephosphoryliertes CCM3 Bestandteil des ternären CCM-Proteinkomplexes ist. Während STK25 die Deletionsmutante nicht mehr binden und phosphorylieren konnte, war die Interaktion mit CCM2 und die Bildung des ternären CCM-Komplexes nicht beeinträchtigt. Somit könnte CCM3 über die Dephosphorylierung durch FAP-1 und die Phosphorylierung durch STK25 funktionell reguliert werden. Es stellte sich zudem heraus, dass CCM3 durch Induktion von oxidativem Stress mittels H₂O₂-Behandlung in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen herunterreguliert wird. Die in dieser Arbeit beschriebene Charakterisierung von CCM3-Interaktionen bringt CCM3 über seine Interaktionspartner erstmals in Zusammenhang mit molekularen Signalwegen, die an Prozessen der Angiogenese und vaskulären Entwicklung beteiligt sind. Die Ergebnisse liefern wichtige Hinweise für die Entschlüsselung der pathogenen Mechanismen zerebraler kavernöser Malformationen und stellen einen ersten Schritt dar, um andere Behandlungsansätze als den bisher angewandten chirurgischen Eingriff, der multiple Risiken birgt, entwickeln zu können.

1. Einleitung

1.1 Eigenschaften zerebraler kavernöser Gefäßmalformationen (CCM)

Zerebrale kavernöse Malformationen (CCMs, OMIM 116860, 603284, 603285) sind häufige vaskuläre Fehlbildungen im Gehirn, die eine Vielzahl neurologischer Störungen verursachen können. Die Häufigkeit des Auftretens beträgt 0.1-0.5% (Siegel et al., 2005). Die familiäre Form ist mit 1:2000 bis 1:10000 mit anderen monogenen Erkrankungen wie Chorea Huntington oder der Neurofibromatose vergleichbar (Felbor, 2007). CCMs gehören neben den arteriovenösen Malformationen, den venösen Angiomen und den kapillären Telangiektasien zu den Gefäßmalformationen (Russel und Rubinstein, 1989). Seit ihrer Erstbeschreibung durch Luschka im Jahr 1854 (Luschka, 1854) wurde die pathologische Definition mehrfach geändert. Heute werden sie als gut abgrenzbare, maulbeerartige Läsionen mit fehlendem Hirnparenchym definiert (Siegel et al., 2005). Sie bestehen aus blutgefüllten, dilatierten Gefäßen, die von einem einschichtigen Endothel umgeben sind. Bestandteile ausgereifter Blutgefäße wie vaskuläre glatte Muskelzellen und feste endotheliale Zell-Zell-Kontakte, sogenannte *tight junctions*, fehlen (Clatterbuck et al., 2001). Die Größe kavernöser Malformationen, auch Kavernome oder kavernöse Angiome genannt, variiert von wenigen Millimetern bis hin zu mehreren Zentimetern (Bertalanffy et al., 2002). Kavernome des Zentralen Nervensystems (ZNS) bilden eine häufige Ursache für hämorrhagischen Schlaganfall im Kindesalter (Lynch et al., 2002). Weitere klinische Symptome sind chronische Kopfschmerzen, epileptische Krampfanfälle oder fokale neurologische Defizite als Folge von Blutungen (Labauge et al., 2007; Revencu und Vikkula, 2006; Robinson et al., 1993). Die klinische Manifestation erfolgt meist zwischen der zweiten und vierten Lebensdekade (Siegel et al., 2005). Mittels Magnetresonanztomographie (MRT) werden Kavernome diagnostiziert. Patienten, bei denen die Notwendigkeit besteht, ein Kavernom zu entfernen, müssen sich in der Regel einem operativen Eingriff unterziehen. Eine Strahlentherapie wird aufgrund der auftretenden Spätschäden selten angewandt. Eine pharmakologische Therapie ist aufgrund fehlenden Wissens über die molekularen Entstehungsmechanismen nicht möglich. Asymptomatische Patienten sollten in regelmäßigen Abständen neuroradiologisch untersucht werden, da auch eine genaue Vorhersage des Krankheitsverlaufs aufgrund der hohen individuellen Variabilität nicht möglich ist. Ein höheres Blutungsrisiko wird Schwangeren und Kindern zugeschrieben (Felbor, 2007; Samii et al., 2001).

Kavernome treten sporadisch oder familiär gehäuft auf. Seit der Erstbeschreibung einer Familie durch Hugo Friedrich Kufs im Jahr 1928 (Kufs, 1928) wurden weltweit über 300 weitere Familien identifiziert und beschrieben. Der Großteil mexikanisch-amerikanischer Familien besitzt aufgrund eines Gründereffekts die familiäre Form (Gunel et al., 1996; Sahoo et al., 1999). Eine Kohortenstudie italienischer und US amerikanischer CCM-Patienten wies eine weitere Gründermutation, eine Deletion von Exon 2-10 im *CCM2*-Gen, in der amerikanischen Patientenkohorte nach (Liquori et al., 2008). In Europa sind 10%-20% der Fälle hereditär (zitiert in Felbor und Sure, 2006). Die Penetranz der familiären autosomal-dominant vererbten Kavernome ist unvollständig. Auch variiert die Expressivität, da CCMs ein klinisches Spektrum von Kopfschmerz bis hin zu Hirnblutungen mit schwerwiegenden Folgen umfassen. Bei familiären Fällen steigt in der Regel die Anzahl der auftretenden Läsionen mit zunehmendem Alter. Während bei familiären Fällen multiple Läsionen im ZNS auftreten, sind bei sporadischen Fällen häufig nur singuläre Läsionen zu finden. Auch ist der Anteil an Patienten mit klinischen Symptomen höher bei der hereditären als bei der sporadischen Form (Labauge et al., 1998).

1.2 Patienten mit zerebralen kavernösen Malformationen zeigen Mutationen in drei Genen

Die genauen Entstehungsmechanismen kavernöser Malformationen sind bislang unklar. Es wurden drei *CCM*-Krankheitsgene identifiziert: *CCM1/KRIT1* auf Chromosom 7q21.2 (Laberge-le Couteulx et al., 1999), *CCM2/MGC4607* auf Chromosom 7p13 (Denier et al., 2004; Liquori et al., 2003) und *CCM3/PDCD10* auf Chromosom 3q26.1 (Bergametti et al., 2005; Guclu et al., 2005). Es wird vermutet, dass Kavernome durch einen *Two-hit*-Mechanismus (Knudson, 1971) entstehen. Das heißt, neben einer heterozygoten Keimbahnmutation ist eine zweite somatische Mutation für die Kavernomausbildung notwendig. Allerdings wurde bisher nur in einer Läsion eine zweite somatische Mutation identifiziert (Gault et al., 2005; Kehrer-Sawatzki et al., 2002). Die nicht vererbten sporadischen CCMs sollten demnach durch zwei Mutationsereignisse in somatischen Zellen entstehen. Einen solchen Fall beschrieben Kehrer-Sawatzki und Mitarbeiter (Kehrer-Sawatzki et al., 2002). In sporadischem Kavernomgewebe wurden zwei *Missense*-Mutationen im *CCM1*-Gen identifiziert. Eine *de novo* Entstehung von Kavernomen wurde nach Bestrahlung bei leukämiekranken Kindern (Detwiler et al., 1998) und in kernspintomographischen Verlaufsstudien belegt (Brunereau et al., 2000; Zabramski et al., 1994).

In den *CCM*-Genen wurden verschiedene Mutationen nachgewiesen (Abb. 1). Neben Leseraster- (*Frameshift*-), Stop-, Spleiß- und *Missense*-Mutationen wurden mehrere Deletionen im *CCM2*-Gen (Denier et al., 2004; Felbor, 2007; Liquori et al., 2007; Liquori et al., 2008), vier große Deletionen im *CCM1*-Gen (Asmus et al., 2007; Felbor, 2007; Gaetzner et al., 2007; Liquori et al., 2008) und zwei Deletionen des gesamten *CCM3*-Gens (Bergametti et al., 2005; Liquori et al., 2008) beschrieben. Häufig resultieren die *CCM*-Mutationen in einem vorzeitigen Stoppkodon, welches zu einem trunkierten Genprodukt führt. Somit wird angenommen, dass diese trunkierten Proteine *in vivo* nicht stabil exprimiert werden und es sich bei den *CCM*-Mutationen um *loss-of-function*-Mutationen handelt.

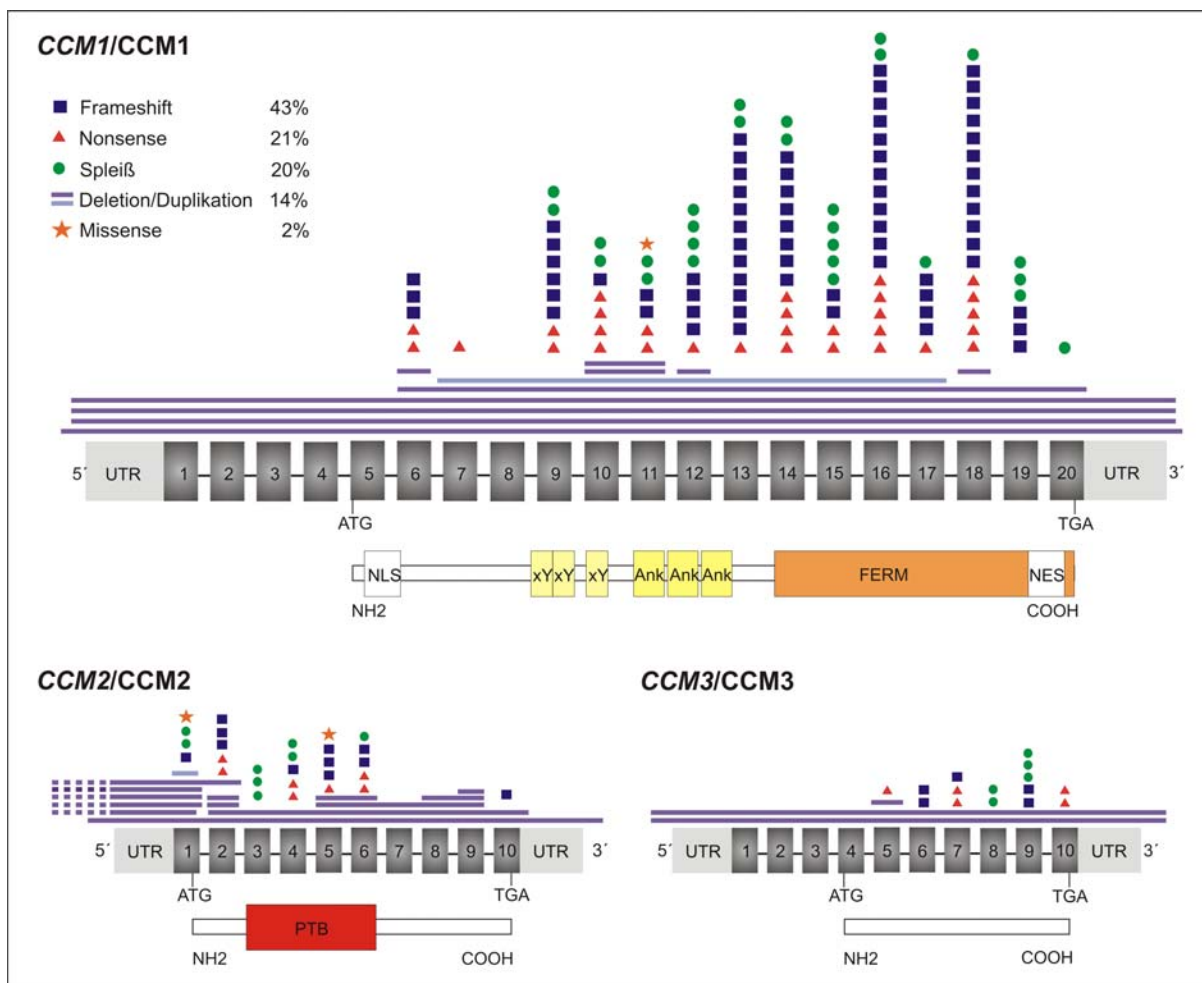


Abb. 1: Schematische Darstellung der Gen- und Proteinstruktur von *CCM1/CCM1*, *CCM2/CCM2* und *CCM3/CCM3*. Die Exons sind als graue Kästchen, die Introns als schwarze Striche dargestellt: UTR – nicht translaterter Bereich, ATG – Startcodon, TGA – Stoppkodon. Über den Genen sind publizierte und nicht publizierte Mutationen notiert (modifiziert und aktualisiert nach Felbor und Sure, 2006): Frameshift (blaues Quadrat), Nonsense (rotes Dreieck), Spleiß (grüner Kreis), Deletion (lila Balken), Duplikation (türkiser Balken) und Missense (roter Stern). Unter den Genen ist die Proteinstruktur vom Aminoterminus (NH₂) bis zum Carboxyterminus (COOH) mit den bekannten Domänen angegeben: NLS – nukleäres Lokalisationssignal, NES – nukleäres Exportsignal, xY – NPxY-Motiv, Ank – Ankyrin Repeat, FERM - four-point-one/ezrin/radixin/moesin Domäne, PTB – Phosphotyrosinbindungsdomäne.

Erst seit 2005 wird in Deutschland eine molekulargenetische Routinediagnostik angeboten (zitiert in Felbor, 2007). Über Stufendiagnostik, die eine Gendosis- und Transkriptanalyse mit einschließt, wird eine über 90%ige Mutationsdetektionsrate bei Patienten mit positiver Familienanamnese erreicht und somit eine präzise, prädiktive genetische Diagnostik möglich. Reine Exon-Screening Studien von familiären CCMs hatten zuvor CCM1-Mutationen in nur 43-54%, CCM2-Mutationen in 22% und CCM3-Mutationen in weniger als 10% der untersuchten Fälle detektieren können (Cave-Riant et al., 2002; Denier et al., 2004; Liquori et al., 2006; Verlaan et al., 2005).

Neuere Genotyp-Phänotyp Korrelationsanalyse schätzen die genspezifische klinische Penetranz für CCM1 auf 60%, für CCM2 auf 55% und für CCM3 auf 68% (Denier et al., 2006). In dieser Studie stellte sich ebenfalls heraus, dass CCM3-Mutationsträger, insbesondere im Kindesalter, ein höheres Risiko für zerebrale Blutungen besitzen.

1.3 Die CCM-Proteine - Eigenschaften und Interaktionen

1.3.1 CCM1 – ein vielseitiger Interaktor und Modulator β 1-Integrin-vermittelter Prozesse

Das CCM1-Gen kodiert das 84 kDa große Protein CCM1/Krit1 (*Krev interaction trapped 1*), welches 1997 in einer *Yeast Two-Hybrid* (Y2H) Studie als Interaktor des kleinen G-Proteins Rap1A (Krev-1) beschrieben wurde (Serebriiskii et al., 1997). Erst im Jahr 1999 wurde CCM1 mit kavernösen Malformationen in Zusammenhang gebracht (Laberge-le Couteulx et al., 1999; Sahoo et al., 1999). CCM1 besitzt drei aminoterminalen NPxY-Motive (Asparagin-Prolin-x-Tyrosin), drei Ankyrin-Motive (*Ankyrin Repeats*) und eine carboxyterminale „four-point-one/ezrin/radixin/moesin“ (FERM)-Domäne (Beraud-Dufour et al., 2007; Zhang et al., 2007) (Abb. 1). Weiterhin enthält es ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) im aminoterminalen und ein nukleäres Exportsignal im carboxyterminalen Bereich (Zhang et al., 2007). Es wird ubiquitär exprimiert (Serebriiskii et al., 1997) und konnte sowohl *in vivo* im vaskulären Endothelium (Guzeloglu-Kayisli et al., 2004) als auch *in vitro* in arteriellen und venösen Endothelzellen nachgewiesen werden (Glading et al., 2007). Die subzelluläre Lokalisation von CCM1 ist in Abhängigkeit der verwendeten Zellen und Versuchsbedingungen mehrfach publiziert worden. In den Zelllinien boviner Aortenendothelzellen (BAEC) und Baby-Hamster-Nierenzellen (BHK) wurde endogenes CCM1 als Mikrotubuli-assoziiertes Protein nachgewiesen (Beraud-Dufour et al., 2007; Gunel et al., 2002). In CCM1 überexprimierenden COS-7 Zellen, einer fibroblastenähnlichen

Affennieren-Epithelzelllinie (*Cercopithecus aethiops*), zeigte das Protein sowohl eine diffuse zytoplasmatische Verteilung als auch eine nukleäre Lokalisation (Zawistowski et al., 2005). In einer weiteren Arbeit, in der das Protein SNX17 (*sorting nexin 17*) als CCM1-Interaktionspartner identifiziert wurde, zeigte sich, dass in einer SNX17 überexprimierenden humanen embryonalen Nierenzelllinie (HEK293) CCM1 zu intrazellulären Vesikeln rekrutiert wird (Czubayko et al., 2006). Weitere Überexpressionsstudien zeigten, dass die Überexpression von ICAP-1 α (*integrin cytoplasmic domain associated protein-1 α*), CCM2 oder der kleinen GTPase Rap1A in verschiedenen Zelllinien zusätzlich die CCM1-Lokalisation beeinflusst (Glading et al., 2007; Zawistowski et al., 2005). CCM1 zeigte in ICAP-1 α überexprimierenden COS-7 Zellen eine nukleäre Lokalisation (Zawistowski et al., 2005). In BHK Zellen, die neben YFP-CCM1 und CFP-Tubulin eine konstitutiv aktive Form von Rap1A (Rap1AV12) überexprimierten, war die Mikrotubuli-Assoziation von CCM1 nicht mehr nachweisbar (Beraud-Dufour et al., 2007). Neuere Immunfluoreszenzstudien ergaben, dass endogenes CCM1 in den Regionen der Zellverbindungen und des Zellkerns (Nukleus) angereichert vorliegt, nicht aber an freiliegenden Membranen akkumuliert (Glading et al., 2007; Zawistowski et al., 2005).

Die genaue Funktion des CCM1-Proteins ist unklar. Es interagiert mit verschiedenen Proteinen und scheint über seine Interaktoren Rap1A und ICAP-1 α unter anderem an Integrin-vermittelten Prozessen beteiligt zu sein. Die 1997 beschriebene Interaktion zwischen CCM1 und Rap1A (Serebriiskii et al., 1997) konnte in neueren Studien belegt und näher charakterisiert werden (Beraud-Dufour et al., 2007; Glading et al., 2007). Die kleine GTPase Rap1A gehört zur Ras-Superfamilie und reguliert diverse zelluläre Prozesse wie die Aktivierung von Integrinen, die Zelladhäsion, die Zellpolarität und die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten (Bos, 2005; Caron, 2003; Kooistra et al., 2007). Es stellte sich heraus, dass CCM1 mittels seiner FERM-Domäne bevorzugt an die Guanosintriphosphat (GTP)-gebundene Form der kleinen GTPase bindet (Beraud-Dufour et al., 2007; Wohlgemuth et al., 2005). Die Überexpression von Rap1A in BAECs erhöhte die Assoziation von CCM1 mit den Zellkontaktproteinen β -Catenin und AF-6 (Glading et al., 2007). Weitere Experimente legten nahe, dass CCM1 an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist. Anhand dieser Ergebnisse wurde vorgeschlagen, dass CCM1 in Abhängigkeit von der Rap1A-Aktivität bei der Aufrechterhaltung der endothelialen Zell-Zell-Kontakte, der Permeabilität und Stabilität eine Rolle spielt. Mittels der FERM-Domäne ist CCM1 ebenfalls in der Lage, an Phosphatidyl-4,5-Inositol-2-Phosphat (PIP₂) von Liposomen zu binden (Beraud-Dufour et al., 2007). Rap1A verstärkte die Bindung an dieses Phospholipid, welches ein wesentlicher Bestandteil von Zellmembranen ist. Weitere *in vitro* Assays ergaben, dass der Aminoterminus (N-Terminus) von CCM1 über das erste NPxY-Motiv (Position Asparagin192-

Tyrosin195) mit dem Carboxyterminus (C-Terminus) interagiert. Dieses Ergebnis führte zu der Annahme, dass CCM1 intrazellulär in zwei Konformationen vorliegt: einer geschlossenen und einer offenen Form (Beraud-Dufour et al., 2007). Während Rap1A an beide Konformationen binden kann, bindet ICAP-1 α ausschließlich an die offene Konformation von CCM1. Das Protein bindet an dasselbe NPxY-Motiv, das auch mit dem C-Terminus interagiert. ICAP-1 α ist ein zytoplasmatisches Protein, welches mittels seiner Phosphotyrosinbindungs- (PTB) Domäne an das NPxY-Motiv des zytoplasmatischen Teils von β 1-Integrinen bindet und dadurch die β 1-Integrin-vermittelte Zelladhäsion und Migration negativ moduliert (Chang et al., 1997; Zhang and Hemler, 1999). Das Protein wurde bereits im Jahr 2001 als CCM1-Bindungspartner identifiziert (Zhang et al., 2001). In Kompetitionsstudien im Y2H-System wurde nachgewiesen, dass CCM1 mit β 1-Integrin um die ICAP-1 α -Bindung konkurriert (Zhang et al., 2001). Anhand dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass CCM1 den inhibitorischen Effekt von ICAP-1 α an β 1-Integrinen aufhebt und somit positiv an der β 1-Integrin-Aktivierung beteiligt ist. ICAP-1 α stört die Interaktion der beiden CCM1-Termini und führt zu einer offenen Konformation des Proteins, welches dann *in vitro* in der Lage ist, mit Rap1A und ICAP-1 α einen ternären Komplex zu bilden (Beraud-Dufour et al., 2007). Die Bindung von Rap1A und ICAP-1 α an CCM1 resultierte *in vitro* weiterhin in einer Aufhebung der Bindung von CCM1 an Mikrotubuli (Beraud-Dufour et al., 2007). Bereits im Jahr 2002 war gezeigt worden, dass CCM1 mit Mikrotubuli interagieren kann (Gunel et al., 2002). In Rap1A überexprimierenden BHK Zellen war die Kolokalisation von CCM1 und Mikrotubuli nicht mehr nachweisbar (Beraud-Dufour et al., 2007). Zugabe von ICAP-1 α zu rekombinantem CCM1 und Tubulin in Form polymerisierter Mikrotubuli führte zu einer 80%igen Reduktion der CCM1-Mikrotubuli-Assoziation. Hierbei stellte sich heraus, dass diese Inhibition nicht kompetitiv war. Diese Daten führten zu der Hypothese, dass CCM1 an der Rap1A-abhängigen Integrin-Aktivierung beteiligt sei. Demnach wandert CCM1 in seiner geschlossenen Konformation an den Mikrotubuli entlang und wird zur Plasmamembran rekrutiert. An der Membran bindet CCM1 dann an aktiviertes Rap1A und ICAP-1 α , was zur Aufhebung der Bindung an die Mikrotubuli und zu einer offenen Konformation des Proteins führt. Die Bindung von CCM1 an ICAP-1 α unterbindet dann die inhibitorische Interaktion von ICAP-1 α mit β 1-Integrin, so dass andere modulatorische Proteine an diese Untereinheit binden könnten und die β 1-Integrin-Aktivierung nicht mehr gestört wäre.

Untersuchungen in Tiermodellen wie der Maus gestalten sich schwierig, da homozygote *Ccm1^{-/-}*-Mausembryonen den elften embryonalen Entwicklungstag nicht überleben (Whitehead et al., 2004). Diese Mäuse zeigten ab dem achten Entwicklungstag vaskuläre Defekte wie dilatierte arterielle Gefäße, die mit einer Herunterregulation von

arterienspezifischen Markern wie *Efnb2*, *Dll4* und *Notch4* assoziiert waren. Der menschliche CCM-Phänotyp konnte in 20 untersuchten heterozygoten *Ccm1*^{+/}-Mäusen nicht nachgestellt werden (Plummer et al., 2004). Erst in *Knockout*-Mäusen, die zusätzlich zu einer heterozygoten *Ccm1*^{+/}-Mutation eine homozygote Mutation des Tumorsuppressorgens *Trp53* (*p53*^{-/-}) besaßen, waren vaskuläre Läsionen nachweisbar. Insgesamt trat jedoch in nur fünf von insgesamt neun analysierten Gehirnen der *Ccm1*^{+/} *p53*^{-/-}-Mäuse ein Phänotyp auf, der dem zerebraler kavernöser Malfomationen entsprach (Plummer et al., 2004). Anhand dieser Studien wurde angenommen, dass CCM1 entscheidend an der Vaskulogenese, insbesondere der Morphogenese und Festlegung der Gefäßidentität beteiligt sein soll. Zellzyklusproteine wie p53 bewirkten demnach zwar nicht alleine vaskuläre Läsionen, könnten aber als modulierende Faktoren in die Pathogenese zerebrovaskulärer Malfomationen eingreifen (Revenu and Vikkula, 2006).

1.3.2 CCM2 – ein Gerüstprotein mit regulatorischer Funktion

Zwei Arbeitsgruppen identifizierten unabhängig voneinander das zweite Kavernomverursachende Gen: *CCM2/MGC4607* (Denier et al., 2004; Liquori et al., 2003). Das *CCM2*-Gen kodiert das ubiquitär exprimierte 50 kDa große *CCM2/Malcavernin* (*cavernous malformation*) Protein. Es besitzt wie der *CCM1*-Interaktionspartner ICAP-1 α eine PTB-Domäne (Liquori et al., 2003) (Abb. 1), bindet aber im Gegensatz zu ICAP-1 α nicht an β 1-Integrine (Zhang et al., 2007). Im Jahr 2005 konnte die Interaktion zwischen *CCM1* und *CCM2* nachgewiesen werden (Zawistowski et al., 2005; Zhang et al., 2007). Das murine Ortholog von *CCM2*, *OSM* (*osmosensing scaffold for MEKK3*), wurde als Bindungspartner der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) MEKK3 und MKK3 sowie der GTPase Rac und dem Zytoskelettprotein Aktin identifiziert (Uhlik et al., 2003). In verschiedenen eukaryotischen Zellen bildete *OSM* nach Induktion von osmotischem Stress das zentrale Gerüstprotein für einen Rac-MEKK3-MKK3-Komplex. Durch siRNA (*short interfering RNA*)-Experimente wurde gezeigt, dass *OSM* notwendig für die Aktivierung des p38 MAPK-Signalwegs war, dem eine Schlüsselrolle bei der Zellantwort auf extrazellulären Stress zukommt. Die p38 mitogenaktivierte Proteinkinase ist hierbei über Regulation der Gentranskription (Garmyn et al., 2001; Sheikh-Hamad et al., 1998) und über post-translationale Modifikation modulierender Zytoskelettproteine (Ito et al., 1997; Landry und Huot, 1999) wesentlich an der zellulären Langzeit-Adaptation beteiligt, die durch anhaltenden hyperosmotischen Stress hervorgerufen wird. Der Rac-OSM-MEKK3-MKK3-Komplex in Säugern soll dem CDC42-STE50-STE11-Pbs2-Komplex in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entsprechen, der für die Regulation der p38-Aktivität notwendig ist (Uhlik et al.,

2003). *CCM2*-heterozygote Mausfibroblasten zeigten ein signifikant geringeres Level an aktivem phosphorylierten p38, wenn osmotischer Stress durch Zugabe von Sorbitol induziert wurde. Studien mit murinen präimplantierten Embryonen untermauern diesen Zusammenhang (Fong et al., 2007). Diese Embryokulturen zeigten in hyperosmotischem Medium einhergehend mit einer erhöhten p38-Aktivität auch ein erhöhtes *Ccm2*-Expressionsniveau. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass *CCM2* zusammen mit *CCM1* einen ternären Komplex mit MEKK3 bildet und an der p38-Aktivierung beteiligt ist (Zawistowski et al., 2005). FRET-Analysen mit CFP-*CCM2* und YFP-*CCM1* überexprimierenden COS-7 Zellen ergaben zudem, dass der *CCM1/CCM2*-Komplex nach Induktion von osmotischem Stress vom Zytoplasma zur Zellperipherie transloziert (Zawistowski et al., 2005). In weiterführenden Überexpressionsexperimenten wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass *CCM2* anscheinend für die zytoplasmatische Lokalisation von *CCM1* verantwortlich ist. Biochemische Bindungsstudien mit *CCM2*-Mutanten, die eine Punktmutation in der PTB-Domäne besaßen, wiesen nach, dass *CCM2* mittels der PTB-Domäne mit *CCM1* interagiert (Zawistowski et al., 2005). Die Bindung von *CCM1* an ICAP-1 α und an *CCM2* ist nicht kompetitiv, da *CCM2* über seine PTB-Domäne an das zweite und dritte NPxY-Motiv (Position 231-234 und 250-253) von *CCM1* bindet und zusammen mit ICAP-1 α einen Komplex bilden kann (Zawistowski et al., 2005; Zhang et al., 2007). Mit diesen Arbeiten wurden erstmals die Proteine *CCM1* und *CCM2* mit dem stress-responsiven p38 MAPK-Signalweg in Verbindung gebracht, der bei Fehlregulation an der Ausbildung vaskulärer Malformationen beteiligt sein könnte.

In Mäusen ist ein homozygoter *Knockout* von *Ccm2* lethal (Plummer et al., 2006) und *in vivo* Analysen gestalten sich daher ebenfalls schwierig. In nur zwei von insgesamt 21 untersuchten Mausgehirnen heterozygoter *Ccm2*^{+/-}-Mäuse konnten vaskuläre Malformationen nachgewiesen werden (Plummer et al., 2006). *In situ* Hybridisierungen und β -Galaktosidase-Färbungen muriner Hirnschnitte zeigten, dass das Expressionsmuster von *Ccm2* dem von *Ccm1* und *Itgb1bp1* (ICAP1 α) weitestgehend entspricht (Plummer et al., 2006; Seker et al., 2006). In dem Angiogenese-Tiermodell Zebrafisch wurde ebenfalls ein vaskulärer Phänotyp durch Mutagenese der *CCM1* und *CCM2* Homologen *santa* (*san*) und *valentine* (*vtn*) beobachtet (Jin et al., 2007). In verschiedenen genetischen Mutationsscreens zeigten *san* und *vtn* Zebrafisch-Mutanten einen signifikanten kardialen Phänotyp (Chen et al., 1996; Mably et al., 2006; Stainier et al., 1996). Die dünnen, auf einem einschichtigen Myokardium basierenden Herzkammern waren stark vergrößert. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Anzahl der Myokard- und Endokardzellen unverändert war. Auch war die Proliferationsfähigkeit dieser Zellen normal. Analysen zeigten, dass das konzentrische Wachstum dieser Zellen gestört war und somit das Ausreifen des Myokards während der

Vaskulogenese nicht stattfinden konnte (Mably et al., 2006). Erst die Analyse der *san* und *vtn* Mutationen in einer transgenen Endothelzell-spezifischen *green-fluorescent-protein* (GFP)-Reporter-Fischlinie (*Tg(flk1:EGFP)*^{s843}) wies nach, dass *san* und *vtn* mutierte Embryonen einen kardiovaskulären Phänotyp ausbilden und die Gefäße erweitert sind (Jin et al., 2007). Untersuchungen in einer zweiten transgenen Fischlinie mit einem GFP-Reporter für die Rezeptortyrosinkinase Tie2 (*Tg(tie2:GFP)*^{s849}) wiesen zudem nach, dass *san* mutierte Embryonen (*san*^{s234}) ein erhöhtes Tie2-Expressionsniveau besitzen (Jin et al., 2007). Paralleler *Knockdown* von *san* und *vtn* durch Koinjektionen der entsprechenden Morpholinos in Zebrafischembryonen (1-4 Zellstadium) bewirkten synergistische Effekte bei der Ausprägung des kardialen Phänotyps (Mably et al., 2006). Die *in vivo* Daten deuten darauf hin, dass CCM2 wie auch CCM1 eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des kardiovaskulären Systems spielt. Die ähnlichen Expressionsmuster von *Ccm1* und *Ccm2* in der Maus und der identische vaskuläre Phänotyp bei *Knockdown* eines der beiden Gene *in vivo* unterstützen die Hypothese, dass die CCM-Proteine Bestandteile eines molekularen Signalwegs sind.

1.3.3 CCM3 - „A Known Gene of Unknown Function“

Das dritte CCM-verursachende Gen, *CCM3*, kodiert das 25 kDa große CCM3 Protein, auch bekannt als PDCD10 (*programmed cell death 10*). Ursprünglich wurde *CCM3/CCM3* als *TFAR-15* Gen (*TF-1 cell apoptosis related gene*) beschrieben, welches nach Induktion von Apoptose in einer humanen myeloiden Zelllinie (TF-1 Zellen) und in einer BB-2 (*brown bullhead*) Fischzelllinie auf RNA-Ebene hochreguliert war (Busch et al., 2004; Wang et al., 1999). Erst im Jahr 2005 wurde das *CCM3*-Gen mit den zerebrovaskulären Malformationen in Zusammenhang gebracht (Bergametti et al., 2005).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung zerebraler kaverner Malformationen führen, sind unbekannt. Die klinischen Symptome dieser Erkrankung reichen von Kopfschmerz bis hin zu hämorrhagischem Schlaganfall mit Todesfolge. Die neurochirurgische Mikrodissektion ist derzeit die Therapie der Wahl. Die drei Gene *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* wurden mit der Erkrankung bei familiären Fällen assoziiert. Patienten mit einer Mutation in einem der drei *CCM*-Gene zeigen einen identischen klinischen Phänotyp, was darauf hindeutet, dass die Genprodukte *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* Bestandteile eines molekularen Signalwegs sein könnten. Ziel dieser Promotion war es, die Interaktionspartner des *CCM3*-Proteins, dessen Struktur und Funktion völlig unbekannt sind, zu identifizieren und die gefundenen Interaktionen zu charakterisieren. Hierzu sollten mit einer *Yeast Two-Hybrid* Studie und mit der Etablierung der *Tandem-Affinity-Purification* (TAP)-Methode neue *CCM3*-Interaktionspartner isoliert und identifiziert werden. Weiterhin wurde untersucht, ob *CCM3* mit den Proteinen *CCM1* und *CCM2* interagiert und die *CCM*-Proteine in einem ternären Proteinkomplex vorliegen. Mit dieser erstmaligen Charakterisierung des *CCM3*-Proteins und seiner Interaktionen wurde angestrebt, Hinweise auf die molekularen Mechanismen der *CCM*-Pathogenese zu erhalten. Dies würde eine erste Grundlage bieten, um in Zukunft risikoärmere, pharmakologische Therapieformen entwickeln zu können, die auch Behandlungsansätze für andere vaskuläre Erkrankungen beinhalten könnten.

2. Ergebnisse

2.1 CCM3 interagiert mit CCM2 und wird von der Serin/Threonin-Kinase STK25 phosphoryliert (Voss et al., 2007)

Das evolutiv hoch konservierte CCM3-Protein interagiert und kolokalisiert mit CCM2 (Anlage 1, Voss et al., 2007). Als weitere neue Interaktionspartner wurden in einem Y2H-Screen unter anderem die Serin/Threonin-Proteinkinasen 24 und 25 (STK24 und STK25) und die Tyrosinphosphatase FAP-1 (*Fas-associated phosphatase-1*) als neue CCM3-Bindungspartner identifiziert (Voss et al., 2007). Die Interaktionen von CCM3 mit der Kinase STK25 und der Phosphatase FAP-1 wurden mittels GST *Pull-down* Assays und Koimmunpräzipitationen bestätigt (Fig. 2a, b, Voss et al., 2007). In weiterführenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass STK25 CCM3 *in vitro* phosphoryliert und die katalytische Domäne von FAP-1 CCM3 *in vitro* dephosphoryliert (Fig. 3a-c, Voss et al., 2007). Die Proteinkinase STK24 besitzt zu STK25 eine 89%ige Aminosäureidentität der Kinasedomäne und eine 73% Aminosäureidentität des gesamten Proteins. STK24 war jedoch nicht in der Lage, CCM3 *in vitro* zu phosphorylieren (Fig. 3b, Voss et al., 2007). Die CCM3-Phosphorylierung durch STK25 wurde mittels Massenspektrometrie bestätigt (Abb. 2, unpublizierte Daten).

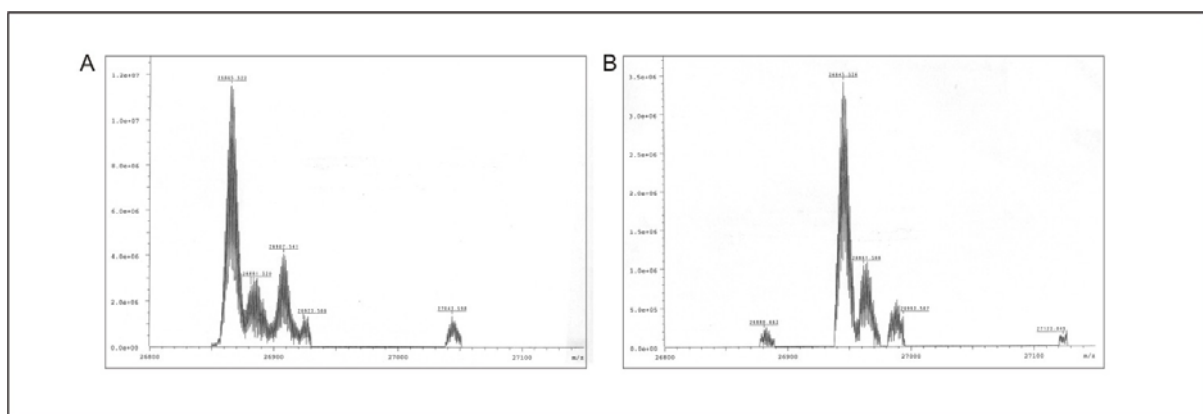


Abb. 2: Dekonvolvierte Massenspektren von nicht phosphoryliertem (**A**) und phosphoryliertem (**B**) His-CCM3. Die Verschiebung in der Masse von 26865,522 Da zu 26945,526 Da entspricht einer Phosphorylierung. In Kooperation mit Herrn Dr. W. Schmitz (Institut für Physiologische Chemie II, Universität Würzburg) erfolgten die massenspektrometrischen Messungen mit einem Bruker APEX II FTICR-MS Apollo ESI-Quelle und Z3T-Magnet und die Analysen der CCM3-Massenspektren.

Mittels Koimmunpräzitationsstudien wurde weiterhin nachgewiesen, dass CCM3 an CCM2 bindet, nicht aber mit CCM1 interagiert (Fig. 4a, b, Voss et al., 2007). Immunfluoreszenzexperimente untermauerten diese Interaktion, da eine Kolo­kalisierung von überexprimiertem CCM2 und CCM3 in HEK293 Zellen nachgewiesen werden konnte (Fig. 4c, Voss et al., 2007). Zudem wurde gezeigt, dass die Kinase STK25 mit CCM2, nicht aber mit CCM1 koimmunpräzipitiert (Fig. 5, Voss et al., 2007). Da CCM3 nicht mit CCM1 interagiert, beide Proteine aber an CCM2 binden können, wurde untersucht, ob CCM1 und CCM3 kompetitiv mit CCM2 interagieren. Es stellte sich heraus, dass die Interaktion der beiden Proteine kooperativ und nicht kompetitiv ist. Mit steigender Menge an CCM1 wurde auch mehr CCM3 koimmunpräzipitiert (Fig. 4d, Voss et al., 2007).

2.2 CCM3 bildet zusammen mit CCM2 und CCM1 einen ternären Komplex (Stahl et al., 2008)

Aufgrund des kooperativen Effekts von CCM1 und CCM3 wurde in weiterführenden Experimenten untersucht, ob die drei CCM-Proteine in einem ternären Komplex vorliegen. Mittels Koimmunpräzitationen und GST *Pull-down* Assays wurde bestätigt, dass CCM1 zusammen mit CCM2 und CCM3 einen ternären Komplex bildet (Anlage 2, Stahl et al., 2008). CCM3 koimmunpräzipitierte in Anwesenheit von CCM2 mit CCM1 (Fig. 5A, B, Stahl et al., 2008). Untersuchungen mit der erstmals beschriebenen *de novo* CCM1-Spleißmutante CCM1:c.2143-2A>G (CCM1:p.pA715VfsX14), der 22 Aminosäuren am C-Terminus fehlen, ergaben, dass auch diese Mutante mit CCM2 und CCM3 komplexieren kann (Fig. 5B, Stahl et al., 2008). Folglich ist die Bindungsfähigkeit dieser Mutante intakt, jedoch zeigte sich, dass die Expressionstärke reduziert war. Mit Hilfe einer humanen CCM2-Mutante, die eine *in-frame* Deletion von Exon 2 im CCM2-Gen besitzt (CCM2:c.31-?_204+?del, Liquori et al., 2007, Stahl et al., 2008), konnte weiterhin gezeigt werden, dass CCM2 das zentrale Linkermolekül zwischen CCM1 und CCM3 ist. Mit der Deletionsmutante CCM2:p.P11_K68del, der aminoterminal von der PTB-Domäne 58 Aminosäuren fehlen, war kein ternärer Komplex nachweisbar (Fig. 5A, Stahl et al., 2008). Es stellte sich heraus, dass neben einer intakten PTB-Domäne auch ein vollständiger N-Terminus in CCM2 vorhanden sein muss, um mit CCM1 interagieren zu können (Fig. 4, Stahl et al., 2008). Die mit einem Aminosäureaustausch in der PTB-Domäne untersuchten Punktmutanten CCM2:p.L198R und CCM2:p.F217A (Zawistowski et al., 2005) sowie die Deletionsmutante CCM2:p.P11_K68del interagierten nicht mehr bzw. nur noch sehr schwach mit CCM1 (Fig. 4A, Stahl et al., 2008). Die CCM3-Bindungsfähigkeit dieser Mutanten war kaum beeinflusst (Fig. 4B, Stahl et al., 2008).

2.3 CCM3 wird durch oxidativen Stress herunterreguliert (Manuskript in Vorbereitung)

In weiterführenden Analysen sollte die Rolle der CCM3-Phosphorylierung näher charakterisiert werden. Hierzu wurden zunächst in Zusammenarbeit mit Dr. J. Reinders (Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg) die Phosphorylierungsstellen massenspektrometrisch bestimmt. Rekombinantes His-CCM3 wurde *in vitro* phosphoryliert, in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE) und mit Trypsin verdaut. Die Peptide wurden anschließend mittels IMAC (*i*mmobilized metal ion affinity chromatography) aufkonzentriert und via nano-LC-MS/MS gemessen. CCM3 wird an zwei Stellen phosphoryliert: am Serin 39 und am Threonin 43 (Abb. 3, Manuskript in Vorbereitung).

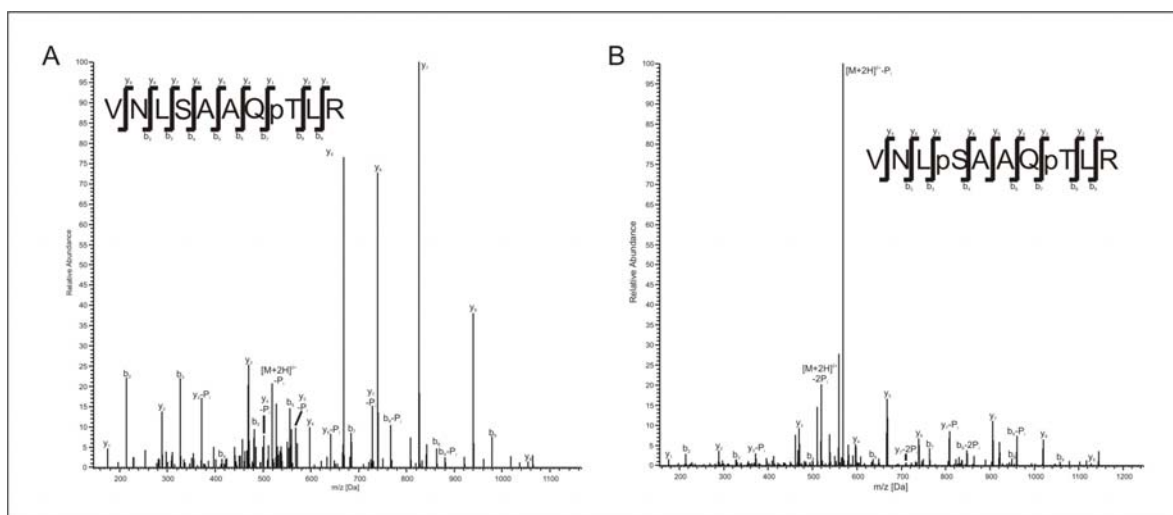


Abb. 3: Fragment-Ionen-Spektren der Peptide VNL[SAAQp]TLR (A) und VNLp[SAAQp]TLR (B). His-CCM3 wurde *in vitro* durch STK25 phosphoryliert, via SDS-PAGE aufgetrennt und im Gel mit Trypsin verdaut. Die Peptide wurden nach Aufkonzentrierung mittels nano-LC-MS/MS in Zusammenarbeit mit Dr. J. Reinders analysiert. CCM3 besitzt ein phosphoryliertes Serin an Position 39 (pS) und ein phosphoryliertes Threonin an Position 43 (pT). Alle prominenten Signale können b- und y- Ionen zugeordnet werden.

In vitro Kinaseassays mit einer rekombinanten humanen CCM3-Deletionsmutante stützen die massenspektrometrischen Daten (Abb. 4, Manuskript in Vorbereitung). Dieser Mutante fehlen aufgrund einer *in-frame* Deletion von Exon 5 (CCM3:c.97_150del) (Bergametti et al., 2005) 18 Aminosäuren (CCM3:p.L33_K50del). Diese Mutante wird nicht von STK25 *in vitro* phosphoryliert (Abb. 4, Manuskript in Vorbereitung).

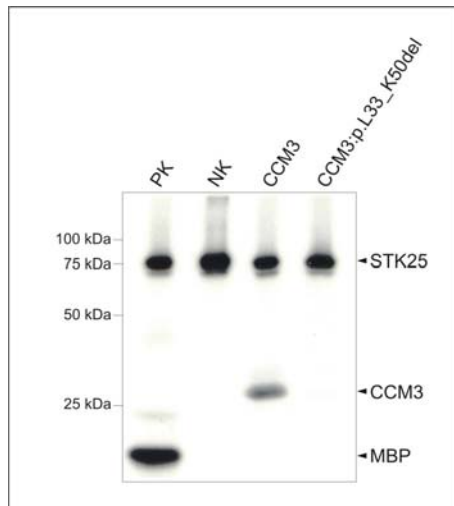


Abb. 4: Die humane CCM3-Mutante CCM3:p.L33_K50del wird *in vitro* nicht von STK25 phosphoryliert. Autoradiographie des *in vitro* Phosphorylierungsassays. Rekombinante GST-STK25 (STK25) wurde zusammen mit γ ATP(32 P) (NK) und den rekombinanten Substraten MBP (Myelin Basic Protein, PK), His-CCM3 (CCM3) und der humanen Mutante His-CCM3:p.L33_K50del inkubiert und auf einem denaturierendem Gel aufgetrennt. MBP (23 kDa Bande) und CCM3 (26 kDa Bande) wurden von STK25 phosphoryliert, nicht aber CCM3:p.L33-K50del. In allen vier Ansätzen ist die Autophosphorylierungsaktivität der Kinase auf Höhe von 75 kDa zu sehen.

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob CCM3 *in vivo* phosphoryliert wird und diese Phosphorylierung bestimmten Bedingungen unterliegt. Hierzu wurden HEK293 Zellen mit FLAG-CCM3 und FLAG-CCM3:p.L33_K50del transfiziert. Um sicher zu stellen, dass eine ausreichende Menge an Kinase in den Zellen vorhanden ist, wurde zusätzlich STK25 mit den CCM3-Konstrukten kotransfiziert.

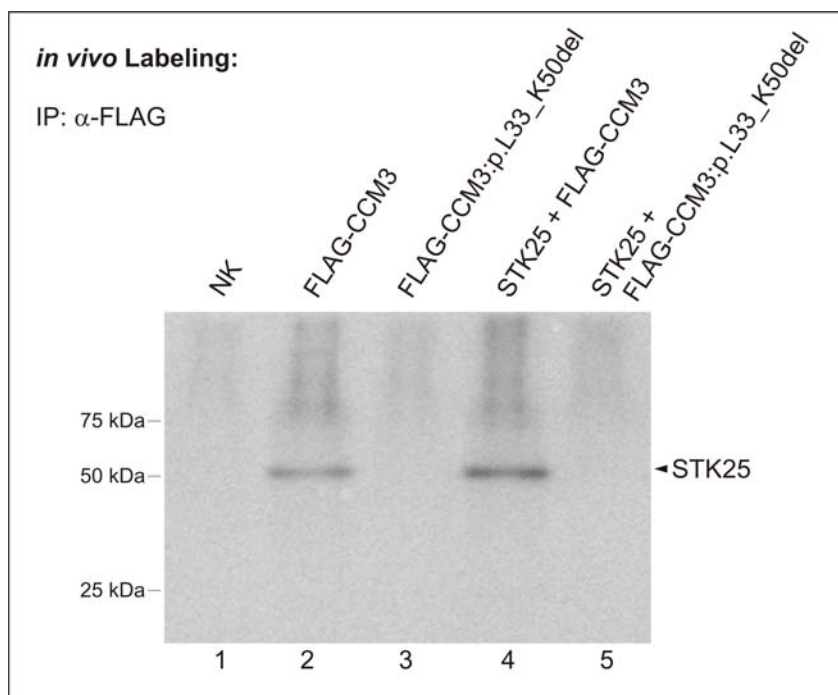


Abb. 5: Autoradiographie der *in vivo* Phosphorylierung von CCM3. HEK293 Zellen wurden wie angegeben mit dem FLAG-Leervektor (Spur 1, NK), Wildtyp FLAG-CCM3 (Spur 2), Mutante FLAG-CCM3:p.L33_K50del (Spur 3) alleine oder zusammen mit STK25 transfiziert (Spuren 4, 5). Nach 24 h erfolgte das metabolische Labeling mit (32 P)-Orthophosphat. Die transfizierten CCM3-Konstrukte wurden mit einem anti-FLAG Antikörper (IP: α -FLAG) immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Ein Signal auf Höhe von 25 kDa war nicht zu detektieren, was einem *in vivo* Phosphorylierungssignal von FLAG-CCM3 und FLAG-CCM3:p.L33_K50del entsprechen würde (Spuren 1-5). Die Signale auf Höhe von 50 kDa entsprechen endogener (Spur 2) und überexprimierter STK25 (Spur 5), die über CCM3 koimmunpräzipitiert wurde und zeigt die Autophosphorylierungsaktivität der Kinase.

Das metabolische Labeling mit (^{32}P)-Orthophosphat sowie die Auswertung des Versuchs erfolgte nach dem Protokoll von Knaus und Mitarbeitern (Hassel et al., 2006). Eine *in vivo* Phosphorylierung von CCM3 in HEK293 Zellen war nicht nachzuweisen (Abb. 5, Manuskript in Vorbereitung). In der Autoradiographie wurde ein Signal auf Höhe von 50 kDa sichtbar, welches der Kinase STK25 entspricht (Abb. 5, Spuren 2 und 4) und ihre Autophosphorylierungsaktivität *in vivo* demonstriert. Mit der humanen Deletionsmutante CCM3:p.L33_K50del konnte kein Signal der Kinase nachgewiesen werden (Abb. 5, Spuren 3 und 5).

Daraufhin wurde untersucht, warum kein Signal im *in vivo* Labeling-Versuch mit der humanen Deletionsmutante nachgewiesen werden konnte. Koimmunpräzitationsstudien mit überexprimierenden HEK293 Zellen wiesen nach, dass CCM3:p.L33_K50del nicht in der Lage ist, an die Kinase STK25 zu binden (Abb. 6, Manuskript in Vorbereitung).

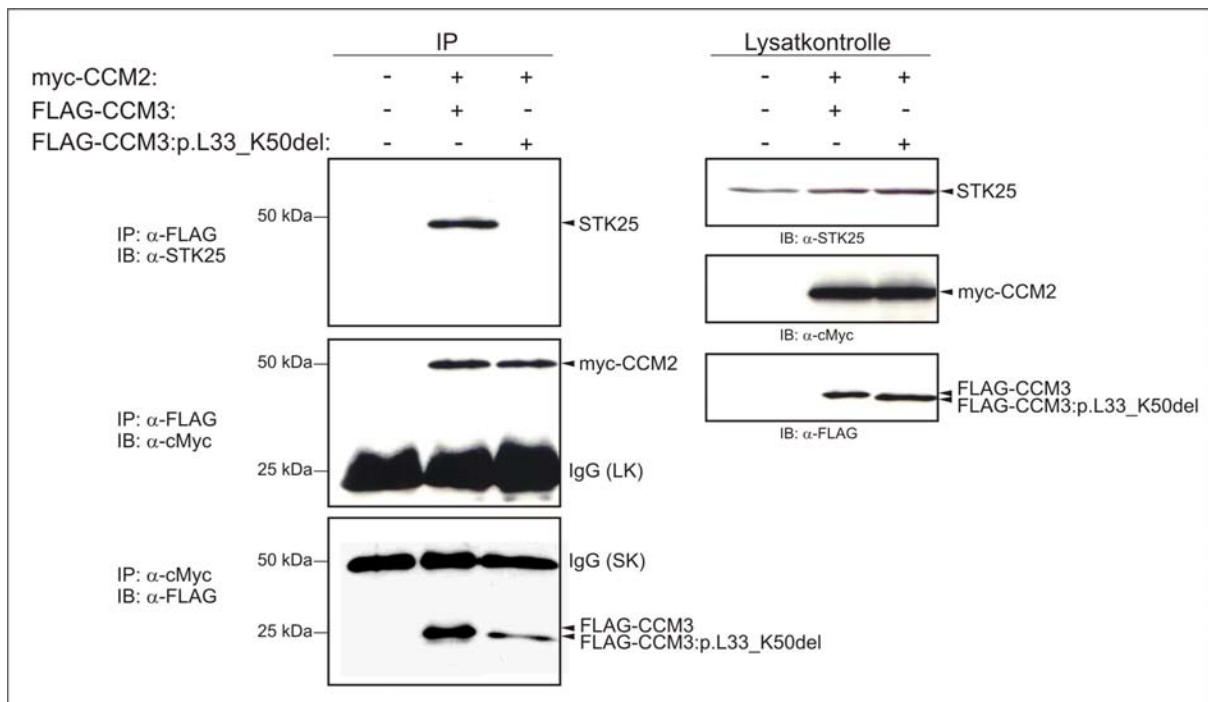


Abb. 6: Die Mutante CCM3:p.L33_K50del interagiert mit CCM2, nicht aber mit STK25. HEK293 Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient kotransfiziert und nach 48h lysiert. Die Proteinkomplexe wurden über anti-FLAG-Agarose (IP: α -FLAG) oder anti-c-Myc-Sepharose (IP: α -cMyc) nach Voss et al., 2007 koimmunpräzipitiert. Die IP-Eluate (IP, links dargestellt) und die Zelllysate (Lysatkontrolle, rechts dargestellt) wurden mittels Western Blot (IB) mit den angegebenen Antikörpern anti-STK25 (α -STK25), anti-c-Myc (α -cMyc) und anti-FLAG (α -FLAG) ausgewertet. CCM3 (FLAG-CCM3), nicht aber die CCM3-Deletionsmutante (FLAG-CCM3:p.L33_K50del) interagierte mit endogener STK25 (links, oberes Bild). Die Interaktion mit CCM2 (myc-CCM2) war nicht beeinträchtigt (links, mittleres und unteres Bild). Sowohl die endogen nachgewiesene Kinase STK25 als auch die kotransfizierten Konstrukte wurden in allen Ansätzen exprimiert (Lysatkontrollen). Als Negativkontrolle diente die Kotransfektion des FLAG- und myc-Leervektors (-). IgG (LK) – IgG-leichte Kette; IgG (SK) – IgG-schwere Kette.

Nur Wildtyp FLAG-CCM3 koimmunpräzipitierte mit endogener STK25 (Abb. 6, IP, oberster Blot). Die Interaktionsfähigkeit mit CCM2 war nicht beeinträchtigt (Abb. 6, IP, untere zwei Blots). Myc-CCM2 wurde sowohl mit Wildtyp FLAG-CCM3 als auch mit der Mutante FLAG-CCM3:p.L33_K50del koimmunpräzipitiert und umgekehrt.

Es war bekannt, dass endogene STK25 (SOK-1) in Ramos B Zellen, MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) Zellen und überexprimierte HA-STK25 in COS-7 Zellen nach Induktion von oxidativem Stress eine erhöhte Kinaseaktivität besitzt und *in vitro* verstärkt MBP phosphoryliert (Pombo et al., 1996; Pombo et al., 1997). Die nicht transfizierten und transfizierten Zellen wurden mit unterschiedlichen Stimuli wie zum Beispiel TNF- α , Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder Interferon- γ behandelt und im Anschluss wurde STK25 immunpräzipitiert. Die Kinasaktivität der immunpräzipitierten STK25 wurde anhand der MBP-Phosphorylierung *in vitro* bestimmt (Pombo et al., 1996). Es stellte sich heraus, dass die katalytische Aktivität nur durch Behandlung mit oxidativen Stress-Stimuli erhöht war. Wasserstoffperoxid und Menadion waren hierbei am effektivsten, so dass die CCM3-Phosphorylierung unter H₂O₂-Einfluss sowohl *in vitro* nach dem Protokoll von Pombo und Mitarbeitern (Pombo et al., 1996) als auch *in vivo* getestet wurde. Hierzu wurde eine Behandlung mit 0,5 mM H₂O₂ gewählt, da dies die effektivste Konzentration war. Die nach Pombo und Mitarbeitern beschriebene erhöhte Kinaseaktivität erreichte nach 20 min ihr Maximum und dauerte bis zu 60 min an. Für die folgenden Versuche wurde eine Inkubationszeit von 45 min gewählt. Eine verstärkte Phosphorylierung von His-CCM3 nach Behandlung der Zellen mit 0,5 mM H₂O₂ für 45 min war *in vitro* nicht nachzuweisen (Abb. 7, Manuskript in Vorbereitung).

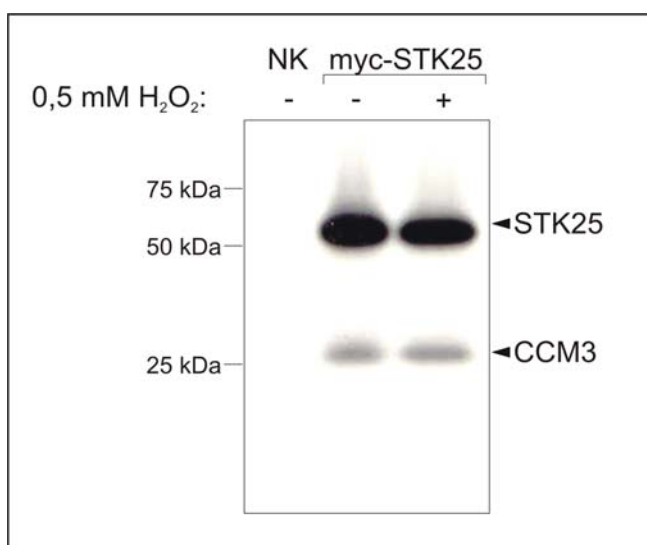


Abb. 7: Die CCM3-Phosphorylierung durch STK25 (myc-STK25) ist nach Induktion von oxidativem Stress nicht erhöht. HEK293 Zellen wurden mit myc-STK25 (Spuren 2, 3) oder dem myc-Leervektor (Spur 1, NK) transfiziert und nach 48 h mit 0,5 mM H₂O₂ für 45 min behandelt (Spur 3) bzw. nicht behandelt (Spuren 1, 2). STK25 wurde mittels myc-Antikörper immunpräzipitiert, zu rekombinantem His-CCM3 und γ ATP(³²P) gegeben und für 10 min bei 30°C inkubiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben (SDS-PAGE) erfolgte die Auswertung mittels Autoradiographie.

Die Bandenintensität von His-CCM3 war bei Einsatz gleicher Mengen an immunpräzipitierter STK25 und γ ATP(32 P) unverändert. Auch wurde kein Unterschied in der Autophosphorylierungsaktivität der Kinase detektiert. Die Banden auf Höhe von 75 kDa, die STK25 entsprechen, waren gleich stark (Abb. 7).

In einem weiteren *in vivo* Labeling Versuch wurde getestet, ob CCM3 nach Induktion von oxidativem Stress phosphoryliert wird (Abb. 8, Manuskript in Vorbereitung). CCM3 wurde auch nach H₂O₂-Behandlung nicht phosphoryliert (Abb. 8, Spuren 4 und 6). Wiederum war ausschließlich ein Autophosphorylierungssignal der Kinase STK25 auf Höhe von 50 kDa zu detektieren (Abb. 8, Spuren 3-6). Nach Zugabe von H₂O₂ war dieses Signal schwächer ausgeprägt als bei unbehandelten Zellen (Abb. 8, Spuren 4 und 6).

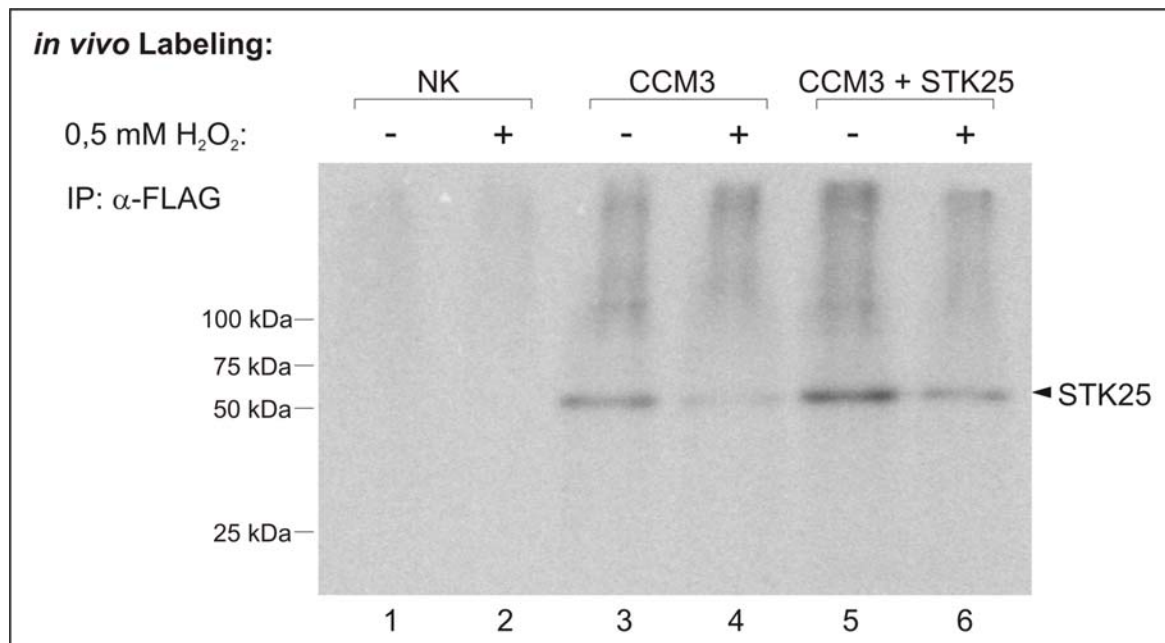


Abb. 8: CCM3 wird auch nach Induktion von oxidativem Stress *in vivo* nicht phosphoryliert. HEK293 Zellen wurden wie angegeben mit dem FLAG-Leervektor (Spuren 1, 2 - NK), mit FLAG-CCM3 alleine (Spuren 3, 4) oder zusammen mit STK25 transfiziert (Spuren 5, 6). Nach 24 h erfolgte das metabolische Labeling mit (32 P)-Orthophosphat (Spuren 1-6) und die Behandlung mit 0,5 mM H₂O₂ für 45 min (Spuren 2, 4, 6). FLAG-CCM3 wurde mittels anti-FLAG Antikörper (IP: α -FLAG) immunpräzipitiert. Nach Auftrennung der IP-Eluate via SDS-PAGE erfolgte die Auswertung mittels Autoradiographie. Ein Signal auf Höhe von 25 kDa war nicht zu detektieren, was einem *in vivo* Phosphorylierungssignal von FLAG-CCM3 entsprechen würde (Spuren 3-6). Die Signale auf Höhe von 50 kDa entsprechen endogener (Spuren 3, 4) und überexprimierter STK25 (Spur 5, 6). Die Signalstärke ist bei unbehandelten Zellen stärker als bei behandelten Zellen.

Aufgrund der unterschiedlichen Bandenintensität der immunpräzipitierten STK25 im *in vivo* Phosphorylierungsversuch (Abb. 8) wurde anschließend untersucht, ob dies auf eine verminderte Bindungsfähigkeit zwischen CCM3 und STK25 unter H₂O₂-Einfluss zurückzuführen ist. Mittels Koimmunpräzipitation stellte sich heraus, dass die Bindung von STK25 an CCM3 nach Behandlung der Zellen mit H₂O₂ nicht beeinträchtigt war (Abb. 9, Manuskript in Vorbereitung).

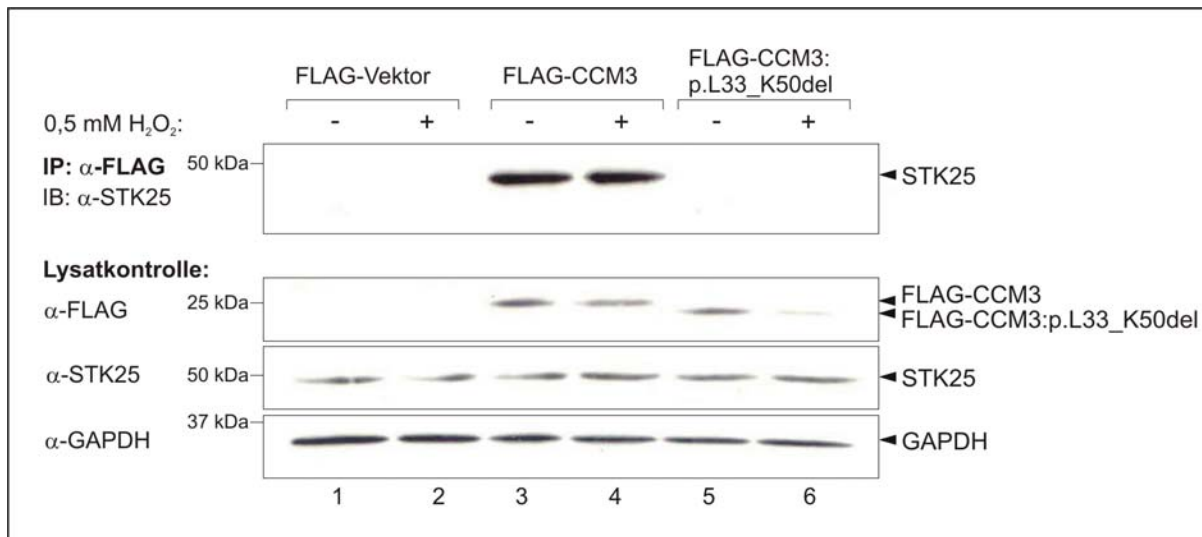


Abb. 9: In HEK293 Zellen ist die Bindung von CCM3 und STK25 nach Induktion von oxidativem Stress nicht beeinträchtigt. Die Plasmide FLAG-Leervektor (Spuren 1, 2 - Negativkontrolle), FLAG-CCM3 (Spuren 3, 4) und FLAG-CCM3:p.L33_K50del (Spuren 5, 6 - Negativkontrolle) wurden wie angegeben in HEK293 Zellen transfiziert und nach 24 h erfolgte die Behandlung der Zellen mit 0,5 mM H₂O₂ für 45 min (Spuren 2, 4, 6). Endogene STK25 wurde über FLAG-CCM3 mittels anti-FLAG Antikörper immunpräzipitiert. Die via SDS-PAGE aufgetrennten IP-Eluate (IP: α-FLAG) und Zelllysate (Lysatkontrolle) wurden im Western Blot (IB) mit den Antikörpern anti-STK25 (α-STK25), anti-FLAG (α-FLAG) und anti-GAPDH (α-GAPDH) analysiert. FLAG-CCM3 immunpräzipitierte endogene STK25 aus unbehandelten (IP: α-FLAG, Spur 3) und H₂O₂-behandelten Zellen (IP: α-FLAG, Spur 4). Bei der Expressionsanalyse der Zelllysate (Lysatkontrolle: oberster Blot) waren nach Behandlung der Zellen mit H₂O₂ schwächere Signale von FLAG-CCM3 (Spur 4) und CCM3:p.L33_K50del (Spur 6) zu sehen. Ein Unterschied in der Bandenintensität der endogenen STK25 war nicht zu detektieren (mittlerer Blot, Spuren 1-6). Die Analyse des α-FLAG-Blots mit dem GAPDH-Antikörper demonstriert gleiche Proteinmengen in allen Spuren (unterer Blot).

Die Western Blot Analyse der Zelllysate ergab, dass die transfizierten Konstrukte FLAG-CCM3 und FLAG-CCM3:p.L33_K50del nach 45 min Behandlung der HEK293 Zellen mit 0,5 mM H₂O₂ schwächer exprimiert waren als in unbehandelten Zellen (Abb. 9, Lysatkontrolle: oberster Blot, Spuren 3-6). Die endogene Expression der Kinase STK25 blieb in HEK293 Zellen unverändert (Abb. 9, Lysatkontrolle: mittlerer Blot). Die Analyse des α-FLAG-Blots mit einem Antikörper für das Protein des *house-keeping*-Gens GAPDH (Glyceraldehyd 3-

Phosphat Dehydrogenase) diene als Ladekontrolle und demonstriert, dass gleiche Proteinmengen in allen Spuren geladen worden sind (Abb. 9, unterer Blot).

In Zusammenarbeit von Frau Dr. Stahl und der Firma Immunoglobine wurde ein polyklonaler CCM3-Antikörper generiert (unpublizierte Daten). Somit war es möglich, die endogene Expression von CCM3 zu analysieren. Da es sich bei CCM-Erkrankungen um vaskuläre Malformationen handelt, wurde untersucht, ob endogenes CCM3 durch oxidativen Stress in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) ebenfalls herunterreguliert wird. In diesen Zellen wurde wiederum durch 45 min Inkubation mit 0,5 mM H₂O₂ oxidativer Stress induziert. Parallel dazu wurde untersucht, ob sich die Expression der Kinase STK25 in diesen Zellen genauso verhält wie in HEK293 Zellen. Sowohl CCM3 als auch STK25 wurden durch Zugabe von H₂O₂ nach 45 min herunterreguliert (Abb. 10, Manuskript in Vorbereitung).

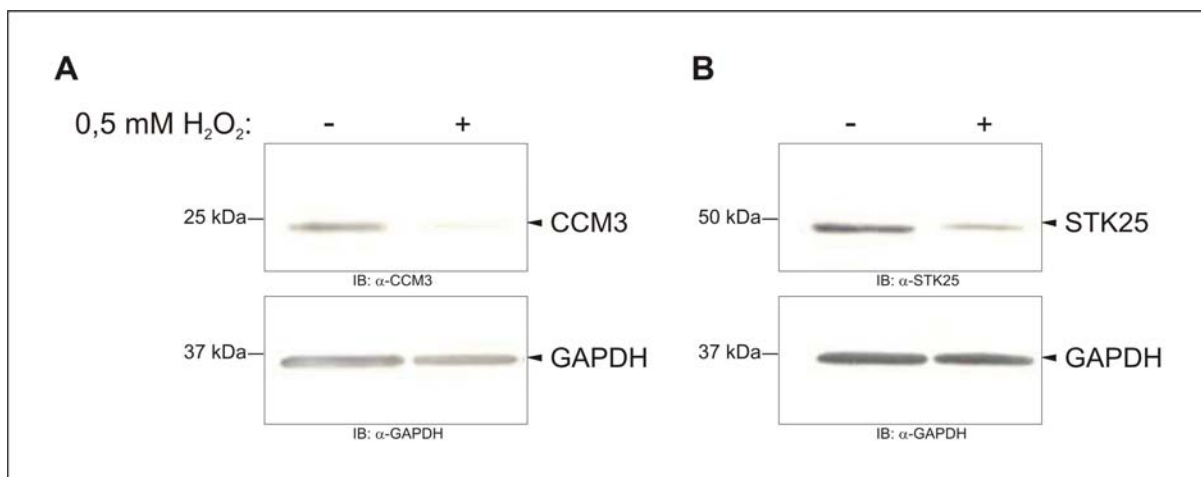


Abb. 10: In HDMECs ist die endogene Expression von CCM3 und STK25 nach Induktion von oxidativem Stress herunterreguliert. HDMEC Zellen wurden unbehandelt (-) oder nach 45 min Behandlung mit 0,5 mM H₂O₂ (+) lysiert. Die Proteinextrakte wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot Analyse (IB) ausgewertet. **(A)** Mit dem anti-CCM3 Antikörper (α -CCM3) konnte endogenes CCM3 in den unbehandelten, nicht aber in den behandelten Zellen detektiert werden. **(B)** Der anti-STK25 Antikörper (α -STK25) detektierte ein schwächeres STK25-Signal in den behandelten als in den unbehandelten Zellen. Die GAPDH-Detektion auf denselben Blots diene als Ladekontrolle in **(A)** und **(B)**.

Während in unbehandelten Zellen CCM3 exprimiert wurde, war ein CCM3-Signal nach Behandlung der Zellen mit H₂O₂ nicht mehr zu detektieren (Abb. 10A). Auch wurde ein schwächeres STK25-Signal im Western Blot nach Behandlung der Zellen mit H₂O₂ nachgewiesen (Abb. 10B). Die Detektion des GAPDH-Proteins diene wiederum als Ladekontrolle und demonstriert, dass gleiche Proteinmengen geladen wurden.

Aufgrund der Ergebnisse der eben beschriebenen Experimente wurde nun untersucht, ob die CCM1/CCM2/CCM3-Komplexbildung (Stahl et al., 2008) nach Induktion von oxidativem Stress gestört, und von der Phosphorylierung von CCM3 abhängig ist (Abb. 11, Manuskript in Vorbereitung).

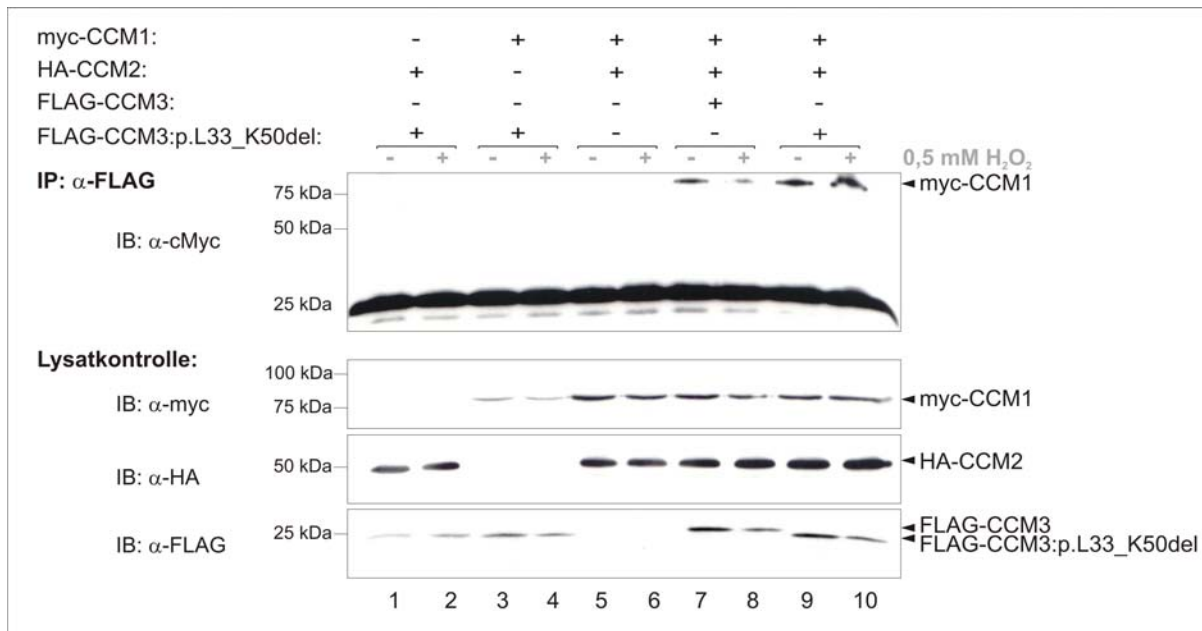


Abb. 11: CCM1 und CCM2 bilden zusammen mit CCM3 und der humanen Deletionsmutante CCM3:p.L33_K50del auch nach Induktion von oxidativem Stress *in vitro* einen ternären Komplex. HEK293 Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert, 48 h später lysiert und mittels anti-FLAG-Agarose koimmunpräzipitiert. Die IP-Eluat (IP: α-FLAG, oberster Blot) und die Zelllysate (Lysatkontrolle: untere drei Blots) wurden mittels Western Blot (IB) mit den angegebenen Antikörpern anti-cMyc (α-cMyc, polyklonal), anti-myc (α-myc, monoklonal), anti-HA (α-HA) und anti-FLAG (α-FLAG) analysiert. FLAG-CCM3:p.L33_K50del koimmunpräzipitierte in Anwesenheit von HA-CCM2 mit myc-CCM1 (Spur 9) auch nach H₂O₂-Behandlung (Spur 10). Die Koimmunpräzipitation von FLAG-CCM3 mit myc-CCM1 in Anwesenheit von HA-CCM2 diente als Positivkontrolle (Spur 7) und war auch nach H₂O₂-Behandlung nachzuweisen (Spur 8). Die Kotretransfektionen dienten als Negativkontrollen (Spuren 1-6). Myc-CCM1 und HA-CCM2 wurden unabhängig von der H₂O₂-Behandlung gleichstark exprimiert (Lysatkontrolle: Spuren 1-10). Die H₂O₂-Behandlung bewirkte eine schwächere Expression von FLAG-CCM3 und FLAG-CCM3:p.L33_K50del. Die Signale auf Höhe von 25 kDa im obersten IP-Blot stellen IgG-Banden dar und dienen als Ladekontrolle (Spuren 1-10).

Hierzu wurden myc-CCM1, HA-CCM2, FLAG-CCM3 und FLAG-CCM3:p.L33_K50del in HEK293 Zellen koexprimiert und mit H₂O₂ behandelt. Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. In den überexprimierenden Zellen war die CCM1/CCM2/CCM3-Komplexbildung durch Induktion von oxidativem Stress nicht gestört (Abb. 11, oberster Blot). Im Vergleich zur Kontrolle, wurde weniger myc-CCM1 über Wildtyp FLAG-CCM3 nach H₂O₂-Behandlung der Zellen koimmunpräzipitiert (Abb. 11, Spuren 7 und 8), da nach Behandlung der Zellen weniger FLAG-CCM3 exprimiert wurde (Abb. 11, Lysatkontrolle: unterster Blot,

Spur 8). Die humane Deletionsmutante FLAG-CCM3:p.L33_K50del koimmunpräzipitierte ebenfalls myc-CCM1 (Abb. 11, Spuren 9 und 10). Das detektierte myc-CCM1-Signal war in beiden Ansätzen gleichstark. Auch die überexprimierte Deletionsmutante FLAG-CCM3:p.L33_K50del wurde durch H₂O₂-Behandlung herunterreguliert (Abb. 11, Lysatkontrolle: unterster Blot, Spur 10). Die beiden anderen überexprimierten Proteine, myc-CCM1 und HA-CCM2, wurden unabhängig von der H₂O₂-Behandlung gleichstark exprimiert (Abb. 11, Lysatkontrolle: oberer und mittlerer Blot).

2.4 Die Etablierung der *Tandem-Affinity-Purification* (TAP)-Methode

Parallel zum Y2H-Screen und den Koimmunpräzipitationsstudien sollte die *Tandem-Affinity-Purification* (TAP)-Methode zur Isolation unbekannter CCM3-Bindungspartner etabliert werden. Diese Methode wurde ursprünglich 1999 von B. Seraphin und Mitarbeitern entwickelt (Rigaut et al., 1999). Die TAP-Methode ermöglicht die Isolierung von Proteinkomplexen unter weitestgehend nativen Bedingungen und eignet sich, im Gegensatz zum Y2H-Screen, auch zur Isolierung von membrangebundenen Proteinen. Das Zielprotein wird mit einem Doppeltag markiert, über welches dann die Aufreinigung in zwei Schritten erfolgt. Eine anschließende massenspektrometrische Untersuchung ermöglicht die Identifizierung der einzelnen Interaktionspartner des Proteinkomplexes (Puig et al., 2001). Um Artefaktmessungen zu vermeiden, wird das Zielprotein in der Regel stabil in eine Zelllinie integriert, um ein annähernd natives Expressionsniveau zu erhalten, und somit spezifische Interaktionspartner isolieren zu können. Verschiedene Doppeltags sind zur nativen Isolation von Proteinkomplexen angewandt worden (Honey et al., 2001; Jao and Chen, 2005; Westermarck et al., 2002). Das CCM3-Protein wurde mit einem FLAG/HA-Tag markiert, welches bereits erfolgreich zur Aufreinigung von Proteinkomplexen eingesetzt wurde (Wysocka et al., 2005). Zusätzlich wurden auch die Proteine CCM1 und CCM2 mit diesem Doppeltag markiert, um bisher unbekannte Interaktionspartner isolieren zu können. Bei dieser Variante der TAP-Methode wurden die CCM-Proteinkomplexe zunächst über den FLAG-Tag an eine FLAG-Säule gebunden. Die mittels FLAG-Peptid eluierten Proteinkomplexe wurden dann in einem zweiten Bindungsschritt über den HA-Tag an eine HA-Säule gebunden. Die Elution der finalen TAP-Eluat erfolgte durch Aufkochen in 2x Lämmli Puffer. Die Bindungs- und Elutionseffizienzen der einzelnen Aufreinigungsschritte für CCM1, CCM2 und CCM3 wurden mittels Western Blot Analyse der einzelnen TAP-Fractionen evaluiert (Daten nicht gezeigt). Alle drei CCM-Proteine wurden erfolgreich mit dieser Methode aus überexprimierenden HEK293 Zellen aufgereinigt (Abb. 12, unpublizierte Daten). Im Silbergel waren CCM1-, CCM2- und CCM3-spezifische Bandenmuster zu sehen,

was auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der aufgereinigten Proteinkomplexe schließen lässt.

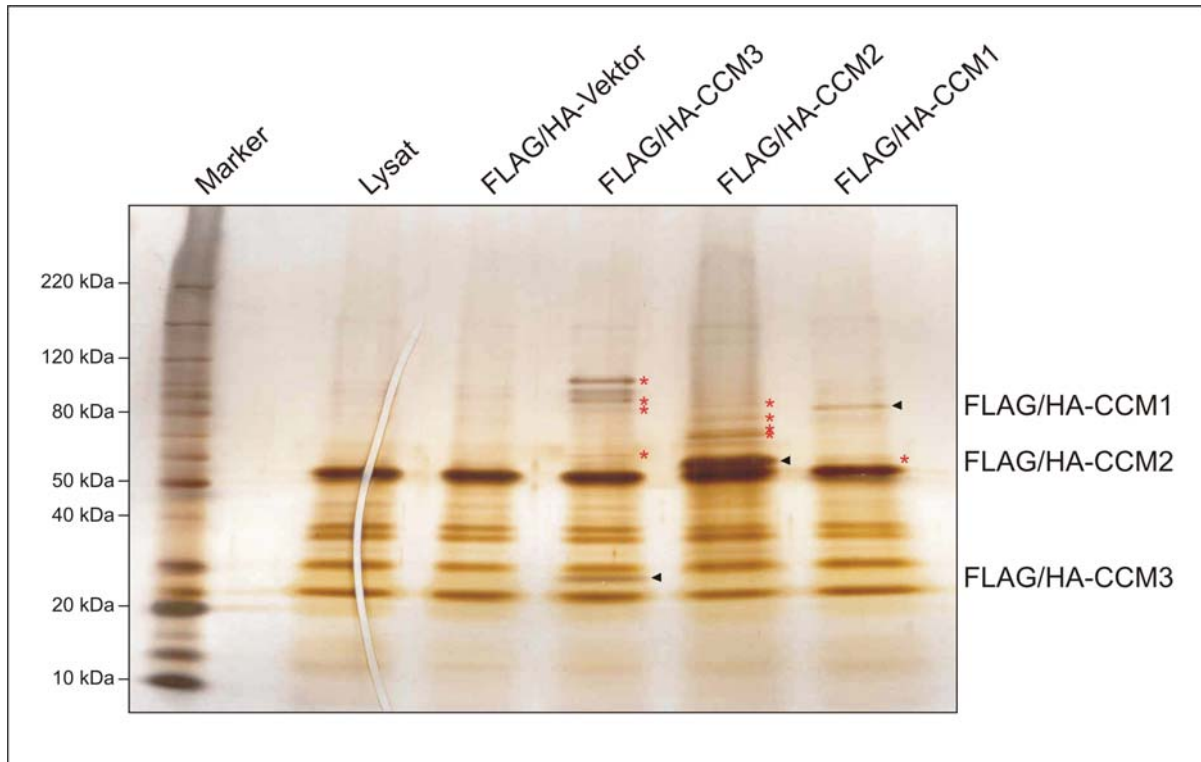


Abb. 12: Silberfärbung der via TAP-Methode isolierten CCM3-, CCM2- und CCM1-Proteinkomplexe (FLAG/HA-CCM3/CCM2/CCM1) aus überexprimierenden HEK293 Zellen. Nicht transfizierte Zellen (Lysat) und mit dem Leervektor (FLAG/HA-Vektor) transfizierte Zellen dienten als Kontrollansätze. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Nach zweistündiger Inkubation mit anti-FLAG-Agarose erfolgte die Elution der gebundenen Proteinkomplexe mit dem FLAG-Peptid. Die Eluate wurden danach mit anti-HA-Agarose inkubiert und durch Aufkochen in 2x Lämmli Puffer eluiert. Die TAP-Eluate wurden auf ein 5-20%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, durch Elektrophorese aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Die schwarzen Dreiecke markieren die Zielproteine FLAG/HA-CCM3, FLAG/HA-CCM2 und FLAG/HA-CCM1. Die roten Sterne markieren Proteine, die spezifisch mit FLAG/HA-CCM3, -CCM2 bzw. -CCM1 aufgereinigt wurden.

3. Diskussion

3.1 CCM3 bildet mit CCM1 und CCM2 einen ternären Proteinkomplex

Zerebrale kavernöse Malformationen sind vaskuläre Fehlbildungen im Gehirn, die durch stark vergrößerte, kavernenartige Gefäße ohne Hirnparenchym charakterisiert und mit Blut gefüllt sind (Russel und Rubinstein, 1989). Sie sind meist im ZNS lokalisiert und kommen sowohl sporadisch als auch familiär gehäuft vor. Familiäre Fälle sind gekennzeichnet durch das Auftreten multipler Läsionen und folgen einem dominant-autosomalen Erbgang (Labauge et al., 2007). Die klinischen Symptome reichen von Kopfschmerz bis hin zu hämorrhagischem Schlaganfall (Labauge et al., 2007; Revencu und Vikkula, 2006). Die genauen Mechanismen der CCM-Pathogenese sind bis heute unklar. Seit der Identifikation der drei Kavernomverursachenden Gene *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* und deren gleichnamiger Genprodukte wurden verschiedene Hypothesen über die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung von zerebralen kavernösen Malformationen führen, aufgestellt. Da der klinische Phänotyp der drei heterozygot vererbten Mutationen nicht voneinander unterscheidbar ist, wurde vorgeschlagen, dass auch die drei CCM-Proteine Bestandteile eines molekularen Signalwegs sind (Revencu und Vikkula, 2006). Bereits in der Maus wurde gezeigt, dass die Expressionsmuster von *Ccm1* und *Ccm2* auf RNA- und Proteinebene weitestgehend übereinstimmen (Plummer et al., 2006; Seker et al., 2006). Eine weitere Studie auf RNA-Ebene belegte, dass *Ccm3* in denselben neuronalen Zellschichten des Gehirns exprimiert wird wie *Ccm1* und *Ccm2* und parallele mRNA Expressionsmuster im Herzen und in arteriellen und venösen Gefäßen auftraten (Petit et al., 2006). Im Modellorganismus Zebrafisch und in der Zellkultur konnte die CCM1/CCM2-Interaktion nachgewiesen werden (Mably et al., 2006; Zawistowski et al., 2005; Zhang et al., 2007). Bindungsstudien zeigten *in vitro*, dass CCM2 über seine PTB-Domäne an CCM1 bindet (Zawistowski et al., 2005). In dieser Arbeit wurde erstmals die CCM3/CCM2 Interaktion und Kolokalisation nachgewiesen und gezeigt, dass CCM3 zusammen mit CCM1 und CCM2 in einem ternären Komplex vorliegt (Stahl et al., 2008; Voss et al., 2007). Ein parallel durchgeführter Proteomics-Screen zeigte ebenfalls, dass die CCM-Proteine einen ternären Komplex *in vitro* bilden und stützt unsere Daten (Hilder et al., 2007). Eine direkte Interaktion von CCM1 und CCM3 konnte zunächst nicht nachgewiesen werden, dennoch deuteten Experimente einen positiven, kooperativen Effekt beider Proteine im Hinblick auf ihre CCM2 Bindung an (Fig. 4d, Voss et al., 2007). Eine Konkurrenz zwischen CCM1 und CCM3 wurde ausgeschlossen, da eine parallele Interaktion von CCM1 und CCM3 mit CCM2 möglich ist. Somit sollten beide Proteine unterschiedliche CCM2-Bindungsstellen besitzen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass CCM2 das zentrale Linkermolekül zwischen CCM1 und CCM3

ist, da CCM3 nur in Anwesenheit von CCM2 mit CCM1 koimmunpräzipitiert (Fig. 5A, B, Stahl et al., 2008). Koimmunpräzipitationsstudien mit der humanen CCM2-Mutante CCM2:p.P11_K68del untermauern diese Linkerfunktion (Fig. 5A, B, Stahl et al., 2008). Bei dieser in Patienten beschriebenen Mutation im CCM2-Gen ist das Exon 2 *in-frame* deletiert (Liquori et al., 2008; Stahl et al., 2008). Diese Deletion resultiert in einem Verlust von 58 Aminosäuren (P11-K68), die sich N-terminal von der PTB-Domäne befinden. Interessanterweise entspricht diese Patientenmutation einer Spleißvariante von CCM2 (Denier et al., 2004). Die Mutante CCM2:p.P11_K68del war nicht in der Lage, mit CCM1 und CCM3 einen ternären Komplex zu bilden (Fi. 5A, B, Stahl et al., 2008). Weiterführende Untersuchungen wiesen erstmals nach, dass nicht nur die PTB-Domäne, sondern auch diese N-terminal von der PTB-Domäne befindlichen Aminosäuren essentiell sind für eine CCM1/CCM2-Assoziation (Fig. 4A, Stahl et al., 2008). Die Bindungsfähigkeit von CCM3 an CCM2 war weder durch die Deletion der 58 Aminosäuren (CCM2:p.P11_K68del) noch durch die Punktmutationen in der PTB-Domäne (CCM2:p.L198R und CCM2:p.F217A) beeinträchtigt (Fig. 4B, Stahl et al., 2008). Für die Interaktion mit CCM3 scheinen diese Domänen somit nicht ausschlaggebend zu sein. Übereinstimmend mit der These, dass es sich bei den meisten CCM-Mutationen, um *loss-of-function* Mutationen handelt, kann man für die Mutante CCM2:p.P11_K68del festhalten, dass diese einen Funktionsverlust im Hinblick auf die CCM1-Bindung und ternäre Komplexbildung mit CCM3 besitzt. Es bleibt zu klären, wann und warum der CCM-Komplex in der Zelle gebildet wird und welche genaue Funktion dieser besitzt. Fest steht, dass die drei CCM-Proteine eine wesentliche Rolle bei der Vaskulogenese spielen, da heterozygote *CCM2*^{+/-} und *CCM1*^{+/-}-*p53*^{-/-}-Mäuse einen vaskulären Phänotyp ausbildeten, der weitestgehend dem CCM-Phänotyp entsprach (Plummer et al., 2004). Auch durch Mutagenese der *CCM1* und *CCM2* Homologe *santa* (*san*) und *valentine* (*vtn*) im Zebrafisch, wurde ein kardiovaskulärer Phänotyp ausgelöst, der vor allem durch stark dilatierte Gefäße gekennzeichnet war (Jin et al., 2007; Mably et al., 2006; Stainier et al., 1996). Eigene *Ccm3-Knockdown*-Experimente im Zebrafisch bestätigen eindeutig, dass auch *ccm3* wesentlich an vaskulären Prozessen beteiligt sein muss. Der CCM3-Phänotyp entspricht den bereits beschriebenen CCM1/CCM2-Phänotypen (persönliche Mitteilung von Frau Dr. Stahl). Da unsere Daten demonstrieren, dass die im Patienten gefundene Mutation *CCM2:c.31-?_204+?del* die ternäre Komplexbildung der drei CCM-Proteine verhindert, ist es sehr wahrscheinlich, dass der CCM-Proteinkomplex ebenfalls bei Prozessen der Vaskulogenese und Angiogenese eine entscheidende Rolle spielt. Da gezeigt wurde, dass CCM2 an der Regulation des stressresponsiven p38 MAPK-Signalwegs beteiligt ist (Uhlik et al., 2003; Zawistowski et al., 2005) und CCM1 über seine Interaktionspartner ICAP-1 α und RAP1A eine modulierende Wirkung auf Integrin-vermittelte Prozesse wie Zelladhäsion und Migration besitzt (Beraud-Dufour et al., 2007; Marchuk et al.,

2003; Zhang et al., 2001), wäre es denkbar, dass die Koordination von Integrin-vermittelten Prozessen und der p38-Aktivierung über den CCM1/CCM2/CCM3-Komplex erfolgt und dieser bei Funktionsstörung an der CCM-Pathogenese beteiligt sein könnte.

Die endogene Lokalisation des CCM-Proteinkomplexes ist derzeit ebenfalls unbekannt. Membranbindende Eigenschaften wurden für die Proteine CCM1 und CCM2 beschrieben (z. B. Beraud-Dufour et al., 2007; Glading et al., 2007; Zawistowski et al., 2005). Untersuchungen legten zudem nahe, dass CCM1, neben seinen Integrin-modulierenden Interaktionen, auch an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist. Eine intrazelluläre Lokalisation und Translokation von CCM1 in Abhängigkeit seiner Interaktionspartner wurde mehrfach beschrieben (Beraud-Dufour et al., 2007; Glading et al., 2007; Zawistowski et al., 2005). Eine neue Studie wies *in vitro* nach, dass auch CCM3 an Phosphatidylinositol-Di- und Triphosphate (PIP₂ und PIP₃) bindet, die Lipidbestandteile von Zellmembranen sind (Hilder et al., 2007). Diese Daten zeigen die Möglichkeit auf, dass CCM3 ebenfalls an Membranen binden kann. Das CCM3-Protein könnte zusammen mit CCM2 und CCM1 Bestandteil eines am Zytoskelett verankerten makromolekularen Proteinkomplexes in der Zelle sein, der wichtig ist für die Aufrechterhaltung endothelialer Integrität und Permeabilität. Fehlt eines der drei CCM-Proteine, wäre die Ausbildung des makromolekularen Proteinkomplexes gestört und die endotheliale Stabilität könnte unter anderem nicht mehr Aufrecht erhalten werden. Weiterführende Untersuchungen sollten die genaue subzelluläre Lokalisation von CCM3 und des CCM1/CCM2/CCM3-Proteinkomplexes klären. Verschiedene exogene Stimuli wären hilfreich, um eine eventuelle Translokation der CCM-Proteine oder des gesamten CCM-Komplexes in Endothelzellen zu identifizieren. Weiterhin stellt sich die Frage, ob CCM3 an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist, die bei der Integrin-vermittelten Zellmigration eine wesentliche Rolle spielt. Auch wäre es denkbar, dass der gesamte CCM-Komplex über seine Membranbindung die Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts steuert, welche z. B. bei zellmigratorischen Prozessen stattfindet.

Mit Hilfe der TAP-Methode könnten in Zukunft weitere Interaktoren der CCM-Proteine identifiziert werden, die Teil des makromolekularen Proteinkomplexes sind. Das würde bei der Aufklärung der Funktion der CCM-Proteine hilfreich sein und eventuell Aufschluss über die pathogenen Mechanismen zerebraler kaverner Malformationen geben. Die TAP-Methode wurde erfolgreich mit überexprimierenden HEK293 Zellen etabliert (Abb. 12) und kann nun gezielt angewendet werden. Sie wurde nicht zur Isolation von CCM3-Interaktionspartnern eingesetzt, da es nicht gelang, eine stabile Zelllinie mit dem FLAG/HA-CCM3-Konstrukt und dem FLAG/HA-eGFP-Kontrollkonstrukt zu generieren. Unter Anwendung verschiedener Transfektions- und Selektionsmethoden war es nicht möglich,

das CCM3-Konstrukt oder das eGFP-Konstrukt stabil in HEK293 Zellen, HeLa Zellen, oder HeLaS3 Zellen zu exprimieren. Die Zellen starben entweder im Verlauf der Antibiotika-Selektion der stabilen Klone oder waren negativ und enthielten zwar das Resistenzgen des Selektionsmarkers, nicht aber das *CCM3*-Gen. Da es sich bei den CCM-Erkrankungen um vaskuläre Defekte handelt, erscheint es sinnvoll, mit einer Endothelzelllinie oder mit primären Endothelzellen zu arbeiten. Hierzu sollte ein retroviraler Ansatz gewählt werden, um *eGFP*, *CCM3* und die anderen *CCM*-Gene stabil in das Genom einzuführen, um das Protein auf einem weitestgehend nativem Niveau zu exprimieren und die TAP-Methode erfolgreich anwenden zu können. Da die Funktion von CCM3 unklar ist, empfiehlt es sich weiterhin, das tet-systems zu etablieren und eine stabile Tet-Zelllinie zu generieren, um die Expression von CCM3 gezielt an- und abschalten zu können. Auch hierzu sollte in Zukunft ein retroviraler Ansatz gewählt werden, da mittels transienter Transfektion das *CCM3*-Gen nicht in HeLaS3-Tet Off Zellen und HEK293-Tet On Zellen integriert werden konnte.

3.2 Dephosphoryliertes CCM3 ist Bestandteil des ternären CCM1/CCM2/CCM3-Proteinkomplexes

Die humanen Serin/Threonin-Kinasen STK24, STK25 und die humane Tyrosinphosphatase FAP-1 wurden in einem Yeast Two-Hybrid Screen erstmals als direkte CCM3-Interaktoren identifiziert (Voss et al., 2007) und mittels Koimmunpräzipitationsstudien und GST Pull-down Assays bestätigt (Fig. 2a, b, Voss et al., 2007). Ein large-scale Y2H-Screen und eine parallel durchgeführte Studie zur Erstellung einer Protein-Protein-Interaktionskarte stützen unsere Ergebnisse und belegen die gefunden Interaktionen bezüglich STK24 und STK25 (Ewing et al., 2007; Rual et al., 2005). In einer neueren Arbeit wurde eine weitere Serin/Threonin-Kinase, MST4 (MASK), als CCM3-Bindungspartner beschrieben (Ma et al., 2007). In Kinaseassays konnte nachgewiesen werden, dass STK25, nicht aber STK24, CCM3 *in vitro* phosphoryliert (Fig. 3a, b, Voss et al., 2007). Ein *in vivo* Nachweis der Phosphorylierung gelang nicht (Abb. 5 und 8), was auf verschiedene Ursachen wie den Versuchsaufbau oder derzeit unbekannte, intrazellulär-inhibitorische Moleküle zurückzuführen sein könnte. Es konnte aber gezeigt werden, dass die katalytische Domäne von FAP-1, die gleichzeitig auch als Bindungsdomäne im Y2H-Screen identifiziert wurde, in der Lage ist, CCM3 *in vitro* zu dephosphorylieren (Fig. 3c, Voss et al., 2007). Es ist bekannt, dass FAP-1 sowohl im Zytoplasma als auch an der Zellmembran mit unterschiedlichen Proteinen interagiert und somit an der Modulation verschiedener Signalwege beteiligt ist (Bompard et al., 2003; Ivanov et al., 2005; Kimber et al., 2003). Die Phosphatase könnte durch Dephosphorylierung auch CCM3 regulieren. Die Serin/Threonin-Kinase STK25 besitzt Autophosphorylierungsaktivität

und phosphoryliert MBP (Pombo et al., 1996; Voss et al., 2007). Sie wird ausschließlich durch oxidativen Stress, nicht aber durch Wachstumsfaktoren oder andere exogene Stressfaktoren aktiviert (Pombo et al., 1996). Eine neuere Studie belegte, dass das Golgi Matrix Protein GM130 durch Bindung an STK25 diese aktiviert und somit das Golgi-assoziierte Protein 14-3-3 ζ durch STK25 phosphoryliert wird (Preisinger et al., 2004). Somit konnte STK25 erstmals mit Signalprozessen des Golgi Apparats wie Proteintransport, Zelladhäsion und andere für die Zellmigration wichtige Prozesse in Zusammenhang gebracht werden. In weiterführenden Untersuchungen mit der humanen CCM3-Mutante *CCM3:c.97_150del* (Bergametti et al., 2005) sollte die Rolle der CCM3-Phosphorylierung durch STK25 analysiert werden. Dieser Mutante fehlen aufgrund einer in-frame Deletion von Exon 5 insgesamt 18 Aminosäuren von Position 33 bis 50 (*CCM3:p.L33_K50del*). In dieser Arbeit wurde erstmals via Massenspektrometrie nachgewiesen, dass CCM3 am Serin 39 und am Threonin 43 durch STK25 *in vitro* phosphoryliert wird (Abb. 3, Manuskript in Vorbereitung). Die humane Mutante *CCM3:p.L33_K50del*, der diese Aminosäuren fehlen, wird nicht mehr von STK25 *in vitro* phosphoryliert (Abb. 4, Manuskript in Vorbereitung). In weiterführenden Koimmunpräzitationsstudien konnte gezeigt werden, dass STK25 nicht mehr an *CCM3:p.L33_K50del* binden kann (Abb. 6, Manuskript in Vorbereitung). Somit scheinen die Aminosäuren L33-K50 das STK25-Bindungssepitop zu bilden. Die Interaktion zwischen CCM2 und *CCM3:p.L33_K50del* war nicht beeinträchtigt (Abb. 6, Manuskript in Vorbereitung). Weiterführend wurde untersucht, ob auch *CCM3:p.L33_K50del* in der Lage ist, mit CCM1/CCM2 einen ternären Komplex zu bilden. Die CCM-Komplexbildung war nicht gestört (Abb. 11, Manuskript in Vorbereitung). Somit scheint die Phosphorylierung von CCM3 weder für die CCM2 Bindung noch für die Ausbildung des CCM1/CCM2/CCM3 Komplexes essentiell zu sein. Es ist sehr wahrscheinlich, dass durch FAP-1 dephosphoryliertes CCM3 zusammen mit CCM1 und CCM2 einen ternären Komplex bildet (Abb. 13). Da STK25 in der Lage ist, mit CCM2 koimmunpräzitivieren (Fig. 5, Voss et al., 2007), könnte durch Bindung von STK25 an CCM3, als Bestandteil des ternären Komplexes, CCM3 phosphoryliert und aktiviert werden (Abb. 13). Phosphoryliertes CCM3 wäre nun in der Lage, sich von dem ternären CCM-Komplex zu lösen und andere regulatorische Funktionen in der Zelle auszuüben. Auch wäre es denkbar, dass der Phosphorylierungszustand von CCM3 die Lokalisation des ternären CCM-Komplexes bestimmt. Die Kinase STK25 und die Phosphatase FAP-1 wären somit funktionelle Regulatoren von CCM3, dessen genaue Funktionen noch zu klären wären und derzeit Gegenstand intensiver Forschungen sind.

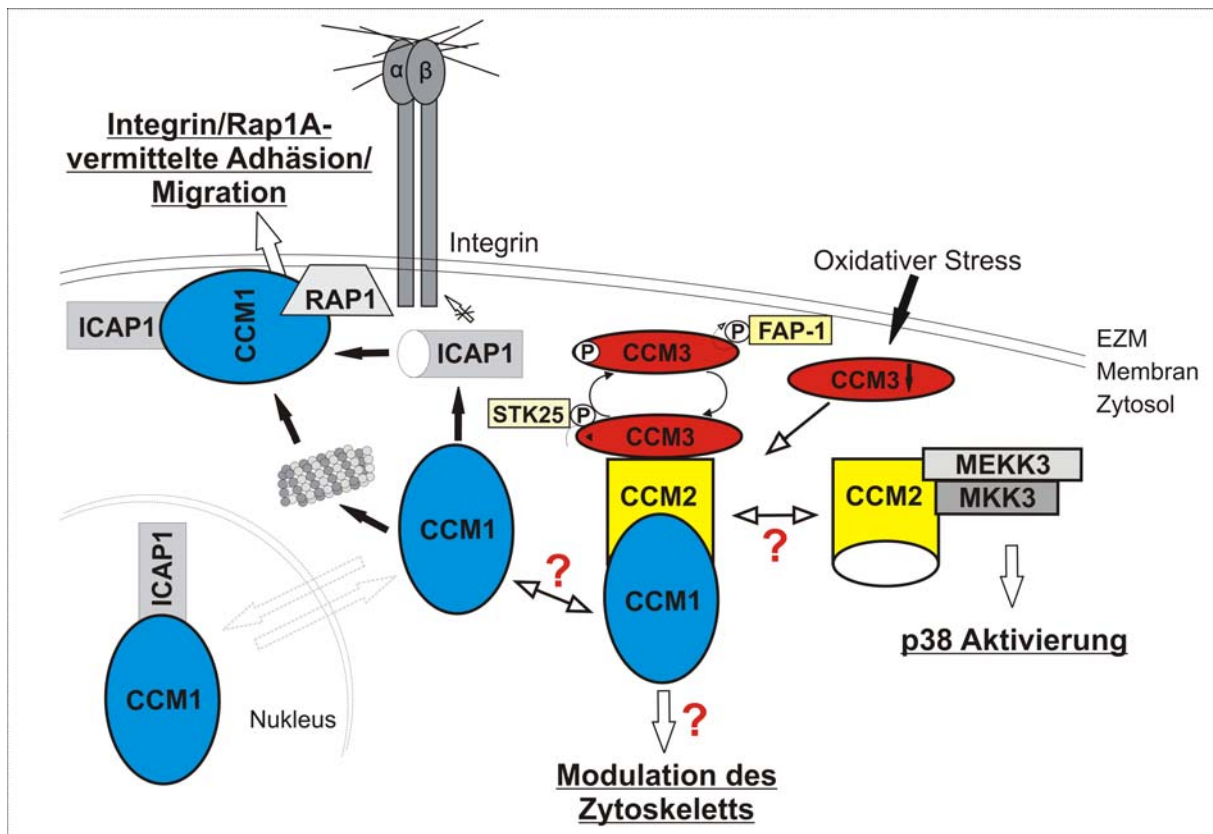


Abb. 13: Hypothetisches Modell der Regulation des CCM1/CCM2/CCM3-Proteinkomplexes in Endothelzellen. Desphosphoryliertes CCM3 ist Bestandteil des ternären CCM1/CCM2/CCM3-Komplexes, der in der ruhenden Endothelzelle vorliegt. Durch oxidativen Stress wird CCM3 herunterreguliert, der ternäre Proteinkomplex löst sich auf und über CCM1 könnten Integrin-vermittelte Prozesse sowohl moduliert als auch koordiniert werden mit p38-vermittelten Prozessen, die über CCM2 gesteuert werden. Über den Phosphorylierungszustand von CCM3 könnte zum Beispiel die Lokalisation des ternären Komplexes vermittelt werden.

3.3 Oxidativer Stress moduliert die CCM3-Expression

Es war bekannt, dass in Ramos B Zellen, MDCK und COS-7 Zellen die Kinaseaktivität von STK25 durch die Induktion von oxidativem Stress erhöht wird und endogene als auch überexprimierte STK25 nach Immunpräzipitation MBP *in vitro* verstärkt phosphoryliert (Pombo et al., 1996). Somit wurde *in vitro* nach Pombo und Mitarbeitern (Pombo et al., 1996) und *in vivo* untersucht, ob eine Erhöhung der CCM3-Phosphorylierung nach Behandlung der Zellen mit 0,5 mM H₂O₂ für 45 min erreicht wird. Eine Erhöhung der Kinaseaktivität durch H₂O₂-Behandlung von HEK293 Zellen konnte weder für MBP (Daten nicht gezeigt) noch für CCM3 *in vitro* nachgewiesen werden (Abb. 7, Manuskript in Vorbereitung). Da unterschiedliche Zelllinien verwendet wurden, könnte dies die Ursache sein für den Widerspruch zu den bereits publizierten Daten von Pombo und Mitarbeitern (Pombo et al.,

1996). Eine längere H₂O₂-Behandlung als die beschriebene von 20 min wurde gewählt, da in Vorexperimenten die im Ergebnisteil und im Folgenden beschriebenen Effekte nach 45 min H₂O₂-Behandlung am stärksten war. Auch nach Induktion von oxidativem Stress konnte die CCM3-Phosphorylierung in den *in vivo* Phosphorylierungsstudien nicht belegt werden (Abb. 8, Manuskript in Vorbereitung). In diesen Untersuchungen wurde beobachtet, dass aus den Zellen nach H₂O₂-Behandlung weniger STK25 koimmunpräzipitiert wurde als aus unbehandelten Zellen (Abb. 8). Somit wurde untersucht, ob die Bindungsfähigkeit zwischen STK25 und CCM3 unter H₂O₂-Einfluß beeinträchtigt ist. In den Experimenten stellte sich heraus, dass die Interaktion zwischen STK25 und CCM3 nicht beeinträchtigt war (Abb. 9, Manuskript in Vorbereitung). Die CCM3-Expression war jedoch nach Zugabe von H₂O₂ herunterreguliert (Abb. 9). Die endogene Expression der Kinase STK25 in HEK293 Zellen blieb unter allen Versuchsbedingungen gleich (Abb. 9). In einer humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzelllinie (HDMEC) wurde hingegen beobachtet, dass auch STK25 nach Induktion von oxidativem Stress herunterreguliert wurde (Abb. 10, Manuskript in Vorbereitung). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass diese Kinase in verschiedenen Zellen nicht nur unterschiedliche Funktionen besitzt, sondern auch im Hinblick auf ihre Aktivität unterschiedlich reguliert wird. Auch die endogene CCM3-Expression wurde durch H₂O₂-Behandlung drastisch reduziert (Abb. 10). Die mitgeführten GAPDH-Ladekontrollen zeigen, dass es sich hierbei um einen CCM3-spezifischen Effekt handelt (Abb. 9 und 10). Da dieser Effekt bereits nach 45 min auftrat, ist anzunehmen, dass CCM3 direkt über H₂O₂ reguliert wird und somit unmittelbar nach Einfluss des exogenen Stress-Signals an einer intrazellulären Antwort beteiligt ist. Diese intrazelluläre Stressantwort der Zellen könnte über die CCM3-Herunterregulation definiert und/oder kontrolliert werden. Da alle drei CCM-Proteine in einem ternären Komplex vorliegen, wurde untersucht, ob die Komplexbildung durch oxidativen Stress *in vitro* gestört ist. Auch nach H₂O₂-Behandlung koimmunpräzipitierte CCM1 in Anwesenheit von CCM2 mit CCM3 (Abb. 11), allerdings wurde ein schwächeres CCM1-Signal in behandelten Zellen detektiert als in den Kontrollansätzen. Somit ist anzumerken, dass dieses im Hinblick auf die Komplexbildung positive Ergebnis darauf zurückzuführen sein könnte, dass alle drei Proteine in HEK293 Zellen überexprimiert wurden und trotz H₂O₂-Behandlung noch genug CCM3 in den Zellen vorhanden war, um CCM1 zu präzipitieren (Abb. 11, siehe Lysatkontrolle). Weiterhin stellte sich heraus, dass CCM1 und CCM2 in ihrer Expression unbeeinflusst blieben (Abb. 11, Lysatkontrolle), was die Spezifität der CCM3-Regulation durch H₂O₂ untermauert. In HDMECs war endogenes CCM3 nicht mehr nachzuweisen (Abb. 10), so dass dieses Protein dem ternären CCM-Komplex nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung stehen würde. Somit ist es wahrscheinlich, dass der CCM1/CCM2/CCM3-Proteinkomplex nach H₂O₂-Behandlung nicht mehr gebildet wird und die über diesen Komplex gesteuerten Prozesse dann nicht mehr (kontrolliert)

ablaufen könnten. Mit Hilfe des CCM3-Antikörpers sollte überprüft werden, ob nach H₂O₂-Behandlung CCM1 und CCM2 koimmunpräzipitiert werden kann. Es bleibt zu klären, ob auch die endogene Expression von CCM1 und CCM2 durch oxidativen Stress moduliert wird. Es ist bekannt, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS – *reactive oxygen species*) wie H₂O₂ konzentrationsabhängig Risikofaktoren für vaskuläre Defekte darstellen, aber auch Neovaskularisierung und Angiogenese stimulieren können (Maulik, 2002). Eine genaue Ausarbeitung der Zeit- und Konzentrationskinetiken der CCM3-Regulation in humanen Endothelzellen unter Anwendung anderer ROS-Substanzen wie z. B. Menadion wäre folglich sinnvoll. Exogenes H₂O₂ stimuliert die VEGF (*v*ascular *e*ndothelial *g*rowth *f*actor)-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen (Ruef et al., 1997). In Endothelzellen (EC) wurde nach H₂O₂-Behandlung ebenfalls die VEGF-Expression hochreguliert (Chua et al., 1998) und Zellmigration sowie Proliferation initiiert (Yasuda et al., 1999). ROS selbst können als *second messenger* innerhalb der ECs wirken und verschiedene Signalkaskaden aktivieren, die zu VEGF-vermittelter Migration und Proliferation führen (Stone and Collins, 2002). Diese Kaskaden umfassen die Aktivierung verschiedener MAPKs, der Proteinkinase B (PKB/Akt) und der endothelialen NO Synthetase (eNOS) (Dimmeler et al., 2000; Morales-Ruiz et al., 2000; Rousseau et al., 2000a; Rousseau et al., 2000b). Somit steht CCM3 nicht nur über seine Interaktionspartner STK25, CCM2 und CCM1, sondern auch über seinen Regulationsmechanismus im Zusammenhang mit angiogenetischen Prozessen. Die CCM3-Regulation durch oxidativen Stress könnte Bestandteil einer der genannten Signalkaskaden sein und migratorische oder proliferative Effekte modulieren. Ob CCM3 einen aktivierenden oder inhibitorischen Effekt auf diese Prozesse besitzt, ist derzeit Gegenstand weiterführender Untersuchungen. Eine Studie legt die Vermutung nahe, dass CCM3 oder der CCM-Komplex inhibitorisch auf angiogenetische Prozesse wirkt, da aus Kavernomgewebe isolierte Endothelzellen (CEC) ein erhöhtes Angiogenesepotential besitzen (Zhao et al., 2007). Diese CECs zeigten unter anderem eine erhöhte Expression der beiden VEGF-Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 und *in vitro* eine spontane Ausbildung kapillar-ähnlicher Strukturen (*tube formation*) auf einer Kollagenmatrix. Es wäre denkbar, dass nach Einfluss von oxidativen Stress-Stimuli, CCM3 in Endothelzellen herunterreguliert wird und sich der ternäre CCM-Komplex auflöst, damit migratorische Signalkaskaden gestartet werden können. Eine Hypothese wäre, dass CCM1 nach Auflösung des ternären Komplexes an Rap1A und an ICAP-1 α binden würde, welches dann wiederum seinen inhibitorischen Einfluss auf die β_1 -Integrine verliert und Integrin-vermittelte Migrationsprozesse ungestört ablaufen könnten (Abb. 13). Parallel dazu könnte CCM2 nun das koordinierende Gerüstprotein für verschiedene MAPK sein, die z. B. die p38-vermittelte Antwort der Zelle auf oxidativen Stress auslösen (Abb. 13). Tritt nun bei Keimbahnmutationsträgern eine zweite somatische Mutation auf und fehlt dann eines der drei CCM-Proteine, so wäre denkbar, dass

dies aufgrund des fehlenden CCM1/CCM2/CCM3-Proteinkomplexes ein unkontrolliertes, gestörtes Angiogeneseverhalten der Endothelzelle zur Folge hat. Sollte sich diese Hypothese bestätigen, so bietet dies neue Behandlungsansätze für eine Pharmakotherapie, welche auf die Regulation der gestörten Migration zielen könnte.

4. Kooperationsprojekt: Klonierung und Expression des G-Protein gekoppelten P2Y5-Rezeptors (Pasternack et al., 2008)

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. R. Betz am Institut für Humangenetik der Universität Bonn wurden in Zusammenarbeit mit Frau S. Pasternack der G-Protein gekoppelte Rezeptor P2Y5 und zwei mutante P2Y5-Rezeptorformen in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA (Invitrogen, Karlsbad) kloniert. Nach Fertigstellung der Konstrukte wurde unter Austesten verschiedener Transfektions- und Proteinextraktionsprotokolle die klonierten Plasmide exprimiert und im Western Blot nachgewiesen (Anlage 3, Pasternack et al., 2008).

Haarausfall (Alopezie) ist weit verbreitet und kann neben genetischen auch umweltbedingte Ursachen haben. *Hypotrichosis simplex* gehört zur Gruppe der nichtsyndromalen humanen Alopezie. In einer genomischen *Linkage*-Analyse wurde der Genlocus für *Hypotrichosis simplex* auf Chromosom 13.q14.11-13q21.33 identifiziert. Durch direkte Sequenzierungen wurden homozygote trunkierende Mutationen im *P2Y5*-Gen gefunden, welches den, aus 344 Aminosäuren bestehenden, G-Protein gekoppelten P2Y5-Rezeptor kodiert. Sowohl die Wildtyp-Form des P2Y5-Rezeptors als auch die beiden mutanten Formen P2Y5:p.Gln155X und P2Y5:p.Lys125AsnfsX37 konnten in COS-7 Zellen exprimiert werden. Mit Hilfe dieser Konstrukte gelang es weiterhin, die intrazelluläre Lokalisation der drei Proteine nachzuweisen. Während der Wildtyp-Rezeptor an der Zellmembran lokalisiert ist, akkumulieren die beiden trunkierten Proteine am endoplasmatischen Retikulum. In Bindungsstudien wurde das bioaktive Lipid LPA (*oleoyl-L- α -lysophosphatidic acid*) als P2Y5-Ligand identifiziert. Untersuchungen zur Signaltransduktion wiesen nach, dass der P2Y5-Rezeptor ein Mitglied der LPA Rezeptorgruppe ist. Mit dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass der G-Protein-gekoppelte Rezeptor P2Y5 bei humanem Haarwachstum eine wesentliche Rolle spielt. Diese Entdeckung bietet somit neue Behandlungsansätze bei Haarausfall.

5. Referenzen

- Asmus, F., Hjermind, L. E., Dupont, E., Wagenstaller, J., Haberlandt, E., Munz, M., Strom, T. M., and Gasser, T. (2007). Genomic deletion size at the epsilon-sarcoglycan locus determines the clinical phenotype. *Brain* 130, 2736-2745.
- Beraud-Dufour, S., Gautier, R., Albiges-Rizo, C., Chardin, P., and Faurobert, E. (2007). Krit 1 interactions with microtubules and membranes are regulated by Rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1. *Febs J* 274, 5518-5532.
- Bergametti, F., Denier, C., Labauge, P., Arnoult, M., Boetto, S., Clanet, M., Coubes, P., Echenne, B., Ibrahim, R., Irthum, B., *et al.* (2005). Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 76, 42-51.
- Bertalanffy, H., Benes, L., Miyazawa, T., Alberti, O., Siegel, A. M., and Sure, U. (2002). Cerebral cavernomas in the adult. Review of the literature and analysis of 72 surgically treated patients. *Neurosurg Rev* 25, 1-53; discussion 54-55.
- Bompard, G., Martin, M., Roy, C., Vignon, F., and Freiss, G. (2003). Membrane targeting of protein tyrosine phosphatase PTPL1 through its FERM domain via binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Sci* 116, 2519-2530.
- Bos, J. L. (2005). Linking Rap to cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 17, 123-128.
- Brunereau, L., Levy, C., Laberge, S., Houtteville, J., and Labauge, P. (2000). De novo lesions in familial form of cerebral cavernous malformations: clinical and MR features in 29 non-Hispanic families. *Surg Neurol* 53, 475-482; discussion 482-473.
- Busch, C. R., Heath, D. D., and Hubberstey, A. (2004). Sensitive genetic biomarkers for determining apoptosis in the brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Gene* 329, 1-10.
- Caron, E. (2003). Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges. *J Cell Sci* 116, 435-440.
- Cave-Riant, F., Denier, C., Labauge, P., Cecillon, M., Maciazek, J., Joutel, A., Laberge-Le Couteulx, S., and Tournier-Lasserre, E. (2002). Spectrum and expression analysis of KRIT1 mutations in 121 consecutive and unrelated patients with Cerebral Cavernous Malformations. *Eur J Hum Genet* 10, 733-740.
- Chang, D. D., Wong, C., Smith, H., and Liu, J. (1997). ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *J Cell Biol* 138, 1149-1157.
- Chen, J. N., Haffter, P., Odenthal, J., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C. P., *et al.* (1996). Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish. *Development* 123, 293-302.
- Chua, C. C., Hamdy, R. C., and Chua, B. H. (1998). Upregulation of vascular endothelial growth factor by H₂O₂ in rat heart endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 25, 891-897.
- Clatterbuck, R. E., Eberhart, C. G., Crain, B. J., and Rigamonti, D. (2001). Ultrastructural and immunocytochemical evidence that an incompetent blood-brain barrier is related to the pathophysiology of cavernous malformations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71, 188-192.
- Czubayko, M., Knauth, P., Schluter, T., Florian, V., and Bohnensack, R. (2006). Sorting nexin 17, a non-self-assembling and a PtdIns(3)P high class affinity protein, interacts with the cerebral cavernous malformation related protein KRIT1. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Denier, C., Goutagny, S., Labauge, P., Krivosic, V., Arnoult, M., Cousin, A., Benabid, A. L., Comoy, J., Frerebeau, P., Gilbert, B., *et al.* (2004). Mutations within the MGC4607 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 74, 326-337.

- Denier, C., Labauge, P., Bergametti, F., Marchelli, F., Riant, F., Arnoult, M., Maciazek, J., Vicaut, E., Brunereau, L., and Tournier-Lasserre, E. (2006). Genotype-phenotype correlations in cerebral cavernous malformations patients. *Ann Neurol* 60, 550-556.
- Detwiler, P. W., Porter, R. W., Zabramski, J. M., and Spetzler, R. F. (1998). Radiation-induced cavernous malformation. *J Neurosurg* 89, 167-169.
- Dimmeler, S., Dernbach, E., and Zeiher, A. M. (2000). Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 477, 258-262.
- Ewing, R. M., Chu, P., Elisma, F., Li, H., Taylor, P., Climie, S., McBroom-Cerajewski, L., Robinson, M. D., O'Connor, L., Li, M., *et al.* (2007). Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* 3, 89.
- Felbor, U. (2007). [Genetics of cerebral cavernous malformations (CCM)]. *Dtsch Med Wochenschr* 132, 1967-1970.
- Fong, B., Watson, P. H., and Watson, A. J. (2007). Mouse preimplantation embryo responses to culture medium osmolarity include increased expression of CCM2 and p38 MAPK activation. *BMC Dev Biol* 7, 2.
- Gaetzner, S., Stahl, S., Surucu, O., Schaafhausen, A., Halliger-Keller, B., Bertalanffy, H., Sure, U., and Felbor, U. (2007). CCM1 gene deletion identified by MLPA in cerebral cavernous malformation. *Neurosurg Rev* 30, 155-159; discussion 159-160.
- Garmyn, M., Mammone, T., Pupe, A., Gan, D., Declercq, L., and Maes, D. (2001). Human keratinocytes respond to osmotic stress by p38 map kinase regulated induction of HSP70 and HSP27. *J Invest Dermatol* 117, 1290-1295.
- Gault, J., Shenkar, R., Recksiek, P., and Awad, I. A. (2005). Biallelic somatic and germ line CCM1 truncating mutations in a cerebral cavernous malformation lesion. *Stroke* 36, 872-874.
- Glading, A., Han, J., Stockton, R. A., and Ginsberg, M. H. (2007). KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. *J Cell Biol* 179, 247-254.
- Guclu, B., Ozturk, A. K., Pricola, K. L., Bilguvar, K., Shin, D., O'Roak, B. J., and Gunel, M. (2005). Mutations in apoptosis-related gene, PDCD10, cause cerebral cavernous malformation 3. *Neurosurgery* 57, 1008-1013.
- Gunel, M., Awad, I. A., Finberg, K., Anson, J. A., Steinberg, G. K., Batjer, H. H., Kopitnik, T. A., Morrison, L., Giannotta, S. L., Nelson-Williams, C., and Lifton, R. P. (1996). A founder mutation as a cause of cerebral cavernous malformation in Hispanic Americans. *N Engl J Med* 334, 946-951.
- Gunel, M., Laurans, M. S., Shin, D., DiLuna, M. L., Voorhees, J., Choate, K., Nelson-Williams, C., and Lifton, R. P. (2002). KRIT1, a gene mutated in cerebral cavernous malformation, encodes a microtubule-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10677-10682.
- Guzeloglu-Kayisli, O., Amankulor, N. M., Voorhees, J., Luleci, G., Lifton, R. P., and Gunel, M. (2004). KRIT1/cerebral cavernous malformation 1 protein localizes to vascular endothelium, astrocytes, and pyramidal cells of the adult human cerebral cortex. *Neurosurgery* 54, 943-949; discussion 949.
- Hassel, S., Yakymovych, M., Hellman, U., Ronnstrand, L., Knaus, P., and Souchelnytskyi, S. (2006). Interaction and functional cooperation between the serine/threonine kinase bone morphogenetic protein type II receptor with the tyrosine kinase stem cell factor receptor. *J Cell Physiol* 206, 457-467.
- Hilder, T. L., Malone, M. H., Bencharit, S., Colicelli, J., Haystead, T. A., Johnson, G. L., and Wu, C. C. (2007). Proteomic Identification of the Cerebral Cavernous Malformation Signaling Complex. *J Proteome Res.*

- Honey, S., Schneider, B. L., Schieltz, D. M., Yates, J. R., and Futcher, B. (2001). A novel multiple affinity purification tag and its use in identification of proteins associated with a cyclin-CDK complex. *Nucleic Acids Res* 29, E24.
- Ito, H., Okamoto, K., Nakayama, H., Isobe, T., and Kato, K. (1997). Phosphorylation of alphaB-crystallin in response to various types of stress. *J Biol Chem* 272, 29934-29941.
- Ivanov, V. N., Ronai, Z., and Hei, T. K. (2005). Opposite roles of FAP-1 and dynamin in the regulation of Fas (CD95) translocation to the cell surface and susceptibility to Fas ligand-mediated apoptosis. *J Biol Chem*.
- Jao, D. L., and Chen, K. Y. (2005). Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *J Cell Biochem*.
- Jin, S. W., Herzog, W., Santoro, M. M., Mitchell, T. S., Frantsve, J., Jungblut, B., Beis, D., Scott, I. C., D'Amico, L. A., Ober, E. A., *et al.* (2007). A transgene-assisted genetic screen identifies essential regulators of vascular development in vertebrate embryos. *Dev Biol* 307, 29-42.
- Kehrer-Sawatzki, H., Wilda, M., Braun, V. M., Richter, H. P., and Hameister, H. (2002). Mutation and expression analysis of the KRIT1 gene associated with cerebral cavernous malformations (CCM1). *Acta Neuropathol (Berl)* 104, 231-240.
- Kimber, W. A., Deak, M., Prescott, A. R., and Alessi, D. R. (2003). Interaction of the protein tyrosine phosphatase PTPL1 with the PtdIns(3,4)P2-binding adaptor protein TAPP1. *Biochem J* 376, 525-535.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823.
- Kooistra, M. R., Dube, N., and Bos, J. L. (2007). Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. *J Cell Sci* 120, 17-22.
- Labauge, P., Denier, C., Bergametti, F., and Tournier-Lasserre, E. (2007). Genetics of cavernous angiomas. *Lancet Neurol* 6, 237-244.
- Labauge, P., Laberge, S., Brunereau, L., Levy, C., and Tournier-Lasserre, E. (1998). Hereditary cerebral cavernous angiomas: clinical and genetic features in 57 French families. *Societe Francaise de Neurochirurgie. Lancet* 352, 1892-1897.
- Laberge-le Couteulx, S., Jung, H. H., Labauge, P., Houtteville, J. P., Lescoat, C., Cecillon, M., Marechal, E., Joutel, A., Bach, J. F., and Tournier-Lasserre, E. (1999). Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat Genet* 23, 189-193.
- Landry, J., and Huot, J. (1999). Regulation of actin dynamics by stress-activated protein kinase 2 (SAPK2)-dependent phosphorylation of heat-shock protein of 27 kDa (Hsp27). *Biochem Soc Symp* 64, 79-89.
- Liquori, C. L., Berg, M. J., Siegel, A. M., Huang, E., Zawistowski, J. S., Stoffer, T., Verlaan, D., Balogun, F., Hughes, L., Leedom, T. P., *et al.* (2003). Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 73, 1459-1464.
- Liquori, C. L., Berg, M. J., Squitieri, F., Leedom, T. P., Ptacek, L., Johnson, E. W., and Marchuk, D. A. (2007). Deletions in CCM2 are a common cause of cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 80, 69-75.
- Liquori, C. L., Berg, M. J., Squitieri, F., Ottenbacher, M., Sorlie, M., Leedom, T. P., Cannella, M., Maglione, V., Ptacek, L., Johnson, E. W., and Marchuk, D. A. (2006). Low frequency of PDCD10 mutations in a panel of CCM3 probands: potential for a fourth CCM locus. *Hum Mutat* 27, 118.
- Liquori, C. L., Penco, S., Gault, J., Leedom, T. P., Tassi, L., Esposito, T., Awad, I. A., Frati, L., Johnson, E. W., Squitieri, F., *et al.* (2008). Different spectra of genomic deletions within the CCM genes between Italian and American CCM patient cohorts. *Neurogenetics* 9, 25-31.

- Lynch, J. K., Hirtz, D. G., DeVeber, G., and Nelson, K. B. (2002). Report of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke workshop on perinatal and childhood stroke. *Pediatrics* *109*, 116-123.
- Ma, X., Zhao, H., Shan, J., Long, F., Chen, Y., Zhang, Y., Han, X., and Ma, D. (2007). PDCD10 Interacts with Ste20-related Kinase MST4 to Promote Cell Growth and Transformation via Modulation of ERK Pathway. *Mol Biol Cell*.
- Mably, J. D., Chuang, L. P., Serluca, F. C., Mohideen, M. A., Chen, J. N., and Fishman, M. C. (2006). *santa* and *valentine* pattern concentric growth of cardiac myocardium in the zebrafish. *Development* *133*, 3139-3146.
- Marchuk, D. A., Srinivasan, S., Squire, T. L., and Zawistowski, J. S. (2003). Vascular morphogenesis: tales of two syndromes. *Hum Mol Genet* *12 Spec No 1*, R97-112.
- Maulik, N. (2002). Redox regulation of vascular angiogenesis. *Antioxid Redox Signal* *4*, 783-784.
- Morales-Ruiz, M., Fulton, D., Sowa, G., Languino, L. R., Fujio, Y., Walsh, K., and Sessa, W. C. (2000). Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circ Res* *86*, 892-896.
- Pasternack, S. M., von Kugelgen, I., Aboud, K. A., Lee, Y. A., Ruschendorf, F., Voss, K., Hillmer, A. M., Molderings, G. J., Franz, T., Ramirez, A., *et al.* (2008). G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet* *40*, 329-334.
- Petit, N., Blecon, A., Denier, C., and Tournier-Lasserre, E. (2006). Patterns of expression of the three cerebral cavernous malformation (CCM) genes during embryonic and postnatal brain development. *Gene Expr Patterns* *6*, 495-503.
- Plummer, N. W., Gallione, C. J., Srinivasan, S., Zawistowski, J. S., Louis, D. N., and Marchuk, D. A. (2004). Loss of p53 sensitizes mice with a mutation in *Ccm1* (KRIT1) to development of cerebral vascular malformations. *Am J Pathol* *165*, 1509-1518.
- Plummer, N. W., Squire, T. L., Srinivasan, S., Huang, E., Zawistowski, J. S., Matsunami, H., Hale, L. P., and Marchuk, D. A. (2006). Neuronal expression of the *Ccm2* gene in a new mouse model of cerebral cavernous malformations. *Mamm Genome* *17*, 119-128.
- Pombo, C. M., Bonventre, J. V., Molnar, A., Kyriakis, J., and Force, T. (1996). Activation of a human Ste20-like kinase by oxidant stress defines a novel stress response pathway. *Embo J* *15*, 4537-4546.
- Pombo, C. M., Tsujita, T., Kyriakis, J. M., Bonventre, J. V., and Force, T. (1997). Activation of the Ste20-like oxidant stress response kinase-1 during the initial stages of chemical anoxia-induced necrotic cell death. Requirement for dual inputs of oxidant stress and increased cytosolic [Ca²⁺]. *J Biol Chem* *272*, 29372-29379.
- Preisinger, C., Short, B., De Corte, V., Bruyneel, E., Haas, A., Kopajtich, R., Gettemans, J., and Barr, F. A. (2004). YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3zeta. *J Cell Biol* *164*, 1009-1020.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* *24*, 218-229.
- Revenu, N., and Vikkula, M. (2006). Cerebral cavernous malformation: new molecular and clinical insights. *J Med Genet*.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* *17*, 1030-1032.
- Robinson, J. R., Jr., Awad, I. A., Magdinec, M., and Paranandi, L. (1993). Factors predisposing to clinical disability in patients with cavernous malformations of the brain. *Neurosurgery* *32*, 730-735; discussion 735-736.

- Rousseau, S., Houle, F., and Huot, J. (2000a). Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med* 10, 321-327.
- Rousseau, S., Houle, F., Kotanides, H., Witte, L., Waltenberger, J., Landry, J., and Huot, J. (2000b). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 275, 10661-10672.
- Rual, J. F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Berriz, G. F., Gibbons, F. D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., *et al.* (2005). Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 437, 1173-1178.
- Ruef, J., Hu, Z. Y., Yin, L. Y., Wu, Y., Hanson, S. R., Kelly, A. B., Harker, L. A., Rao, G. N., Runge, M. S., and Patterson, C. (1997). Induction of vascular endothelial growth factor in balloon-injured baboon arteries. A novel role for reactive oxygen species in atherosclerosis. *Circ Res* 81, 24-33.
- Sahoo, T., Johnson, E. W., Thomas, J. W., Kuehl, P. M., Jones, T. L., Dokken, C. G., Touchman, J. W., Gallione, C. J., Lee-Lin, S. Q., Kosofsky, B., *et al.* (1999). Mutations in the gene encoding KRIT1, a Krev-1/rap1a binding protein, cause cerebral cavernous malformations (CCM1). *Hum Mol Genet* 8, 2325-2333.
- Samii, M., Eghbal, R., Carvalho, G. A., and Matthies, C. (2001). Surgical management of brainstem cavernomas. *J Neurosurg* 95, 825-832.
- Seker, A., Pricola, K. L., Guclu, B., Ozturk, A. K., Louvi, A., and Gunel, M. (2006). CCM2 expression parallels that of CCM1. *Stroke* 37, 518-523.
- Serebriiskii, I., Estojak, J., Sonoda, G., Testa, J. R., and Golemis, E. A. (1997). Association of Krev-1/rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene* 15, 1043-1049.
- Sheikh-Hamad, D., Di Mari, J., Suki, W. N., Safirstein, R., Watts, B. A., 3rd, and Rouse, D. (1998). p38 kinase activity is essential for osmotic induction of mRNAs for HSP70 and transporter for organic solute betaine in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 273, 1832-1837.
- Siegel, A. M., Bertalanffy, H., Dichgans, J. J., Elger, C. E., Hopf, H., Hopf, N., Keidel, M., Kleider, A., Nowak, G., Pfeiffer, R. A., *et al.* (2005). [Familial cavernous malformations of the central nervous system. A clinical and genetic study of 15 German families]. *Nervenarzt* 76, 175-180.
- Stahl, S., Gaetzner, S., Voss, K., Brackertz, B., Schleider, E., Surucu, O., Kunze, E., Netzer, C., Korenke, C., Finckh, U., *et al.* (2008). Novel CCM1, CCM2, and CCM3 mutations in patients with cerebral cavernous malformations: in-frame deletion in CCM2 prevents formation of a CCM1/CCM2/CCM3 protein complex. *Hum Mutat.* 0:1-9
- Stainier, D. Y., Fouquet, B., Chen, J. N., Warren, K. S., Weinstein, B. M., Meiler, S. E., Mohideen, M. A., Neuhauss, S. C., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., *et al.* (1996). Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development* 123, 285-292.
- Stone, J. R., and Collins, T. (2002). The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium* 9, 231-238.
- Uhlik, M. T., Abell, A. N., Johnson, N. L., Sun, W., Cuevas, B. D., Lobel-Rice, K. E., Horne, E. A., Dell'Acqua, M. L., and Johnson, G. L. (2003). Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol* 5, 1104-1110.
- Verlaan, D. J., Roussel, J., Laurent, S. B., Elger, C. E., Siegel, A. M., and Rouleau, G. A. (2005). CCM3 mutations are uncommon in cerebral cavernous malformations. *Neurology* 65, 1982-1983.
- Voss, K., Stahl, S., Schleider, E., Ullrich, S., Nickel, J., Mueller, T. D., and Felbor, U. (2007). CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. *Neurogenetics* 8:249-256

Westermarck, J., Weiss, C., Saffrich, R., Kast, J., Musti, A. M., Wessely, M., Ansorge, W., Seraphin, B., Wilm, M., Valdez, B. C., and Bohmann, D. (2002). The DEXD/H-box RNA helicase RHIII/Gu is a co-factor for c-Jun-activated transcription. *Embo J* 21, 451-460.

Whitehead, K. J., Plummer, N. W., Adams, J. A., Marchuk, D. A., and Li, D. Y. (2004). Ccm1 is required for arterial morphogenesis: implications for the etiology of human cavernous malformations. *Development* 131, 1437-1448.

Wohlgemuth, S., Kiel, C., Kramer, A., Serrano, L., Wittinghofer, F., and Herrmann, C. (2005). Recognizing and defining true Ras binding domains I: biochemical analysis. *J Mol Biol* 348, 741-758.

Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T. A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A. L., Roeder, R. G., Brivanlou, A. H., and Allis, C. D. (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 121, 859-872.

Yasuda, M., Ohzeki, Y., Shimizu, S., Naito, S., Ohtsuru, A., Yamamoto, T., and Kuroiwa, Y. (1999). Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sci* 64, 249-258.

Zabramski, J. M., Wascher, T. M., Spetzler, R. F., Johnson, B., Golfinos, J., Drayer, B. P., Brown, B., Rigamonti, D., and Brown, G. (1994). The natural history of familial cavernous malformations: results of an ongoing study. *J Neurosurg* 80, 422-432.

Zawistowski, J. S., Stalheim, L., Uhlik, M. T., Abell, A. N., Ancrile, B. B., Johnson, G. L., and Marchuk, D. A. (2005). CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Hum Mol Genet* 14, 2521-2531.

Zhang, J., Clatterbuck, R. E., Rigamonti, D., Chang, D. D., and Dietz, H. C. (2001). Interaction between krit1 and icap1alpha infers perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet* 10, 2953-2960.

Zhang, J., Rigamonti, D., Dietz, H. C., and Clatterbuck, R. E. (2007). Interaction between krit1 and malcavernin: implications for the pathogenesis of cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery* 60, 353-359; discussion 359.

Zhang, X. A., and Hemler, M. E. (1999). Interaction of the integrin beta1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *J Biol Chem* 274, 11-19.

Zhao, Y., Tan, Y. Z., Zhou, L. F., Wang, H. J., and Mao, Y. (2007). Morphological observation and in vitro angiogenesis assay of endothelial cells isolated from human cerebral cavernous malformations. *Stroke* 38, 1313-1319.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten: Katrin Voß
geboren am 24.01.1976 in Berlin
deutsch

Schulausbildung

1982 – 1989 Polytechnische Oberschule in Quedlinburg
1990 – 1995 Gymnasium in Berlin, Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

1997 – 2004 Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin (FU Berlin)
2003 – 2004 Verhaltenspharmakologische Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. J. Wolffgramm am Universitätsklinikum für Psychiatrie in Tübingen, Thema: „Einfluss von Acamprosat und Naltrexon auf die Alkoholeinnahme langzeitalkoholerfahrener Ratten“
Abschluss: Diplom-Biologin
seit 2005 Promotion am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Ute Felbor, Thema: „Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des humanen CCM3-Proteins“

Publikationsliste

Im Rahmen der Promotion entstandene Publikationen, Poster und Vorträge:

Voss, K., Stahl, S., Schleider, E., Ullrich, S., Nickel, J., Mueller, T. D., and Felbor, U. (2007). CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. Neurogenetics 8:249-256

Stahl, S., Gaetzner, S., **Voss, K.**, Brackertz, B., Schleider, E., Surucu, O., Kunze, E., Netzer, C., Korenke, C., Finckh, U. (2008). Novel CCM1, CCM2, and CCM3 mutations in patients with cerebral cavernous malformations: in-frame deletion in CCM2 prevents formation of a CCM1/CCM2/CCM3 protein complex. Human Mutation 0:1-9

Pasternack, S. M., von Kugelgen, I., Aboud, K. A., Lee, Y. A., Ruschendorf, F., **Voss, K.**, Hillmer, A. M., Molderings, G. J., Franz, T., Ramirez, A. (2008). G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. Nature Genetics 40:329-334.

Voss, K., Schleider, E., Ullrich, S., Stahl, S. und Felbor, U. (2007). Functional Characterization of CCM1 Missense Mutation. *Poster*, 18. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, Bonn, April 2007

Voss, K., Stahl, S., Schleider, E., Ullrich, S., Nickel, J., Mueller, T. D., and Felbor, U. (2007). CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. *Poster*, ELSO-European Life Scientist Organization - 6th International Meeting, Dresden, September 2007

Stahl S., Gaetzner S., **Voss K.**, Schleider E., Mueller T.D., Felbor U. (2008). CCM2 is the core molecule of the cerebral cavernous malformation protein complex *Poster*, 19. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, Hannover, April 2008

Katrin Voss und Ute Felbor: Diagnostik und Pathogenese zerebraler kaverner Malformationen (CCM): ein Update, *Vortrag*, 4. Mitarbeiterkolloquium des Bayerischen Genomforschungsnetzwerkes (BayGene), Regensburg, 02.02.2007

Katrin Voss: CCM2 interacts with CCM3 indicating common Pathogenesis of Cerebral Cavernous Malformations, *Vortrag*, 5. Mitarbeiterkolloquium des Bayerischen Genomforschungsnetzwerkes (BayGene), München, 18.10.2007

Sonja Stahl: CCM2 is the core molecule of the cerebral cavernous malformation protein complex *Vortrag*, 19. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, Hannover, 10.04.2008

Weitere Publikationen und Poster:

Brumm H., **Voss K.**, Köllmer I., Todt D. (2004). Acoustic communication in noise: regulation of call characteristics in a New World monkey. *J Exp Biol* 207 (Pt 3): 443-448

Zimdahl H., Gösele C., Lutjens G., Grutzner F., Kreitler T., **Voss K.**, Wanker E., Knoblauch M. (2001). Assignment (1) of the huntingtin (Hdh) gene, the huntingtin associated protein (Hap1) gene, and the huntingtin interacting protein (Hip1) gene to rat chromosomes 14, 10, and 12 by radiation hybrid mapping and the fluorescent in situ hybridisation. *Cytogenet Cell Genet* 94 (1-2): 101-104

Voss K., Friedrich A., Eisenhardt D., Müller U. (2001). Modulation of CREB isoforms by satiation in honeybees. *Poster*, 28. Göttinger Neurobiologie Konferenz, Göttingen, 2001

Erklärung

Erklärung gemäß §4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayrischen Universität Würzburg vom 15. März 1999:

1. Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.
2. Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.
3. Weiterhin erkläre ich, dass ich außer den mit Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben, oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 26.03.2008

Katrin Voß

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg von Oktober 2005 bis März 2008 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Ute Felbor angefertigt. Hiermit bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. U. Felbor, die mir die Möglichkeit gegeben hat, im Rahmen des CCM3-Projekts promovieren zu dürfen. Insbesondere danke ich ihr für ihre Unterstützung und Betreuung, für den wissenschaftlichen Freiraum während der Bearbeitung verschiedenster Fragestellungen und dafür, dass ich an verschiedenen Kongressen teilnehmen durfte.

Herrn Prof. Benavente danke ich für Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. H. Höhn danke ich für die gute Ausstattung am Institut für Humangenetik und sein Interesse an meiner Arbeit.

Frau Dr. Stahl danke ich sehr für die Aufreinigung der rekombinanten CCM3-Proteine, für die Austestung des CCM3-Antikörpers, die Auswertung der Lokalisationsstudien am konfokalen Mikroskop und für die Durchführung der GST Pull-down Assays sowie für die netten Gespräche bei einer Tasse Kaffee. Den anderen Kolleginnen der Arbeitsgruppe, Elisa Schleider, Bettina Brackertz, Juliane Kläß, Sabine Gätzner und Sybille Ullrich danke ich für die Unterstützung bei der Klonierung verschiedener CCM1-, CCM2-, und CCM3-Konstrukte sowie für ihre sonstige Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. J. Nickel, Herrn Dr. W. Schmitz und Herrn Prof. Dr. E. Conzelmann vom Institut für Physiologische Chemie II der Universität Würzburg danke ich sehr für ihre Bereitschaft, mir fachlich mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Insbesondere möchte ich mich bei Joachim Nickel für die Hilfe bei der Etablierung der Phosphorylierungsassays bedanken und seine äußerst geduldige Art, mir fachliche Fragen zu beantworten. Auch halfen mir seine aufmunternden Worte und hessische Geschichtchen aus dem Leben sehr, wenn die Versuche mal nicht so gelaufen sind, wie ich erhofft hatte. Seine Hilfsbereitschaft trug wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Dr. J. Reinders vom Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg danke ich für die massenspektrometrische Bestimmung der CCM3-Phosphorylierungsstellen und seine generelle Hilfsbereitschaft bei der Auswertung der Daten. Bei Herrn Prof. Dr. T. D. Müller möchte ich mich für die CCM3-Strukturmodellanalysen bedanken.

Herrn Dr. P. Tripal danke ich herzlich für die fachliche und „spacige“ Unterstützung während dieser Arbeit. Danke Phil, dass Du immer geduldig meine Fragen beantwortet und Dich intensiv mit diesem Manuskript auseinandergesetzt hast.

Meinem Cousin Constantin und insbesondere seiner Frau Beate danke dafür, dass sie mir in jeder Lebenslage Mut gemacht haben und immer für mich da waren, wenn es Probleme gab.

Christjane und Familie, Sammy, Anke, Jana, Dine, Bille, Sanne, Alice und Gertrud danke ich für die stetige Unterstützung. Ihr alle habt mir immer Mut gemacht und mich auch nach privaten Tiefschlägen wieder zum Lachen bringen können.

Meinem Lebensgefährten Christoph und seiner Familie danke ich herzlich für ihre Unterstützung in den letzten Jahren. Ohne Christoph hätte ich weder das Studium noch diese Promotion erfolgreich zum Abschluss bringen können. Danke!

Anlage 1 - 3

CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations

Katrin Voss · Sonja Stahl · Elisa Schleider ·
Sybille Ullrich · Joachim Nickel ·
Thomas D. Mueller · Ute Felbor

Received: 2 May 2007 / Accepted: 4 July 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Individuals carrying a mutation in one of the three cerebral cavernous malformation genes (*CCM1/KRIT1*, *CCM2*, *CCM3*) cannot be clinically distinguished, raising the possibility that they act within common molecular pathways. In this study, we demonstrate that *CCM3* (*PDCD10*) coprecipitates and colocalizes with *CCM2*. We also show that *CCM3* directly binds to serine/threonine kinase 25 (*STK25*, *YSK1*, *SOK1*) and the phosphatase domain of Fas-associated phosphatase-1 (*FAP-1*, *PTPN13*, *PTP-Bas*, *PTP-BL*). *CCM3* is phosphorylated by *STK25* but not by its other Yeast-Two hybrid interactor *STK24*, whereas the C-terminal catalytic domain of *FAP-1* dephosphorylates *CCM3*. Finally, our experiments reveal that *STK25* forms a protein complex with *CCM2*. Thus, our data link two proteins of unknown function, *CCM3* and *STK25*, with *CCM2*, which is part of signaling pathways essential for vascular development and CCM pathogenesis.

Keywords Cerebral cavernous malformation · *CCM3* · *CCM2* · *STK25* · *FAP-1*

Introduction

Cerebral cavernous malformations (CCM; MIM 116860, 603284, 603285) are common sporadic or autosomal dominantly inherited vascular lesions predisposing to recurrent headaches, seizures, and hemorrhagic stroke [1, 2]. Heterozygous germline mutations have been identified in three genes, *CCM1* [3], *CCM2* [4], and *CCM3* [5]. A second somatic mutation appears to be required for lesion genesis [6, 7]. Genotype–phenotype correlation analyses in a large cohort of CCM patients suggested that *CCM3* mutation carriers are more prone to cerebral hemorrhage during childhood. In addition, the gene-specific disease penetrance was corrected to 60, 55, and 68% for *CCM1*, *CCM2*, and *CCM3*, respectively [8]. However, individual risk prediction is still impossible because severe hemorrhages in the brainstem leading to hemiparesis have also been reported for infant *CCM1* mutation carriers [9, 10].

Because neurological symptoms in patients with germline mutations in *CCM1*, *CCM2*, or *CCM3* are similar, it has been suggested that the three gene products might be integrated into a common functional pathway [1]. It has been shown that *CCM1* binds to *CCM2* in vitro [11, 12]. Synergistic effects of *CCM1* and *CCM2* have also been confirmed in vivo by coinjection of morpholinos designed to knock down the *CCM1* and *CCM2* homologues in zebrafish [13]. *CCM1* also binds to integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 α , thereby presumably modulating integrin signaling [14, 15]. *CCM2*, also known as osmosensing scaffold for MEKK3, acts as a scaffold protein within the stress-activated p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling cascade [16]. The function of the

K. Voss · S. Stahl · E. Schleider · S. Ullrich · U. Felbor (✉)
Department of Human Genetics, University of Würzburg,
Biozentrum, Am Hubland,
97074 Würzburg, Germany
e-mail: felbor@biozentrum.uni-wuerzburg.de

J. Nickel · T. D. Mueller
Department of Physiological Chemistry II,
University of Würzburg,
Biozentrum, Am Hubland,
97074 Würzburg, Germany

widely expressed 25-kDa *CCM3* gene product CCM3, also known as programmed cell death 10 because the *CCM3* gene is upregulated in apoptotic cells [17], remains largely unknown.

Materials and methods

Yeast two-hybrid analysis

The screen was carried out by Dualsystems Biotech AG, Zürich, Switzerland. The bait construct was made by subcloning full-length human *CCM3* complementary deoxyribonucleic acid (cDNA; cDNA clone IRAUp969E086D, RZPD, Germany) into the vector pLexA-DIR (Dualsystems Biotech AG) and transformed into the strain NMY32 (MATa his3 Δ 200 trp1–901 leu2–3,112 (lexAop)₈–ADE2 LYS2::(lexAop)₄–HIS3 URA3::(lexAop)₈–lacZ GAL4) using standard procedures. The bait construct was cotransformed together with a human fetal brain cDNA library (Clontech) into NMY32 grown on a selective medium. Positive clones with strong β -galactosidase activity were isolated and assayed in a bait dependency test. The bait plasmid and control baits encoding either a LexA–p53 or a LexA–laminC fusion were retransformed into NMY32. Positive clones that showed β -galactosidase activity when coexpressed with the bait but not with the control baits were considered to be bait-dependent positive interactors. The identity of positive interactors was determined by sequencing and basic local alignment search tool homology searches.

Generation of plasmids

For prokaryotic expression, full-length human *CCM3* was cloned into the *Bam*HI and *Sal*I sites of pGEX-6P-1 (Amersham). For expression in eukaryotic cell lines, polymerase chain reaction (PCR)-amplified human full-length *CCM1*, *CCM2*, *CCM3*, and *serine/threonine kinase 25* (*STK25*; *CCM1* cDNA clone IRAKp961A16196Q, *CCM2* cDNA clone IRAUp969E1219D6, and *STK25* cDNA clone IRAUp969G0636D6, RZPD, Germany) were cloned into the *Nhe*I and *Not*I sites of the pIRESneo-derived vector VP5 (pIRESVP5), which allows expression of N-terminal FLAG/HA-tagged CCM1, CCM2, CCM3, and STK25 (Flag-CCM1, Flag-CCM2, Flag-CCM3/HA-CCM3, Flag-STK25). The vector pIRESVP5 and the control plasmid pIRESneoVP5-eGFP were a kind gift from Dr. Robert G. Roeder (Rockefeller University, New York). Additionally, *CCM1* and *CCM2* were PCR cloned into the *Eco*RI and *Xho*I sites of pcDNA3.1myc/His-B (Invitrogen), which allows expression of Myc/His-tagged CCM1 and CCM2 (Myc-CCM1, Myc-CCM2).

Antibodies

The following commercially available antibodies were used: goat polyclonal anti-yeast Sps1/Ste20-related kinase 1 (YSK1) antibody (N-19, α -STK25) and rabbit polyclonal anti-Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) antibody (H-300; Santa Cruz), rabbit polyclonal anti-MST3b antibody (Cell Signaling), mouse monoclonal anti-MST3 antibody (BD Bioscience), mouse monoclonal anti-Flag M2 antibody and mouse monoclonal anti-HA antibody (HA7; Sigma-Aldrich), rabbit polyclonal anti-Flag antibody (Abgent), mouse monoclonal anti-myc antibody (9E10, Upstate Signaling), and rabbit polyclonal anti-c-myc antibody (Sigma-Aldrich). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase, Alexa488 (Molecular Probes), or Cy3 were purchased from Dianova.

Glutathione transferase pull-down

Glutathione transferase (GST)-CCM3 and GST alone were expressed in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3), purified on glutathione sepharose 4 Fast Flow (4FF) beads (Amersham), and prepared as described in the GST fusion system handbook (Amersham). Cell extracts were prepared as in Pombo et al. [18]. Precleared lysates of untransfected human embryonic kidney cell line 293 (HEK293) cells or cells transiently transfected with Flag-CCM2 were added to glutathione sepharose 4FF and rotated overhead for 1 h at 4°C. Bound protein complexes were washed 4 \times in lysis buffer. Then, 5 \times Laemmli buffer was added to the samples, which were heated for 5 min at 95°C and analyzed by 5–20% gradient sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting.

Phosphorylation and dephosphorylation assays

In vitro kinase assays were carried out with recombinant GST-STK25 (Invitrogen), GST-STK24 (Invitrogen), GST-CCM3, myelin basic protein (MBP, Biomol), and GST alone. Kinases and substrates were diluted in assay buffer [18], and reactions were performed with 100 μ M (γ -³²P) ATP (50,000–90,000 cpm/pmol) as in Pombo et al. [18]. Samples were subjected to 12.5% SDS-PAGE and autoradiography. All assays were performed in triplicates. In vitro dephosphorylation assays were performed with the catalytic domain of FAP-1 (aa2,091–2,490, US Biological). CCM3 (50 μ g) was phosphorylated as described above. The catalytic domain of FAP-1 (cdFAP-1) was diluted in assay buffer (50 mM hydroxyethylpiperazineethanesulfonic acid pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM ethylenediamine tetraacetic acid, and 3 mM dithiothreitol). One microgram of phosphorylated CCM3 was incubated with 0.005–5 U of cdFAP-1. After 4, 20, and 40 min at 30°C,

the reactions were terminated by adding 5× Laemmli buffer to the samples. Analysis was done via SDS-PAGE and autoradiography.

Coimmunoprecipitation experiments

HEK293 cells were transiently transfected with the indicated constructs using FuGene6™ (Roche). For double and triple transfections, the transfection protocol was optimized to provide equal expressions of the proteins. Harvesting of cells and immunoprecipitations of endogenous STK25 and FAP-1 with HA-tagged CCM3 using anti-HA-agarose (clone HA7, Sigma-Aldrich) were done as in Pombo et al. [18]. Coimmunoprecipitation experiments (IPs) with Myc- or Flag-CCM1, Myc- or Flag-CCM2, Flag-CCM3, and Flag-STK25 were performed as described in Zawistowski et al. [11]. Cell extracts were precleared with sepharose 6B CL beads (Sigma-Aldrich) by overhead rotation for 1 h at 4°C. Then, precleared lysates were incubated either with α-Myc antibody coupled to protein G sepharose beads (Sigma-Aldrich) or with anti-Flag agarose (M2, Sigma-Aldrich) and rotated overhead for 2 h at 4°C. The beads were washed three times with lysis buffer and three times with lysis buffer containing 0.06% Triton-X 100. For analysis, 2× Laemmli buffer was added to the beads and IP eluates were boiled for 10 min at 100°C. IP eluates were subjected to 5–20% gradient SDS-PAGE and analyzed by Western blotting.

Immunocytochemistry

Flag-CCM3- and Myc-CCM2-transfected HEK293 cells grown on coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). Then, cells were washed with PBS followed by permeabilization in 0.05% saponin in PBS for 5 min and two additional washes with 0.2% gelatine in PBS (blocking solution) for 5 min. The cells were incubated overnight at 4°C with mouse anti-Flag and rabbit anti-c-Myc primary antibodies. After three washes with blocking solution, cells were incubated with anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies conjugated with Alexa 488 or Cy3 for 1 h at 37°C. After several washing steps, coverslips were mounted onto glass slides in 10% (w/v) Moviol 4-88 in PBS. Imaging was performed with a LSM510 Meta confocal laser scanning microscope (Zeiss).

Results

STK25 and FAP-1 directly bind to CCM3

The three-dimensional structure of the evolutionarily highly conserved CCM3 protein is unknown, but a number of observations strongly suggest that CCM3 consists of only one stably folded domain. Extensive sequence analyses failed to reveal significant homologies to protein domains

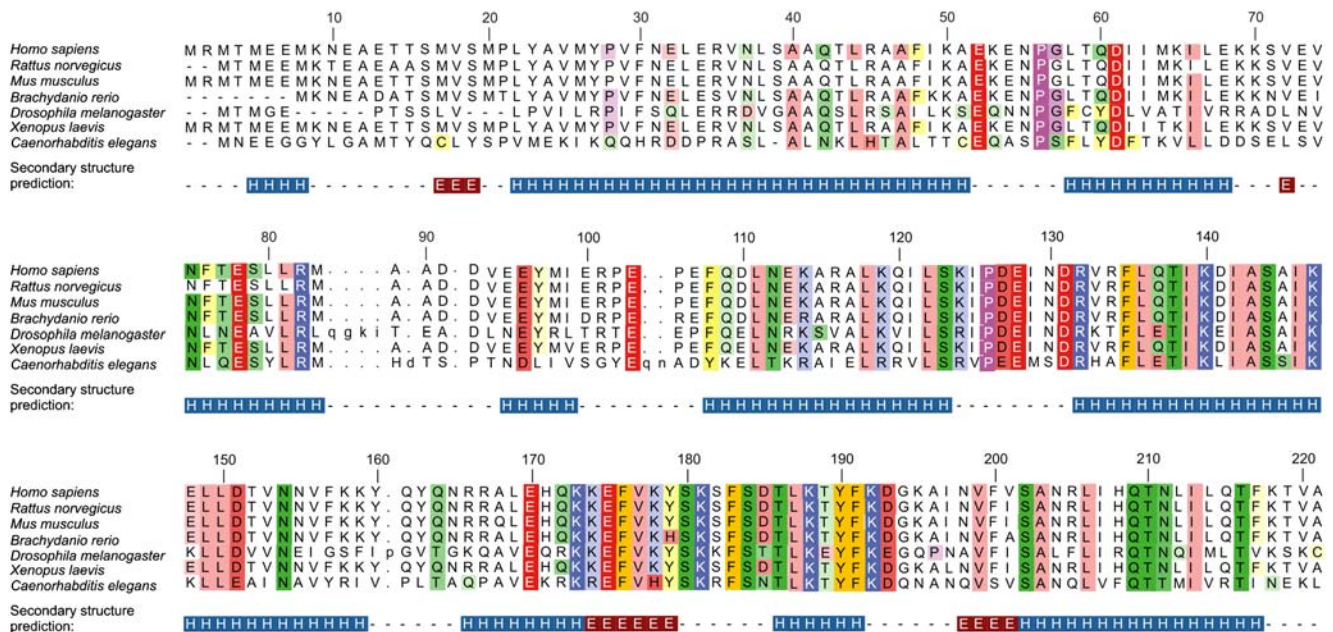


Fig. 1 Secondary structure predictions show highly conserved human CCM3 to be a mainly helical protein with a predicted helical content of more than 62% lacking long flexible linker peptide sequences (≥10 residues). For sequence alignment, a selection of CCM3 domains from the “full alignment” of the PFAM database was used (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). The software Jalview (www.jalview.org) was used for analysis of sequence conservation, and Taylor color

coding was applied to the sequence alignment [25]. Color intensities are modulated by the degree of conservation; the color intensities shown were produced with a scale of 75 of the conservation tool in Jalview. Secondary structure elements according to the software packages JPRED (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred>) and PhD(<http://www.predictprotein.org>) are indicated below the sequence alignment (H= α-helix, E= β-sheet)

with a known structure. Furthermore, sequence alignments of CCM3 proteins indicate the absence of a flexible linker, implying the presence of only one structural domain in CCM3 essentially formed by the entire protein (Fig. 1). Any attempt to use smaller fragments of CCM3 as bait in yeast two-hybrid experiments would therefore result in a large number of artifacts and high background caused by the display of an unfolded protein sequence that is prone to aggregate. Therefore, only full-length human CCM3 (CCM3) was chosen to screen a human fetal brain cDNA library using a LexA-based yeast two-hybrid system.

STK25, FAP-1, and STK24 were identified as bait-dependent interactors of CCM3. The majority of positive

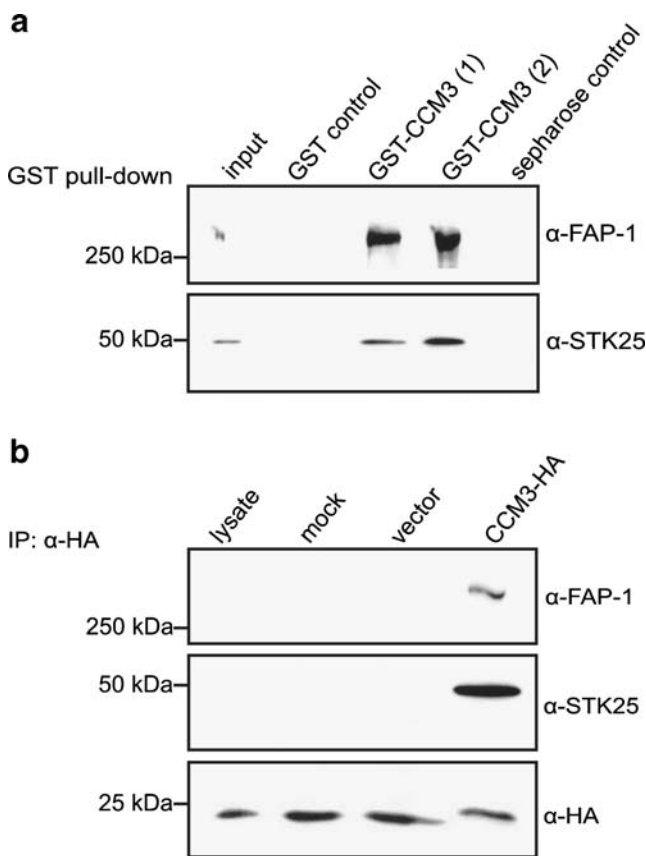


Fig. 2 Human CCM3 interacts with STK25 and FAP-1. **a** GST pull-down assay. Sepharose alone and immobilized GST alone and GST-CCM3 (clone 1 and 2) were incubated with HEK293 cell lysates and subjected to SDS-PAGE. Western blot analyses with anti-STK25 (α -STK25) and anti-FAP-1 (α -FAP-1) antibodies demonstrate that endogenous STK25 and FAP-1 were exclusively pulled down by GST-CCM3 (clone 1 and 2) and not by the controls. **b** Coimmunoprecipitation (IP) of CCM3 with endogenous STK25 and FAP-1 using HEK293 cells transiently transfected with HA-tagged CCM3 (CCM3-HA). Nontransfected cells as well as mock- (HA-tagged GFP) and vector-transfected cells served as negative controls. IPs with anti-HA agarose and Western blot analyses with the antibodies α -FAP-1 (top panel) and α -STK25 (middle panel) show that both proteins interact with CCM3-HA but not with the controls. Analysis of the blots with α -HA antibody serves as loading control (bottom panel)

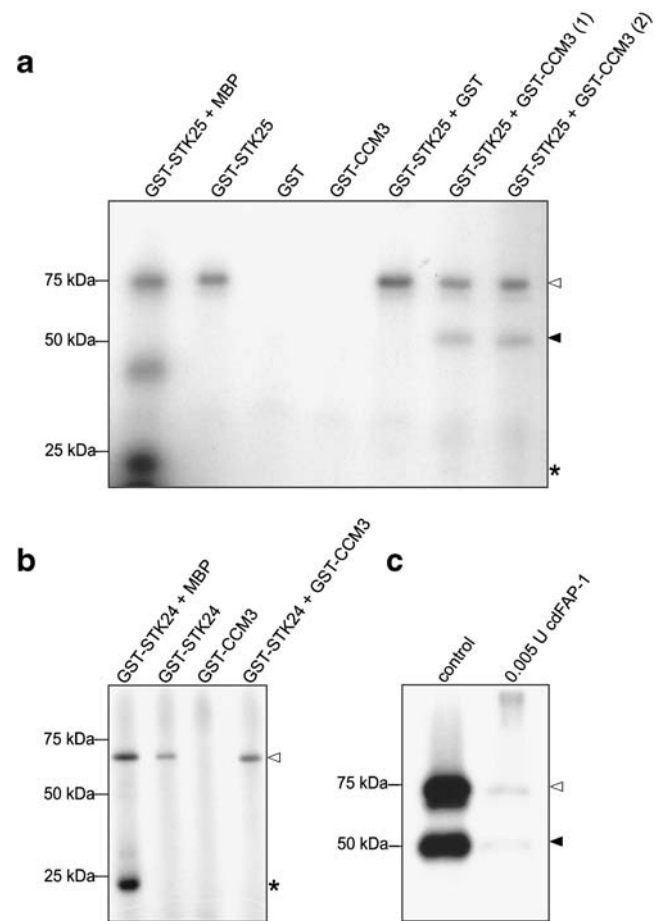


Fig. 3 STK25 but not STK24 phosphorylates CCM3 in vitro. **a** Recombinant 75-kDa GST-STK25 shows autophosphorylation (white arrowhead) and specifically phosphorylates recombinant 50-kDa GST-CCM3 (black arrowhead). Phosphorylation of 21-kDa MBP by GST-STK25 was used as positive control (asterisk). Recombinant GST as well as GST incubated with GST-STK25 served as negative controls. **b** Recombinant 61-kDa GST-STK24 possessed autophosphorylation activity (white arrowhead), phosphorylated MBP (asterisk), but did not phosphorylate GST-CCM3. **c** Dephosphorylation assay. GST-CCM3 was phosphorylated as described above (control) and then incubated with 0.005 U of the catalytic domain of FAP-1 (cdFAP-1) for 4 min at 30°C. cdFAP-1 dephosphorylated both GST-CCM3 (black arrowhead) and the kinase GST-STK25 (white arrowhead)

transformants contained inserts coding for the C-terminal regulatory domain of STK25. A few coded for the N-terminal kinase domain of STK25. As for FAP-1, most inserts harbored a region predicted to contain the C-terminal phosphatase domain; only one insert contained the coding sequence for PDZ domains 2 and 3. A minority of positive clones also revealed inserts coding for the C-terminal domain of STK24.

To confirm the interaction of CCM3 with STK25 and FAP-1, GST pull-down assays (Fig. 2a) as well as coimmunoprecipitation studies (Fig. 2b) were performed. For GST pull-down assays, lysates of a human embryonic kidney cell line (HEK293) were incubated with GST alone, sepharose alone, or CCM3 fused to the C-terminus of GST (GST-CCM3) and analyzed by Western blotting using antibodies

against human STK25 and FAP-1. Only GST-CCM3 was able to trap endogenous STK25 and FAP-1, whereas no STK25 and FAP-1 were detected in the control lanes (Fig. 2a). For coimmunoprecipitation studies, HEK293 cells were transiently transfected with HA-CCM3 and control plasmids and lysed 48 h post-transfection. Lysates were incubated with anti-HA agarose. Western blot analyses showed that the interactors STK25 and FAP-1 specifically coprecipitated with HA-CCM3 but not with the controls (Fig. 2b). Direct binding of STK24 to CCM3 was not confirmed because the commercially available antibodies against STK24 also recognized STK25 (data not shown).

STK25 phosphorylates CCM3

Because it was described that STK25 possesses autophosphorylation activity and phosphorylates MBP [18], we

wanted to know whether STK25 is able to phosphorylate CCM3. Therefore, kinase assays with recombinant GST-coupled STK25 and GST-CCM3 were performed. Phosphorylation of the substrate MBP was used as positive control. GST-CCM3 but not GST alone was phosphorylated by GST-STK25 *in vitro*. Autophosphorylation activity of CCM3 was not detected (Fig. 3a).

STK25 is significantly homologous to STK24, in particular in the N-terminal kinase domain. However, recombinant GST-STK24, which was shown to autophosphorylate and to phosphorylate the control substrate MBP, did not phosphorylate GST-CCM3 (Fig. 3b).

To investigate dephosphorylation of CCM3 by FAP-1, phosphorylated GST-CCM3 was incubated with cdFAP-1, and reactions were analyzed by autoradiography. Again, GST-STK25 phosphorylated GST-CCM3 and possessed autophosphorylation activity. cdFAP-1 of 0.005 U were

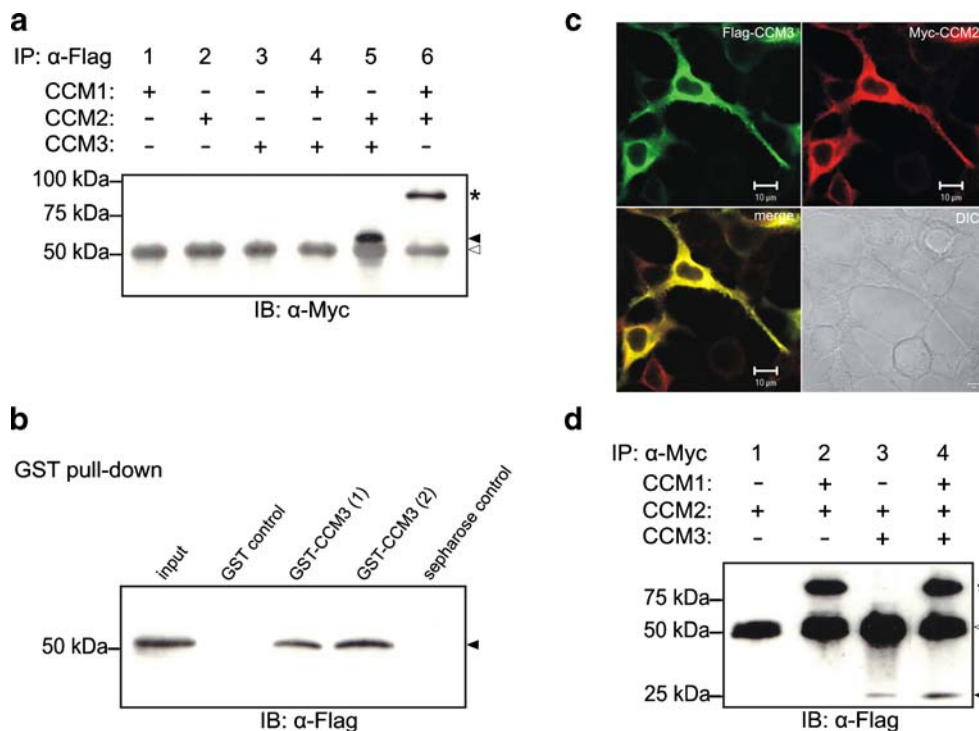


Fig. 4 CCM3 interacts with CCM2. **a** Coimmunoprecipitation studies (IP) using HEK293 cells transiently coexpressing Flag-CCM3 (CCM3) and Myc-CCM1 (CCM1) or Myc-CCM2 (CCM2), respectively. IPs were performed with anti-Flag agarose and analyzed by Western blot (IB) with anti-Myc antibody (α -Myc). Cotransfections of the individual plasmids with empty Myc or Flag vectors were used as negative controls (lanes 1–3). Binding of Flag-CCM2 and Myc-CCM1 was used as positive control (lane 6, asterisk). Flag-tagged CCM3 specifically interacted with Myc-CCM2 (lane 5, black arrowhead) but not with Myc-CCM1 (lane 4). IgG heavy chain bands at 50 kDa (white arrowhead) served as loading controls. **b** GST pull-down of CCM2 with CCM3. HEK293 cells were transfected with Flag-CCM2 (input) and incubated with immobilized GST-CCM3 (GST-CCM3, clone 1 and 2), GST alone (GST control), or sepharose alone (sepharose control). Western blot analysis revealed that Flag-CCM2 was detected only in

GST-CCM3 lanes but not in control lanes (black arrowhead). **c** CCM2 colocalizes with CCM3 in HEK293 cells. Myc-CCM2 and Flag-CCM3-overexpressing cells were costained with anti-mouse Alexa488 for Flag-CCM3 (green) and anti-rabbit Cy3 for Myc-CCM2 (red) detection. The merged images (merge) were obtained by confocal microscopy (DIC=differential interference contrast image). **d** Increased interaction of CCM3 with CCM2 in the presence of CCM1. HEK293 cells were cotransfected with Flag-CCM1, Myc-CCM2, and Flag-CCM3 as indicated, and IPs were performed with anti-c-Myc antibody (α -Myc). IB analysis with anti-Flag antibody (α -Flag) revealed that CCM1 (lane 2, asterisk) and CCM3 coprecipitated with CCM2 (lane 3, black arrowhead). Compared to the control (lane 1), a stronger CCM3 band was detected when CCM1 was overexpressed in parallel (lane 4). CCM2-transfected cells served as negative control (lane 1) and IgG bands at 50 kDa as loading controls (white arrowhead)

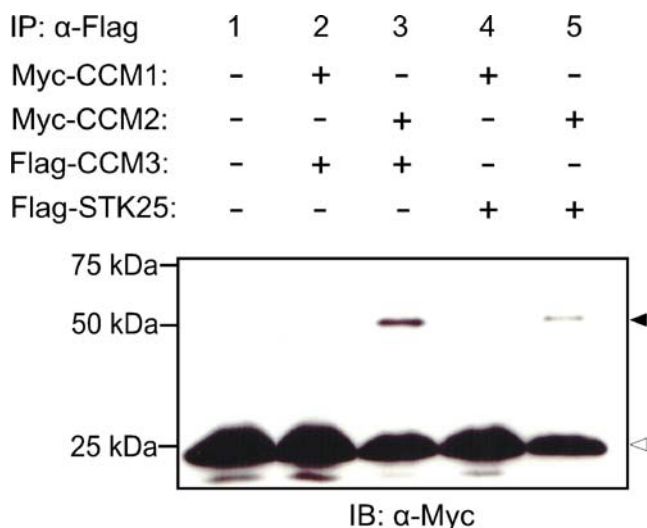


Fig. 5 STK25 coprecipitates with CCM2. Lysates of HEK293 cells coexpressing the indicated plasmids were subjected to coimmunoprecipitations using an anti-Flag antibody generated in rabbit (α -Flag). Binding of CCM2 and CCM3 was used as positive control (lane 3). Western blot (IB) analysis with α -Myc antibody revealed that Myc-CCM2 coprecipitated with Flag-CCM3 and Flag-STK25 (lanes 3 and 5, black arrowhead), whereas Myc-CCM1 did not bind to STK25 (lane 4) or CCM3 (lane 2). IgG bands at 25 kDa served as loading controls (white arrowheads)

sufficient to dephosphorylate GST-CCM3 as well as the kinase GST-STK25 (Fig. 3c).

CCM3 coprecipitates and colocalizes with CCM2

To assess whether CCM3 is a member of the CCM1/CCM2 complex, we first coexpressed Flag-CCM3 with either Myc-CCM1 or Myc-CCM2 and performed coimmunoprecipitation studies using anti-Flag agarose. Transfection of each plasmid with the appropriate empty vector expressing the tags alone served as negative controls (Fig. 4a, lanes 1–3). Interaction of Flag-CCM2 with Myc-CCM1 was used as positive control (Fig. 4a, lane 6, asterisk). Myc-CCM2 did coprecipitate with Flag-CCM3 (Fig. 4a, lane 5, black arrowhead), whereas Myc-CCM1 did not (Fig. 4a, lane 4).

Because an alternative Flag antibody raised in a different species also showed cross-reactivity with the antibody used for antigen detection, independent confirmation of the CCM2/CCM3 interaction was provided by GST pull-down (Fig. 4b) and subcellular colocalization (Fig. 4c). HEK293 cells were transiently transfected with Flag-CCM2, and lysates (input) were exposed to the controls GST alone and sepharose beads as well as to GST-CCM3. Both GST-CCM3 clones but not the controls were able to pull down Flag-CCM2 (Fig. 4b). Furthermore, immunofluorescence analyses demonstrated colocalization of Myc-CCM2 and Flag-CCM3 (Fig. 4c).

Given that both CCM1 and CCM3 are capable to interact with CCM2, we next analyzed whether this interaction is

exclusive or cooperative. Anti-Myc coimmunoprecipitation experiments were performed with HEK293 cells coexpressing Myc-CCM2 and Flag-CCM3 in the absence or presence of Flag-CCM1. Reproducibly, an increase in CCM3 band intensity could be visualized after triple transfections (Fig. 4d) indicating that CCM1 supports coprecipitation of CCM2 with CCM3 and that simultaneous interaction of CCM1 and CCM3 with CCM2 is possible.

STK25 coprecipitates with CCM2

Finally, we wanted to know whether the CCM3 interactor STK25 also associates with CCM2. To investigate this question, HEK293 cells were transiently cotransfected with Flag-STK25 and Myc-CCM2, and anti-Flag coimmunoprecipitation was performed (Fig. 5). The interaction of CCM2 with CCM3 was used as the positive control (Fig. 5, lane 3), and coexpression of CCM1 and CCM3 served as negative control (Fig. 5, lane 2). Western blot analyses clearly showed that Myc-CCM2 coprecipitates with Flag-tagged CCM3 and STK25 (Fig. 5, lanes 3 and 5, black arrowhead), whereas Myc-CCM1 does not bind to STK25 and to CCM3 in the absence of overexpressed CCM2 (Fig. 5a, lanes 4 and 2).

Discussion

Heterozygous autosomal-dominantly inherited mutations in human *CCM1*, *CCM2*, or *CCM3* are associated with malformations of the vasculature that cannot be phenotypically distinguished [1]. Comparative expression pattern analyses using in situ hybridization revealed that *Ccm1*–*Ccm3* mRNAs were detected in neuronal cell layers, the heart, and large arterial and venous vessels of murine embryos and adult mice. *Ccm2* and *Ccm3* but not *Ccm1* mRNAs were also detected in early postnatal murine meningeal and parenchymal cortical vessels [19]. It has been shown that CCM1 associates with CCM2 and MEKK3 in a ternary complex affecting the p38 MAPK signaling cascade [11], and it was suggested that CCM3 might be part of this complex. Our data show that CCM3 interacts with CCM2 in vitro. Because CCM3 did not coprecipitate with CCM1 in the absence of overexpressed CCM2, it seems unlikely that CCM3 functions as a stabilizing molecular link between CCM1 and CCM2. It is interesting to note that more CCM3 can be immunoprecipitated by CCM2 in the presence of CCM1. Therefore, we hypothesize that CCM3 is part of the CCM1/CCM2 protein complex through its interaction with CCM2 and, thereby, participates in CCM1-dependent modulation of β 1-integrin-mediated signaling and CCM2-mediated p38 MAPK signaling in response to cellular stress.

Supporting our data, the mammalian kinases STK24 and STK25 were identified as CCM3 interactors in a concurrent large-scale yeast two-hybrid screen for generation of a human binary protein–protein interaction map [20] and, most recently, during a large-scale protein mapping study [21]. A further kinase with high sequence similarities to STK24 and STK25, MST4, was also recently identified as a binding partner of CCM3 [22]. We here demonstrate that STK25 but not STK24 phosphorylates CCM3. In addition, our yeast two-hybrid analysis revealed that CCM3 also binds to the 270-kDa nonreceptor protein tyrosine phosphatase FAP-1 in a region predicted to contain the C-terminal phosphatase domain [23]. We have shown that this catalytic domain is capable to dephosphorylate CCM3. By dephosphorylation, FAP-1 might therefore negatively regulate CCM3 activity and downstream signaling.

The mammalian kinase STK25, also known as YSK1 or sterile 20/oxidant stress-response kinase 1, can be slightly activated by reactive oxygen intermediates but not by growth factors or other environmental stresses including heat shock and osmolar stress [18]. More recently, the Golgi matrix protein GM130 was shown to function as a scaffold protein for STK25 and to activate STK25 through stimulation of autophosphorylation. In contrast, STK24 neither localizes to the Golgi apparatus nor binds to GM130 [24]. The present results demonstrating phosphorylation of CCM3 only by STK25 support the conclusion that STK24 and STK25 have different regulatory partners and substrates despite an 89% amino acid identity of their kinase domains and a 73% overall amino acid identity. The only two published substrates for STK25 are myelin basic protein [18] and Golgi-associated 14–3–3 ζ [24]. Both dominant-negative STK25^{T174A} and downstream 14–3–3 ζ ^{S58A} were shown to abrogate collagen invasion and cell migration suggesting that signaling events important for cell migration occur at the Golgi apparatus [24]. Taken together, our data are intriguing in that we provide a substrate for the oxidant stress-response kinase STK25 whose activation has been associated with cell migration. Therefore, rather than remaining limited to apoptosis, future studies on CCM3 protein function will need to address additional potential roles.

Acknowledgments This work was supported by the Bavarian Genome Network. U.F. was a recipient of an Emmy Noether-grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Fe 432/6-5). S.U. receives a stipend from the Graduiertenkolleg 1048.

References

1. Revencu N, Vikkula M (2006) Cerebral cavernous malformation: new molecular and clinical insights. *J Med Genet* 43:716–721
2. Labauge P, Denier C, Bergametti F, Tournier-Lasserre E (2007) Genetics of cavernous angiomas. *Lancet Neurol* 6:237–244
3. Laberge-le Couteulx S, Jung HH, Labauge P, Houtteville JP, Lescoat C, Cecillon M, Marechal E, Joutel A, Bach JF, Tournier-Lasserre E (1999) Truncating mutations in *CCM1*, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat Genet* 23:189–193
4. Liquori CL, Berg MJ, Siegel AM, Huang E, Zawistowski JS, Stoffer T, Verlaan D, Balogun F, Hughes L, Leedom TP, Plummer NW, Cannella M, Maglione V, Squitieri F, Johnson EW, Rouleau GA, Ptacek L, Marchuk DA (2003) Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 73:1459–1464
5. Bergametti F, Denier C, Labauge P, Arnoult M, Boetto S, Clanet M, Coubes P, Echenne B, Ibrahim R, Irthum B, Jacquet G, Lonjon M, Moreau JJ, Neau JP, Parker F, Tremoulet M, Tournier-Lasserre E (2005) Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 76:42–51
6. Gault J, Shenkar R, Recksiak P, Awad IA (2005) Biallelic somatic and germ line *CCM1* truncating mutations in a cerebral cavernous malformation lesion. *Stroke* 36:872–874
7. Kehrer-Sawatzki H, Wilda M, Braun VM, Richter HP, Hameister H (2002) Mutation and expression analysis of the *KRIT1* gene associated with cerebral cavernous malformations (CCM1). *Acta Neuropathol (Berl)* 104:231–240
8. Denier C, Labauge P, Bergametti F, Marchelli F, Riant F, Arnoult M, Maciazek J, Vicaute E, Brunereau L, Tournier-Lasserre E (2006) Genotype-phenotype correlations in cerebral cavernous malformations patients. *Ann Neurol* 60:550–556
9. Sürücü O, Sure U, Gaetzner S, Stahl S, Benes L, Bertalanffy H, Felbor U (2006) Clinical impact of *CCM* mutation detection in familial cavernous angioma. *Child's Nerv Syst* 22:1461–1464
10. Ng BH, Mulyadi E, Pereira JK, Ghedia S, Pinner J, Mowat D, Vonau M (2006) Familial cerebral cavernous haemangioma diagnosed in an infant with a rapidly growing cerebral lesion. *Australas Radiol* 50:583–590
11. Zawistowski JS, Stalheim L, Uhlik MT, Abell AN, Ancrile BB, Johnson GL, Marchuk DA (2005) CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Hum Mol Genet* 14:2521–2531
12. Zhang J, Rigamonti D, Dietz HC, Clatterbuck RE (2007) Interaction between *krit1* and malcavernin: implications for the pathogenesis of cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery* 60:353–359
13. Mably JD, Chuang LP, Serluca FC, Mohideen MA, Chen JN, Fishman MC (2006) *santa* and *valentine* pattern concentric growth of cardiac myocardium in the zebrafish. *Development* 133:3139–3146
14. Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, Chang DD, Dietz HC (2001) Interaction between *krit1* and *icap1 α* . Inferred perturbation of integrin β 1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet* 10:2953–2960
15. Zawistowski JS, Serebriiskii IG, Lee MF, Golemis EA, Marchuk DA (2002) KRIT1 association with the integrin-binding protein ICAP-1: a new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (CCM1) pathogenesis. *Hum Mol Genet* 11:389–396
16. Uhlik MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, Horne EA, Dell'Acqua ML, Johnson GL (2003) Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol* 5:1104–1110
17. Wang Y, Liu H, Zhang Y, Ma D (1999) cDNA cloning and expression of an apoptosis-related gene, human *TFAR15* gene. *Sci China* 42:323–329
18. Pombo CM, Bonventre JV, Molnar A, Kyriakis J, Force T (1996) Activation of a human Ste20-like kinase by oxidant stress defines a novel stress response pathway. *EMBO J* 15:4537–4546
19. Petit N, Blecon A, Denier C, Tournier-Lasserre E (2006) Patterns of expression of the three cerebral cavernous malformation (CCM) genes during embryonic and postnatal brain development. *Gene Expr Patterns* 6:495–503

20. Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, Goldberg DS, Zhang LV, Wong SL, Franklin G, Li S, Albala JS, Lim J, Fraughton C, Llamosas E, Cevik S, Bex C, Lamesch P, Sikorski RS, Vandenhaute J, Zoghbi HY, Smolyar A, Bosak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Cusick ME, Hill DE, Roth FP, Vidal M (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 437:1173–1178
21. Ewing RM, Chu P, Elisma F, Li H, Taylor P, Climie S, McBroom-Cerajewski L, Robinson MD, O'Connor L, Li M, Taylor R, Dharsee M, Ho Y, Heilbut A, Moore L, Zhang S, Ornatsky O, Bukhman YV, Ethier M, Sheng Y, Vasilescu J, Abu-Farha M, Lambert JP, Duewel HS, Stewart II, Kuehl B, Hogue K, Colwill K, Gladwish K, Muskat B, Kinach R, Adams SL, Moran MF, Morin GB, Topaloglou T, Figeys D (2007) Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* 3:89
22. Ma X, Zhao H, Shan J, Long F, Chen Y, Zhang Y, Han X, Ma D (2007) PDCD10 interacts with Ste20-related kinase MST4 to promote cell growth and transformation via modulation of ERK pathway. *Mol Biol Cell* 18:1965–1978
23. Erdmann KS (2003) The protein tyrosine phosphatase PTP-basophil/basophil-like. Interacting proteins and molecular functions. *Eur J Biochem* 270:4789–4798
24. Preisinger C, Short B, De Corte V, Bruyneel E, Haas A, Kopajtich R, Gettemans J, Barr FA (2004) YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3 ζ . *J Cell Biol* 164:1009–1020
25. Clamp M, Cuff J, Searle SM, Barton GJ (2004) The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* 20:426–427

RESEARCH ARTICLE

Novel CCM1, CCM2, and CCM3 Mutations in Patients With Cerebral Cavernous Malformations: In-Frame Deletion in CCM2 Prevents Formation of a CCM1/CCM2/CCM3 Protein Complex

Sonja Stahl,¹ Sabine Gaetzner,¹ Katrin Voss,¹ Bettina Brackertz,¹ Elisa Schleider,¹ Oguzkan Sürücü,² Ekkehard Kunze,³ Christian Netzer,⁴ Christoph Korenke,⁵ Ulrich Finckh,⁶ Mario Habek,⁷ Zdravka Poljakovic,⁷ Miriam Elbracht,⁸ Sabine Rudnik-Schöneborn,⁸ Helmut Bertalanffy,² Ulrich Sure,⁹ and Ute Felbor^{1*}

¹Department of Human Genetics, University of Würzburg, Würzburg, Germany; ²Department of Neurosurgery, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland; ³Department of Neurosurgery, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany; ⁴Institute of Human Genetics, Institute for Genetics, University of Cologne, Cologne, Germany; ⁵Department of Pediatrics, Klinikum Oldenburg, Oldenburg, Germany; ⁶Laboratoriumsmedizin Dortmund, Dortmund, Germany; ⁷Department of Neurology, Zagreb School of Medicine, Zagreb, Croatia; ⁸Institute of Human Genetics, University Hospital, RWTH Aachen University, Aachen, Germany; ⁹Department of Neurosurgery, University of Marburg, Marburg, Germany

Communicated by Peter Oefner

Cerebral cavernous malformations (CCM) are prevalent cerebrovascular lesions predisposing to chronic headaches, epilepsy, and hemorrhagic stroke. Using a combination of direct sequencing and MLPA analyses, we identified 15 novel and eight previously published CCM1 (*KRIT1*), CCM2, and CCM3 (*PDCD10*) mutations. The mutation detection rate was >90% for familial cases and >60% for isolated cases with multiple malformations. Splice site mutations constituted almost 20% of all CCM mutations identified. One of these proved to be a de novo mutation of the most 3' acceptor splice site of the CCM1 gene resulting in retention of intron 19. A further mutation affected the 3' splice site of CCM2 intron 2 leading to cryptic splice site utilization in both CCM2 and its transcript variant lacking exon 2. With the exception of one in-frame deletion of CCM2 exon 2, which corresponds to the naturally occurring splice variant of CCM2 on the RNA level and is predicted to result in the omission of 58 amino acids (CCM2:p.P11_K68del), all mutations lead to the introduction of premature stop codons. To gain insight into the likely mechanisms underlying the only known CCM2 in-frame deletion, we analyzed the functional consequences of loss of CCM2 exon 2. The CCM2:p.P11_K68del protein could be expressed in cell culture and complexed with CCM3. However, its ability to interact with CCM1 and to form a CCM1/CCM2/CCM3 complex was lost. These data are in agreement with a loss-of-function mechanism for CCM mutations, uncover an N-terminal CCM2 domain required for CCM1 binding, and demonstrate full-length CCM2 as the essential core protein in the CCM1/CCM2/CCM3 complex. *Hum Mutat* 0,1–9, 2008. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: cerebral cavernous malformation; CCM1; CCM2; CCM3

INTRODUCTION

Cerebral cavernous malformations (CCM; MIM#s 116860, 603284, and 603285) are vascular lesions composed of densely packed, dilated vascular channels that lack components of organized mature vessel walls such as smooth muscle cells and intact endothelial cell–cell junctions. Growth of these slow-flow lesions and repeated hemorrhages clinically manifest as chronic headaches, epilepsy, and hemorrhagic stroke, mostly during the second to fourth decade of life [Labauge et al., 2007; Revencu and Vikkula, 2006]. Autosomal dominantly inherited familial CCM has been estimated to occur with a frequency of 1:2,000–1:10,000 and is generally associated with the occurrence of multiple CCMs. In addition to a heterozygous germline mutation in 1 out of 3 genes, CCM1 [Laberge-le Couteulx et al., 1999], CCM2 [Liquori

et al., 2003], or CCM3 [Bergametti et al., 2005], a second somatic mutation appears to be required for lesion genesis [Gault et al., 2005; Kehrer-Sawatzki et al., 2002]. Apart from very few exceptions, mutations in CCM genes are truncating or the result

Received 29 August 2007; accepted revised manuscript 29 November 2007.

*Correspondence to: Ute Felbor, Department of Human Genetics, University of Würzburg, Biozentrum, Am Hubland, D-97074 Würzburg, Germany. E-mail: felbor@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Grant sponsors: Bavarian Genome Network; Deutsche Forschungsgemeinschaft: Emmy Noether grant number Fe 432/6-5 and Graduiertenkolleg 1048.

DOI 10.1002/humu.20712

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

of large genomic rearrangements. While this facilitates medical genetic counseling, this does not provide a basis for structural and functional analyses of the CCM proteins.

The 84-kDa CCM1 gene product CCM1 (KRIT1) was originally identified and later confirmed as a RAPIA interactor [Béraud-Dufour et al., 2007; Serebriiskii et al., 1997; Wohlgenuth et al., 2005] (our unpublished results). RAPIA is a member of the Ras superfamily and requires CCM1 for maintaining the integrity of endothelial junctions [Glading et al., 2007]. CCM1 also binds to integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 α (ICAP-1 α) through its most N-terminal NPXY motif [Zawistowski et al., 2002; Zhang et al., 2001]. Furthermore, CCM1 is a yeast two-hybrid interactor of CCM2 [Zhang et al., 2007]. The murine ortholog of 50-kDa CCM2 (OSM) is a scaffold protein for MEKK3 within the stress-activated p38 MAPK signaling cascade [Uhlík et al., 2003], and the phosphotyrosine binding domain (PTB) of CCM2 has been reported to be important for the CCM1/CCM2 association [Zawistowski et al., 2005]. Recently, we have shown that CCM2 interacts with 25-kDa CCM3 (PDCD10) and that this interaction is increased in the presence of CCM1 [Voss et al., 2007].

We present here a total of 23 CCM mutations comprising nine stop, eight frameshift, and four splice site mutations as well as two genomic deletions. With the help of the only known human in-frame deletion within the CCM2 gene which leads to lack of the 58 amino acids encoded by exon 2 (CCM2:p.P11_K68del), we show that this domain located N-terminally to the PTB domain is critical for CCM1 binding and for linking CCM1 with CCM3: While deletion of amino acids 11–68 does not impair formation of a CCM2/CCM3 complex, it prevents formation of a CCM1/CCM2 and of a ternary CCM1/CCM2/CCM3 complex.

MATERIALS AND METHODS

Mutation and Transcript Analyses

Genetic testing was approved by local ethics committees (University of Würzburg, Study 21/05) and performed with informed consent. Direct sequencing of all coding CCM1, CCM2, and CCM3 exons including adjacent splice sites and subsequent screening for large CCM alterations using the SALSA MLPA Kits P130 & P131 CCM (MRC Holland, Amsterdam, Netherlands) were performed as described [Gaetner et al., 2007]. For paternity testing, the PowerPlex[®] 16 system (Promega, Mannheim, Germany) was used.

Total RNA was extracted with TRIZOL[®] reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) from cultured lymphocytes immortalized with the Epstein-Barr virus for the patient carrying the de novo c.2143–2A>G CCM1 mutation and the affected individual harboring a heterozygous deletion of CCM2 exon 2. For the CCM2:c.205-1_2delinsT mutation carrier, RNA was extracted from untreated peripheral blood lymphocytes using the PAXgene Blood RNA kit (PreAnalytiX, Qiagen, Hilden, Germany). cDNA was synthesized using SuperScript[™] III Reverse Transcriptase (Invitrogen). CCM1 intron 19 was amplified using a cDNA-specific forward primer complementary to the exon 18/exon 19 junction (5'-ATGGAACTAAGGCTTTACTC-3') and allele-specific reverse primers (wild-type: 5'-TTACCACGAGAC-CAGCCT-3'; mutant: 5'-TTACCACGAGACCAGCCC-3') and directly sequenced. Exons 1–4 of the CCM2 gene were amplified using primers 5'-GCGGCGATATGGAAGAGG-3' [Denier et al., 2004] and 5'-GCACCCTGAGGATGATATC-3'. PCR-products were size-separated by agarose gel electrophoresis prior to TA-cloning (Invitrogen) and sequencing.

GenBank accession numbers are as follows: CCM1, NM_194456.1; CCM2, NM_031443.3; and CCM3, NM_007217.3. DNA mutation numbering is based on cDNA sequence with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon.

Protein Expression, Coimmunoprecipitation, and Glutathione S Transferase (GST) Pull-Down Experiments

For expression in HEK293 cells, PCR-amplified full-length human CCM1, CCM2, and CCM3 were cloned into the *NheI* and *NotI* sites of the pIRESneo-derived vector VP5, which allows expression of N-terminal FLAG/HA tagged fusion proteins (FLAG-CCM1, FLAG-CCM2, and FLAG-CCM3) as described previously [Voss et al., 2007]. Similarly, CCM1, the C-terminally altered CCM1 coding sequence of Patient 14 (using the allele-specific reverse primer 5'-CGC CTC GAG GCA CAC AAT AGT TTA TGA AGT CCA A-3'), CCM2, and CCM2 lacking exon 2 (derived from control cDNA) were PCR-cloned into the *EcoRI* and *XhoI* sites of pcDNA3.1myc/His-B (Invitrogen), which allows expression of myc/His tagged CCM1, CCM1:p.A715VfsX14, CCM2, and CCM2:p.P11_K68del (myc-CCM1, myc-CCM1:p.A715VfsX14, myc-CCM2, myc-CCM2:p.P11_K68del). After QuickChange[™] site-directed mutagenesis (Stratagene, Amsterdam, Netherlands), the PTB domain mutants CCM2:p.L198R and CCM2:p.F217A were also cloned into pcDNA3.1myc/His-B (Invitrogen). Furthermore, pcDNA3.1 constructs for expression of HA-CCM2, HA-CCM2:p.P11_K68del, and FLAG-CCM3 were generated by PCR-cloning using a 5' primer containing the coding sequences for the HA or FLAG tag, respectively.

HEK293 cells were transiently transfected with the indicated constructs using FuGene6[™] (Roche, Mannheim, Germany) and harvested 48 hr after transfection. Coimmunoprecipitation experiments were performed as described [Voss et al., 2007]. In brief, precleared lysates were incubated with either anti-FLAG M2 agarose (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) or α -c-myc antibody (Sigma-Aldrich) coupled to protein A sepharose beads (Sigma-Aldrich) for 2 hr overhead at 4°C. After extensive washing, 2 \times Laemmli buffer was added and samples were boiled for 10 min at 100°C. For Western blot analyses, cell lysates and immunoprecipitation (IP) eluates were subjected to 5–20% gradient SDS-PAGE, immobilized on a nitrocellulose membrane, and probed with rabbit polyclonal anti-c-myc (1:1,000; Sigma-Aldrich) or primary mouse monoclonal anti-FLAG M2 antibodies (1:1,000; Sigma-Aldrich). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase were obtained from Dianova (Hamburg, Germany). Glutathione S transferase (GST) pull-down experiments were performed exactly as described in Voss et al. [2007].

RESULTS

Over 90% of Familial Cases Harbor a Mutation in CCM1, CCM2, or CCM3

Based on family history and clinical examination, our cohort initially consisted of 16 familial and 12 isolated cases. Mutations were identified in 15 out of 16 (94%) familial and 8 out of 12 (67%) isolated subjects (Table 1). Genetic analyses revealed that the mutations of two of the isolated cases (Patients 5 and 8; Table 1) had in fact been inherited from a silent carrier parent while one isolated case proved to be truly sporadic (Patient 13; Table 1). Thus, the proportion of mutations for CCM families was 56% (10/18) for CCM1, 33% (6/18) for CCM2, and 6% (1/18) for CCM3. A total of nine stop, eight frameshift, and four splice-site

TABLE 1. *CCM1*, *CCM2*, and *CCM3* Gene Mutations Identified in This Study*

Patient	Presentation	Gene	Exon	Nucleotide change	Amino acid change	Type of mutation	Reference
1	Familial	<i>CCM1</i>	Deletion of entire <i>CCM1</i> gene				Gaetzner et al. [2007]
2	Isolated	<i>CCM1</i>	12	c.1066_1070dupATTTC	p.P358VfsX15	Frameshift	Novel
3	Isolated	<i>CCM1</i>	13	c.1201_1204delCAAA	p.Q401TfsX10	Frameshift	Novel
4	Familial	<i>CCM1</i>	13	c.1246_1249del	p.K416HfsX19	Frameshift	Novel
5	Familial	<i>CCM1</i>	13	c.1253del	p.P417HfsX19	Frameshift	Novel
6	Familial	<i>CCM1</i>	Intron 13	c.1255-4_1255-2del	p.?	Splice	Verlaan et al. [2002]
7	Familial	<i>CCM1</i>	14	c.1258G>T	p.E420X	Stop	Novel
8	Familial	<i>CCM1</i>	16	c.1678C>T	p.Q560X	Stop	Novel
9	Familial	<i>CCM1</i>	16	c.1683_1684insA	p.V562SfsX6	Frameshift	Sürücü et al. [2006]
10	Isolated	<i>CCM1</i>	16	c.1710_1711insA	p.H571TfsX8	Frameshift	Novel
11	Familial	<i>CCM1</i>	17	c.1780_1783delinsTACCTGTACCAAA	p.A594YfsX14	Frameshift	Sürücü et al. [2007]
12	Familial	<i>CCM1</i>	17	c.1815C>G	p.Y605X	Stop	Novel
13	Familial	<i>CCM1</i>	18	c.1877T>A	p.L626X	Stop	Novel
14	Sporadic	<i>CCM1</i>	Intron 19	c.2143-2A>G	p.A715VfsX14	Splice	Novel
15	Familial	<i>CCM2</i>	Intron 1	c.30+1G>A	p.?	Splice	Verlaan et al. [2004]
16	Familial	<i>CCM2</i>	2	c.55C>T ^a	p.R19X	Stop	Verlaan et al. [2004]
17	Isolated	<i>CCM2</i>	2	c.55C>T ^a	p.R19X	Stop	Verlaan et al. [2004]
18	Isolated	<i>CCM2</i>	2	c.31-?_204+?del	p.P11_K68del	Deletion in-frame	Liquori et al. [2007]
19	Familial	<i>CCM2</i>	Intron 2	c.205-1_2delinsT	p.Y69VfsX3; p.Y11VfsX3	Splice	Novel
20	Familial	<i>CCM2</i>	4	c.353_354insA	p.Y118X	Stop	Novel
21	Familial	<i>CCM2</i>	5	c.475C>T	p.Q159X	Stop	Novel
22	Familial	<i>CCM2</i>	6	c.622G>T	p.E208X	Stop	Novel
23	Familial	<i>CCM3</i>	7	c.350_351insT	p.D118RfsX2	Frameshift	Novel

*GenBank accession numbers: *CCM1*: NM_194456.1, *CCM2*: NM_031443.3, and *CCM3*: NM_007217.3. DNA mutation numbering is based on cDNA sequence with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon.

^aEthnic origin different: German vs. Asian. Since this mutation occurred at a CpG dinucleotide, this base may be highly mutable.

mutations were identified by direct sequencing while two genomic deletions were only detected with the MLPA method (Patients 1 and 18; Table 1). Consistent with the literature [Felbor et al., 2006], close to one-fifth of *CCM* mutations affected invariant splice consensus sequences. Of the four splicing errors identified in the present study, two had previously been reported to be associated with *CCM* pathology. The two novel splice site mutations as well as the only in-frame deletion discovered in this study were characterized in more detail.

Retention of *CCM1* Intron 19 Due to a De Novo c.2143-2A>G Splice Site Mutation: Reduced Expression of *CCM1*:p.A715VfsX14 In Vitro

The first proband (Patient 14; Table 1) is a 15-year-old girl who presented with a 4-month history of progressive proximal paresis of the left arm preceded by an intermittent right-sided dysesthesia for 4 years. Correspondingly, magnetic resonance imaging revealed a large cavernous malformation within the right central sulcus (Fig. 1A) and multiple clinically asymptomatic lesions in both cerebral hemispheres (data not shown). The symptomatic lesion was completely excised by microsurgery without morbidity for the patient who is the only affected individual in her family (Fig. 1B). Direct sequencing and MLPA analyses of the entire *CCM1*, *CCM2*, and *CCM3* coding regions revealed an A to G transition disrupting the conserved AG dinucleotide in the acceptor splice site of *CCM1* intron 19 (Fig. 1C and D). This mutation is not present in the parents and sisters (data not shown). Since paternity was confirmed (data not shown), this patient carries a de novo mutation. Transcript analyses demonstrated the presence of intron 19 in the affected individual's cDNA (Fig. 1E and F). The predicted altered C-terminus lacks 22 amino acids. Instead, 13 different amino acids are introduced prior to the occurrence of a

new stop codon (Fig. 1D). This alteration of the C-terminus of the *CCM1* protein, *CCM1*:p.A715VfsX14, did result in reduced protein expression, decreased binding to *CCM2*, and reduced *CCM1*/*CCM2*/*CCM3* complex formation in vitro (see Fig. 5B).

CCM2:c.205-1_2delinsT Leads to Use of an Alternative Splice Acceptor in Both *CCM2* and the *CCM2* Transcript Variant Lacking Exon 2

The second individual is a 32-year-old male manifesting with ataxia, left-sided dysmetria, dysidiadochokinesis, and sudden severe nausea at the age of 28 years (Patient 19; Table 1). Subsequently, a large cerebellar cavernoma was resected. Two years later, two further lesions were excised microsurgically because of repeated hemorrhages and growth of the lesions. The patient's mother had been diagnosed to carry multiple *CCMs* at the age of 56 years when she had experienced reversible loss of vision.

Direct sequencing detected a mutation that affects the invariant splice consensus sequence at the 3' end of intron 2 of the *CCM2* gene (c.205-1_2delinsT; Fig. 2A and B). In accordance with the predicted effect of this mutation by www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html, experimental analyses of the full-length *CCM2* transcript confirmed that an illegitimate splice site within exon 3 is selected (Fig. 2B). Since this splice acceptor is located seven nucleotides downstream of the original acceptor, the splicing defect leads to a frameshift resulting in premature termination of the coding sequence after the introduction of two altered amino acids (p.Y69VfsX3; Fig. 2B).

Interestingly, the 3' splice site mutation of *CCM2* intron 2 also affects correct splicing of the widely expressed *CCM2* transcript variant lacking exon 2. The transcript variant is predicted to produce a 386-amino acid *CCM2* isoform lacking 58 amino acids. Subcloning and sequencing of the proband's smaller transcript

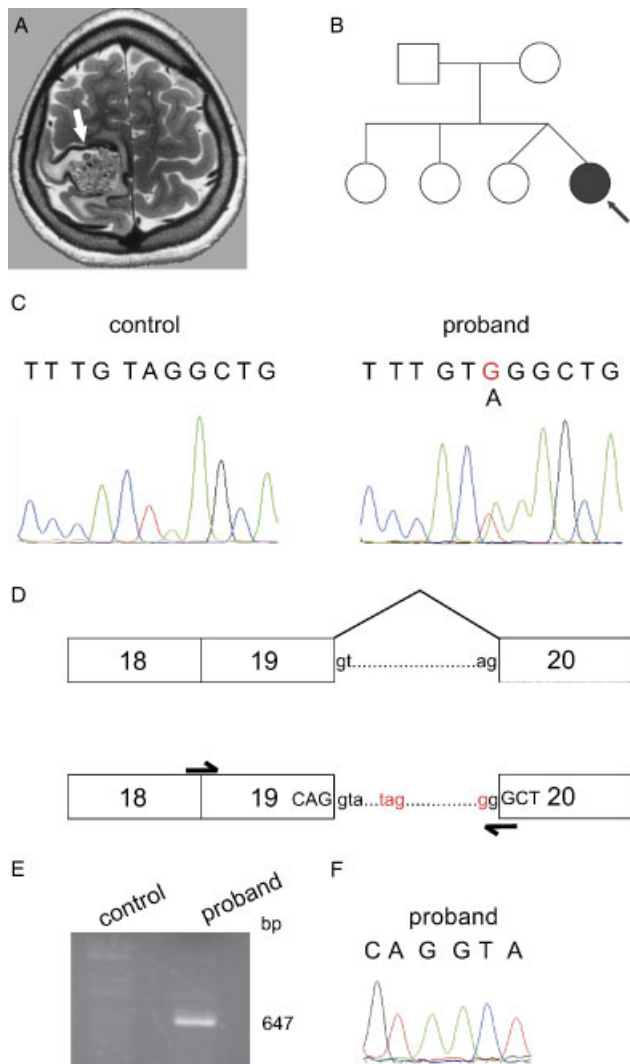


FIGURE 1. De novo c.2143–2A>G splice site mutation resulting in retention of CCM1 intron 19. **A:** T2-weighted magnetic resonance imaging of the 15-year-old proband showed a large cavernous malformation (arrow) within the right central sulcus displaying the typical black hemosiderin rim caused by repeated hemorrhages. **B:** Pedigree demonstrating that the proband is an isolated case. **C,D:** Sequencing revealed a novel c.2143–2A>G splice site mutation. **E:** Allele-specific PCR from lymphocyte cDNA yields a specific 647-bp product only in the proband suggesting the inclusion of intron 19. **F:** Electropherogram illustrating the junction between exon 19 and intron 19 in the pathogenic transcript. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://www.interscience.wiley.com>.]

variant (Fig. 2C) revealed that 52% of the clones were incorrectly spliced again resulting in a frameshift and a premature stop (p.Y11VfsX3; Fig. 2D).

Genomic Deletion of CCM2 Exon 2 Confirmed by Transcript Analysis

In a further isolated case with multiple lesions but negative sequencing results (Patient 18; Table 1), a heterozygous deletion of CCM2 exon 2 was reproducibly found with two adjacent MLPA probes designed for CCM2 exon 2 (Fig. 3A) while all other CCM1, CCM2, and CCM3 peaks and ratios did not differ between patient and controls (Fig. 3B). This 35-year-old female patient had experienced generalized seizures at the age of 30 years

and successfully underwent neurosurgical therapy of the epileptogenic lesion. Three remaining asymptomatic cavernous lesions in the pons, the basal ganglia, and the frontoorbital gyrus are monitored by MRT annually (Fig. 3C). Her father had died of cancer. MLPA analyses of her clinically unaffected mother did not show the proband's deletion. Thus, concurrent appearance of the CCM phenotype with a de novo mutation could not be demonstrated for this patient.

Both the proband and her mother are heterozygous for SNP rs11552377 in exon 4 of the CCM2 gene (c.358G>A), which allowed independent confirmation of the deletion detected by MLPA. PCR-amplification of the proband's CCM2 cDNA resulted in two products corresponding to the size of CCM2 and its transcript variant lacking exon 2 [Denier et al., 2004]. The intensity of the proband's full-length CCM2 transcript was decreased when compared to controls carrying two full-length CCM2 genes (Fig. 3D). Instead, the band corresponding to the shorter transcript variant lacking exon 2 was stronger in the proband carrying the genomic deletion of exon 2 when compared to controls with an alternatively spliced CCM2 transcript only. Subcloning and sequencing of both transcripts revealed that the proband's wild-type allele carried an A at SNP rs11552377 in exon 4 of the CCM2 gene (c.358G>A) while the in-frame deletion of exon 2 was located on the G allele. Thus, the transcript variant generated by alternative splicing is characterized by the c.358G>A substitution and can be distinguished from the transcript derived from the deleted G allele in this patient (Fig. 3E). Otherwise, both transcripts showed exactly the same in-frame omission of the entire exon 2 sequence, which consists of 174 nucleotides. 90% of the clones representing the smaller transcript were in fact derived from the proband's deleted allele. Alternative splicing was only identified in 10% of clones.

Interaction of CCM2:p.P11_K68del With CCM1 Is Impaired, Resulting in the Inability to Form a CCM1/CCM2/CCM3 Complex

The genomic deletion of exon 2 of the CCM2 gene (seen in Patient 18, in Table 1, and illustrated in Fig. 3) as well as skipping of exon 2 in the ubiquitously occurring transcript variant [Denier et al., 2004] are predicted to result in the omission of 58 amino acids (CCM2:p.P11_K68del). Compared with 50-kDa CCM2, CCM2:p.P11_K68del migrated at about 44 kDa in overexpression experiments (Fig. 4). To assess whether CCM2:p.P11_K68del coimmunoprecipitates with CCM1 and CCM3, we coexpressed myc-CCM2:p.P11_K68del with either FLAG-CCM1 (Fig. 4A) or FLAG-CCM3 (Fig. 4B) and performed coimmunoprecipitation studies. The interaction of myc-CCM2 with FLAG-CCM1 or FLAG-CCM3 was used as positive control (Fig. 4A and B; lane 2). FLAG-CCM3 coimmunoprecipitated with myc-CCM2:p.P11_K68del (Fig. 4B; lane 3) whereas FLAG-CCM1 did not (Fig. 4A; lane 3). Only upon long exposure, a faint myc-CCM2:p.P11_K68del band became visible (Fig. 4A; lane 3) comparable to those obtained with the PTB domain mutants CCM2:p.L198R and CCM2:p.F217A (Fig. 4A; lanes 4 and 5). While these point mutations had previously been described to abrogate CCM1/CCM2 complex formation [Zawistowski et al. 2005], we show here that the respective mutants retain their ability to interact with CCM3 (Fig. 4B; lanes 4 and 5).

Since these data imply that CCM2 is capable to simultaneously interact with CCM1 and CCM3, we next demonstrated that CCM1, CCM2, and CCM3 in fact form a ternary complex (Fig. 5). For GST pull-down experiments (Fig. 5A), HEK293 cells were

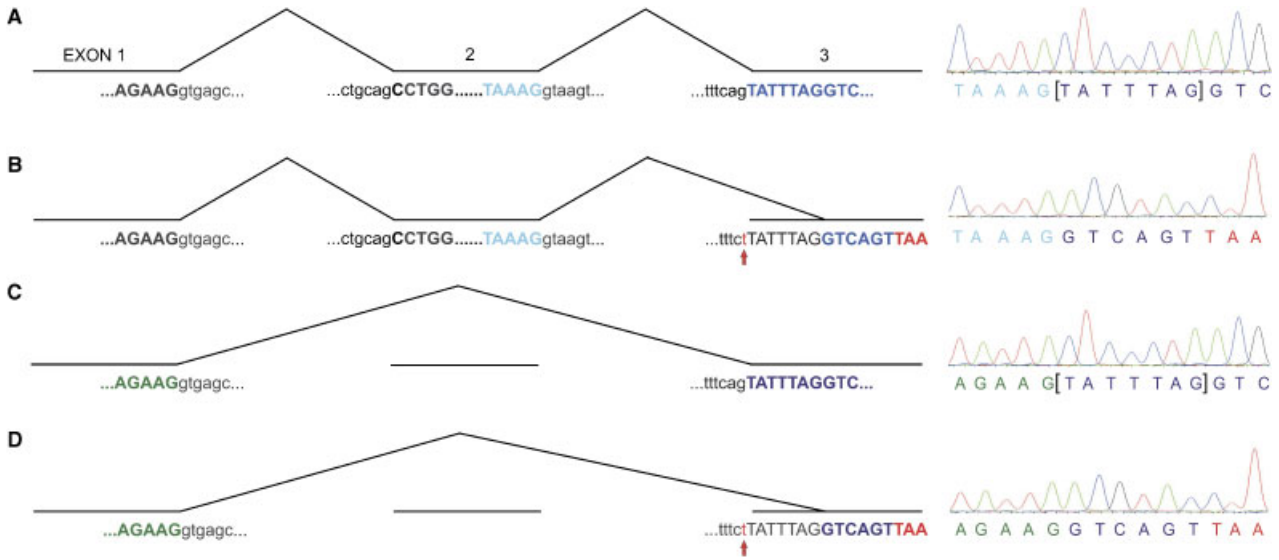


FIGURE 2. Schematic presentation of splicing errors introduced on account of *CCM2:c.205-1_2delinsT*. **A:** Regular splicing and electropherogram of the full-length wild-type *CCM2* transcript (omitted sequence in **(B,D)** is marked by brackets). **B:** Aberrant splicing of the mutant allele (red T at 3' splice acceptor) results in a premature TAA stop codon (red) in the pathogenic transcript. **C:** Alternative splicing leads to complete skipping of exon 2. **D:** Aberrant alternative splicing of the mutant allele.

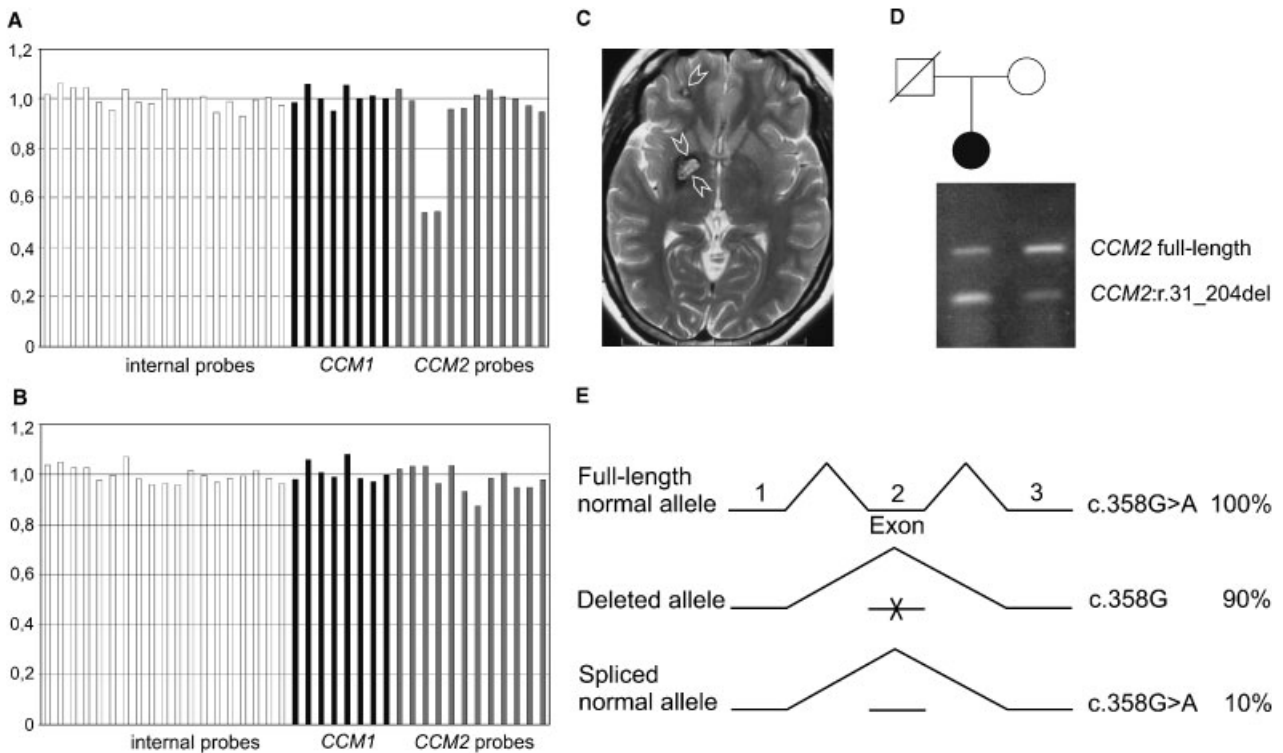


FIGURE 3. MLPA analysis demonstrating reduced peaks for two adjacent *CCM2* exon 2 probes in the proband (**A**) when compared to a control (**B**). **C:** The T2-weighted MR image shows 2 of the remaining 3 cavernomas in the right basal ganglia and the right fronto-orbital cortex (white arrowheads). **D:** The intensity of the band corresponding to the proband's full-length *CCM2* transcript was decreased while the signal corresponding to the shorter transcript lacking exon 2 was increased when compared to the proband's mother who carries two full-length *CCM2* genes. **E:** Schematic presentation of the full-length (all clones containing the proband's full-length *CCM2* allele (see **D**) have the c.358G>A SNP), deleted (90% of clones harboring *CCM2:r.31_204del*), and alternatively spliced (10% of *CCM2:r.31_204del* clones) *CCM2* transcripts observed in the proband.

transiently cotransfected with FLAG-CCM1 and myc-CCM2 or mutant myc-CCM2:p.P11_K68del, respectively, and lysates were exposed to GST-CCM3 as well as to the controls GST and

sepharose beads. GST-CCM3, but not the controls, was able to pull down FLAG-CCM1 only in the presence of intact myc-CCM2. Coexpression of mutant myc-CCM2:p.P11_K68del with

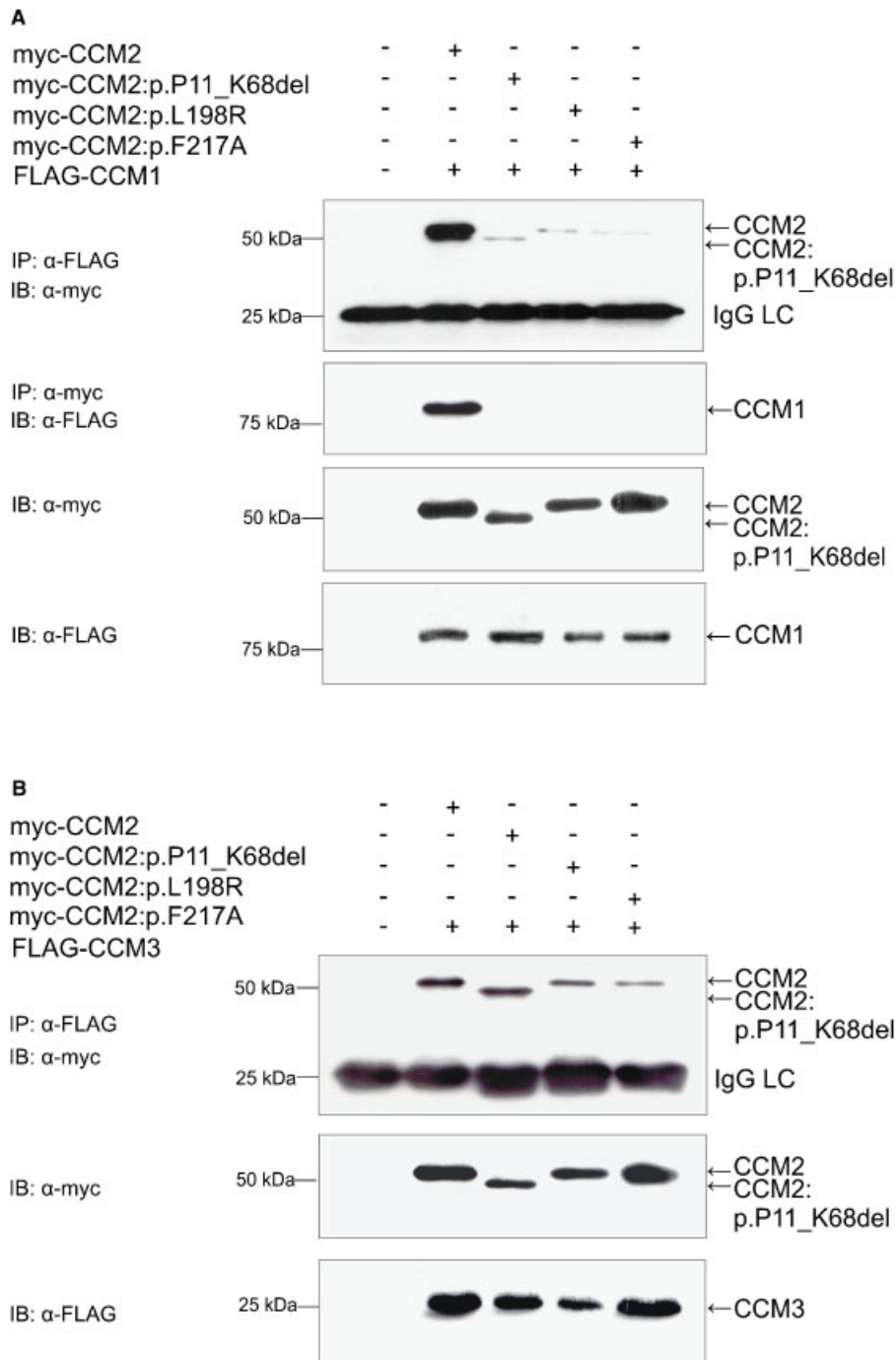


FIGURE 4. Impaired interaction of CCM1 with CCM2:p.P11_K68del. A,B: Coimmunoprecipitation experiments (IP) of HEK293 cells transiently coexpressing the indicated plasmids were performed and analyzed by Western blotting (IB). Cotransfection of empty myc- and FLAG-vectors (A,B; lanes 1) or transfection of FLAG-CCM1 with the PTB domain point mutations myc-CCM2:p.L198R and myc-CCM2:p.F217A (A; lanes 4 and 5) were used as negative controls. Coimmunoprecipitation of myc-CCM2 with FLAG-CCM1 (A; lane 2) or FLAG-CCM3 (B; lane 2) served as positive controls. Myc-CCM2:p.P11_K68del did not (A; lane 3) coprecipitate with FLAG-CCM1 whereas coprecipitation of FLAG-CCM3 with myc-CCM2:p.P11_K68del was not altered (B; lane 3). Western blot analyses of IgG bands at 25 kDa (A,B; upper panels) and of cell lysates (A,B; the two lower panels) served as loading and expression controls.

FLAG-CCM1 resulted in the absence of the ternary complex. Consistent with our coimmunoprecipitation experiments, GST-CCM3 complexed with myc-CCM2 and mutant myc-CCM2:p.P11_K68del but not with FLAG-CCM1 in the absence of myc-CCM2. In order to further prove the existence of a ternary complex, HA-tagged CCM2 and CCM2:p.P11_K68del were generated. Again, coimmunoprecipitation experiments demon-

strated that CCM3 was only able to form a complex with CCM2 and CCM1 or CCM2 and CCM1:p.A715Vfsx14 (seen in Patient 14, in Table 1, and illustrated in Fig. 1) if intact HA-tagged CCM2 was cotransfected with myc-CCM1 or myc-CCM1:p.A715Vfsx14 and FLAG-CCM3 (Fig. 5B). Taken together, the interaction between CCM1 and CCM3 proteins depends on the presence of intact CCM2.

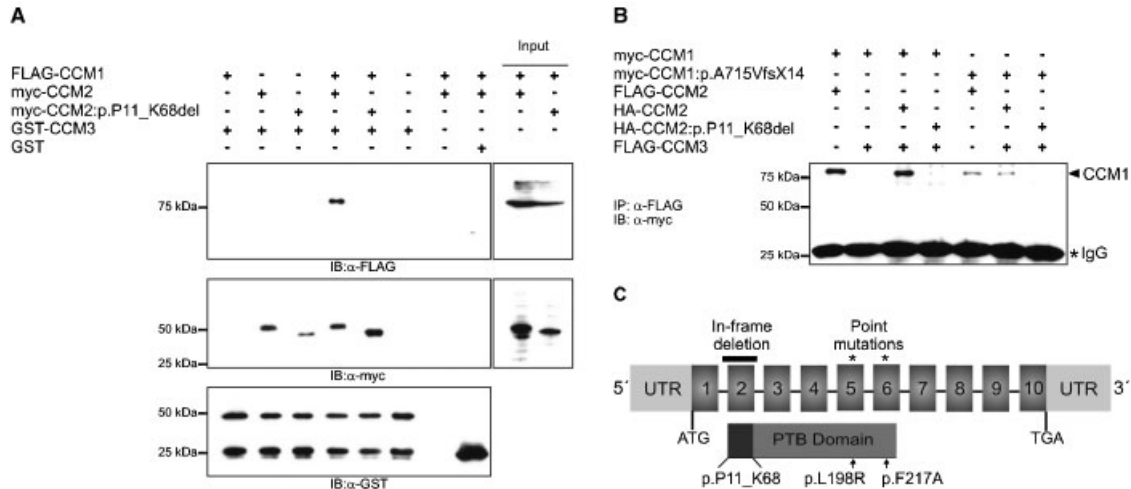


FIGURE 5. The formation of a ternary CCM1/CCM2/CCM3 complex is impaired if mutant CCM2:p.P11_K68del is overexpressed instead of CCM2. **A:** GST-CCM3 (lanes 1–6), sepharose alone (lane 7), and immobilized GST alone (lane 8) were incubated with HEK293 cell lysates (input) expressing the indicated proteins and subjected to SDS-PAGE. Western blot analyses with an anti-FLAG (α -FLAG) antibody demonstrated that FLAG-CCM1 was only pulled down by GST-CCM3 if intact myc-CCM2 was coexpressed (upper panel, lane 4). An anti-myc antibody confirmed that GST-CCM3 did complex with myc-CCM2 and mutant myc-CCM2:p.P11_K68del (middle panel). Western blot analysis using an anti-GST antibody proved the presence of GST-CCM3, which is partially cleaved (lower panel). **B:** Coimmunoprecipitation using anti-FLAG agarose revealed that CCM3 complexes with CCM1 or CCM1:p.A715VfsX14 only in the presence of intact HA-CCM2 (lanes 3 and 6) and not in the presence of HA-CCM2:p.P11_K68del (lanes 4 and 7). FLAG-tagged CCM2 was used in lanes 1 and 5 only demonstrating that CCM1:p.A715VfsX14 binds to CCM2 albeit with reduced efficiency due to decreased expression of the mutant CCM1 protein. IgG bands at 25 kDa served as loading controls. **C:** Schematic localization of the N-terminal CCM2 domain encoded by exon 2 of the CCM2 gene. This CCM1 interacting domain is adjacent to the PTB domain previously studied with help of the two point mutations indicated.

DISCUSSION

Mutation Detection Rates Differ for Familial and Isolated CCM

The sporadic case harboring a c.2143–2A>G splice site mutation in the *CCM1* gene (Patient 14; Table 1) is the sixth patient with a proven de novo mutation among the almost 200 CCM mutations reported thus far. One of the previously described truly sporadic cases also carried a *CCM1* mutation [Lucas et al., 2001], the four others a *CCM3* mutation [Bergametti et al., 2005; Liquori et al., 2006]. In an attempt to elucidate whether the isolated cases presented in this study were inherited or are de novo, an aspect of CCM genetics important in the context of genetic counseling of the respective individuals and their families, we have made some effort to get back to the patients and their families. However, most are currently unavailable or noninformative either due to the fact that at least one parent had died (e.g., Patient 18; Table 1) or did not consent to predictive genetic or neuroradiological testing. In addition, several patients did not wish to involve their parents or did not maintain contact with them. However, the known incomplete penetrance, the high inter- and intrafamilial variability of the disease, and the rare occurrence of nonreproductivity are reasonable explanations for the limited description of de novo mutations. Furthermore, a systematic analysis of a French cohort of 22 isolated probands with multiple CCMs demonstrated that 75% of cases were in fact inherited through an asymptomatic parent as determined by neuroimaging [Labauge et al., 1998]. Thus, most seemingly isolated cases are in fact familial.

Consistent with a previous study [Denier et al., 2006], the mutation detection rate for familial CCM was 94% in our cohort. The only index case without a thus far identified mutation may carry a mutation within regulatory elements of *CCM1-3*, within

deep intronic *CCM1-3* regions relevant for correct splicing or within a fourth CCM gene. While the majority of our cases were familial, a significant proportion of patients with multiple CCMs initially presented without a family history (12/28). As opposed to familial cases, a clearly reduced mutation detection rate of 57–71% for isolated cases with multiple CCMs has been noticed [Denier et al., 2006; Felbor et al., 2007]. The difference ranges from 26% (this study) to 37% [Denier et al., 2006]. One explanation for this observation might be the occurrence of phenocopies given a prevalence of 0.5% for CCMs in the general population. Another explanation might be somatic mosaicism, which has been described for other autosomal dominantly inherited hamartomatous diseases such as tuberous sclerosis [Verhoef et al., 1999]. Even severe tuberous sclerosis manifesting with seizures, mental retardation, and facial angiofibromas was shown to be associated with a *TSC1* mutation in only a minority of lymphocytes [Kwiatkowska et al., 1999]. Given the variability of somatic mosaicism in different cells and tissues as well as the limitations of the mutation scanning techniques applied, it is likewise conceivable that mosaic mutations in peripheral blood cells of isolated CCM individuals remained undetected. However, depending on the level of mosaicism in germ cells, the risk of transmission to children may be up to 50% for an apparent noncarrier with multiple CCMs.

CCM2 Isoform Does Not Assemble Into a CCM1/CCM2/CCM3 Protein Complex

Even large genomic rearrangements can pose a difficult question for risk assessment if only a single exon is deleted in-frame in an isolated case such as in our Patient 18 (Table 1) who carries a deletion of exon 2 of the *CCM2* gene. For instance, deletion of exon 16 of the dystrophin gene has recently been reported not to

be associated with disease at all [Schwartz et al., 2007]. A deletion of exon 2 of the *CCM2* gene has thus far been found in one CCM family and one isolated CCM case using MLPA without further confirmatory data or experimental proof of pathogenicity [Liquori et al., 2007]. In zebrafish embryos, injection of an antisense morpholino oligonucleotide directed against the donor splice site of intron 2 resulted in both partial and complete loss of zebrafish *ccm2* exon 2. The phenotype was comparable with a *ccm2* mutant harboring a nonsense mutation in *ccm2* exon4: enlarged heart chambers, absent blood circulation, and a myocardial wall consisting of only a single cell layer [Mably et al., 2006]. Transcript analyses of our Patient 18 validated the deletion of *CCM2* exon 2 and demonstrated that this deletion in fact results in an in-frame mRNA corresponding to the alternatively spliced shorter *CCM2* transcript lacking exon 2. This has inspired us to focus on the functional analyses of a *CCM2* protein lacking the 58 amino acids encoded by exon 2.

We show here that this *CCM2* isoform can be expressed and pulled-down by GST-*CCM3* in vitro. In addition, this isoform coprecipitates with *CCM3*. Consequently, partial *CCM2* function is retained in its normal form. However, coimmunoprecipitation experiments demonstrated that the *CCM2* isoform lacking amino acids 11 to 68 is unable to interact with *CCM1*. Thus, the shorter *CCM2* isoform cannot completely compensate for full-length *CCM2*.

Previously, it had been shown that mutagenesis of the PTB pocket critical for binding to NPXY peptides (*CCM2*:p.F217A) resulted in the abrogation of *CCM1/CCM2* complex formation. Similar results were obtained with a familial *CCM2* missense mutation, *CCM2*:p.L198R, which resides in the C-terminal region of the PTB domain of *CCM2* [Zawistowski et al., 2005]. According to the PFAM database (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam), the PTB domain comprises amino acids 66 to 227. Therefore, our data on a mutant protein lacking amino acids 11 to 68 suggest that an intact *CCM2* domain located N-terminally of the PTB domain is essential for binding of *CCM1* to *CCM2* (Fig. 5C).

In agreement with our previous observation that interaction of *CCM1*, *CCM2*, and *CCM3* is cooperative [Voss et al., 2007], our present results on intact interaction of *CCM2*:p.P11_K68del with *CCM3* implied that *CCM1* and *CCM3* can simultaneously interact with *CCM2* and that *CCM2* has linker properties within the *CCM1/CCM2/CCM3* protein complex. In this study, we confirm the existence of a *CCM1/CCM2/CCM3* complex in cells. These results are corroborated by most recently published data demonstrating that purified recombinant *CCM3* does complex with *CCM2* and *CCM1* in vitro [Hilder et al., 2007]. Consistent with a loss-of-function mechanism for CCM mutations, we have also shown that the human in-frame deletion of exon 2 of the *CCM2* gene resulted in the inability of the gene product to form this complex. Therefore, we demonstrate for the first time that the N-terminal *CCM2* domain encoded by exon 2 is an essential *CCM1* binding domain (Fig. 5C). In conclusion, our data show cooperative assembly of the *CCM1/CCM2/CCM3* protein complex in which full-length *CCM2* is the central scaffold molecule strictly required for complex formation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the affected individuals and their families for participating in this study and Dr. Robert G. Roeder (Rockefeller University, New York, New York) for plasmids pIRESVP5 and pIRESneoVP5-eGFP. This work was supported by the Bavarian

Genome Network. U.F. was the recipient of an Emmy Noether grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Fe 432/6-5). S.S. received a stipend from the Graduiertenkolleg 1048.

REFERENCES

- Béraud-Dufour S, Gautier R, Albiges-Rizo C, Chardin P, Faurobert E. 2007. Krit 1 interactions with microtubules and membranes are regulated by Rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1. *FEBS J* 274:5518–5532.
- Bergametti F, Denier C, Labauge P, Arnoult M, Boetto S, Clanet M, Coubes P, Echenne B, Ibrahim R, Irthum B, Jacquet G, Lonjon M, Moreau JJ, Neau JP, Parker F, Tremoulet M, Tournier-Lasserre E. 2005. Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 76:42–51.
- Denier C, Goutagny S, Labauge P, Krivosic V, Arnoult M, Cousin A, Benabid AL, Comoy J, Frerebeau P, Gilbert B, Houtteville JP, Jan M, Lapiere F, Loiseau H, Menei P, Mercier P, Moreau JJ, Nivelon-Chevallier A, Parker F, Redondo AM, Scarabin JM, Tremoulet M, Zerah M, Maciazek J, Tournier-Lasserre E. 2004. Mutations within the *MGC4607* gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 74:326–337.
- Denier C, Labauge P, Bergametti F, Marchelli F, Riant F, Arnoult M, Maciazek J, Vicaut E, Brunereau L, Tournier-Lasserre E. 2006. Genotype-phenotype correlations in cerebral cavernous malformations patients. *Ann Neurol* 60:550–556.
- Felbor U, Sure U, Grimm T, Bertalanffy H. 2006. Genetics of cerebral cavernous angioma. *Zentralbl Neurochir* 67:110–116.
- Felbor U, Gaetzner S, Verlaan DJ, Vijzelaar R, Rouleau GA, Siegel AM. 2007. Large germline deletions and duplication in isolated cerebral cavernous malformation patients. *Neurogenetics* 8:149–153.
- Gaetzner S, Stahl S, Sürücü O, Schaafhausen A, Halliger-Keller B, Bertalanffy H, Sure U, Felbor U. 2007. *CCM1* gene deletion identified by MLPA in cerebral cavernous malformation. *Neurosurg Rev* 30:155–159.
- Gault J, Shenkar R, Recksiek P, Awad IA. 2005. Biallelic somatic and germ line *CCM1* truncating mutations in a cerebral cavernous malformation lesion. *Stroke* 36:872–874.
- Glading A, Han J, Stockton RA, Ginsberg MH. 2007. KRIT-1/*CCM1* is a Rap1 effector that regulates endothelial cell-cell junctions. *J Cell Biol* 179:247–254.
- Hilder TL, Malone MH, Bencharit S, Colicelli J, Haystead TA, Johnson GL, Wu CC. 2007. Proteomic identification of the cerebral cavernous malformation signaling complex. *J Proteome Res* 6:4343–4355.
- Kehrer-Sawatzki H, Wilda M, Braun VM, Richter HP, Hameister H. 2002. Mutation and expression analysis of the *KRIT1* gene associated with cerebral cavernous malformations (*CCM1*). *Acta Neuropathol* 104:231–240.
- Kwiatkowska J, Wigowska-Sowinska J, Napierala D, Slomski R, Kwiatkowski DJ. 1999. Mosaicism in tuberous sclerosis as a potential cause of the failure of molecular diagnosis. *N Engl J Med* 340:703–707.
- Labauge P, Laberge S, Brunereau L, Levy C, Tournier-Lasserre E. 1998. Hereditary cerebral cavernous angiomas: clinical and genetic features in 57 French families. *Lancet* 352:1892–1897.
- Labauge P, Denier C, Bergametti F, Tournier-Lasserre E. 2007. Genetics of cavernous angiomas. *Lancet Neurol* 6:237–244.
- Laberge-le Couteulx S, Jung HH, Labauge P, Houtteville JP, Lescoat C, Cecillon M, Marechal E, Joutel A, Bach JF, Tournier-Lasserre E. 1999. Truncating mutations in *CCM1*, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat Genet* 23:189–193.
- Liquori CL, Berg MJ, Siegel AM, Huang E, Zawistowski JS, Stoffer T, Verlaan D, Balogun F, Hughes L, Leedom TP, Plummer NW, Cannella M, Maglione V, Squitieri F, Johnson EW, Rouleau GA, Ptacek L, Marchuk DA. 2003. Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 73:1459–1464.
- Liquori CL, Berg MJ, Squitieri F, Ottenbacher M, Sorlie M, Leedom TP, Cannella M, Maglione V, Ptacek L, Johnson EW, Marchuk DA. 2006.

- Low frequency of *PDCD10* mutations in a panel of CCM3 probands: potential for a fourth CCM locus. *Hum Mutat* 27:118.
- Liquori CL, Berg MJ, Squitieri F, Leedom TP, Ptacek L, Johnson EW, Marchuk DA. 2007. Deletions in *CCM2* are a common cause of cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 80:69–75.
- Lucas M, Costa AF, Montori M, Solano F, Zayas MD, Izquierdo G. 2001. Germline mutations in the *CCM1* gene, encoding Krit1, cause cerebral cavernous malformations. *Ann Neurol* 49:529–532.
- Mably JD, Chuang LP, Serluca FC, Mohideen MA, Chen JN, Fishman MC. 2006. *santa* and *valentine* pattern concentric growth of cardiac myocardium in the zebrafish. *Development* 133:3139–3146.
- Revenu N, Vikkula M. 2006. Cerebral cavernous malformation: new molecular and clinical insights. *J Med Genet* 43:716–721.
- Schwartz M, Duno M, Palle AL, Krag T, Vissing J. 2007. Deletion of exon 16 of the dystrophin gene is not associated with disease. *Hum Mutat* 28:205.
- Serebriiskii I, Estojak J, Sonoda G, Testa JR, Golem EA. 1997. Association of *Krev-1/rap1a* with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene* 15:1043–1049.
- Sürücü O, Sure U, Gaetzner S, Stahl S, Benes L, Bertalanffy H, Felbor U. 2006. Clinical impact of CCM mutation detection in familial cavernous angioma. *Childs Nerv Syst* 22:1461–1464.
- Sürücü O, Sure U, Stahl S, Gaetzner S, Miller D, Bertalanffy H, Felbor U. 2007. A novel *CCM1* mutation in a 2-year old child. Cerebral and cutaneous manifestations of familial cavernoma. *Monatsschr Kinderheilkd* 155:1161–1165.
- Uhlík MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, Horne EA, Dell'Acqua ML, Johnson GL. 2003. Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol* 5:1104–1110.
- Verhoef S, Bakker L, Tempelaars AM, Hesselink-Janssen AL, Mazurczak T, Jozwiak S, Fois A, Bartalini G, Zonnenberg BA, van Essen AJ, Lindhout D, Halley DJ, van den Ouweland AM. 1999. High rate of mosaicism in tuberous sclerosis complex. *Am J Hum Genet* 64:1632–1637.
- Verlaan DJ, Davenport WJ, Stefan H, Sure U, Siegel AM, Rouleau GA. 2002. Cerebral cavernous malformations: mutations in *KRIT1*. *Neurology* 58:853–857.
- Verlaan DJ, Laurent SB, Rochefort DL, Liquori CL, Marchuk DA, Siegel AM, Rouleau GA. 2004. *CCM2* mutations account for 13% of cases in a large collection of kindreds with hereditary cavernous malformations. *Ann Neurol* 55:757–758.
- Voss K, Stahl S, Schleider E, Ullrich S, Nickel J, Mueller TD, Felbor U. 2007. *CCM3* interacts with *CCM2* indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. *Neurogenetics* 8:249–256.
- Wohlgemuth S, Kiel C, Kramer A, Serrano L, Wittinghofer F, Herrmann C. 2005. Recognizing and defining true Ras binding domains I: biochemical analysis. *J Mol Biol* 348:741–758.
- Zawistowski JS, Serebriiskii IG, Lee MF, Golem EA, Marchuk DA. 2002. *KRIT1* association with the integrin-binding protein *ICAP-1*: a new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (*CCM1*) pathogenesis. *Hum Mol Genet* 11:389–396.
- Zawistowski JS, Stalheim L, Uhlík MT, Abell AN, Ancrile BB, Johnson GL, Marchuk DA. 2005. *CCM1* and *CCM2* protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Hum Mol Genet* 14:2521–2531.
- Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, Chang DD, Dietz HC. 2001. Interaction between *krit1* and *icap1 α* infers perturbation of integrin β 1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet* 10:2953–2960.
- Zhang J, Rigamonti D, Dietz HC, Clatterbuck RE. 2007. Interaction between *krit1* and *malcavernin*: implications for the pathogenesis of cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery* 60:353–359.

G protein–coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth

Sandra M Pasternack¹, Ivar von Kügelgen², Khalid Al Aboud³, Young-Ae Lee-Hübner^{4,5}, Franz Rüschemann⁵, Katrin Voss⁶, Axel M Hillmer⁷, Gerhard J Molderings², Thomas Franz⁸, Alfredo Ramirez^{9–11}, Peter Nürnberg^{11,12}, Markus M Nöthen^{1,7} & Regina C Betz¹

Hypotrichosis simplex is a group of nonsyndromic human alopecias. We mapped an autosomal recessive form of this disorder to chromosome 13q14.11–13q21.33, and identified homozygous truncating mutations in *P2RY5*, which encodes an orphan G protein–coupled receptor. Furthermore, we identified oleoyl-L- α -lysophosphatidic acid (LPA), a bioactive lipid, as a ligand for P2Y5 in reporter gene and radioligand binding experiments. Homology and studies of signaling transduction pathways suggest that P2Y5 is a member of a subgroup of LPA receptors, which also includes LPA4 and LPA5. Our study is the first to implicate a G protein–coupled receptor as essential for and specific to the maintenance of human hair growth. This finding may provide opportunities for new therapeutic approaches to the treatment of hair loss in humans.

Hair loss is a common occurrence in humans and has a variety of causes. The causes include purely genetic factors, as in androgenetic alopecia, multifactorial factors (that is, genetic as well as external factors), as in alopecia areata, or mainly external factors, as in drug-induced alopecia. Hair loss causes considerable psychological distress in most of those affected. Currently available therapies are unsatisfactory, and there is a demand for new treatment strategies. A powerful approach to advance our understanding of the pathophysiology of human hair loss is to identify genes underlying mendelian isolated alopecias. Investigation of this type of hair loss offers the unique opportunity to identify factors that are not only necessary for, but also specific to, hair growth. Genes previously identified using this approach include *HR* (encoding hairless)^{1,2}, *VDR* (encoding vitamin D receptor)³, *CDSN* (encoding corneodesmosin)⁴, *DSG4* (encoding desmoglein 4)⁵ and *LIPH* (encoding lipase, member H)⁶. Despite substantial progress in this research field, the complex pathophysiology of human hair growth is far from completely understood, and a major breakthrough in therapy has yet to be achieved.

Hypotrichosis simplex (MIM 146520 and MIM 605389) is a group of hereditary isolated alopecias that affects men and women equally⁷. The hair loss is diffuse and progressive, and usually begins in early childhood. Autosomal recessive inheritance has been observed in a small number of families^{5,8,9}.

To identify the molecular cause of autosomal recessive hypotrichosis simplex in a consanguineous Saudi Arabian family, we collected blood samples from 11 family members after obtaining informed consent. Four of the ten siblings present with progressive hair loss (Fig. 1a,b), thinning of scalp hair since early childhood (3–6 years) and sparse body hair. The oldest and the youngest of the affected individuals are almost completely bald. Eyebrows, eyelashes and the pubic and axillary hair are normal in all but one individual (the oldest affected sibling showed a mild thinning of the eyebrows). The clinical characteristics and pedigree structure of the family have been described in detail elsewhere⁹.

We carried out a genome-wide linkage analysis using 320 highly polymorphic microsatellite markers, after first excluding a number of candidate loci in this family (Supplementary Table 1a online). Through homozygosity mapping, we identified a gene locus for hypotrichosis simplex on chromosome 13q14.11–13q21.33, with a maximum lod score of 3.9 ($\theta = 0.0$) between flanking recombinant markers D13S1233 and D13S634 (Fig. 1b, Supplementary Fig. 1a and Supplementary Table 1b online). We defined a critical interval of around 28 Mb through haplotype analysis based on the smallest homozygous haplotype segment shared by the affected siblings (Fig. 1b). This region overlaps with the hypotrichosis simplex-associated region reported recently in a Pakistani family¹⁰.

Our region of interest contains 61 known genes. After excluding 37 of these by direct sequencing (Supplementary Table 2 online), we identified a nonsense mutation in *P2RY5*, which encodes the orphan G protein–coupled receptor P2Y5. According to standard designations, the symbol *P2RY5* is used for the gene, and P2Y5 is used for the

^{Q1} ¹Institute of Human Genetics, University of Bonn, Bonn, Germany. ²Department of Pharmacology, University of Bonn, Bonn, Germany. ³Department of Dermatology, King Faisal Hospital, Makkah, Saudi Arabia. ⁴Department of Pediatric Pneumology and Immunology, Charité, Humboldt-University Berlin, Berlin, Germany. ⁵Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany. ⁶Department of Human Genetics, University of Würzburg, Würzburg, Germany. ⁷Department of Genomics, Life and Brain Center, University of Bonn, Bonn, Germany. ⁸Department of Anatomy, University of Bonn, Bonn, Germany. ⁹Institute for Genetics, University of Cologne, Cologne, Germany. ¹⁰Institute of Human Genetics, University of Cologne, Cologne, Germany. ¹¹Center for Molecular Medicine Cologne, University of Cologne, Cologne, Germany. ¹²Cologne Center for Genomics, University of Cologne, Cologne, Germany. Correspondence should be addressed to R.C.B. (regina.betz@uni-bonn.de).

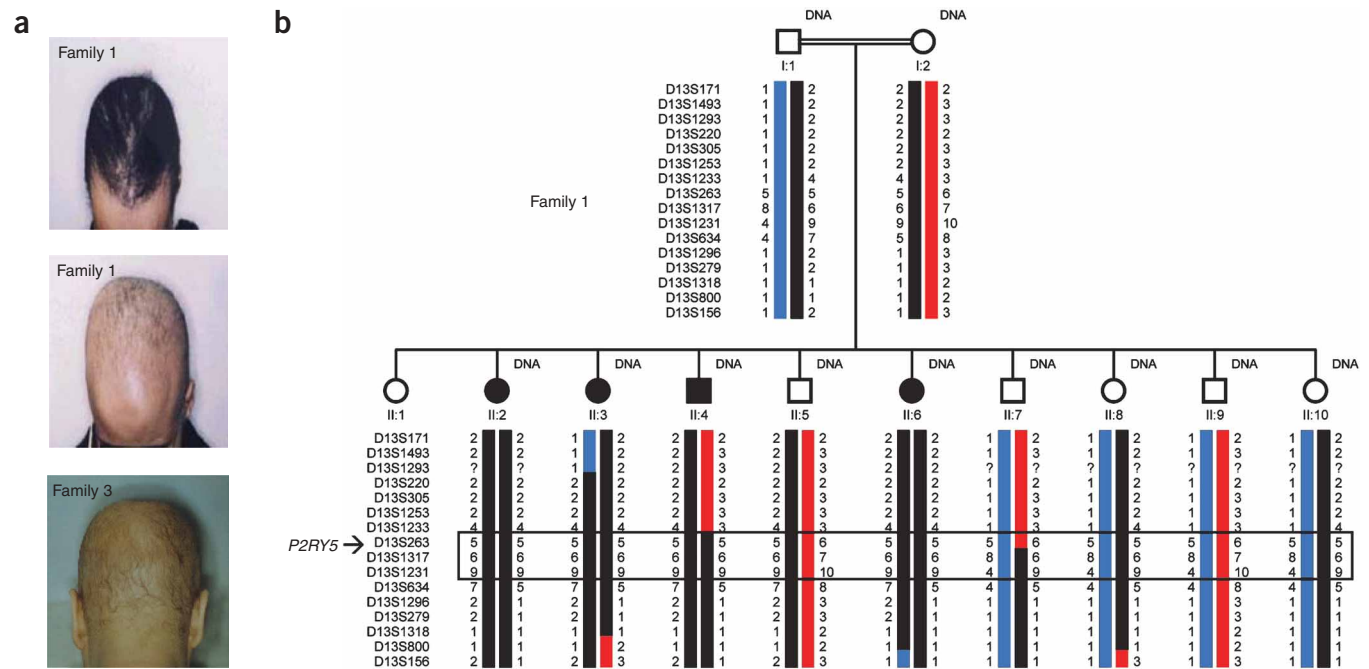
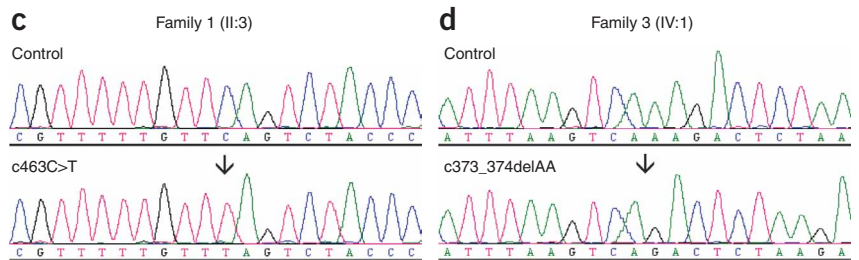


Figure 1 Clinical appearance and underlying genetic defect of autosomal recessive hypotrichosis simplex. (a) Variable extent of hypotrichosis in individuals of two different families with hypotrichosis simplex, corresponding to individuals (from left to right) II:3, aged 25 years and II:2, aged 28 years (family 1) and to II:11, aged 27 years (family 3, **Supplementary Fig. 1c**) (photos previously published^{8,9} and reproduced with permission of the Sudanese Journal of Dermatology and Blackwell Publishing).



(b) Pedigree of family 1, homozygosity mapping. Marker haplotypes on chromosome 13q that are linked to hypotrichosis simplex are indicated by black bars. Affected family members are shown in black; circles and squares denote females and males, respectively. Microsatellite markers are given on the left, and the location of *P2RY5* is indicated by an arrow. The homozygous region of the affected individuals is boxed, confined by a recombination in II:4 at the centromeric site and the observation of heterozygosity at the telomeric site. (c,d) Sequence analysis. The 463C>T (Gln155X) mutation results in a premature termination of translation, and the 373_374delAA (Lys125AsnfsX37) mutation leads to a frameshift and a premature termination of translation at amino acid 161; both result in a truncated protein.

protein. The four affected siblings carry a homozygous C>T transition (463C>T), which results in a premature termination of translation (Gln155X) (Figs. 1c and 2a); both parents are heterozygous for the mutation. By sequencing *P2RY5* in two additional families with hypotrichosis simplex from Saudi Arabia (families 2 and 3, Fig. 1a and **Supplementary Fig. 1b,c**), we identified a 2-bp deletion (373_374delAA) leading to a frameshift and a premature termination of translation (Lys125AsnfsX37; Figs. 1d and 2a) in both families. Haplotype analysis using densely spaced genetic markers suggests an ancestor common to both families (**Supplementary Fig. 1b,c** and **Supplementary Table 3** online). Families 2 and 3 show a similar pattern of hair loss as family 1 and are described in detail elsewhere⁸. We did not detect either of the two mutations in 606 control chromosomes, including 238 chromosomes of Arabian origin.

P2RY5 consists of one coding exon with a putative ORF of 344 amino acids¹¹. Through expression analysis in human and murine tissues, we found that the *P2RY5* mRNA is expressed ubiquitously (**Supplementary Fig. 2a,c** online), including in skin and hair follicle cells (Fig. 3e).

Protein blots of transiently transfected COS7 cell lysates showed a signal at about 30 kDa, corresponding to the size anticipated for the wild-type protein. Both mutants also showed bands in their predicted size ranges (**Supplementary Fig. 3a** online; see also protein truncation test in **Supplementary Figure 3b**).

We studied subcellular localization of P2Y5 receptor proteins using immunofluorescence analyses. We observed staining of the membrane for wild-type P2Y5, which colocalized with cadherins (Fig. 2b). In contrast, staining of the mutants revealed a network-like structure. Through costaining for the protein disulfide isomerase (PDI), a marker for the endoplasmic reticulum (ER), we demonstrated the accumulation of truncated P2Y5 in the ER (Fig. 2c,d).

The P2Y5 protein contains seven predicted hydrophobic transmembrane regions, a structural feature of G protein-coupled receptors (GPCRs). P2Y5 was originally reported to bind extracellular nucleotides as ligands¹², although this was not substantiated by additional experiments^{13,14}.

In order to identify ligands of the orphan receptor P2Y5, we assessed receptor function using the cAMP response element (CRE)-directed luciferase reporter gene assay in Flp-In-CHO cells stably

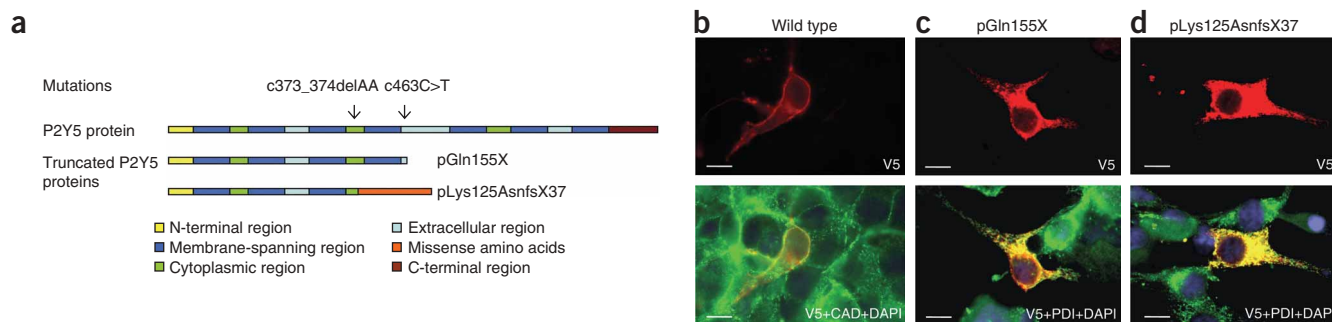


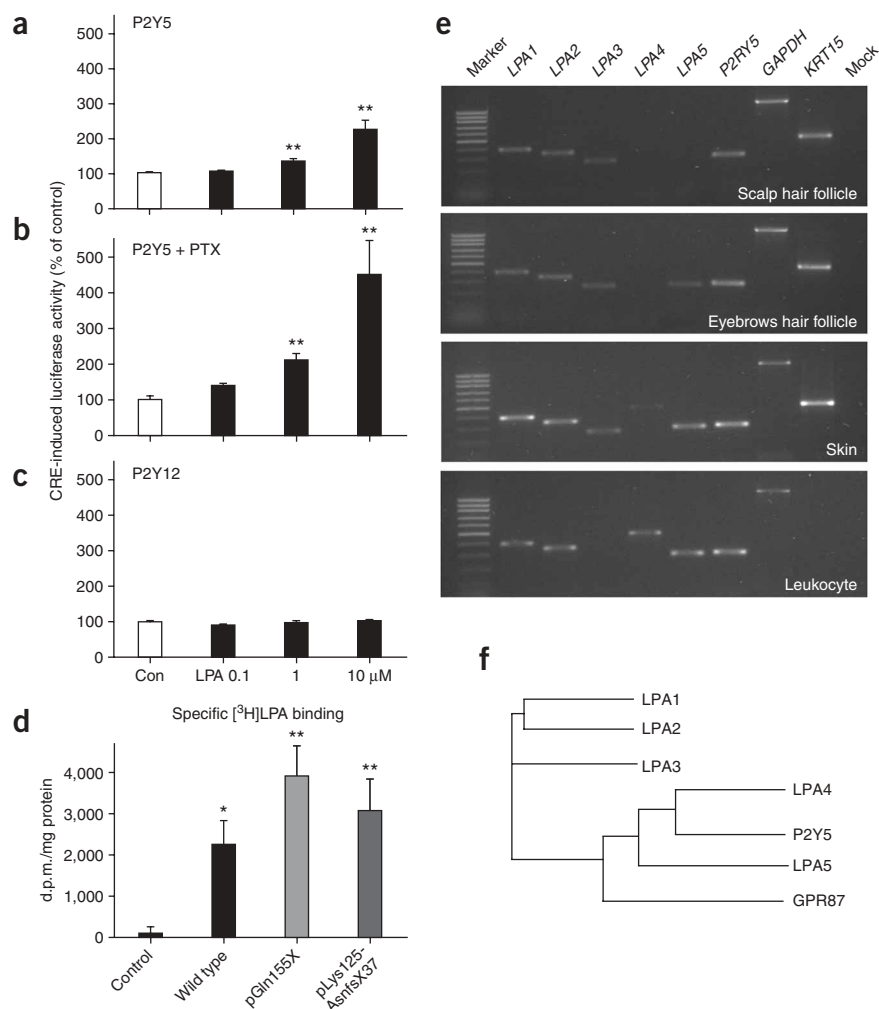
Figure 2 Structure and biochemical analysis of P2Y5 wild-type and mutant proteins. **(a)** Domain structure of wild-type and mutant proteins of P2Y5. The positions of the mutations 463C>T and 373_374delAA are indicated by arrows. **(b–d)** Immunofluorescence analysis of COS7 cells transiently expressing wild-type and mutant P2Y5. Cells were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride (DAPI) and antibodies against V5 (P2Y5), and protein disulfide isomerase (PDI, mutant) or pan-cadherin (CAD, wild type) respectively. P2Y5 wild type is located in the cell membrane **(b)**, whereas the mutant P2Y5 proteins are located predominantly in the endoplasmic reticulum **(c,d)**. Scale bars, 10 μm .

expressing wild-type receptors, as described by others¹⁵. Although a number of compounds failed to induce a response (**Supplementary Table 4** online), oleoyl-L- α -lysophosphatidic acid (LPA; up to 10 μM ; given for 3 h) increased luciferase activity in a concentration-dependent manner (**Fig. 3a**; see also **Supplementary Figure 4a** online for a LPA-induced response in McA-RH7777 cells transiently expressing the mouse P2Y5 receptor). The analog 1-oleoyl-sn-glycero-2,3-cyclic-phosphate (10 μM) caused a small increase in luciferase activity ($37 \pm 11\%$, $n = 8$, $P < 0.05$). For the control experiment, we used CHO cells expressing the human platelet P2Y12 receptor¹⁶. LPA

caused no change in these cells (**Fig. 3c**), indicating that the observed responses were in fact mediated by the recombinant P2Y5 itself and not by an endogenous receptor. LPA also failed to elicit a response in CHO cells expressing the truncated P2Y5 protein Lys125AsnfsX37 (**Supplementary Fig. 4b**), an observation consistent with the absence of intracellular loops 2 and 3, which are important for the activation of G proteins¹⁷. We excluded the involvement of G_i proteins in the

Q10

Figure 3 Pharmacological analysis of P2Y5 and expression analysis of LPA receptors in different tissues. **(a–c)** Effects of oleoyl-L- α -lysophosphatidic acid (LPA) on the cAMP response element (CRE)-directed luciferase activity in Flp-In-CHO cells stably expressing the human P2Y5 receptor **(a,b)** or the human P2Y12 receptor **(c)**. After transient transfection with the pCRE-luc vector, cells were treated with solvent **(a,c)** or pertussis toxin (PTX) 200 ng/ml for 20 h **(b)**. Solvent or LPA was added at the concentrations indicated for 3 h (con, solvent control). Light units are given as a percentage of the respective control. Means \pm s.e.m. of 6–22 measurements. **(d)** Specific binding of [³H]lysophosphatidic acid ([³H]LPA) in HEK-Flp-In cells stably expressing the human P2Y5 receptor (wild type) or the mutant constructs Gln155X and Lys125AsnfsX37 (control, cells transfected with empty vector). Cells were incubated for 30 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ with 10 nM [³H]LPA. Specific binding was assessed in the presence of 50 μM LPA³⁰. Means \pm s.e.m. of 9–16 measurements. **(a–d)** Asterisks indicate significant differences from the respective control ($*P < 0.05$ and $**P < 0.01$; Kruskal-Wallis analysis followed by the Dunn's post test). **(e)** Expression of mRNA for LPA receptors and control genes in skin, leukocytes and human hair follicle cells of scalp hair and eyebrows. Last lane shows a negative control (mock). **(f)** Phylogenetic tree of human LPA receptors, including P2Y5 and GPR87 (Clustal W algorithm).



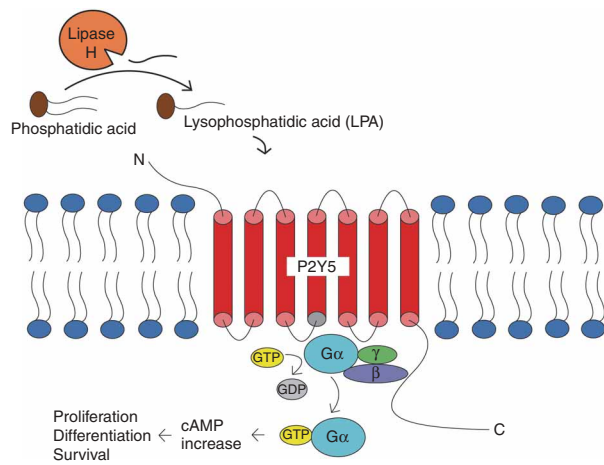


Figure 4 Schematic depicting signaling of lysophosphatidic acid via the P2Y5 receptor.

responses to activation of the P2Y5 receptor by experiments using pertussis toxin (PTX), which is known to inactivate G_i proteins. In PTX-treated cells, LPA caused an even more pronounced enhancement in cAMP-controlled reporter gene activity (Fig. 3b). Moreover, in cells pretreated with forskolin (1 μ M), which is used to directly stimulate adenylate cyclase, LPA (10 μ M) increased luciferase activity in addition to the increase induced by forskolin itself (Supplementary Fig. 4c), compatible with an involvement of intracellular cAMP in the responses to receptor activation. In radioligand binding experiments, the specific binding of the radioligand [3 H]LPA (10 nM 1-oleoyl [oleoyl-9,10- 3 H(N)]-lysophosphatidic acid) to cells expressing the wild-type P2Y5 receptor corroborated the identification of LPA as a ligand of P2Y5 (Fig. 3d).

GPCRs may form heterodimers¹⁸. Even if a proportion of the response to LPA in the reporter gene assay (Fig. 3a) or of the specific binding of [3 H]LPA (Fig. 3d) is mediated by heterodimers composed of P2Y5 and an additional receptor, the cellular expression of an intact P2Y5 protein will increase the response to LPA, as demonstrated by our experiments. It is of note that cells expressing the truncated receptor proteins also showed specific binding of [3 H]LPA (Fig. 3d). This is consistent with the presence of transmembrane domain 3 in the truncated proteins, as this domain is important for ligand binding by the LPA1 receptor¹⁹.

LPA exerts stimulatory effects on the proliferation and migration of cells via effects on a group of GPCRs^{20,21}. Three GPCRs for LPA (LPA1, LPA2 and LPA3) are known to inhibit adenylate cyclase activity (by coupling to G_i proteins). These three receptors show relatively high homology at the amino acid level, indicating that they form a subgroup of receptors for LPA. Two further GPCRs for LPA (LPA4 and LPA5) have recently been identified, and it has been suggested that they form a second subgroup of LPA receptors. In contrast to LPA1, LPA2 and LPA3, the highly homologous LPA4 and LPA5 receptors mediate an increase in intracellular cAMP production^{15,22,23}. P2Y5 is likely to represent a new member of the second subgroup of LPA receptors, considering homology and common signaling transduction pathways (for example, no coupling to G_i proteins) (Fig. 3f and Supplementary Fig. 5 online). GPR87 (ref. 24) may be another member of this group (Fig. 3f).

LPA1, LPA2, LPA3 and P2Y5 are expressed in human hair follicle cells, but LPA4 and LPA5 are not (Fig. 3e). As LPA4, LPA5 and P2Y5

are highly homologous and share the same signaling transduction pathway, it could be speculated that these receptors are redundant in function. However, as P2Y5 is the only member of this subgroup of LPA receptors that is expressed in hair follicle cells, a loss of P2Y5 function will not be compensated for, and will ultimately lead to pathological changes and hair loss. Of note, eyebrow hair follicles express LPA5 receptors in addition to P2Y5 (Fig. 3e), which is consistent with the normal appearance of eyebrows in all but one of the affected individuals.

Consistent with the crucial role of LPA or endogenous analogs in the maintenance of hair growth are the findings of a recent study linking another autosomal-recessive form of hypotrichosis simplex to the *LIPH* gene. *LIPH* encodes the enzyme lipase H, which forms acyl-lysophosphatidic acid from phosphatidic acid (Fig. 4)⁶. LPA and phosphatidic acid have also been reported to promote hair growth *in vivo*²⁵. Our results elucidate the molecular identity of the receptor mediating the stimulatory effect of LPA on hair growth.

In conclusion, our study provides molecular evidence for the role of lysophosphatidic acid in the maintenance of human hair growth, consistent with the previous report on the involvement of the enzyme lipase H⁶. By the functional characterization of the LPA receptor P2Y5, we have identified the missing link required to explain transmission of the LPA signal through the cell membrane in hair follicle cells. The molecular identification of this receptor will facilitate the development of new lipophilic analogs of LPA, which may offer opportunities for new therapeutic approaches in the treatment of hair loss in humans.

METHODS

Sample collection. We collected blood samples from 11 members of a consanguineous Saudi Arabian family⁹ (the parents are third cousins, family 1, Fig. 1b) after obtaining informed consent. Samples from the two smaller families⁸ (families 2 and 3, Supplementary Fig. 1b,c) were collected independently at a later date. We extracted genomic DNA from families 1,2 and 3 according to standard methods. In addition, EBV-transformed lymphoblastoid cell lines were created from samples of family 3.

Genotyping and linkage analysis. A total genome scan was done using 320 highly polymorphic microsatellite markers (Génethon) at an average density of 10 cM on an ABI 3100 Sequencer (Applied Biosystems). We detected mendelian incompatibilities with the program PedCheck and deleted erroneous genotypes in the whole family²⁶. We assumed an autosomal recessive model with full penetrance and a trait locus mutant allele frequency of 0.0001. The genetic marker map from Génethon with equal male and female recombination rates was used. We calculated two-point lod scores between each marker locus and hypotrichosis simplex with the LINKAGE version 5.21 software²⁷ (Supplementary Table 1b). For multipoint lod-score calculation and haplotyping, we used Merlin and Simwalk2 (Supplementary Fig. 1a)^{28,29}.

Mutation screening. We screened 38 genes (including *P2RY5*, Supplementary Table 2) by amplifying the coding regions and splice sites by PCR and by direct sequencing of affected individual II:2 (family 1) and her parents. PCR was done in a total volume of 25 μ l with 40 ng of genomic DNA using the REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with $MgCl_2$ (Sigma Aldrich). The PCR products were purified with the GFX PCR DNA Purification Kit (Amersham Biosciences) and directly sequenced on an ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) using the BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and the DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen). Primers used in amplification of PCR products for sequencing of *P2RY5* and genotyping of microsatellites are given in Supplementary Tables 3 and 5 online.

Structure and expression of human *P2RY5*. We obtained human occipital hair follicles from various individuals by plucking with sterile forceps. The hair follicles were cut off, pooled and immediately stored in RNAlater Stabilization Solution (Ambion). We isolated the RNA using the RNeasy Micro Kit (Qiagen),

followed by a RT-PCR using the SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random hexamers under standard conditions (25 °C 10 min, 42 °C 50 min, 70 °C 15 min).

As alternative transcripts of *P2RY5* differing in the length of the 5' UTR are given in the database (University of California Santa Cruz, NCBI Build 36.1), we analyzed the structure of *P2RY5* expressed in hair follicle cells. We created primers for different parts of the UTR (Supplementary Table 5) and amplified hair follicle cDNA by PCR using the REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂ (Sigma Aldrich). Samples were subjected to gel electrophoresis on 1.5% agarose gels. We found only one transcript to be expressed in hair follicle cells, consisting of the one coding exon, and resulting in a short 5' UTR. To determine the exact sequence of the 5' UTR, we carried out a RACE analysis with the 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche) according to the manufacturer's instructions (data not shown).

To study the expression of *P2RY5* mRNA in different tissues, we used the Human MTC Panel I and II (BD Biosciences), as well as a human keratinocyte cDNA library (Clontech) (Supplementary Fig. 2a). We amplified the cDNA by PCR using the P2RY5 Ex1.1F and the P2RY5 Ex1R primers (Supplementary Table 5). As internal standards, the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and the Keratin15 (*KRT15*) gene were amplified (Supplementary Table 5). To prevent genomic DNA contamination, we treated total RNA with DNase I after isolation (Supplementary Fig. 2b).

Expression of human LPA receptors. RNA isolation of human hair follicles and leukocytes, RT-PCR and subsequent PCRs were carried out as described above. Primer sequences are given in Supplementary Table 5. We used human skin poly(A)⁺ RNA (BD Biosciences) to perform first strand cDNA synthesis for the analysis of *LPA1*, *LPA2*, *LPA3*, *LPA4*, *LPA5* and *P2RY5* expression in skin.

Cloning and cell culture. We cloned *Taq* polymerase-amplified PCR products (*P2RY5* mutations and wild-type sequence) in a eukaryotic expression vector with the pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit (Invitrogen). Primer sequences are given in Supplementary Table 5. After vector reproduction in host cells (*Escherichia coli*) and isolation, COS7 cells were transfected transiently.

We cultured COS7 cells in DMEM with 4.5 g L-glucose and L-glutamine (Cambrex) supplemented with 10% FCS (FCS), penicillin/streptomycin and amphotericin B (PAA) at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂.

Protein analysis. Detailed protocols for protein blot analysis, protein truncation test and immunofluorescence analysis are given in Supplementary Methods online.

Pharmacological analysis of the P2Y5 receptor. We used Flp-In-CHO cells stably expressing the V5 epitope-tagged wild-type human P2Y5 receptor (vector pcDNA5/FRT/V5-His; Invitrogen); for control experiments, we used Flp-In-CHO cells expressing the human platelet P2Y12 receptor or the truncated P2Y5 protein p.Lys125AsnfsX37 (vector pcDNA5/FRT/V5-His). We assessed a possible coupling of the receptor to changes in intracellular adenylate cyclase activity by the cAMP response element (CRE)-directed luciferase reporter gene assay 48 h after transient transfection of the cells with the pCRE-luc vector (Stratagene). Drugs or their solvents (water or ethanol/water or 2-propanol or dimethylsulfoxide, DMSO) were added for 3 h (1-oleoyl-sn-glycero-2,3-cyclic-phosphate was obtained from Avanti Polar Lipids; all other drugs and their solvents were obtained from Sigma Aldrich). We stopped the reaction by adding Bright-GLO luciferase assay solution (Promega) used for cell lysis and the analysis of luciferase activity. The luciferase activity determined for each well with cells was calculated as percentage of control (average activity in cells treated with solvent only).

Radioligand binding studies using [³H]LPA (1-oleoyl [oleoyl-9,10-³H(N)]-lysophosphatidic acid; Perkin Elmer) were done on HEK Flp-In cells (Invitrogen) stably expressing the P2Y5 receptor (wild-type) or the two truncated proteins (p.Gln155X and p.Lys125AsnfsX37; vector pcDNA5/FRT/V5-His). For control experiments, we used HEK Flp-In cells transfected with the empty vector. The binding assay was performed on intact cells cultured on 12-well plates coated with poly-L-lysine (Sigma Aldrich) as described previously³⁰. After washing, cells were incubated for 30 min at 4 °C with 10 nM [³H]LPA in the presence of the solvent used for LPA (2-propanol) or in the presence of 50 μM

unlabeled LPA. The values were normalized toward the protein contents of the cell lysates (d.p.m. (disintegrations per minute) per mg protein). Specific [³H]LPA binding was assessed by the differences in radioactivity measured in cells in the absence and in the presence of unlabeled LPA. Cells expressing the human P2Y5 receptor showed a specific binding of [³H]LPA of 2,250 dpm (20.9 fmol) per mg total cellular protein, amounting to 19% of total binding. Cells expressing the truncated receptor proteins also showed specific binding of [³H]LPA amounting to 33% and 31% of total binding, respectively. Further details are given in Supplementary Methods.

Statistical analysis of pharmacological data. Means ± standard errors (s.e.m.) are given. For statistical comparison, we carried out the nonparametric Kruskal-Wallis analysis followed by the Dunn's post test using GraphPad Prism version 4.03 (GraphPad). *P* < 0.05 or lower was the significance criterion.

Accession codes. GenBank: *P2RY5*, NM_005767; *P2Y5*, NP_005758. University of California Santa Cruz Genome Browser: uc001vcf.1.

Note: Supplementary information is available on the Nature Genetics website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all individuals for their participation in the study. We thank W. Friedl and S. Uhlhaas for their help with the PTT, C. Schmael for her help in preparing the manuscript, and M. Michels, G. Eversloh, N. Schäfer, A. Pietrosiuk and E. Mertens for their technical help. We thank S. A. Farooq and K. S. Al-Dhafari (Department of Biology, Sultan Qaboos University, Sultanate of Oman) for providing DNA samples of 69 Arabian control individuals. E. Sprecher (Laboratory of Molecular Dermatology, Department of Dermatology, Rambam Medical Center, Haifa, Israel) provided DNA samples of 50 control individuals of Arabian origin. M.M.N. is the recipient of a grant from the Alfried Krupp von Bohlen und Halbach-Stiftung. R.C.B. is a recipient of an Emmy Noether grant from the German Research Foundation (DFG).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.C.B. and M.M.N. initiated the study. S.M.P. and I.V.K. contributed to the study design. S.M.P., I.V.K., M.M.N. and R.C.B. coordinated the work and prepared the manuscript, with feedback from the other authors. K.A.A. diagnosed the affected individuals and collected the blood samples; R.C.B., F.R., Y.-A.L.-H. and P.N. performed and interpreted the linkage analysis; S.M.P. conducted most of the genetic and protein experiments; K.V., A.R. and A.M.H. supported the protein analyses; G.J.M. and I.V.K. performed the pharmacological analyses; T.F. performed the RNA blot analysis; R.C.B. oversaw the entire project.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare competing financial interests: details accompany the full-text HTML version of the paper at <http://www.nature.com/naturegenetics>.

Published online at <http://www.nature.com/naturegenetics>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions>

- Ahmad, W. *et al.* Alopecia universalis associated with a mutation in the human hairless gene. *Science* **279**, 720–724 (1998).
- Cichon, S. *et al.* Cloning, genomic organization, alternative transcripts and mutational analysis of the gene responsible for autosomal recessive universal congenital alopecia. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1671–1679 (1998).
- Miller, J. *et al.* Atrichia caused by mutations in the vitamin D receptor gene is a phenocopy of generalized atrichia caused by mutations in the hairless gene. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 612–617 (2001).
- Levy-Nissenbaum, E. *et al.* Hypotrichosis simplex of the scalp is associated with nonsense mutations in *CDSN* encoding corneodesmosin. *Nat. Genet.* **34**, 151–153 (2003).
- Kljiuc, A. *et al.* Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell* **113**, 249–260 (2003).
- Kazantseva, A. *et al.* Human hair growth deficiency is linked to a genetic defect in the phospholipase gene *LIPH*. *Science* **314**, 982–985 (2006).
- Betz, R.C., Kruse, R., Cichon, S. & Nöthen, M.M. in *Progress in Monogenic Hair Disorders* (ed. Sprecher, E.) Hypotrichosis simplex 43–51 (Nova Science Publishers, Inc., New York, 2006).
- Al Aboud, D., Al Aboud, K., Al Hawsawi, K. & Al Aboud, A. Hereditary hypotrichosis simplex of the scalp: a report of 2 additional families. *Sudan J. Dermatol.* **3**, 128–131 (2005).

9. Al Aboud, K., Al Hawsawi, K., Al Aboud, D. & Al Githami, A. Hereditary hypotrichosis simplex: report of a family. *Clin. Exp. Dermatol.* **27**, 654–656 (2002).
10. Wali, A. *et al.* Localization of a novel autosomal recessive hypotrichosis locus (LAH3) to chromosome 13q14.11-q21.32. *Clin. Genet.* **72**, 23–29 (2007).
11. Herzog, H., Darby, K., Hort, Y.J. & Shine, J. Intron 17 of the human retinoblastoma susceptibility gene encodes an actively transcribed G protein-coupled receptor gene. *Genome Res.* **6**, 858–861 (1996).
12. Webb, T.E., Kaplan, M.G. & Barnard, E.A. Identification of 6H1 as a P2Y purinoceptor: P2Y5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**, 105–110 (1996).
13. Li, Q., Schachter, J.B., Harden, T.K. & Nicholas, R.A. The 6H1 orphan receptor, claimed to be the p2y5 receptor, does not mediate nucleotide-promoted second messenger responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 455–460 (1997).
14. von Kügelgen, I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.* **110**, 415–432 (2006).
15. Kotarsky, K. *et al.* Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**, 619–628 (2006).
16. Hollopeter, G. *et al.* Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* **409**, 202–207 (2001).
17. Johnston, C.A. & Siderovski, D.P. Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights. *Mol. Pharmacol.* **72**, 219–230 (2007).
18. Pin, J.P. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol. Rev.* **59**, 5–13 (2007).
19. Wang, D.A. *et al.* A single amino acid determines lysophospholipid specificity of the S1P1 (EDG1) and LPA1 (EDG2) phospholipid growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 49213–49220 (2001).
20. Chun, J. *et al.* International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* **54**, 265–269 (2002).
21. Meyer zu Heringdorf, D. & Jakobs, K.H. Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 923–940 (2007).
22. Lee, C.W., Rivera, R., Gardell, S., Dubin, A.E. & Chun, J. GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *J. Biol. Chem.* **281**, 23589–23597 (2006).
23. Noguchi, K., Ishii, S. & Shimizu, T. Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J. Biol. Chem.* **278**, 25600–25606 (2003).
24. Tabata, K. *et al.* The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363**, 861–866 (2007).
25. Takahashi, T., Kamimura, A., Hamazono-Matsuoka, T. & Honda, S. Phosphatidic acid has a potential to promote hair growth *in vitro* and *in vivo*, and activates mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase in hair epithelial cells. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 448–456 (2003).
26. O'Connell, J.R. & Weeks, D.E. PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 259–266 (1998).
27. Lathrop, G.M., Lalouel, J.M., Julier, C. & Ott, J. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3443–3446 (1984).
28. Abecasis, G.R., Cherny, S.S., Cookson, W.O. & Cardon, L.R. Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat. Genet.* **30**, 97–101 (2002).
29. Sobel, E. & Lange, K. Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics. *Am. J. Hum. Genet.* **58**, 1323–1337 (1996).
30. Molderings, G.J. *et al.* S1P-receptors in PC12 and transfected HEK293 cells: molecular targets of hypotensive imidazoline I(1) receptor ligands. *Neurochem. Int.* **51**, 476–485 (2007).

QUERY FORM

NG	
Manuscript ID	[Art. Id: 84]
Author	
Editor	
Publisher	

AUTHOR:

The following queries have arisen during the editing of your manuscript. Please answer queries by making the requisite corrections directly on the galley proof. It is also imperative that you include a typewritten list of all corrections and comments, as handwritten corrections sometimes cannot be read or are easily missed. Please verify receipt of proofs via e-mail

<i>Query No.</i>	<i>Nature of Query</i>
Q1	Please provide postal codes for all affiliations.
Q2	Please note that we require use of HUGO-approved gene symbols throughout; please substitute the approved symbol for <i>HR</i> .
Q3	Correct as edited?
Q4	Previous sentence OK as edited?
Q5	Correct as edited?
Q6	Please cite Fig. 1d, or Fig.1 as a whole, before citing Fig. 2a.
Q7	OK?
Q8	OK?
Q9	OK? Please cite Fig. 2b–d and Fig. 3a–d, or Fig. 2 and Fig. 3 in their entirety, before citing Fig. 3e. Please ensure that all figures are called out in numerical order, and all panels in alphabetical order.
Q10	Please cite Fig. 3b, or Fig. 3 as a whole, before citing Fig. 3c.
Q11	OK as edited?
Q12	Previous sentence OK as edited?
Q13	OK as edited?
Q14	OK as edited?
Q15	Was this study approved by an institutional ethical review board? If so, please also include a statement to that effect.
Q16	OK?
Q17	OK as edited?
Q18	Correct as edited?
Q19	OK?
Q20	d.p.m. correct as defined?
Q21	Please provide a short description for this code -- hypotrichosis simplex--associated region on chromosome 13?
Q22	OK as edited?

QUERY FORM

NG	
Manuscript ID	[Art. Id: 84]
Author	
Editor	
Publisher	

AUTHOR:

The following queries have arisen during the editing of your manuscript. Please answer queries by making the requisite corrections directly on the galley proof. It is also imperative that you include a typewritten list of all corrections and comments, as handwritten corrections sometimes cannot be read or are easily missed. Please verify receipt of proofs via e-mail.

<i>Query No.</i>	<i>Nature of Query</i>
Q23	OK as edited?