

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuropathologie

Prof. Dr. med. Markus Glatzel

Mannose-6-Phosphat abhängiger Transport von Neuroserpin

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Sergej Marik
aus Dnepropetrowsk

Hamburg 2013

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 4.11.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Glatzel

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. H.-J. Kreienkamp

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. T. Braulke

Inhalt

1. Einleitung	5
1.1. Serpine	5
1.2. Neuroserpin	5
1.3. Serpinopathien	7
1.4. FENIB	7
1.5. Glykosylierung von Proteinen	8
1.6. Sekretion von Proteinen	9
1.7. Mannose-6-Phosphorylierung von Proteinen	10
1.8. Lysosomen	11
1.9. Arbeitshypothese	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Material	13
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien	13
2.1.2. Puffer und Lösungen	18
2.1.3. Kits	22
2.1.4. Organismen	22
2.1.5. Verbrauchsmittel	23
2.1.6. Geräte	23
2.2. Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1. Transformation von Bakterienzellen	25
2.2.2. Anlegen einer Glyzerolkultur	26
2.2.3. Präparation von Plasmid-DNA	26
2.2.4. Konzentrationsbestimmung von DNA	27
2.2.5. DNA-Aufreinigung	27
2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese	27
2.2.7. DNA-Extraktion aus Agarosegelen	28
2.2.8. Restriktionsverdau	28
2.2.9. DNA-Sequenzierung nach [Sanger, 1977]	28
2.2.10. Polymerase-Kettenreaktion	29
2.2.11. Mutagenese-PCR	30
2.3. Proteinbiochemische Methoden	30
2.3.1. Probenvorbereitung für die SDS-Page	30
2.3.2. SDS-Page	31
2.3.3. Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brilliant-Blue	32
2.3.4. Western Blot	32
2.3.5. Immundetektion	33
2.3.6. Deglykosylierung von N-glykosylierten Proteinen	33
2.3.7. Mannose-6-Phosphat-Affinitätschromatographie	34
2.4. Zellbiologische Methoden	35
2.4.1. Kultivierung von Zelllinien	35
2.4.2. Passagieren von Zellen	35
2.4.3. Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen	35
2.4.4. Generierung stabil transfizierter Zelllinien	36

2.4.5. Immunzytochemie	36
2.5. Mäuse	37
2.5.1. Morphologische Untersuchungen von Mäusehirnen.....	37
3. Ergebnisse	39
3.1. Mannose-6-Phosphorylierung von Neuroserpin <i>in vivo</i>	39
3.2. Transport von Neuroserpin in das Lysosom <i>in vivo</i>	42
3.3. Herstellung von Plasmiden zur Zelltransfektion	43
3.4. Expression von Neuroserpin-Mutanten in HEK-293 Zellen	46
3.5. Transport von Neuroserpin in das Lysosom <i>in vitro</i>	47
3.6. Mannose-6-Phosphorylierung von Neuroserpin <i>in vitro</i>	51
3.7. Bedeutung der Glykosylierung für den Transport von Neuroserpin in das Lysosom <i>in vitro</i>	52
3.8. Glykosylierungsstatus und Sekretion von Neuroserpin <i>in vitro</i>	56
3.9. Charakterisierung der Glykosylierung von Neuroserpin <i>in vitro</i>	57
4. Diskussion.....	59
4.1. Fragestellung	59
4.2. Mannose-6-Phosphorylierung und lysosomale Lokalisierung von Neuroserpin <i>in vivo</i>	61
4.3. Mannose-6-Phosphorylierung und lysosomale Lokalisierung von Neuroserpin <i>in vitro</i>	63
4.4. Glykosylierung von Neuroserpin	65
4.5. Zusammenfassung und Ausblick.....	66
5. Zusammenfassung	68
6. Anhang.....	69
6.1. Abkürzungsverzeichnis	69
6.2. Abbildungsverzeichnis	72
6.3. Tabellenverzeichnis	73
7. Literaturverzeichnis	74
8. Danksagung.....	80
9. Lebenslauf	81
10. Eidesstattliche Erklärung	82

1. Einleitung

1.1. Serpine

Serpine (Serinproteaseinhibitoren) sind eine hoch konservierte Superfamilie von Proteinen, die viele unterschiedliche physiologische Aufgaben erfüllen (Lomas et al., 2005, Silverman et al., 2001, Hunt and Dayhoff, 1980). Über 3000 verschiedene Serpine sind bekannt, womit die Superfamilie die größte Gruppe der Peptidinhhibitoren darstellt. Eine wichtige Aufgabe, die von 27 der 36 bekannten humanen Serpinen erfüllt wird, ist es, Serinproteasen irreversibel zu hemmen (Law et al., 2006). Die reaktive Schleife (reactive center loop, RCL) des Serpins stellt dabei ein Pseudosubstrat für die zu hemmende Protease dar (Elliott et al., 1998, Kim et al., 2001). Bindet die Protease daran, so spaltet sie einige Aminosäuren aus dem reaktiven Zentrum des Serpins ab und es kommt im Serpin vor allem in der sogenannten Shutter-Region zu Konformationsänderungen. Die Protease wird vom oberen zum unteren Pol des Serpins verlagert und der neu entstandene Serpin-Proteasen-Komplex wird abgebaut (Huntington et al., 1997). Da durch die Hemmung der Protease auch das Serpin irreversibel geschädigt ist und mit dem Komplex abgebaut wird, wird der Vorgang der Hemmung auch als Suizidmechanismus bezeichnet (van Meijer et al., 1997). Eine korrekte Funktionsweise sämtlicher Serpine ist sehr wichtig für die Homöostase, da die Aktivität von Serinproteasen, darunter etwa der Verdauungsenzyme Trypsin und Elastase oder der an der Blutgerinnung beteiligten Proteine Plasmin und Thrombin, über die zuverlässige Inhibition durch Serpine sehr genau geregelt werden muss (Hedstrom, 2002).

Serpine sind ubiquitär exprimiert und erfüllen neben der Hemmung von Proteinen vielseitige andere Aufgaben, darunter etwa im Hormontransport (Thyroxin-bindendes Globulin), in der Blutdruckregulation (Angiotensinogen) oder als neutrophile Faktoren (Neuroserpin) (Silverman et al., 2001).

1.2. Neuroserpin

Neuroserpin ist ein 1989 entdecktes Serpin, das axonal im zentralen (ZNS) und peripheren Nervensystem (PNS) sezerniert wird (Ruegg et al., 1989, Stoeckli et al., 1989, Hastings et al., 1997). Daneben ist eine Expression von Neuroserpin auch in der

Bauchspeicheldrüse, im Hoden sowie in der Hypophyse und Nebenniere beschrieben (Hastings et al., 1997, Krueger et al., 1997, Osterwalder et al., 1996, Hill et al., 2000). Humanes und murines Neuroserpin haben zu den anderen Serpinen ihrer Spezies eine Sequenzhomologie von 33–42 % (Schrimpf et al., 1997, Miranda and Lomas, 2006). Neuroserpin besitzt ein 16 Aminosäure langes Signalpeptid und ein Großteil des synthetisierten Proteins folgt dem Sekretionspfad (Osterwalder et al., 1996, Krueger et al., 1997, Ishigami et al., 2006). Die Sekretion von Neuroserpin im Gehirn findet vor allem im Neocortex und Hippocampus während der späten Entwicklungsphase des Gehirns, aber auch bei vielen strukturellen Veränderungen des Gehirns im Erwachsenenalter, statt (Krueger et al., 1997). Neuroserpin wird eine wichtige Rolle bei cerebralen Prozessen wie dem Lernen, der Gedächtnisbildung sowie in der synaptischen Plastizität zugeschrieben (Yepes and Lawrence, 2004b, Osterwalder et al., 1996, Galliciotti and Sonderegger, 2006). Außerdem werden Neuroserpin neuroprotektive Eigenschaften zugesprochen. Beispielsweise ist das Volumen von provozierten Schlaganfällen bei Neuroserpin überexprimierenden Tieren geringer als in Wildtyp Kontrollmäusen (Cinelli et al., 2001). Proteasen, die von Neuroserpin extrazellulär inhibiert werden, sind laut *in vitro* Studien der gewebespezifische Plasminogenaktivator (t-PA), die Urokinase (u-PA), Plasmin und Thrombin (Krueger et al., 1997, Osterwalder et al., 1998, Hastings et al., 1997). t-PA selbst spielt eine wichtige Rolle bei der Gedächtnisbildung und in der synaptischen Plastizität (Seeds et al., 1995, Seeds et al., 2003, Huang et al., 1996). Da Neuroserpin zudem vor allem in den Bereichen des ZNS exprimiert wird, in denen auch t-PA vorkommt (Yepes and Lawrence, 2004a, Yepes and Lawrence, 2004b), lassen sich einige der genannten Funktionen von Neuroserpin durch die Regulierung von t-PA erklären. Daneben sind auch von t-PA unabhängige Funktionen von Neuroserpin in der Zelladhäsion sowie bei der Verhinderung von neuronalem Zelltod beschrieben (Wu et al., 2010).

Neuroserpin alleine sowie der Komplex aus Neuroserpin und t-PA können durch das Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) wieder in die Zelle aufgenommen werden, wo der Komplex im Lysosom abgebaut wird (Makarova et al., 2003).

1.3. Serpinopathien

Zur Inhibition seiner Zielprotease sind Konformationsänderungen vor allem in der sogenannten Shutter-Region im Serpinmolekül notwendig (1.1.). Diese Shutter-Region ist jedoch anfällig für Punktmutationen. Tritt eine solche Punktmutation auf, so kann das betroffene Serpin bereits intrazellulär Konformationsänderungen durchführen, ohne dass die Zielprotease an das reaktive Zentrum binden konnte. Daraufhin kann sich ein weiteres mutiertes Serpin mit seiner RCL in der Shutter-Region des ersten mutierten Serpins anlagern, sodass ein stabiles Dimer entsteht. Durch Anlagerung weiterer mutierter Serpine kommt es zur Polymerbildung und Polymeranlagerung im ER (Davies and Lomas, 2008). Diese Polymeranlagerung führt entweder über toxische Reaktionen innerhalb der Zelle (toxic gain of function) oder über Mangel an funktionierendem Serpin für die extrazelluläre Inhibition der Zielprotease (loss of function) zu einer bestimmten für das mutierte Serpin charakteristischen Serpinopathie (Lomas, 2005). Die Ätiologie von Serpinopathien ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Allerdings gibt es Hinweise, dass die Polymeranlagerung im ER zu einer über den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelten Entzündungsreaktion führt (Davies and Lomas, 2008, Davies et al., 2009). Die am besten untersuchte Serpinopathie betrifft Mutationen im Serpin Alpha-1-Antitrypsin. Tritt eine von mehreren charakteristischen Mutationen im in der Leber synthetisierten Alpha-1-Antitrypsin auf, so kann die direkte Folge (toxic gain of function) eine Leberzirrhose sein. Durch die verminderten Plasmaspiegel an Alpha-1-Antitrypsin kann es dazu kommen, dass eine wichtige Zielprotease namens Leukozytenelastase nicht mehr inhibiert werden kann. Die Leukozytenelastase kann das Lungengerüst zerstören und zu einem progredienten Lungenemphysem führen. Die Serpinopathie, die mit Mutationen im Alpha-1-Antitrypsin einhergeht, heißt Alpha-1-Antitrypsin-Mangel und wird autosomal-rezessiv vererbt.

1.4. FENIB

Auch Mutationen in der Shutter-Region von Neuroserpin führen zu einer Serpinopathie. Fünf verschiedene Mutationen sind bisher beschrieben, die zu einer autosomal-dominant vererbten Demenz namens familiäre Enzephalopathie mit Neuroserpin-Einschlusskörperchen (FENIB) führen (Davis et al., 1999a, Coutelier et al., 2008). Bei

FENIB werden sogenannte Collins-Körperchen aus Neuroserpinpolymeren im ER von Neuronen im Cortex, Striatum und Hippocampus beobachtet (Galliciotti et al., 2007, Davis et al., 2002). Es besteht eine direkte Korrelation zwischen dem Ausmaß an Collins-Körperchen und der Schwere des klinischen Bildes. Die fünf bekannten Mutationen, die zu FENIB führen, haben eine unterschiedliche Polymerisationsrate (Belorgey et al., 2011). Je größer diese ist und je größer damit das Ausmaß an Collins-Körperchen ist, desto schwerer ist die Erkrankung und desto früher ist die Erstmanifestation (je nach Mutation liegt sie zwischen 13 und 63 Lebensjahren) (Belorgey et al., 2011, Lomas, 2005). Frühe Symptome von FENIB sind ein Aufmerksamkeits- und Konzentrationsverlust, spätere sind Demenz, Krampfanfälle sowie Myoklonien (Bradshaw et al., 2001, Lomas, 2005, Davies and Lomas, 2008). Die Ätiologie von FENIB ist nicht komplett entschlüsselt (Davis et al., 1999b, Lomas and Carrell, 2002). Allerdings ist beschrieben, dass Mäuse, die Neuroserpin überexprimieren oder auch Mäuse, die Neuroserpin unterexprimieren, durch ängstliches Verhalten auffallen (Madani et al., 2003). Zudem gibt es den Versuch, Krampfanfallerisiken wie sie bei FENIB vorkommen mit der Neurotoxizität von überschüssigem t-PA zu erklären (Belorgey et al., 2004, Lebourrier et al., 2005).

1.5. Glykosylierung von Proteinen

Bei der Glykosylierung von Proteinen werden zwei verschiedene Formen unterschieden. Entweder erfolgt eine N-Glykosylierung an einem Asparaginrest oder eine O-Glykosylierung an einem Serin- oder Threoninrest. N-Glykane werden dabei an der Membran des rauen ER synthetisiert (Roth et al., 2010). Allen N-glykosylierten Proteinen ist dabei ein fünf Zucker umfassendes Core Glycosid gemeinsam, welches an der zytosolischen Seite des ER an das membranständige Dolicholphosphat gebunden wird. Dabei übertragen spezifische Glykosyltransferasen zunächst zwei durch Uridindiphosphat (UDP) aktivierte N-Acetylglucosaminreste und danach fünf durch Guanosindiphosphat (GDP) aktivierte Mannosylreste auf das Dolicholphosphat. Das so entstandene Heptasaccharid wird in das ER-Lumen transloziert, wo noch einmal vier Mannosylreste und drei Glycosylreste angehängt werden. Die so entstandene Oligosaccharid-Vorstufe $(Glc)_3-(Man)_9-(GlcNAc)_2$ wird dabei cotranslational an jedes zu glykosylierende Protein übertragen. Erkennungssequenz ist dabei die

Aminosäurefolge Asn-X-Ser/Thr, wobei X für jede beliebige Aminosäure außer Prolin steht. Bereits im ER findet das sogenannte Trimmen statt, bei dem Glucose- und Mannosereste wieder entfernt werden, bis nur noch das Core Glycosid (GlcNAc)₂-(Man)₃ verbleibt und das so glykosylierte Protein zum Golgi-Apparat transportiert wird (Kukuruzinska and Lennon, 1998). Je nachdem welche Zuckerreste im Golgi-Apparat an das Core Glycosid gehängt werden, unterscheidet man drei verschiedenen Glykosylierungstypen, die jeweils bis zu fünf verschiedene Zuckerketten enthalten können. Komplexe Zucker enthalten außerhalb des Core Glycosids keine Mannose, mannosereiche Zucker bzw. Zucker vom Oligomannose-Typ enthalten außerhalb des Core Glycosids nur Mannosylreste und Zucker vom Hybrid-Typ bestehen sowohl aus mannosefreien als auch aus reinen Mannosezuckerketten.

Die O-Glykosylierung ist nicht so komplex wie die N-Glykosylierung. Sie findet ausschließlich posttranslational im Golgi-Apparat statt.

Die Glykosylierung eines Proteins erfüllt vielfältige Aufgaben (Varki, 1993). So wird die korrekte Faltung des Proteins durch die richtige Glykosylierung unterstützt. Oligosaccharide spielen eine Rolle bei der Zellerkennung. So ist beispielsweise die Blutgruppe über die O-Glykosylierung von Membranproteinen auf Erythrozyten bestimmt. Außerdem maskieren sie ein Protein, indem eine Erkennung des Proteins durch Proteasen, Mikroorganismen und Antikörper verhindert wird. Auch bei der Zellerkennung spielen Oligosaccharide eine Rolle. So sind die auf Endothelzellen exprimierten Selektine Voraussetzung für die Erkennung von Lymphozyten und Leukozyten und leiten deren Migration in das Gewebe ein (Somers et al., 2000).

1.6. Sekretion von Proteinen

Die Synthese von sekretorischen Proteinen beginnt im Zytosol. Zunächst wird aus der mRNA des Proteins am Ribosom ein N-terminales 15-50 Aminosäuren langes Signalpeptid translatiert. Sobald dieses fertig synthetisiert ist, bindet ein Signalerkennungspartikel (Signal Recognition Particle) an das Signalpeptid, unterbricht die Translation und transportiert das Ribosom samt mRNA und Proteinkette an die Membran des rauen ER, wo es an einen SRP-Rezeptor bindet. Über einen sog. Protein-Translokator, der sich in der ER-Membran befindet, wird das Protein direkt in das ER synthetisiert. Eine Signalpeptidase im ER schneidet zunächst das Signalpeptid ab und

das Protein wird cotranslational im ER glykosyliert (1.5.). Am Ende dieses Prozesses und nach korrekter Faltung werden die Proteine in Vesikeln abgeschnürt und zum Golgi-Apparat transportiert. Proteine, die im Golgi-Apparat kein weiteres spezifisches Transportsignal erhalten, werden in Vesikeln verpackt und vom trans-Golgi abgeschnürt. Sie fusionieren entweder sofort mit der Zellmembran und werden in das extrazelluläre Milieu abgegeben oder erst nach einem Signal von außen.

1.7. Mannose-6-Phosphorylierung von Proteinen

Mannose-6-Phosphatreste an einem Protein sind ein spezifisches Zielsignal für den Transport des Proteins in das Lysosom. Lysosomale Enzyme werden genau wie sekretorische Proteine an der Membran des rauen ER synthetisiert. Im ER erhalten sie ihre N-Glykosylierung. Allerdings wird ein weiteres Trimmen der Zuckerketten im Golgi-Apparat zu komplexen Zuckern durch eine enzymatische Modifikation an den Zuckerketten verhindert (Hasilik and Von Figura, 1981). Zwei enzymatische Schritte im cis-Golgi sind notwendig, um mannosereiche Oligosaccharide zu phosphorylieren. Zunächst überträgt die GlcNAc-Phosphotransferase GlcNAc-1-Phosphat von einem Uridinphosphat-N-acetylglucosamin-Molekül auf bis zu zwei Mannosereste pro α -1,6 bzw. α -1,3-verknüpfter Oligosaccharidseitenkette (Braulke and Bonifacino, 2009, Kornfeld and Mellman, 1989). Die GlcNAc-Phosphotransferase erkennt dabei lysosomale Proteine spezifisch an der Konformation bestimmter Domänen (Cuozzo and Sahagian, 1994). Im zweiten Schritt entfernt die N-Acetylglucosamin-1-phosphodiester- α -N-Acetylglucosaminidase ein Molekül N-Acetylglucosamin so, dass das Mannose-6-Phosphat (Man6P) freiliegt. Lysosomale Enzyme können über freie Man6P-Reste entweder an einen 46 kDa großen (MPR46) oder einen 300 kDa großen (MPR300) Man6P-Rezeptor im trans-Golgi binden. Der Komplex aus Rezeptor und Protein wird in Vesikeln abgeschnürt, die mit Endosomen verschmelzen. Dort sorgt der niedrige pH-Wert für die Dissoziation des Proteins vom Rezeptor und der Rezeptor zirkuliert zurück zum Golgi-Apparat (Braulke and Bonifacino, 2009). Etwa 5–20 % der neu synthetisierten lysosomalen Proteine entgehen dem Transport in das Lysosom und werden sezerniert. Auf der Zellmembran befindet sich der MPR300, über den Man6-phosphorylierte Proteine wieder internalisiert werden können. Auch sind Man6P

unabhängige Transportmöglichkeiten von lysosomalen Proteinen bekannt (Braulke and Bonifacino, 2009).

1.8. Lysosomen

Lysosomen sind vesikuläre, von einer einfachen Membran umschlossene Zellorganellen mit einem Durchmesser zwischen 0,1 und 1 µm. Primäre Lysosomen entstehen direkt aus Abschnürungen des trans-Golgi und enthalten bereits lysosomale Enzyme, die jedoch noch an einen MPR gebunden sind. Primäre Lysosomen verschmelzen mit Endosomen, die aus der Zellmembran abgeschnürt sind und Endozytosematerial enthalten. Aus dieser Fusion entstehen sekundäre Lysosomen. Lysosomen enthalten in ihrer Membran eine H⁺-ATPase, die dafür sorgt, dass der pH-Wert im Lysosom stabil unter 5 liegt. Das saure Milieu ist einerseits notwendig, damit die lysosomalen Enzyme vom MPR dissoziieren können, andererseits erreichen die Enzyme erst bei saurem pH-Wert ihre volle Aktivität. Sollten lysosomale Enzyme versehentlich in das Zytosol gelangen, so sind sie dementsprechend nur schwach aktiv. Lysosomale Enzyme sind ausschließlich saure Hydrolasen, von denen bereits über 50 bekannt sind. Ihre Aufgabe besteht darin, große Makromoleküle, die entweder aus der Zelle oder von außerhalb kommen, abzubauen. Dazu stehen etwa Proteasen, Glykosidasen, DNAsen und Lipasen zur Verfügung. Zellfremdes Material, das per Endozytose aufgenommen wird oder zelleigenes Material von einfachen Molekülen bis zu ganzen Zellorganellen, das per Autophagie in Lysosomen gelangt, wird in kleine Moleküle zerlegt, die dem Zytosol wieder für die Neusynthese zur Verfügung gestellt werden. Außer den Hydrolasen ist auch die aus bis zu 140 für das Lysosom spezifischen Proteinen bestehende Lysosomenmembran für die Funktion von Lysosomen wichtig. Diese Membranproteine sind stark glykosyliert, was sie vor hydrolytischem Abbau schützt.

Lysosomale Fehlfunktionen haben in Form von Speicherkrankheiten klinische Relevanz. Gendefekte führen dazu, dass entweder Proteine, die für die Biosynthese lysosomaler Enzyme entscheidend sind oder lysosomale Enzyme selbst nicht funktionieren.

Bei der I-Zellkrankheit beispielsweise, die auch als Mukopolidose II bezeichnet wird, ist die GlcNAc-Phosphotransferase defekt, so dass sämtliche Proteine nicht mehr Man6-phosphoryliert werden können, sondern stattdessen vermehrt sezerniert werden. Die

Zelle lagert Mukopolysaccharide, Lipide und Oligosaccharide an. Betroffene Kinder sind körperlich und geistig retardiert und erreichen selten die zweite Lebensdekade.

Beim Morbus Hunter, einer Mukopolysaccharidose, dagegen ist das lysosomale Enzym Iduronat-2-Sulfatase defekt, sodass sich die Makromoleküle Heparan- und Dermatansulfat in Nerven- und Mesenchymzellen anlagern, was auch zu körperlicher und geistiger Retardierung führt.

Lysosomale Speicherkrankheiten galten lange als unheilbar, allerdings gibt es erste Erfolgsansätze über die Substitution defekter Enzyme, die über den MPR300 an der Zellmembran internalisiert werden können (Braulke and Bonifacino, 2009).

1.9. Arbeitshypothese

Die Arbeitshypothese dieser Arbeit beruht darauf, dass eine kleine Fraktion von Neuroserpin mit Man6P markiert ist.

Sollte dies der Fall sein, so würde ein Teil des im ER synthetisierten Neuroserpins welches nicht mit Man6P markiert ist über den Standardsekretionsweg in den extrazellulären Raum sezerniert werden. Eine andere (kleinere) Fraktion von Neuroserpin mit Man6P würde über Bindung an den Man6P-Rezeptor im Golgi-Apparat (siehe 1.7.) zum Lysosom transportiert werden, um dort möglicherweise eine Serinprotease zu hemmen.

Mutiertes, polymerisiertes Neuroserpin könnte dazu führen, dass vermindert funktionierendes Neuroserpin in die Lysosomen gelangt. Dort kommt es dann eventuell zu einer Akkumulation der nicht inhibierten Serinprotease. Dies könnte zu Zellschaden und damit zu der Entstehung von FENIB beitragen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

2.1.1.1. Nukleinsäure und Nukleotide

Plasmide

Benutzt wurde das Plasmid pCDNA3 von Invitrogen, Darmstadt.

Primer

Alle Primer wurden bei Sigma-Aldrich (München) bestellt.

Tabelle 1: Sequenzierungs-Primer für Neuroserpin

Bezeichnung	Sequenz
NSP-F1	CATGGTAACTGCTAAAGAGAGCC
NSP-F2	CGCAGTTTAGGCCTGAAAAT
NSP-F3	GGTTCACAGTGGAACAGGAAA
NSP-T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

Tabelle 2: Mutagenese-Primer für Neuroserpin

Bezeichnung	Sequenz
NSP-N157I	CAATAAGTGGGTGGAGATTAACACAAACAATCTGG
NSP-N321I	CATCAAAGATGCAATTTTGACAGGCCTCT

Die jeweils eingefügte Punktmutation ist rot markiert.

Als Längenmarker für die DNA-Gelelektrophorese wurde der TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder von Invitrogen (Darmstadt) verwendet.

Als Größenmarker für die SDS-Gelelektrophorese wurde der Page Ruler™, Prestained Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

2.1.1.2. Enzyme

Tabelle 3: Restriktionsendonukleasen

Enzym	Hersteller
FastDigest® Restriktionsenzym EcoRI	Fermentas, St.Leon-Rot
FastDigest® Restriktionsenzym PvuI	Fermentas, St.Leon-Rot
FastDigest® Restriktionsenzym XhoI	Fermentas, St.Leon-Rot

Tabelle 4: Endoglykosidasen

Enzym	Hersteller
Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F)	Roche, München
Endo-β-N-acetylglucosaminidase H (Endo H)	Roche, München

2.1.1.3. Antikörper

Tabelle 5: Primärantikörper

Antigen	Spezies	Hersteller	Verdünnung
beta-Aktin	Kaninchen	Sigma-Aldrich, München	1:1000 WB
Cathepsin D	Maus	Sigma-Aldrich, München	1:1000 WB
Cathepsin D	Maus	Oncogene Research Products, San Diego, USA	1:20 IH
Golgin-97	Maus	Sigma, Deisenhofen	1:200 IZ
LAMP-1	Maus	DAKO, Hamburg	1:150 IZ
Mannose-6-Phosphat	Maus	(Muller-Loennies et al., 2010)	2 mg/ml AC
Neuroserpin	Kaninchen	David A Lomas, Cambridge, UK	1:2000 EM
Neuroserpin	Maus	Abcam, Cambridge, UK	1:2000 IH

Neuroserpin	Ziege	Peter Sonderegger, Zürich (Galliciotti et al., 2007)	1:250 WB 1:50 IZ
PDI	Kaninchen	DAKO, Hamburg	1:250 IZ

WB: Western Blot; IH: Immunhistochemie; IZ: Immunozytochemie;
EM: Immuno-Elektronenmikroskopie; AC: Affinitätschromatographie

Tabelle 6: Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
anti-Kaninchen-HRP IgG	Ziege	Promega, Mannheim	1:10000 WB
anti-Maus-HRP IgG	Ziege	Promega, Mannheim	1:10000 WB
anti-Ziege-HRP IgG	Esel	Promega, Mannheim	1:10000 WB
anti-Maus-Alexa Fluor® 555 IgG	Esel	Invitrogen, Darmstadt	1:500 IZ
anti-Kaninchen-Alexa Fluor® 555 IgG	Esel	Invitrogen, Darmstadt	1:500 IZ
anti-Ziege-Alexa Fluor® 633 IgG	Esel	Invitrogen, Darmstadt	1:500 IZ
anti-Maus-Alexa Fluor® 546 IgG	Ziege	Invitrogen, Darmstadt	1:500 IH
anti-Kaninchen-Alexa Fluor® 488 IgG	Ziege	Invitrogen, Darmstadt	1:500 IH
anti-Kaninchen-Biotin IgG	Ziege	Vector laboratories, Burlingame, USA	1:1000 EM

WB: Western Blot; IH: Immunhistochemie; IZ: Immunozytochemie;
EM: Immuno-Elektronenmikroskopie

2.1.1.4. Chemikalien

Tabelle 7: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2,2-Bis-(hydroxyethyl)-(iminotris) (hydroxymethyl)methan (Bis Tris)	Merck, Darmstadt
ABC	Vector Labs, Burlingame, USA
Acetat	Merck, Darmstadt
Aceton	ROTH, Karlsruhe
Agarosepulver	Invitrogen, Darmstadt
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	ROTH, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Bis-Acrylamid, Rotiphorese® Gel 30	ROTH, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	ROTH, Karlsruhe
Brefeldin A (BFA)	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
DAPI (4',6-Diamidin-2'- phenylindoldihydrochlorid)	Invitrogen, Darmstadt
Diaminobenzidin (DAB)-H ₂ O ₂ -Lösung	Sigma, Deisenhofen
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	ROTH, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Biomol, Hamburg
DMEM High Glucose Medium	PAA, Pasching, Österreich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, München
DNA Loading Dye (6x)	Fermentas, St. Leon.Rot
dNTP-Mix	Invitrogen, Darmstadt
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching, Österreich
Epon	ROTH, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München

FastDigest® Puffer	Fermentas, St. Leon.Rot
FluoromoutG	Southern Biotech, Birmingham, USA
Foetal Bovine Serum (FBS)	PAA, Pasching, Österreich
FuGENE® HD Transfection Reagent	Roche, Grenzach
Furin-Inhibitor Dec-RVKR-CMK	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Geneticin (G418)	PAA, Pasching, Österreich
Glucose	Sigma-Aldrich, München
Glucose-6-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Sigma-Aldrich, München
Hefeextrakt	ROTH, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, München
Kaliumdihydrogenphosphat(KH ₂ PO ₄)	ROTH, Karlsruhe
Magermilchpulver	Frema Reform, Lüneburg
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, München
Mannose-6-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetrametylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	ROTH, Karlsruhe
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	Sigma-Aldrich, München
Natrium-Deoxycholat	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogenphosphatdihydrat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydroxid (NaOH)	ROTH, Karlsruhe
Nonidet P40	Sigma-Aldrich, München
Nonylphenoethoxylat NP-40	Sigma-Aldrich, München
Opti-MEM®	Invitrogen, Darmstadt

Paraformaldehyd	BÜFA Chemikalien, Lübeck
Penicillin/Streptomycin (100x) (Pen/Strep)	PAA, Pasching, Österreich
PMSF	Roche, Grenzach-Wyhlen
ProLong Gold mit DAPI	Invitrogen
Protease Inhibitor (Cocktail Tablets)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Saccharose	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, München
Saponin	ROTH, Karlsruhe
Sodiumdodecyl Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	ROTH, Karlsruhe
Trizma base, (Tris)	Sigma-Aldrich, München
Trizma hydrochloride (Tris HCl)	Sigma-Aldrich, München
Trypsin-EDTA (1x)	PAA, Pasching, Österreich
Trypton	ROTH, Karlsruhe
Tween® 20	ROTH, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, München
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, München

2.1.2. Puffer und Lösungen

Tabelle 8: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x CVL-Ladepuffer	2 g SDS 5 ml 1 M Tris HCl pH 7.4 5 ml Mercaptoethanol 3 g Saccharose ad. 20 ml mit ddH ₂ O 1 % Bromphenolblau pH 6,8
4x SDS-Ladepuffer	0,4 % (w/v) Bromphenolblau 400 mM DTT

	40 % (v/v) Glycerin 250 mM Tris pH 6.8 8 % (w/v) SDS
Blockierlösung EM	10 % (v/v) Pferdeserum 0,2 % (w/v) BSA in PBS (1x)
Blockierlösung WB	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T
Blockierserum IZ	3 % (w/v) BSA 0,2 % (w/v) Saponin in PBS (1x)
Carrierlösung EM	1 % (v/v) Pferdeserum 0,2 % (w/v) BSA in PBS (1x)
Denaturierungspuffer	0,5 % (w/v) SDS 1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol in PBS
Einfriermedium	40 % (v/v) DMEM 50 % (v/v) FBS 10 % (v/v) DMSO
Endo H-Puffer	0,5 mM Natriumcitrat in PBS pH von 5,5 mit Zitronensäure einstellen
Ethidiumbromidlösung	0,1 % Ethidiumbromid in TAE-Puffer (50x)
HSG-Amp-Medium	13,5 g Trypton 12,5 g NaCl 7,0 g Hefeextrakt 17,0 g 87 % Glycerol 2,3 g K ₂ HPO ₄ 1,5 g KH ₂ PO ₄ 0,25 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 100 mg Ampicillin

	In 1 l H ₂ O
Kulturmedium	DMEM High Glucose Medium 10 % (v/v) FBS 5 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
LB-Agar	1,2 % (w/v) Agar in LB-Amp-Medium
LB-Amp-Medium	100 µg/ml Ampicillin in LB-Medium
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl in ddH ₂ O
Lysispuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl pH 8 0,5 % (w/v) Natrium-Deoxycholat 0,5 % (v/v) Triton X-100 in ddH ₂ O
NZY-Kulturmedium	12,5 ml 1 M MgCl ₂ 12,5 ml 1 M MgSO ₄ 10 ml 2M Glucose in 1 l LB-Medium pH 7,5
PBS (10x)	1,37 M NaCl 27 mM Kgl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 20 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Permeabilisierungslösung IZ	0,2 % (w/v) Saponin in PBS (1x)
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl 1 % (v/v) Nonylphenoethoxylat NP-40 0,5 % (w/v) Natrium-Deoxycholat

	0,5 % (w/v) SDS in ddH ₂ O
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris 2 M Glycin 1 % (w/v) SDS
Selektionsmedium	500 µg/ml G418 in Kulturmedium
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris base 57,1 ml Essigsäure 50 mM EDTA pH 8,0 in 1 L dd.H ₂ O
TBS-T	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20 pH 7,6
Trenngelpuffer	1,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8
Verdünnungspuffer Deglykolysierung	0,5 mM PMSF in PBS + EDTA-freie Protease- und Phosphatase- Inhibitoren
Wet-Blot-Puffer (10x)	250 mM Tris 1,92 M Glycin pH 8.3
Wet-Blot-Puffer (1x)	10 % (v/v) 10x Wet-Blot-Puffer 20 % (v/v) Methanol in Wasser

2.1.3. Kits

Folgende Kits sind nach Herstellerangaben verwendet worden.

Tabelle 9: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
Bradford Assay	BioRad, München
Gelextraktionskit	Seqlab, Göttingen
GeneJet™ PCR Purification Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Invisorb® Spin Plasmid Mini Two-Kit	Invitek, Berlin
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, Bremen
Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi-Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent, Waldbronn

2.1.4. Organismen

Tabelle 10: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Hersteller
XL10-Gold® Ultracompetent Cells	Agilent, Waldbronn

Tabelle 11: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Quelle
HEK-293	Institut für Neuropathologie, UKE, Hamburg

Tabelle 12: Verwendete Mäuselinien

Linie	Quelle
C57BL/6 (NSwt)	Versuchstierhaltung, UKE, Hamburg
Tg(NS)	Versuchstierhaltung, UKE, Hamburg

2.1.5. Verbrauchsmittel

Tabelle 13: Verbrauchsmittel

Verbrauchsmittel	Hersteller
10 kDa Filter (0,5 ml)	Millipore, Schwalbach am Taunus
10 kDa Filter (3,5 ml)	PALL Life Sciences, Dreieich
AminoLink Plus Gel Beads	Pierce, Rockford, USA
Deckgläser	Assistent, Sondheim
Kryoröhrchen 1 ml	ROTH, Karlsruhe
Kunststoffküvetten UVette®	Eppendorf, Hamburg
Objektträger	Hecht-Assistent, Sondheim
Pasteurpipette Glas	ROTH, Karlsruhe
Pinzetten	Biochem, Weilburg
Pipetten Serol 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen (1 ml, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Eppendorf, Hamburg
Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Essen
Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß (Tube)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm	Kodak, Hürth
Skalpellklingen	BAYHA, Tuttlingen
Whatman (Blotting-Papier)	Whatman GmbH, Dassel
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte (6 well, 12 well, 10 cm)	Nunc, Langenselbold

2.1.6. Geräte

Tabelle 14: Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Miniport	Hassheider Medizintechnik, Köln
Autoklav	Technorama, Fernwald
Axiovert 200 MAT Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen

Belichtungsgerät Chemidoc	BioRad, München
Brutschrank (Zellkultur)	Heraeus electronic, Hanau
Digital Sonifier Model 250 D	BRANSON, Danbury, USA
Elektronenmikroskop Zeiss EM 902	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Filmentwicklungsgerät Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Gefrierschrank -20°C	Bosch, Gerlingen
Gefrierschrank -80°C	Colora Messtechnik GmbH, Lorch/Württ
Geldokumentationsgerät Chemi Doc™ XRS	BioRad, München
Gelelektrophoresekammer	BioRad, München
Gelschlitten	BioRad, München
Gießapparatur für Polyacrylamid-Gele	BioRad, München
Glasplatten	BioRad, München
Kippschüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Kippschüttler Plattform Shaker STR 6	Stuart Scientific, Essex, England
Konfokales Lasermikroskop Leica TCS SP2	Leica, Solms
Kühlschränke (4°C)	Liebherr, Kirchdorf
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Kunststoffkämme (für Agarose- und Polyacrylamid-Gele)	BioRad, München
LABOPORT®-Membran-Vakuumpumpe	ROTH, Karlsruhe
Laborschüttler Orbital shaker incubator	TEQ, Weinheim
Laborwaage Shinko Denshi	Vibra, Tokyo, Japan
Magnetthermorührer RCT basic IKAMAG®	IKA Werke GmbH&Co. KG, Staufen
Mikro-Dismembrator	B. Braun, Melsungen
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon, Melville, USA
Mikrowelle Micromat	AEG, Frankfurt am Main
Multiwell-Spektrophotometer µQuant	Biotek, Bad Friedrichshall
Netzgerät Electrophoresis Supply, EPS 200	Pharmacia Biotech, Freiburg

Netzgerät Power Supply, Power Pac Basic	BioRad, München
pH-Meter CG 840	Schott, Mainz
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten (verschiedene Größen)	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen
Printer P93D	Mitsubishi, Ratinge
Spektrophotometer Gene Quant RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech, Freiburg
Sterilbank Thermo Electron Corporation Herasafe	Heraeus electronic, Hanau
Stickstofftank Chronos 80 Biosafe®	Messer, Griesheim
Thermocycler (MyCycler)	BioRad, München
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Sarstedt, Nümbrecht
Überkopfschüttler (Reagenzglas-Rotator)	LabMarket, Mannheim
Vortexer	IKA Werke GmbH&Co. KG, Staufen
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft mbH, Dresden
Zellkulturzentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Transformation von Bakterienzellen

Plasmid-DNA wurde nach Herstellerangaben in den ultrakompetenten Stamm XL10 Gold® (Agilent) eingebracht.

Hierzu wurden 45 µl Zellsuspension auf Eis aufgetaut und 2 µl β-Mercaptoethanol zugegeben. Nach kurzem Schütteln wurden 2 µl Plasmid-DNA zu den Zellen hinzugefügt. Das Gemisch wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock unterzogen (42°C/30 sec). Die transformierten Bakterien wurden für 30 Minuten in 0,5 ml NZY-Kulturmedium bei 240 rpm geschüttelt. Danach wurden Selektionsplatten mit 20, 80, 150 oder 200 µl Bakteriensuspension bestrichen und über

Nacht bei 37°C inkubiert. Pro Platte wurden je 4 Bakterienklone „gepickt“ und in je 3 ml HSG-Medium (+ 1:1000 Ampicillin) aufgenommen. Die Kulturen wurden für 2 Tage bei 25°C und 240 rpm inkubiert.

2.2.2. Anlegen einer Glyzerolkultur

Transformierte Bakterien können in Glycerol bei -80°C konserviert werden. Dazu wurden 200 µL 87 % (w/v) Glycerol in ein 1,5 ml Tube vorgelegt, 800 µl frische Übernachtskultur hinzupipettiert, das Gemisch gevortext und im Gefrierschrank bei -80°C eingefroren.

2.2.3. Präparation von Plasmid-DNA

Transformierte XL10 Gold® Zellen beinhalten außer dem benötigten DNA-Plasmid auch genomische DNA, RNA sowie verschiedene Proteine. Aus all diesen Bestandteilen muss die Plasmid-DNA möglichst effektiv isoliert werden.

2.2.3.1. Minipräparation

Für die Minipräparation wurde das Invisorb® Spin Plasmid Mini Two-Kits verwendet. Zellen einer 2 ml Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation bei 14.000xg für 1 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in Lösung A resuspendiert (enthält RNase zum Abbau zellulärer RNA), anschließend wurde Lösung B im gleichen Volumenanteil hinzugefügt. Die Lösungen dienen der alkalischen Lyse der Bakterien sowie dem Abbau der zellulären RNA. Nach Neutralisation mit Lösung C wurde das Gemisch für 5 min bei 14.000xg zentrifugiert. Der Überstand, der nun frei von Proteinen, Zellresten und genomischer DNA ist, wurde auf eine Membran übertragen (spin-filter), die spezifisch DNA bindet. Nach weiteren Zentrifugationen und Waschschritten wurde die DNA aus der Membran mit 50 µl ddH₂O eluiert.

2.2.3.2. Midipräparation

Für die Midipräparation wurde das Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi-Kit von MACHEREY-NAGEL gemäß Herstellerangaben verwendet. Das Prinzip

ist ähnlich wie bei der Minipräparation, allerdings sind die Säulen größer, sodass das Pellet einer 100 ml großen Zellsuspension als Ausgangsmaterial verwendet werden kann, was eine Gewinnung von 100-200 µg DNA ermöglicht.

2.2.4. Konzentrationsbestimmung von DNA

DNA-Konzentrationen lassen sich mit dem Photometer bestimmen. Die aromatischen Ringe der DNA-Basen besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Enthält eine Lösung 50 µg/ml doppelsträngige DNA, so liegt eine Absorption von 1 bei 260 nm vor. Bei 280 nm besitzen viele in Proteinen enthaltene Aminosäuren ihr Absorptionsmaximum. Daher gibt der Absorptionsquotient bei 260 und 280 nm von DNA eine Aussage über die Reinheit der Probe. Reine DNA besitzt einen 260/280 Quotienten von 1,8.

2.2.5. DNA-Aufreinigung

Plasmid-DNA wurde mit dem GeneJet™ PCR Purification Kits von Fermentas gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Der Aufreinigung liegt eine Silikatmembran zugrunde, die spezifisch DNA bindet, die mit 50 µl ddH₂O eluiert wurde.

2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe. Dies erfolgte entweder analytisch, um zu untersuchen, ob das benötigte DNA-Fragment in der richtigen Größe und Menge vorhanden war oder präparativ, wenn direkt aus dem Gel das benötigte DNA-Fragment für weiter Experimente isoliert werden sollte. Die Auftrennung erfolgte in einem elektrischen Feld (10-20 Volt/cm). Je nach Größe der DNA-Fragmente erfolgte die Elektrophorese in einem 0,8-1 %igem Agarosegel in 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer. Die DNA wurde dazu in einem selbst hergestellten 6x DNA-Ladepuffer oder in einem von Fermentas (cat. No. R0611) erworbenen Puffer aufgenommen, in die Taschen des zuvor gegossenen Geles pipettiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurde 1 Kb Plus DNA Ladder von Invitrogen aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer 0,1 %igen Ethidiumbromidlösung für 20 Minuten angefärbt. Das angefärbte Gel wurde unter einen

UV-Transilluminator gelegt und die DNA-Banden wurden unter einer Kamera detektiert.

2.2.7. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem Gelextraktionskit von Sequlab. Banden von Interesse wurden unter einem UV-Transilluminator mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten, das Gel nach Herstellerangabe mit mitgelieferten Reagenzien bei 50°C verflüssigt und die DNA über eine Anionenaustauschsäule aufgereinigt und schließlich in ddH₂O eluiert.

2.2.8. Restriktionsverdau

DNA kann mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen gespalten werden. Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die DNA anhand bestimmter oft palindromischer Erkennungssequenzen zerschneiden. Sie gelten den Bakterien als Abwehr gegen Phagen-DNA. Je nach Endonuklease entstehen Fragmente mit glatten oder kohäsiven Enden. Über die kohäsiven Enden lassen sich die Fragmente mit anderen komplementären Fragmenten hybridisieren und über eine Ligase verknüpfen. In dieser Arbeit wurde der Restriktionsverdau verwendet, um DNA für eine anschließende Transfektion zu linealisieren oder um zu überprüfen, ob Plasmid-DNA das gewünschte Insert enthält.

Verwendet wurden die drei Restriktionsenzyme PvuI, XhoI und EcoRI. 5 µg der Plasmid-DNA, 2 µl der jeweiligen Restriktionsenzyme und 5 µl des 10x FastDigest® Puffers wurden mit ddH₂O auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und der Restriktionsverdau bei 37°C für 1 h durchgeführt. Das entstandene Produkt wurde per Gelelektrophorese analysiert.

2.2.9. DNA-Sequenzierung nach [Sanger, 1977]

Die DNA-Sequenzierung erfolgt nach der Kettenverlängerungs-Kettenabbruchmethode. Benötigt werden Template-DNA in ausreichender Menge, Primer, die spezifisch an die Template-DNA binden, eine hitzestabile Taq-Polymerase, ein dNTP-Gemisch, sowie die vier ddNTPs, die im Verhältnis zu den dNTPs in einer sehr geringen Konzentration

vorhanden sind, wobei jedes der vier ddNTPs an einen eigenen Fluorochrom gekoppelt ist. Es finden 20-30 Zyklen (1. Denaturierung 10 sec 96°C; 2. Annealing 5 sec 50°C; 3. Elongation 4 min 60°C) statt, bei denen die Polymerase die zuvor denaturierte Template-DNA angefangen bei dem an die DNA gebundenen Primer amplifiziert, bis mit dem zufälligen Einbau eines ddNTP ein Kettenabbruch erfolgt. Das entstandene Gemisch mit den Strängen unterschiedlicher Länge wird über eine Harnstoff/Polyacrylamidgel-Gelelektrophorese nach Länge aufgetrennt. Durch Anregung der aufgetrennten Nukleinsäurefragmente mit UV-Licht können die fluorochrom-markierten ddNTPs detektiert und die Template-DNA dadurch auf die Base genau sequenziert werden (Sanger et al., 1977).

MWG Biotech (Ebersberg) führte die Sequenzierung für uns durch. 1 µg Plasmid-DNA und 3 µl der entsprechenden forward- und reverse-Primer wurden mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 15 µl gebracht. Die Software Vector-NTI® von Invitrogen und die NCBI-Blast-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) dienten der Untersuchung der Ergebnisse.

2.2.10. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode, die es ermöglicht spezifische Abschnitte von Template-DNA effizient zu amplifizieren. Für die PCR verwendet man unterschiedliche Vorwärts- und Rückwärts-Primertypen, eine hitzestabile Taq-Polymerase, dNTPs in ausreichender Menge sowie einen Puffer, MgCl₂ und Wasser. Es finden mehrere Zyklen statt, bei denen zunächst die Doppelstränge der Template-DNA denaturiert werden, anschließend hybridisieren komplementäre Primer an die jeweilige template-DNA-Stränge (Annealing), sodass die Taq-Polymerase mit der Amplifikation der DNA starten kann (Elongation). Für die einzelnen Schritte sind unterschiedliche Temperaturen notwendig (siehe Tabelle 15).

1	2 min	initiale Denaturierung	94°C	} 30x	Tabelle 15: PCR-Programm
2	0,5 min	Denaturierung	94°C		
3	1 min	Annealing	50°C		
4	1,5 min	Elongation	72°C		
5	5 min	terminale Elongation	72°C		

2.2.11. Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR wurde mit dem QuickChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Agilent durchgeführt. Dabei diente ein doppelsträngiges DNA-Plasmid als Template-DNA, indem Neuroserpin-cDNA in den Vektor pcDNA3 einkloniert vorlag. Diese trägt besondere Methylierungen, die noch von Bedeutung sein werden. Die Template-DNA ist zirkulär. Es werden für die PCR zwei komplementäre Primer benötigt (2.1.1.1.), die die gewünschte Mutation mittig (Insertion, Deletion oder Substitution) enthielten und bei SIGMA bestellt wurden. In Ausnahme zur oben beschriebenen PCR benutzten wir hier die Pfu-Polymerase, die sich von der Taq-Polymerase u.a. dadurch unterscheidet, dass sie eine 3`-5`-Exonucleaseaktivität besitzt. Der Reaktionsansatz bestand aus 5 µl 10x Reaktions-Puffer, 50 ng Plasmid-DNA Template, 125 ng reverse Primer (10 mMol), 125 ng forward Primer (10 mMol), 1 µl dNTP Mix (10 mMol), 1,5 µl QuickSolution™ Reagenz, 1 µl QuickChange® Lightning Enzym und wurde mit ddH₂O auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

Nach Beendigung der PCR konnten die Template-Plasmide mit dem Restriktionsenzym DpnI, welches methylierte DNA an bestimmten Erkennungssequenzen sehr zuverlässig hydrolisiert, für 5 min bei 37°C verdaut werden. Die gewonnene DNA wurde für die Transformation von XL10 Gold® Zellen verwendet (2.2.1.).

2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.3.1. Probenvorbereitung für die SDS-Page

Um die Expression von Proteinen in transfizierten HEK-293 Zellen per SDS-Page und anschließendem Western Blot zu analysieren, wurden HEK-293 Zellen für 48 h in serumfreiem Opti-MEM kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 80 % erreichten. Die Zellen wurden für 5 min bei 4°C und 14000xg pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit Hilfe eines 10 kDa-Filters durch Zentrifugation bei 7500xg und 4°C einkonzentriert. Der aufkonzentrierte Überstand wurde in RIPA-Puffer aufgenommen und mit 10x CVL-Ladepuffer versetzt.

Die Zellen selbst wurden zunächst zwei Mal mit warmem PBS gewaschen und dann nochmals mit kaltem PBS von den Platten gelöst. Die Pellets wurden durch Zentrifugation bei 300xg und 4°C für 15 min gewonnen. Sie wurden in RIPA-Puffer

lysiert und anschließend 15 sec sonifiziert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 10000xg wurde den Pellets 10x CVL-Ladepuffer zugegeben.

Hirne von 6 Wochen alten Mäusen wurden entnommen und entweder bei -80°C schockgefroren oder mit einem Mikro-Dismembrator in Lysispuffer + PI (2.1.2.) homogenisiert. Die Homogenate wurden für 5 min bei 12000xg zentrifugiert, der Proteingehalt per Bradford-Test (Bradford, 1976) nach Herstellerangabe durchgeführt. Danach wurden die Homogenate in 4x SDS-Ladepuffer (2.1.2.) bei 95°C für 10 min erhitzt.

2.3.2. SDS-Page

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Proteine aus Zelllysaten, Zellüberständen und Mäusehirnhomogenaten aufgetrennt und anschließend auf Neuroserpin untersucht. Damit die Proteine in der Gelelektrophorese möglichst nur nach Länge der Aminosäuresequenz, und nicht nach Ladung oder Beschaffenheit von Sekundär- und Tertiärstruktur getrennt werden, wurde SDS (Natriumdodecylsulfat) als Detergenz verwendet. Bei der Gelelektrophorese werden Proteinproben durch ein elektrisches Feld zunächst durch ein Trenn- und danach ein Sammelgel geleitet. Beide Gele folgen unmittelbar aufeinander und enthalten SDS (Laemmli, 1970). SDS ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladung von Proteinen überdeckt und an diese proportional zur Masse bindet, so dass alle Proteine während der Elektrophorese eine gleiche negative Ladungsverteilung aufweisen. Das Gel befindet sich in einer Elektrophoresekammer, die mit Laufpuffer (2.1.2.) gefüllt ist. Ein Proteinmarker, der als Größenvergleich dient, wurde mit auf das Gel aufgetragen und galt anschließend als Relation zur Bestimmung der Proteinlängen. Bevor die Proben in das Gel geladen wurden, wurden sie im 10x CVL-Puffer (2.1.2.) oder 4x SDS-Ladepuffer (2.1.2.) bei 95°C für 5 min denaturiert und anschließend bei 4°C und 14000xg für 2 min abzentrifugiert. Um anschließend Neuroserpin (55 kDa) zu detektieren, ist ein 12,5 %iges Trenngel am besten geeignet. Die SDS-Gele setzten sich wie folgt zusammen (Tabelle 16):

Tabelle 16: Zusammensetzung von SDS-Gelen

Reagenz	Sammelgel	Trenngel (12,5 %)
ddH ₂ O	2,75 ml	2,17 ml
0,5 M Tris HCl	500 µl	-
1,5 M Tris HCl	-	1,9 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	650 µl	3,33 ml
10 % SDS	40 µl	75 µl
10 % APS	40 µl	75 µl
TEMED	4 µl	3 µl

Die Elektrophorese erfolgte bei 10 mA pro Gel bis die Proteinspur das Sammelgel verlassen hat. Danach wurde die Stromstärke konstant auf 20 mA pro Gel gestellt und die Elektrophorese für 3 h bei Zimmertemperatur durchgeführt.

2.3.3. Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brilliant-Blue

Um unter UV-Licht die Proteine in dem Polyacrylamidgel zu erkennen, müssen diese angefärbt werden. Dazu eignet sich eine Färbelösung mit Inhalt von Coomassie-Brilliant-Blue. Das Gel wurde für 30 min in die Färbelösung hineingelegt. Der Farbstoff bindet gut an Proteine, sodass nach dem Entfärben mit Entfärbelösung allein die Proteine angefärbt bleiben.

Coomassie Färbelösung 1 l:

800 ml Methanol, 140 ml Essigsäure. ~2 g Coomassie, dd.H₂O auf 1 l.

Entfärbung in 1 l: 400 ml Methanol, 70 ml Essigsäure, dd.H₂O

2.3.4. Western Blot

Um Proteine, die per SDS-Page separiert wurden, spezifisch detektieren zu können, müssen diese auf eine Membran übertragen werden. Verwendet wurde das sog. Nassblot-Verfahren. In einer Kasette wurde ein Schwämmchen auf die Anoden-Seite gelegt. Darauf wurden abwechselnd ein Stück Whatman-Papier, eine Nitrocellulosemembran, das Gel, ein weiteres Stück Whatman-Papier sowie ein zweites Schwämmchen positioniert und die Kasette fest verschlossen. Die Kasette wurde in die Blotkammer eingespannt, die mit 1x Wet-Blot-Puffer gefüllt war. Der Transfer erfolgte 1 h bei 400 mA und Raumtemperatur. Der Erfolg des Transfers wurde per Färbung mit Ponceau S Lösung überprüft, in der die Nitrocellulosemembran für 1 min geschwenkt

wurde. Ponceau S bindet an positiv geladenen Aminogruppen von Proteinen und macht sie so sichtbar.

2.3.5. Immundetektion

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran zu sättigen, wurde diese für 1 h in 5 % TBS-T für 1 h blockiert. Danach wurde die Membran über Nacht mit Primärantikörper, welcher in Blockierlösung (2.1.2.) in entsprechender Konzentration (2.1.1.3.) vorlag, inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 20 Minuten in TBS-T gewaschen und mit HRP gekoppeltem Sekundärantikörper für 1 h inkubiert. Die Membran wurde noch fünf Mal für jeweils 20 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Für die Immunodetektion wurde die Membran zunächst in einem ECL-(enhancedchemoluminescence) Substrat von Thermo Scientific inkubiert. Benutzt wurden entweder das femto Kit für 1 min oder das pico Kit für 5 min. Die Banden wurden per Chemidoc von BioRad detektiert. Alternativ wurde ein Röntgenfilm in einer Dunkelkammer auf die mit dem ECL-Substrat aktivierte Membran gelegt, der anschließend in einem automatischen Entwickler entwickelt wurde.

2.3.6. Deglykosylierung von N-glykosylierten Proteinen

Für die Deglykosylierung von Proteinen wurden entweder Zellysate, Zellüberstände oder Hirnhomogenate als Ausgangsmaterial verwendet. Behandelt wurden die Proben entweder mit dem Enzym Endo H, welches mannosereiche und hybride Glykane von Proteinen abspaltet oder mit PNGase F, das alle Glykane entfernt. Zunächst wurden die Ausgangsproben so aliquotiert, dass sie jeweils eine Proteinmenge von 40 µg aufwiesen. Die Proben für den Endo H Verdau wurden zunächst im Verdünnungspuffer (PBS + EDTA-freie Protease- und Phosphatase-Inhibitoren + 0,5 mM PMSF) lysiert und mit ddH₂O auf ein Volumen von 80 µl gebracht. Anschließend wurden 8 µl Verdünnungspuffer hinzugefügt (PBS mit 0,5 % (w/v) SDS und 1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol). Die Proben wurden für 10 min bei 95°C erhitzt und Endo H Puffer beigefügt (PBS mit 0,5 mM Natriumcitrat, mit Zitronensäure auf einen pH von 5,5 eingestellt). 5 µl Endo H (40 U/mg, Roche) wurden den Proben hinzugefügt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Für die Behandlung mit PNGase F wurden die Proben direkt mit Verdünnungspuffer auf ein Volumen von 80 μ l gebracht. Nach der Zugabe von 2 μ l 10 % (w/v) SDS wurden die Proben für 10 min bei 70°C inkubiert. Für den Verdau wurden 10 μ l Nonidet P40 und 5 μ l PNGase F (1 U/ μ l, Roche) zugefügt und die Proben bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.3.7. Mannose-6-Phosphat-Affinitätschromatographie

Die Man6P-Affinitätschromatographie wurde in der Arbeitsgruppe Molekularbiologie der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin am UKE unter Mitarbeit von Dr. Georgia Makrypidi nach dort erarbeitetem und bereits veröffentlichtem Protokoll (Muller-Loennies et al., 2010, Makrypidi et al., 2011) durchgeführt. Frisches Hirngewebe (150-200 mg) wurde 6 Wochen alten Tg(Ns) und Wildtyp Mäusen entnommen und mit einem Glas-Douncer mit 30 Schlägen in 10 mM PBS pH 7.4 mit Protease- und Phosphataseinhibitoren und 0,2 % (v/v) Triton X-100 auf Eis homogenisiert (200 mg/ml). Auch NS_{wt} Zellen wurden durch Hinzuführen des gleichen Homogenisierungspuffers lysiert. Die so angefertigten Proben wurden anschließend mit einem Reagenzglasrotator bei 40°C für 30 Minuten inkubiert und anschließend bei 10.0000xg und 4°C für 1 h abzentrifugiert. Die Überstände wurden entnommen und deren Proteingehalt per Bradford-Test nach Herstellerangabe bestimmt. 2 mg an Gesamtprotein wurden für 30 min bei 4°C mit 2 mg/ml des Antikörperfragments scFv M6P-1 (Muller-Loennies et al., 2010) inkubiert, der zuvor mit AminoLink Plus Gel Beads an eine Säule gebunden wurde. Material, das nicht an das Antikörperfragment gebunden hat, wurde als „flow through“ gesammelt. Um unspezifisch gebundenes Material zu entfernen, wurde die Säule 10 Mal mit 10 mM PBS mit 0.2 % (v/v) Triton X-100 und 10 mM Glucose 6-Phosphat ausgewaschen. Man6P enthaltene Proteine, die an die Säule gebunden haben, wurde mit 10 mM PBS mit 10 mM Man6P und Protease- und Phosphataseinhibitoren eluiert. Das Man6P-Eluat wurde mit Centiprep YM-10 einkonzentriert. Die einzelnen Fraktionen wurden aliquotiert (je 1 % von Ausgangsmaterial und flow through sowie 100 % des Man6P-Eluats) und per SDS-Page und Western Blot untersucht.

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1. Kultivierung von Zelllinien

HEK-293 Zellen wurden in 10 cm Schalen in Kulturmedium bestehend aus 8 ml DMEM High Glucose Medium mit 10 % (v/v) fötalem Rinderserum (FBS) und 5 % (v/v) Pen/Strep (Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)) in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % (v/v) CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert.

2.4.2. Passagieren von Zellen

Sobald die Zellen eine Konfluenz von 90 % erreicht haben, wurden sie passagiert. Dies war in der Regel zweimal wöchentlich der Fall. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und Zellreste mit PBS abgewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (1x) bedeckt und für 5 min in den Brutschrank gestellt. Danach ließen sich die Zellen leicht durch Spülen mit frischem Medium von dem Boden der Schale lösen. Ein Zehntel der abgelösten Zellen wurde zurück in die Schale transferiert, welche mit frischem Medium aufgefüllt und zurück in den Brutschrank gestellt wurde. Die mit Trypsin abgelösten Zellen, die nicht zurück in die Schale versetzt wurden, wurden entweder verworfen oder in einer neuen Schale kultiviert.

2.4.3. Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Mit Zellen, die eingefroren werden sollten, wurde bis zum Hinzugeben von Trypsin-EDTA (1x) genauso verfahren wie mit Zellen, die passagiert werden sollten. Allerdings wurden sie nach der Inkubation mit Trypsin-EDTA (1x) mit einem speziellen Einfriermedium abgelöst. Dieses bestand aus 40 % (v/v) DMEM, 50 % (v/v) FBS und 10 % (v/v) DMSO. Die so abgelösten Zellen wurden in spezielle Kryoröhrchen, die auf Eis vorgekühlt waren, versetzt und bei -80°C eingefroren.

Sollten Zellen wieder aufgetaut werden, so wurde das entsprechende Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37°C für etwa eine Minute aufgetaut. In der Zwischenzeit wurden in ein T25-Fläschchen 2 ml Kulturmedium vorpipettiert und die aufgetauten Zellen anschließend hinzugegeben. In diesem Medium wurden die Zellen für einen Tag kultiviert. Danach wurde das Medium, das noch DMSO enthielt mit samt den Zellen,

die das Auftauen nicht überlebten, abgesaugt und den lebenden Zellen frisches Kulturmedium hinzugegeben.

2.4.4. Generierung stabil transfizierter Zelllinien

HEK-293 Zellen, die stabil transfiziert werden sollten, wurden in 6-well Platten mit 2 ml Kulturmedium kultiviert. Für die Transfektion wurde der Zeitpunkt gewählt, an dem die Zellen eine Zelldichte von 80-90 % erreicht haben. Neuroserpin-cDNA lag bereits inkloniert im pcDNA3 Vektor vor. Nach einer eventuellen Mutagenese (2.2.11.), der Konzentrationsbestimmung (2.2.4.), Aufreinigung (2.2.5.) und Linearisierung mit PvuI (2.2.8.) wurden 2 µg DNA mit serumfreien Opti-MEM auf 100 µL aufgefüllt. Zu der verdünnten DNA wurden 3 µl FUGENE® HD hinzugegeben und das Gemisch für 15 Minuten inkubiert. Dieses Reaktionsreagenz wurde tröpfchenweise auf die zu transfizierenden Zellen gegeben, die daraufhin für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen in 10 cm Schalen umgesetzt und das serumfreie Transfektionsmedium durch Kulturmedium mit 500 µg/ml Geneticin ersetzt (Selektionsmedium). Der pcDNA3 Vektor enthält eine Geneticinresistenz, so dass die Zugabe des Antibiotikums einen Selektionsdruck auf erfolgreich transfizierte Zellen ausübte. Verschiedene Klone wurden beim Umsetzen der Zellen per Metallring ausgewählt und in einzelne Schalen umgesetzt. Die Expression von Neuroserpin der einzelnen Klone wurde per Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Neuroserpin aus der Ziege überprüft (dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von G. Galliciotti und P. Sonderegger, Universität Zürich). Klone, die die höchste Expression zeigten wurden einerseits kryokonserviert (2.4.3.) und andererseits dauerhaft in Selektionsmedium für weitere Versuche kultiviert.

2.4.5. Immunzytochemie

Stabil transfizierte HEK-293 Zellen wurden auf Deckgläschen in 6-well Platten kultiviert. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 70 % erreicht haben, wurde das Medium abgesaugt, die Deckgläschen mit PBS gewaschen, anschließend in auf Eis aufgetautem 4 % (w/v) Formaldehyd für 20 min fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Anschließend fand eine Permeabilisierung mit 0,2 % (w/v) Saponin in PBS (Permeabilisierungslösung) statt gefolgt von einer 1-stündigen Inkubation in

Blockierserum bestehend aus 3 % (w/v) BSA und 0,2 % (w/v) Saponin in PBS. Daraufhin wurden die Deckgläschen in eine lichtgeschützte, feuchte Kammer übertragen und für 1 h mit dem Primärantikörper inkubiert, der in jeweiliger Konzentration (2.1.1.3.) in Blockierserum gelöst wurde. Die Deckgläschen wurden in Permeabilisierungslösung gewaschen und anschließend für 1 h mit dem Sekundärantikörper (1:500 in Blockierserum), der aus der Ziege stammt und jeweils gegen die Spezies gerichtet war, aus der der Primärantikörper stammte, inkubiert. Die Sekundärantikörper waren entweder mit dem rot fluoreszierenden Alexa 633 oder dem grün fluoreszierenden Alexa 555 versehen. Nach erneutem Waschen in Permeabilisierungslösung wurde dieser 0,4 µg/ml 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) zur Zellkernfärbung für 5 min hinzugegeben und die Deckgläschen mit Fluoromount G auf Objektträgern eingebettet. Nach dem die Objektträger lichtgeschützt über Nacht bei Zimmertemperatur getrocknet wurden, konnten sie mit dem konfokalen Lasermikroskop Leica TCS SP2 analysiert werden.

2.5. Mäuse

Alle Tiere wurden unter strenger Einhaltung der Richtlinien der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gehalten und die Tierorganentnahmen sind unter org 587 bewilligt worden.

2.5.1. Morphologische Untersuchungen von Mäusehirnen

Die morphologischen Untersuchungen von Mäusehirnen erfolgte unter Mitarbeit von Dr. Michaela Schweizer von der Servicegruppe Morphologie des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg nach dort ausgearbeiteten Protokollen.

2.5.1.1. Elektronenmikroskopie

Die Tiere wurden zunächst mit einer Mischung aus Ketanest und Rompun tief betäubt. Anschließend fand eine Perfusion mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd und 0,1 % (w/v) Glutaraldehyd in PBS durch das Herz statt. Vibratonschnitte von 60 µm Breite wurden aus den Hirnen erstellt. Nach einem Waschschrift in PBS pH 7,2 wurden die Schnitte mit 0,3 % H₂O₂ und 1 % NaBH₄ in PBS für 30 min behandelt, um die Aktivität der

endogenen Peroxidase zu inhibieren. Die Schnitte wurden nochmals in PBS gespült und danach unspezifische Bindungen 15 Minuten mit einer Blockierlösung bestehend aus 10 %igem Pferdeserum und 0,2 % BSA blockiert. Anschließend wurde ein Antikörper gegen Neuroserpin (2.1.1.3.) in Carrierlösung (2.1.2.) verdünnt (1:2000) und die Schnitte darin über Nacht inkubiert. Nach erneutem Spülen in PBS wurden die Schnitte für 90 min in biotinyliertem Ziege gegen Kaninchen IgG (1:1000 in Carrierlösung) inkubiert. Nach wiederholtem Spülen wurden die Schnitte für 90 min in ABC (1:100 in PBS) inkubiert. Die Schnitte wurden in PBS gewaschen und für 10 min mit einer Diaminobenzidin (DAB)-H₂O₂-Lösung angefärbt. Hiernach wurden die Schnitte in 1 %igem Osmiumtetroxid nachfixiert, in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe mit Ethanol dehydriert und in Epon eingebettet. Die ultradünnen Schnitte wurden mit dem Zeiss EM 902 untersucht.

2.5.1.2. Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden 100 µm dicke Vibratonschnitte zur Kryoprotektion bei 4°C über Nacht in 2,3 mol/l Saccharose in PBS eingetaucht. Kleine Teile des Cortexes wurden mit Probehaltern in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Ultradünne Schnitte wurden erstellt und nach publiziertem Protokoll behandelt (Slot and Geuze, 2007). Dabei wurden die Schnitte auf Objektträgern platziert und mit Antikörpern gegen Cathepsin D (1:20, 2.1.1.3.) und Neuroserpin (1:2000, 2.1.1.3.) inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Inkubation mit mit Alexa 888 versehenem Ziege gegen Kaninchen IgG und mit mit Alexa 546 versehenem Ziege gegen Maus IgG. Schließlich wurden die Schnitte mit ProLong® Gold antifade + DAPI eingedeckt.

3. Ergebnisse

3.1. Mannose-6-Phosphorylierung von Neuroserpin *in vivo*

Nimmt man die bisherigen Erkenntnisse über Neuroserpin und seine Glykosylierung beziehungsweise Man6-Phosphorylierung zusammen (Abbildung 1), so sind von drei N-Glykosylierungen (N157, N321, und N401) zwei (N157 und N321) potentiell Man6-phosphoryliert (Sleat et al., 2006).



Abb.1: Glykosylierung von Neuroserpin

Neuroserpin besteht aus 410 Aminosäuren, die ersten 16 stellen das Signalpeptid dar, welches noch im ER abgespalten wird. Von den drei N-Glykosylierungen an Position 157, 321 und 401 sind N157 und N321 potentiell Man6-phosphoryliert.

Phosphorylierungen an Man6P-Resten können nur an mannosereichen Oligosacchariden vorgenommen werden (Pohl et al., 2009, Makrypidi et al., 2011). Mannosereiche Oligosaccharide sind gegenüber einem Verdau mit dem Enzym Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo H, EC 3.2.1.96) sensibel. Endo H spaltet nur mannosereiche und hybride N-Glykosylierungen von Proteinen ab, während komplexe Glykane unverdaut bleiben. Zur Bestimmung der Zusammensetzung der Oligosaccharide im Neuroserpin *in vivo* wurden Gehirnhomogenate von genetisch modifizierten Mäusen, die Neuroserpin überexprimieren (Tg(NS)) und von Wildtyp Mäusen (C57BL/6) untersucht. Die Homogenate wurden entweder mit dem Enzym Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F, EC 3.5.1.52), welches alle N-Glykosylierungen abspaltet oder mit Endo H behandelt. Daraufhin folgte ein Western Blot mit einem Antikörper gegen Neuroserpin. Sowohl im Hirngewebe von Wildtyp Mäusen als auch von Tg(NS) Mäusen lag Neuroserpin überwiegend in einer glykosylierten Form mit einer Größe von 48 kDa vor, während ein kleiner Teil unglykosyliert (44 kDa) war. Die Gesamtmenge an Neuroserpin dagegen unterscheidet sich zwischen Wildtyp und Tg(NS) (Galliciotti et al., 2007) (Abbildung 2a)). Die Abspaltung der N-Glykane vom Neuroserpin durch PNGase F führte zu einem kompletten Verschwinden der 48 kDa

großen Bande und dem Erscheinen einer kleineren und damit im elektrophoretischen Feld beweglicheren Bande mit einer Masse von etwa 44 kDa. Da nach dem Verdau mit Endo H noch zwei Banden von jeweils 48 und 44 kDa verblieben, ließ dies auf sowohl mannosereiche als auch komplexe Oligosaccharide im Neuroserpin schließen (Abbildung 2b)). Es ließ sich bei genauer Betrachtung eine dünne Neuroserpinbande bei etwa 46 kDa entdecken, die darauf schließen lässt, dass zwei mannosereiche Glykane im Neuroserpin enthalten sind, die Endo H nacheinander vom 48 kDa großen Ausgangsprotein abspaltet und über eine Übergangsform von 46 kDa zu einem deglykoylierten Protein von 44 kDa führt (Abbildung 2b)), welches auch nach einem Verdau mit PNGase F vorzufinden war. Da sich die Intensität der Banden nach einem Verdau von 1 h mit Endo H nicht mehr veränderte, wurde ein bereits vollständiger Verdau angenommen. Zur Bestätigung wurde die gleiche Membran mit einem Antikörper gegen Cathepsin D inkubiert. Cathepsin D liegt in einer 47 kDa großen Vorläuferform und einer 32 kDa großen reifen Form vor (Delbruck et al., 1994). Die Vorläuferform enthält außer mannosereichen eine hybride N-Glykosylierung, während die reife Form ausschließlich aus mannosereichen Glykanen besteht. Bereits nach einem Endo H Verdau von einer Stunde lagen beide Cathepsin D Formen in einem unglykosylierten Zustand vor (Abbildung 2b)).

Es konnte gezeigt werden, dass Neuroserpin über mannosereiche Glykane verfügt. Nun sollte geprüft werden, ob es sich dabei um funktionelle Man6P-Reste handelt. Hierzu wurde ein 2010 entwickeltes Antikörperfragment namens scFv M6P-1 verwendet, das spezifisch eine Phosphorylierung von Mannose an Position 6 erkennt und für eine Affinitätschromatographie (2.3.7.) verwendet werden kann (Muller-Loennies et al., 2010). Gehirnhomogenate von 6 Wochen alten C57BL/6 Mäusen (wt) wie auch von 6 Wochen alten Tg(NS) Mäusen wurden als Ausgangsmaterial für die beschriebene Man6P-Affinitätschromatographie verwendet. Daraufhin wurde die Chromatographiesäule ausgewaschen und die Man6P enthaltenden Proteine, die an die Säule gebunden haben, mit 10 mM Man6P eluiert. Das Eluat wie auch das Ausgangsmaterial sowie das nicht gebundene Material (flow through) wurden per Western Blot auf Neuroserpin untersucht. Die Densität der Banden wurde per Software (Quantity One, BioRad) ausgemessen. 0,13-0,45 % des gesamten Neuroserpins, welches im Ausgangsmaterial von Hirnhomogenaten von wt und Tg(NS) Mäusen

enthalten war, band an die Chromatographiesäule. Ein kleiner Anteil von Neuroserpin enthielt damit Man6P-Reste (Abbildung 3).

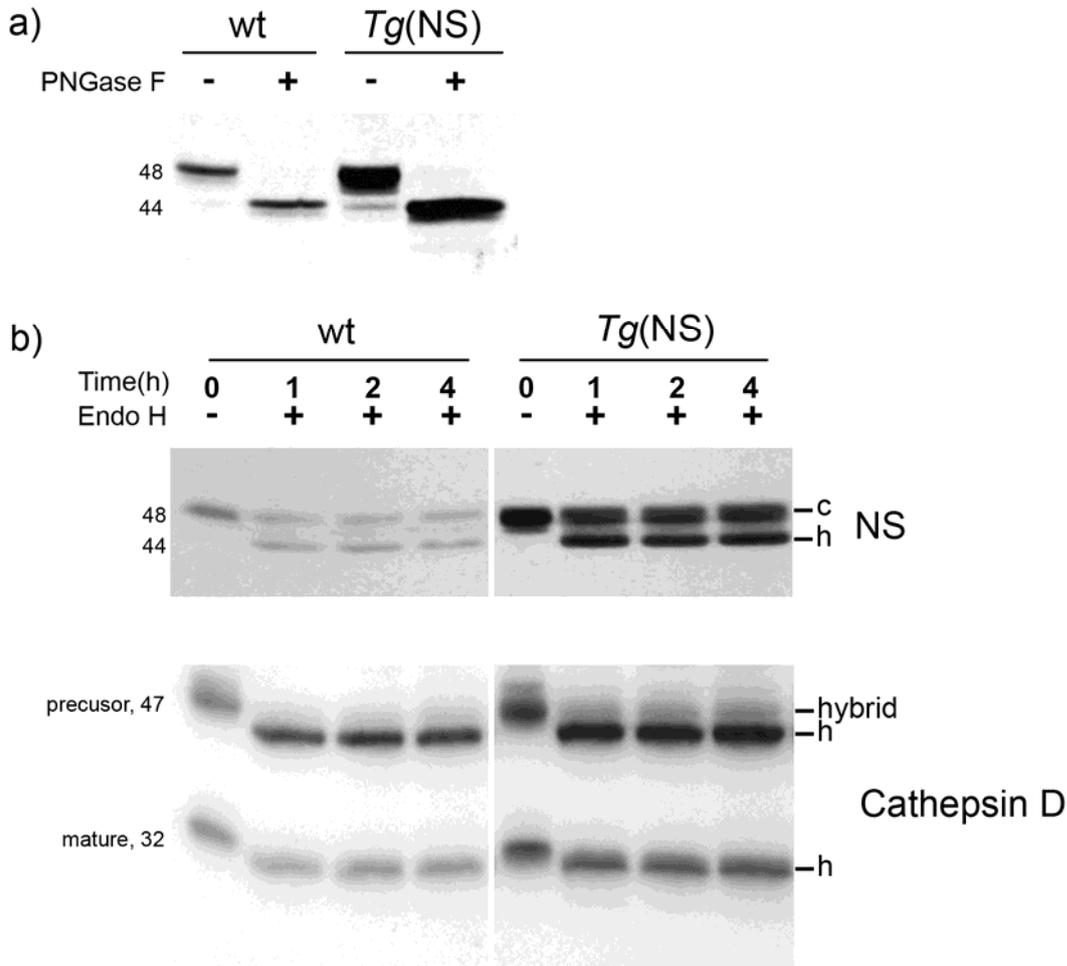


Abb.2: Charakterisierung der Glykosylierung von Neuroserpin *in vitro*

Gehirnhomogenate von 6 Wochen alten C57BL/6 (wt) und Tg(NS) Mäusen wurden mit (+) oder ohne (-) PNGase F (a) oder Endo H (b)) behandelt, eine SDS-Page (12,5 % Acrylamid) durchgeführt. Nach dem Western Blot wurden die Membranen mit einem Antikörper entweder gegen Neuroserpin (1:250) oder Cathepsin D (1:1000) inkubiert. Die beobachtete Verschiebung von 48 kDa zu 44 kDa in a) deutet auf eine Glykosylierung von Neuroserpin. Der Verdau mit Endo H (b)) für 1, 2 und 4 Stunden zeigte sowohl komplexe (c) als auch mannosereiche Oligosaccharide (h). Die Effizienz des Verdau wurde durch die komplette Spaltung der hybriden und mannosereichen Oligosaccharide vom Cathepsin D nach bereits einer Stunde gezeigt. Nach dieser Zeit kommt es auch im Verdau von Neuroserpin zu keiner weiteren Verschiebung von Banden. Alle Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

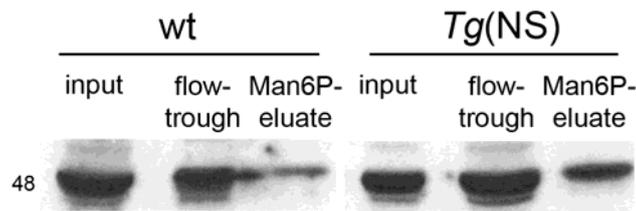


Abb.3: Man6P-Affinitätschromatographie für Neuroserpin *in vivo*

Die lysosomal angereicherte Fraktion aus Hirnhomogenaten von wt und Tg(NS) Mäusen diente als Ausgangsmaterial. Spezifisch an die Säule gebundenes Material wurde mit 10 mM Man6P in drei Durchgängen eluiert, lyophilisiert und per Western Blot auf Neuroserpin untersucht. Aliquote von Input (1 % des Ausgangsmaterials), flow-through (1 %) und dem Eluat (100 %) wurden im Blot verwendet. Alle Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

3.2. Transport von Neuroserpin in das Lysosom *in vivo*

Die Mannose-6-Phosphorylierung eines Proteins ist physiologischerweise die Kennzeichnung für den Transport des Proteins in das Lysosom (Brulke and Bonifacio, 2009), (1.7.). Ob Neuroserpin auch in das Lysosom transportiert wird, wurde zunächst *in vivo* geprüft. Dazu wurden 100 µm dünne Vibratomschnitte aus den Hirnen von Tg(NS) Mäusen angefertigt, fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung parallel mit einem Antikörper gegen Neuroserpin und dem Lysosomenmarker Cathepsin D durchgeführt (2.5.1.2.). Die darauf folgende Analyse der Färbungen zeigte im Konfokalmikroskop eine Kolokalisierung zwischen Neuroserpin und Cathepsin D, sodass Neuroserpin anteilig in das Lysosom transportiert wurde (Abbildung 4).

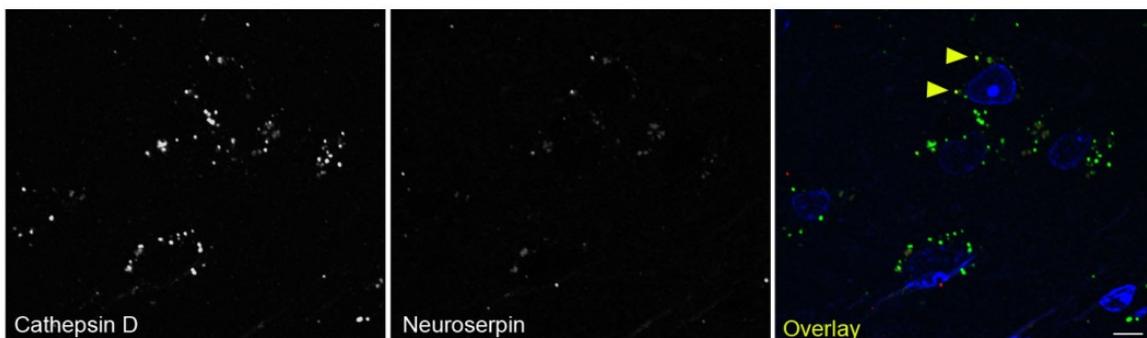


Abb.4: Immunhistochemie von Tg(NS) Hirngewebe

Zweifachfärbungen mit einem Antikörper gegen Cathepsin D (1:20, grün) als lysomaler Marker und Neuroserpin (1:2000, rot) zeigten eine partielle Kolokalisierung zwischen Neuroserpin und lysosomalen Vesikeln (gelbe Pfeile). Der Maßstab entspricht 10 µm.

Zusätzlich zu der Immunfluoreszenzfärbung wurde noch eine Immuno-Elektronenmikroskopie (2.5.1.1.) durchgeführt. Erneut wurde Hirngewebe von Tg(NS) Mäusen in 60 µm dünne Vibratomschnitte geschnitten. Nach der Fixation wurde Neuroserpin mit Hilfe eines Antikörpers mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiert. Das so gekennzeichnete Neuroserpin wurde in der anschließenden Mikroskopie in vesikulären Strukturen vorgefunden, die von Größe und Morphologie am ehesten Lysosomen ähnelten (Abbildung 5).

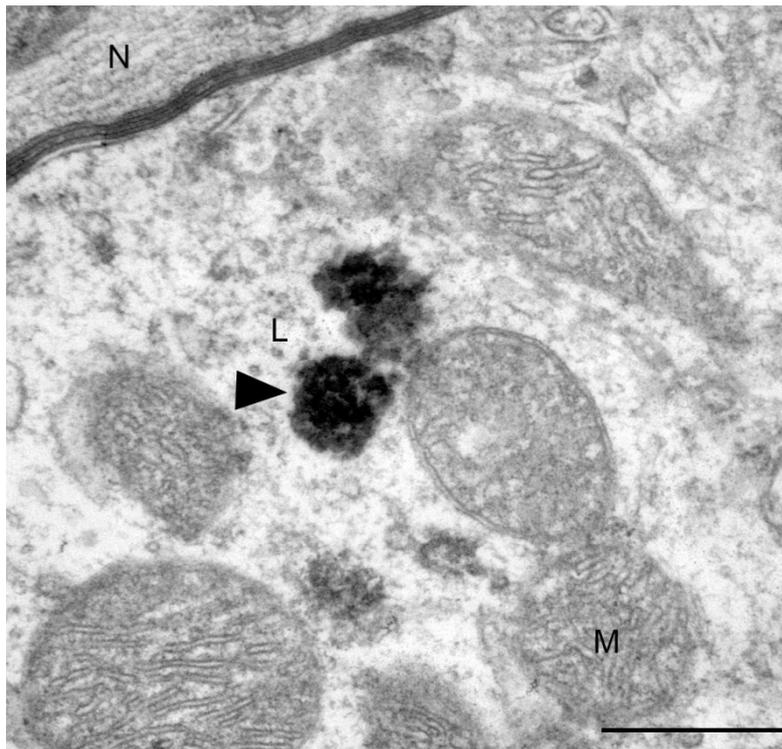


Abb.5: Immuno-Elektronenmikroskopie von Tg(NS) Hirngewebe
HRP-markiertes Neuroserpin befand sich in lysosomalen Strukturen (L, schwarzer Pfeil; M, Mitochondrium; N, Nucleus, der Maßstab entspricht 500 nm).

3.3. Herstellung von Plasmiden zur Zelltransfektion

Die cDNA-Sequenz des humanen Wildtyp Neuroserpins (NS_{wt}) wurde bereits von Dr. Susanne Krasemann und Dr. Sascha Lange in den Vektor pcDNA3 zwischen die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI inkloniert und in den Bakterienstamm SURE 2 transformiert. Nachdem die Bakterien für zwei Tage in einem Nährmedium inkubiert wurden, erfolgte die DNA-Gewinnung durch Midipräparation (2.2.3.2). Nach der Quantifizierung der DNA durch eine photometrische Bestimmung wurde sie auf ein Agarosegel geladen und eine Gelelektrophorese durchgeführt (2.2.6.). Reinheit, Menge

und die richtige Größe des Plasmids von 6600 bp waren für eine anschließende Mutagenese zufriedenstellend (Abbildung 6).

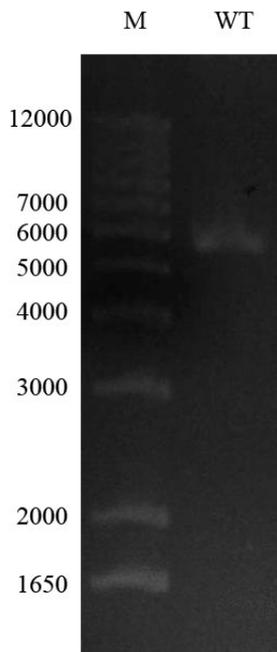


Abb.6: Agarosegelelektrophorese vom Ausgangsplasmid für folgende Mutagenesen und Transfektionen

In das Plasmid pcDNA3 (5400 bp) wurde DNA von humanem Neuroserpin (1200 bp) einkloniert. Das angefertigte Plasmid (WT) wurde unlinealisiert mit einem DNA-Längenstandard (M) auf ein 0,8 %iges Agarosegel geladen. Die Probe wurde bei 80 V für 1,5 h im elektrischen Feld aufgetrennt. Das zu untersuchende Plasmid besaß eine Größe von 6600 bp. Da es unlinealisiert war, konnte es sich schneller durch das Feld bewegen als linealisierte DNA gleicher Größe, wie sie auch im Längenstandard verwendet wird. So lief das verwendete Plasmid zwischen der 5000 bp und 6000 bp großen Vergleichs-DNA des Längenstandards. Alle DNA-Längen sind in bp angegeben.

Die Bedeutung und die Funktion der beiden potentiellen Mannose-6-Phosphorylierungen sollten untersucht werden. Dazu wurde das Asparagin entweder an der Stelle 157, 321 (N157I, N321I) oder an beiden Stellen (N157/321I) zu einem Isoleucin mutiert und die entsprechenden Glykosylierungen verhindert. Verwendet wurde das QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent Technologies zur PCR-Mutagenese (2.2.11). Die benötigten Mutagenese-Primer wurden entworfen und bei SIGMA bestellt (2.1.1.1.).

Die Mutagenese wurde streng nach Protokoll durchgeführt, wobei die aus SURE 2 isolierte NS_{wt}-DNA als Template diente. Nach der Transformation der mutierten DNA in den ultrakompetenten Bakterienstamm XL10-Gold wurden pro Mutation vier, also insgesamt zwölf Bakterienkolonien kultiviert und daraufhin eine Minipräparation durchgeführt (2.2.3.1).

Die daraus gewonnene DNA wurde ebenfalls photometrisch quantifiziert. Zusätzlich wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI und XhoI durchgeführt. Die so entstandenen Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, um zu überprüfen, ob das Insert über die richtige Größe von 1200 bp verfügte (Abbildung 7).

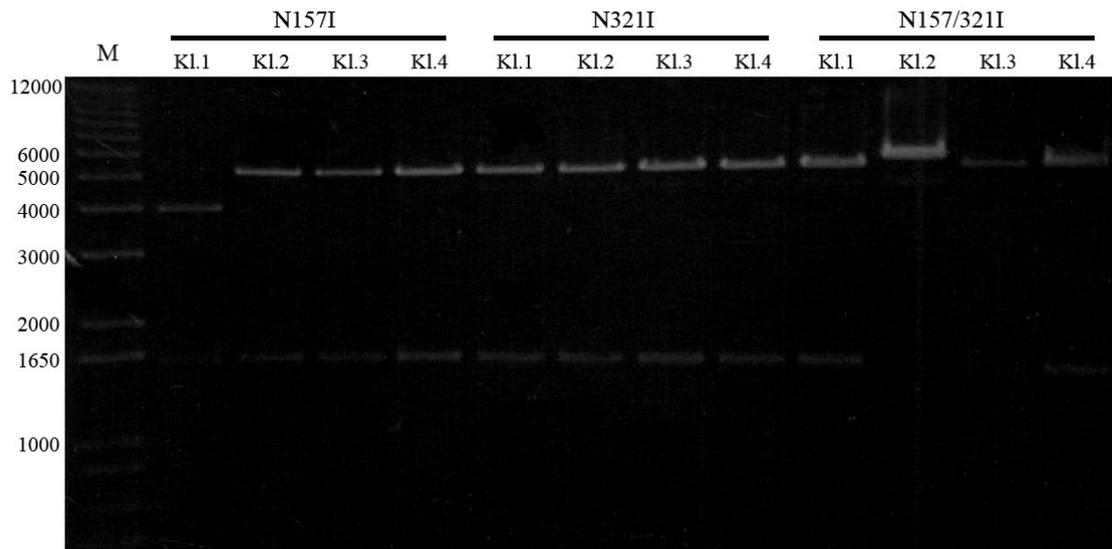


Abb.7: Agarosegelelektrophorese von mutagenisierten Neuroserpin-Plasmiden

Neben dem DNA-Längenstandard (M) wurde mutagenisierte DNA, die aus 12 Bakterienkolonien des Stammes XL-10 Gold gewonnen wurde, aufgetragen. Pro Neuroserpin-Mutation (N157I; N321I; N157/321I) wurden vier Klone (je Kl.1–Kl.4) ausgewählt. Aus den Plasmiden (6600 bp) wurde das Neuroserpin-Insert (1200 bp) mit den Endonukleasen EcoRI und XhoI herausgeschnitten, sodass bei erfolgreicher Mutagenese und Spaltung zwei Banden mit je einer Größe von 5400 bp und 1200 bp zu sehen sein sollten, so wie es bei den meisten Klonen der Fall ist. Alle DNA-Längen sind in bp angegeben.

Pro Mutante wurde aus den Ergebnissen der Quantifizierung und des Restriktionsverdaus jeweils eine Probe (N157I, Kl.2; N321I, Kl.1; N157I/321I, Kl.4) ausgewählt und zum Sequenzieren mit jeweils vier Primern (NSP-F1, NSP-F2, NSP-F3, NSP-T7; 2.2.9) zu der Firma MWG Biotech (Ebersberg) verschickt. Mit Hilfe der NCBI-Blast-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zeigte sich, dass nur Mutation N157I, Kl.2 geglückt war, die anderen beiden Klone erhielten DNA von Wildtyp Neuroserpin. Daraufhin wurden die verbleibenden neun Proben mit dem Primer NSP-F1 zur Sequenzierung verschickt. Die laut Sequenzierung erfolgreich mutierten Proben N157I, Kl.3; N321I, Kl.3; N157I/321I, Kl.3 sowie DNA von Wildtyp Neuroserpin wurden mit Hilfe der Restriktionsendonuklease PvuI linealisiert (2.2.8) und danach gelelektrophoretisch analysiert (Abbildung 8).

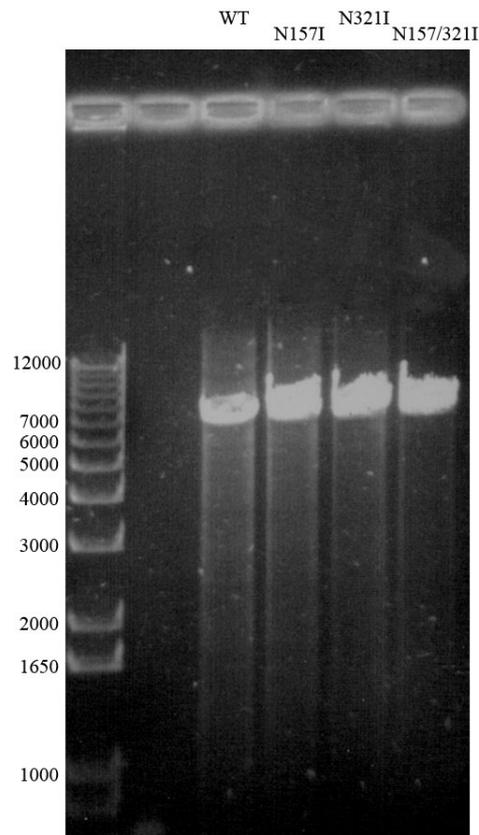


Abb.8: Agarosegelelektrophorese von Neuroserpin-Plasmiden zur Zelltransfektion DNA von vier Neuroserpin-Konstrukten (WT, N157I, N321I, N157/321I) jeweils inkliniert im Vektor pcDNA3 wurde nach Sequenzierung durch Linealisierung mit PvuI für eine Transfektion von humanen Zellen vorbereitet. Vor der Transfektion wurde die Länge (6600 bp) und Menge der DNA per Gelelektrophorese durch einen DNA-Längenstandard überprüft. Beides war zufriedenstellend. Alle DNA-Längen sind in bp angegeben.

Die linealisierte DNA hatte die richtige Länge von 6600 bp, war in ausreichender Menge vorhanden und wurde für die anschließende Transfektion ausgewählt.

3.4. Expression von Neuroserpin-Mutanten in HEK-293 Zellen

Um die Auswirkung der mutierten Glykosylierungsstellen auf Expression und Transport von Neuroserpin zu überprüfen, sollte ein *in vitro* Zellmodell etabliert werden. Dafür wurde die humane Zelllinie HEK-293 aus embryonalem Nierengewebe gewählt, welche natürlicherweise kein Neuroserpin exprimiert (Hill et al., 2001). Das Transfektionsreagenz FuGENE® HD der Firma Roche wurde verwendet, um HEK-293 Zellen mit DNA von entweder Wildtyp Neuroserpin (NS_{wt}), der Mutation einer einzelnen (NS_{N157I} ; NS_{N321I}) oder beiden potentiellen Mannose-6-phosphorylierten

Glykosylierung (NS_{N157/3211}) zu transfizieren. Die Zellen wurden danach in einem mit Geneticin versetzten Medium kultiviert und jeweils sechs Klone pro Neuroserpin-Konstrukt ausgewählt, indem sie beim Passagieren mittels eines Metallringes vor dem Ablösen von der Kulturschale mit Trypsin geschützt waren. Die Expression der einzelnen Klone wurde per Western Blot der Zelllysate und Überstände für Neuroserpin geprüft. Jeweils die Klone, die die beste Expression zeigten, wurden für die weiteren Versuche ausgewählt (Abbildung 14).

3.5. Transport von Neuroserpin in das Lysosom *in vitro*

Zunächst wurde der intra- und extrazelluläre Transport von Neuroserpin in HEK-293 Zellen untersucht, die stabil humanes Wildtyp Neuroserpin (NS_{wt}) exprimieren. Als Kontrolle dienten HEK-293 Zellen, die mit dem Expressionsvektor pcDNA3 ohne inkloniertes Neuroserpin transfiziert wurden (mock). Die Expression von Neuroserpin in beiden Zelllinien wurde nochmals per Western Blot überprüft (Abbildung 9). Wie erwartet zeigte sich, dass Neuroserpin zum größten Teil ins Medium sezerniert wurde, während nur ein kleiner Teil innerhalb der Zellen verblieb.

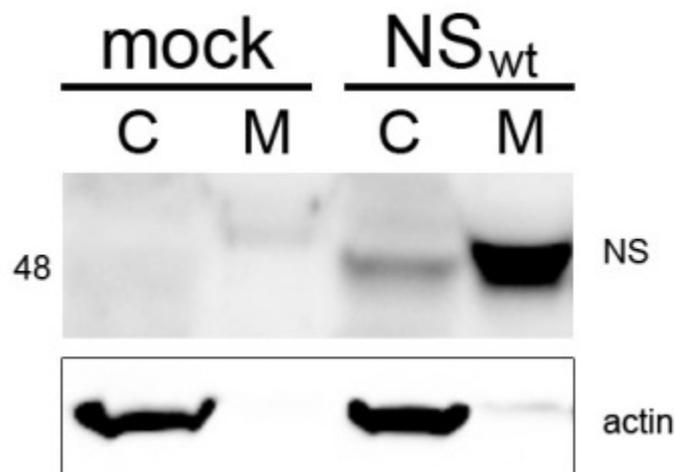
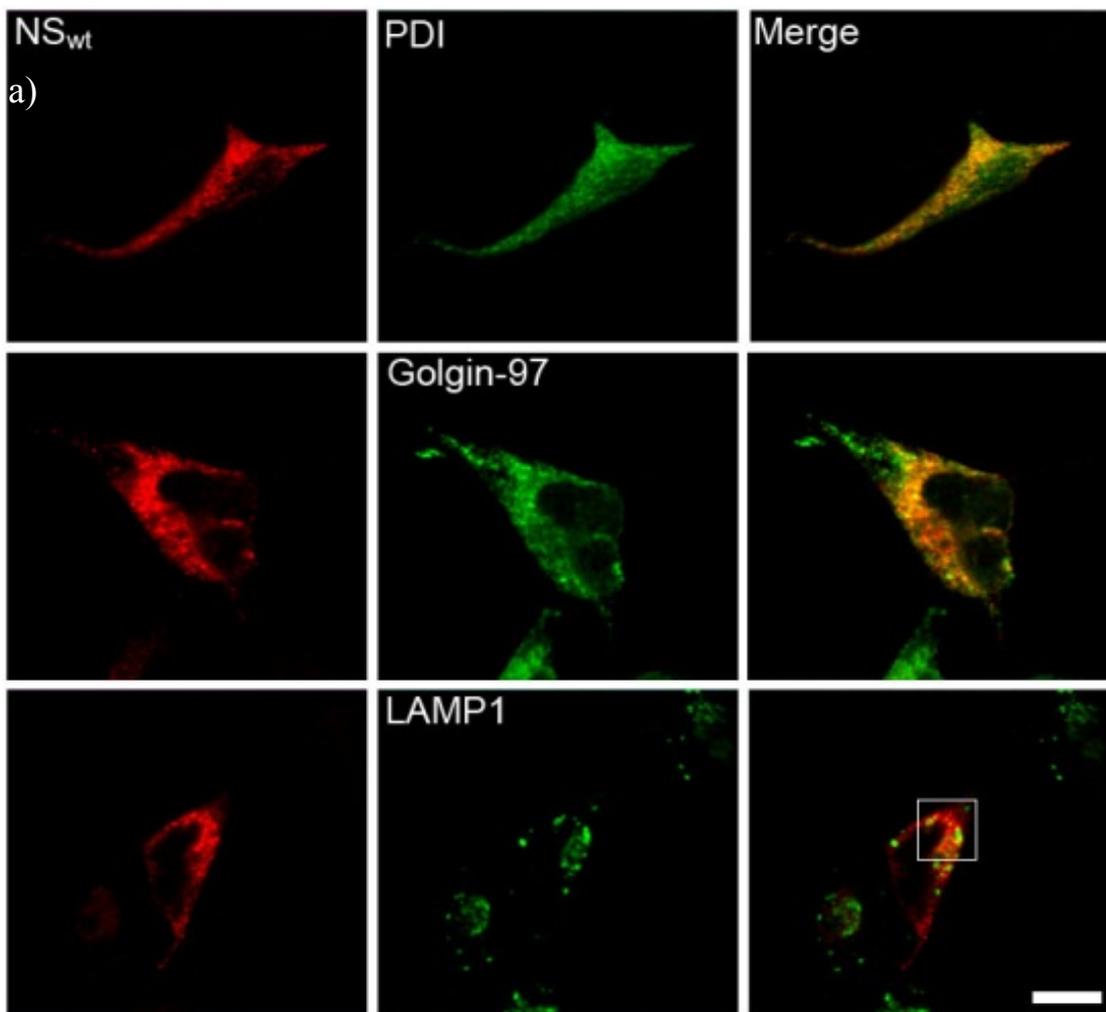


Abb.9: Expression von Neuroserpin in HEK-293 Zellen

Lysate (C) von HEK-293 Zellen, die entweder mit einem leeren pcDNA3 Vektor (mock) oder mit humaner Neuroserpin-cDNA (NS_{wt}) transfiziert wurden, und ihre über 24 Stunden gesammelten Überstände (M) wurden per Western-Blot auf Neuroserpin untersucht. Neuroserpin wurde hauptsächlich sezerniert, während nur ein kleiner Teil des Proteins in den Zellen verblieb. Aktin diente als Ladekontrolle. Alle Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

Um der Lokalisierung von Neuroserpin innerhalb der Zelle nachzugehen, wurden Zweifach-Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, wobei jeweils Neuroserpin und ein Zellorganell gleichzeitig in zwei verschiedenen Farben angefärbt wurden. Benutzt wurden dabei entweder ein Marker für das Endoplasmatische Retikulum namens Protein Disulfid Isomerase (PDI), ein Marker des Trans-Golgi-Netzwerkes (Golgin-97) oder der lysosomale Marker LAMP-1. Anschließend wurden die Färbungen mit dem konfokalen Lasermikroskop Leica TCS SP2 analysiert. Kolokalisierungen waren dabei gelb. Neuroserpin (rot) war überwiegend im Endoplasmatischen Retikulum (grün) und im Golgi-Apparat (grün) vorzufinden. Ein kleiner Anteil konnte auch in mit LAMP-1 angefärbten Lysosomen (grün) gefunden werden (Abbildung 10 a) + b)). Von den exemplarisch ausgewählten Zellen wurden nochmals sogenannte Z-stacks erstellt, bei denen das Konfokalmikroskop pro Zelle mehrere Ebenen hintereinander aufnahm, um zu zeigen, dass Kolokalisierungen nicht versehentlich auf der Auswertung verschiedener Ebenen beruhten (Abbildung 10 c)).



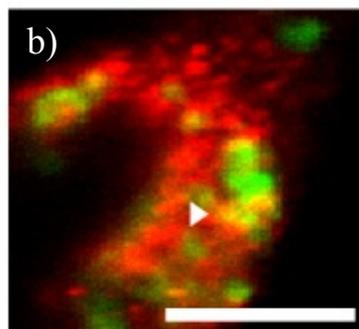
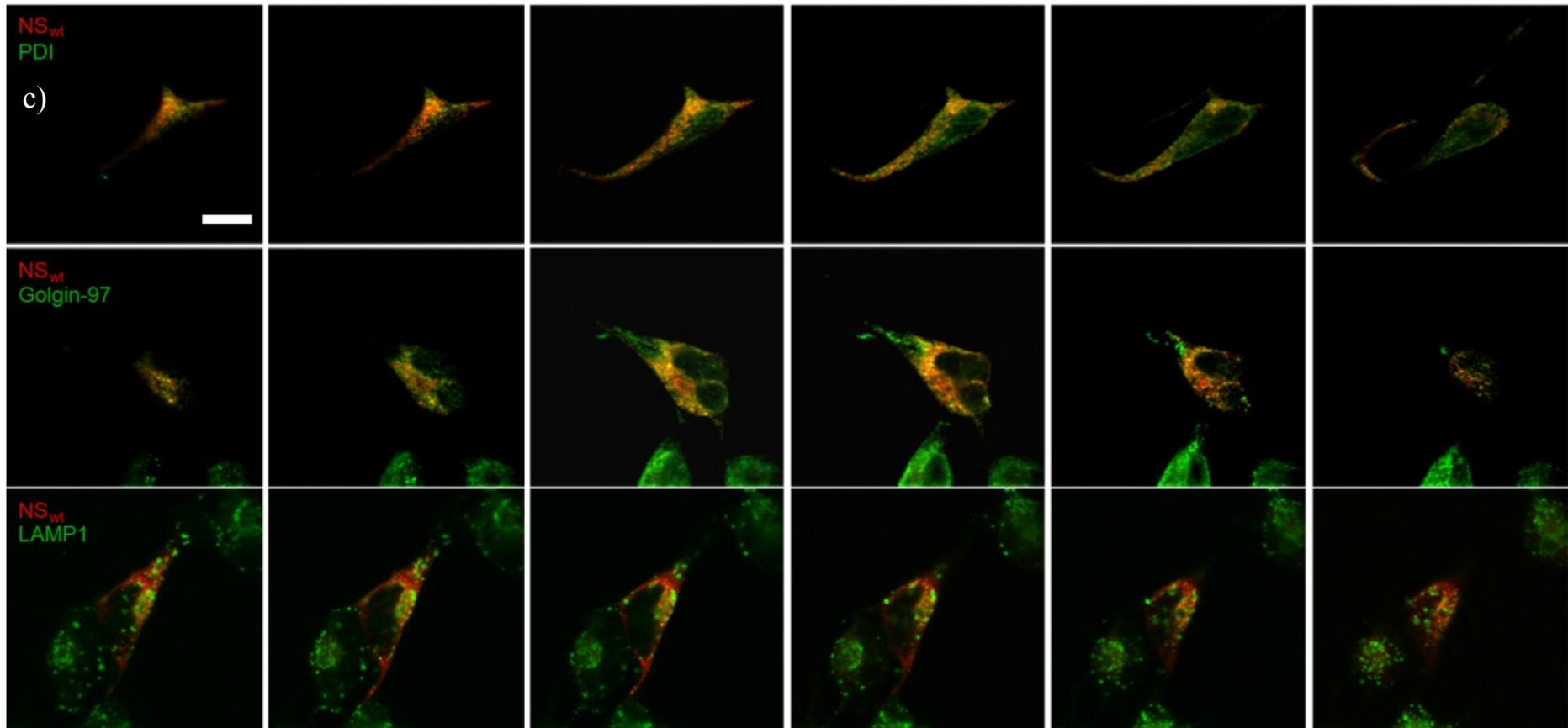


Abb. 10: Lokalisierung von Wildtyp Neuroserpin in HEK-293 Zellen

a) HEK-293 Zellen, die humanes Neuroserpin exprimieren, wurden fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen Neuroserpin (linke Spalte, 1:50, rot), den ER-Marker PDI (mittlere Spalte, 1:300, grün), den Trans-Golgi-Marker Golgin-97 (mittlere Spalte, 1:200, grün) oder den lysosomalen Marker LAMP-1 (mittlere Spalte, 1:150, grün) angefärbt. Die Färbungen wurden mit einem Konfokalmikroskop analysiert. In zusammengelegten Bildern (Merge) lassen sich Kollokalisierungen erkennen (gelb). Der Maßstab entspricht 10 μm .

b) Die Vergrößerung des in a) markierten Bereichs zeigt Neuroserpin in LAMP-1 positiven Strukturen (Pfeil). Der Maßstab entspricht 5 μm .

c) Konfokale Z-stacks der in a) durchgeführten Färbungen (obere Zeile Neuroserpin + PDI, mittlere Zeile Neuroserpin + Golgin-97, untere Zeile Neuroserpin + LAMP-1). Der Maßstab entspricht 10 μm .

3.6. Mannose-6-Phosphorylierung von Neuroserpin *in vitro*

Die Man6P–Affinitätschromatographie kann auch mit Zelllysaten als Ausgangsmaterial durchgeführt werden. Zelllysate von mock und NS_{wt} wurden aufgearbeitet (2.3.7.) und jeweils als Input in die Chromatographiesäule geladen. Ausgangslysat sowie an die Säule nicht gebundenes, durchgeflossenes Material von NS_{wt} Zellen wurden gesammelt. Bevor Man6P enthaltende Proteine mit 10 mM Man6P eluiert wurden, musste sichergestellt werden, dass nicht unspezifisch an die Säule gebundene Proteine im Man6P-Eluat verblieben. Dazu wurde die Säule mit einer speziellen Lösung ausgewaschen (2.3.7.). Die so ausgewaschene Fraktion genauso wie das letztlich gewonnene Man6P-Eluat wurden gesammelt und sämtliche Fraktionen per Western Blot auf Neuroserpin untersucht (Abbildung 11). Auch der Input und das Man6P–Eluat von mock Zellen wurden auf der gleichen Membran untersucht und erhielten erwartungsgemäß kein Neuroserpin. Der Hauptteil des Neuroserpins in NS_{wt}–Zellen war nicht Man6-phosphoryliert und befand sich im flow through. Ein kleiner Anteil von Neuroserpin konnte auch im Man6P–Eluat entdeckt werden. Neuroserpin lag also zu einem geringen Teil intrazellulär in einer Man6-phosphorylierten Form vor. Dass Neuroserpin an den für Man6-Phosphorylierungen spezifischen Antikörper gebunden hat und nicht als Kontaminat im Man6P-Eluat vorzufinden war, ließ sich daran erkennen, dass der Waschschrift zwischen flow through und Man6P-Eluat kein Neuroserpin enthielt (Abbildung 11).

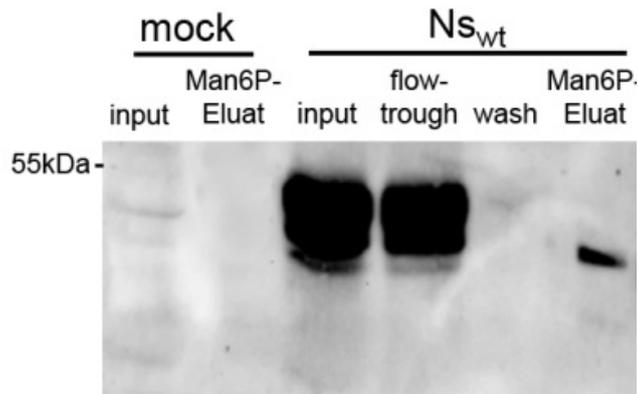


Abb.11: Man6P-Affinitätschromatographie für Neuroserpin *in vitro*

Stabil transfizierte, N_{swt} exprimierende HEK Zellen sowie mock Zellen wurden als Ausgangsmaterial in die Chromatographiesäule geladen. Nach Aufarbeitung von flow-through, Man6P-Eluat und einer dazwischenliegenden Auswaschfraktion der Säule wurde ein Western Blot mit einem Antikörper gegen Neuroserpin durchgeführt, der eine kleine Fraktion von Neuroserpin im spezifisch mit 10 mM Man6P eluiertem Material bestätigte.

3.7. Bedeutung der Glykosylierung für den Transport von Neuroserpin in das Lysosom *in vitro*

Als nächstes sollte geklärt werden, ob die Bindung von Mannose-6-phosphoryliertem Neuroserpin an den Man6P-Rezeptor im Trans-Golgi-Netzwerk hinter dem Transport von Neuroserpin in das Lysosom steckt. Es ist nämlich auch ein Transport von Neuroserpin in das Lysosom von extrazellulär vermutet, der nicht Man6P abhängig ist, sondern über das Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) funktioniert (Makarova et al., 2003). HEK-293 Zellen, die stabil ein in zwei Glykosylierungsstellen mutiertes Neuroserpin exprimierten (NS_{N157/321I}), wurden verwendet. Diese Zellen produzierten ein Neuroserpin, das nicht mehr Mannose-6-phosphoryliert werden kann. Zellysate und Überstände wurden von NS_{N157/321I}, N_{swt} and mock transfizierten Zellen per Western Blot auf Neuroserpin untersucht. Im NS_{N157/321I} Lysat war eine 44 kDa große Bande zu sehen, deren Intensität vergleichbar war zum Lysat von N_{swt} exprimierenden Zellen (Abbildung 12). Ein Fehlen der beiden N-Glykosylierungen hatte somit keinen Einfluss auf die Stabilität des Proteins. Das Medium von NS_{N157/321I} Zellen zeigte zwei Banden von jeweils 44 und 40 kDa Größe, die nicht glykosyliertes Neuroserpin repräsentieren (3.8.). Im N_{swt} Medium fanden sich wie auch schon *in vivo* (3.1.) zwei Banden glykosylierten Neuroserpins von 48 und 44 kDa Größe. Diesmal wurden NS_{N157/321I} exprimierende HEK-293 Zellen fixiert und mit Antikörpern im Sinne

einer Immunfluoreszenzfärbung markiert. Benutzt wurden für die Zweifachfärbungen außer dem Antikörper gegen Neuroserpin wieder PDI, Golgin-97 und LAMP-1. Neuroserpin ohne Man6-Phosphorylierungsstellen war überwiegend im ER zu finden. Kleinere Mengen waren auch im Golgi-Apparat. Dagegen konnte kein Man6P defizientes Neuroserpin in LAMP-1 positiven lysosomalen Vesikeln gefunden werden (Abbildungen 13 a)+b)), so dass der in 3.5. gezeigte Transport von NS_{wt} Man6P abhängig war und nicht durch einer Internalisierung durch LRP zu erklären wäre. Dass nicht Man6-phosphoryliertes Neuroserpin nicht im Lysosom zu finden war, bestätigte sich auch in den Z-stacks (Abbildung 13 c)).

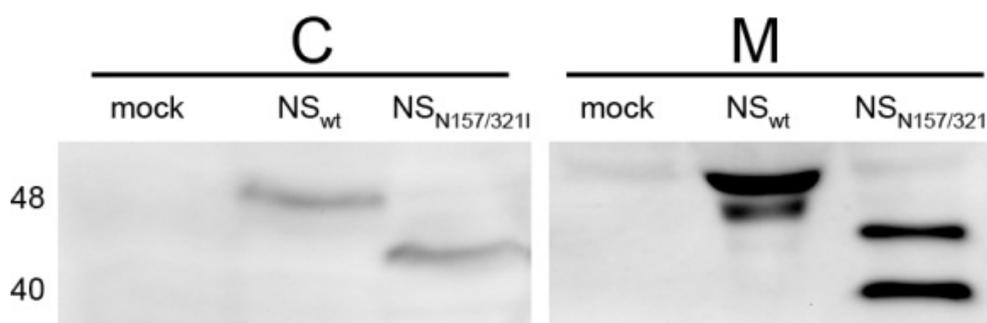
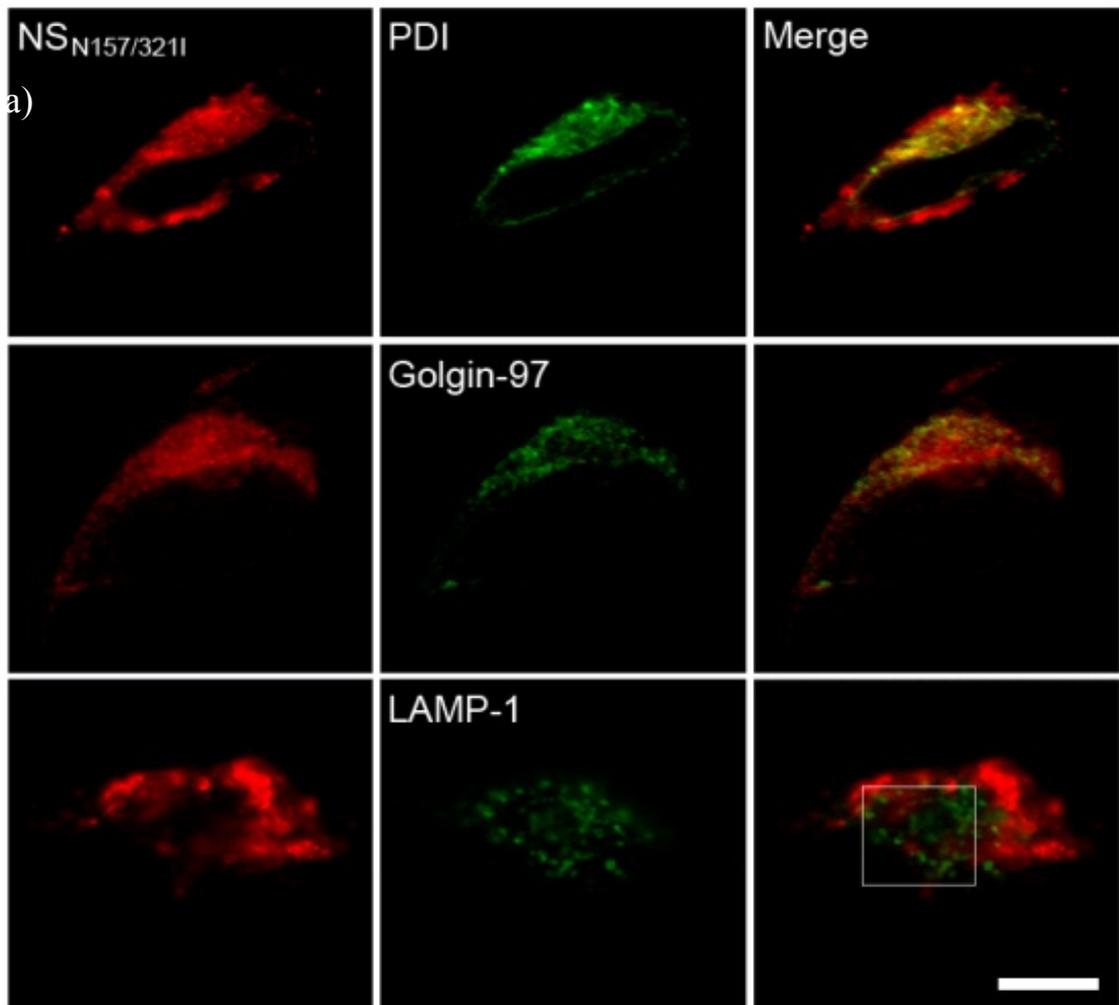


Abb.12: Expression von NS_{N157/321I} in HEK-293 Zellen

Western Blot mit einem Antikörper gegen Neuroserpin von Lysaten (C) und Überständen (M) von HEK-293 Zellen, die entweder humanes Wildtyp Neuroserpin (NS_{wt}) oder ein an den potentiellen Man6P-Stellen mutiertes Neuroserpin (NS_{N157/321I}) exprimieren sowie von mock Zellen. Die Menge an produziertem Neuroserpin war in NS_{wt} und NS_{N157/321I} Zellen ähnlich. Alle Molekulargewichte sind in kDa angegeben.



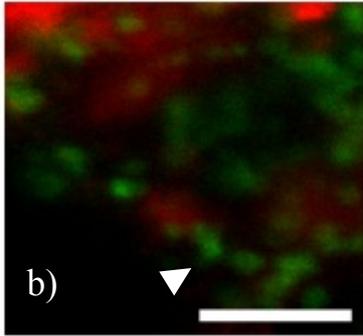
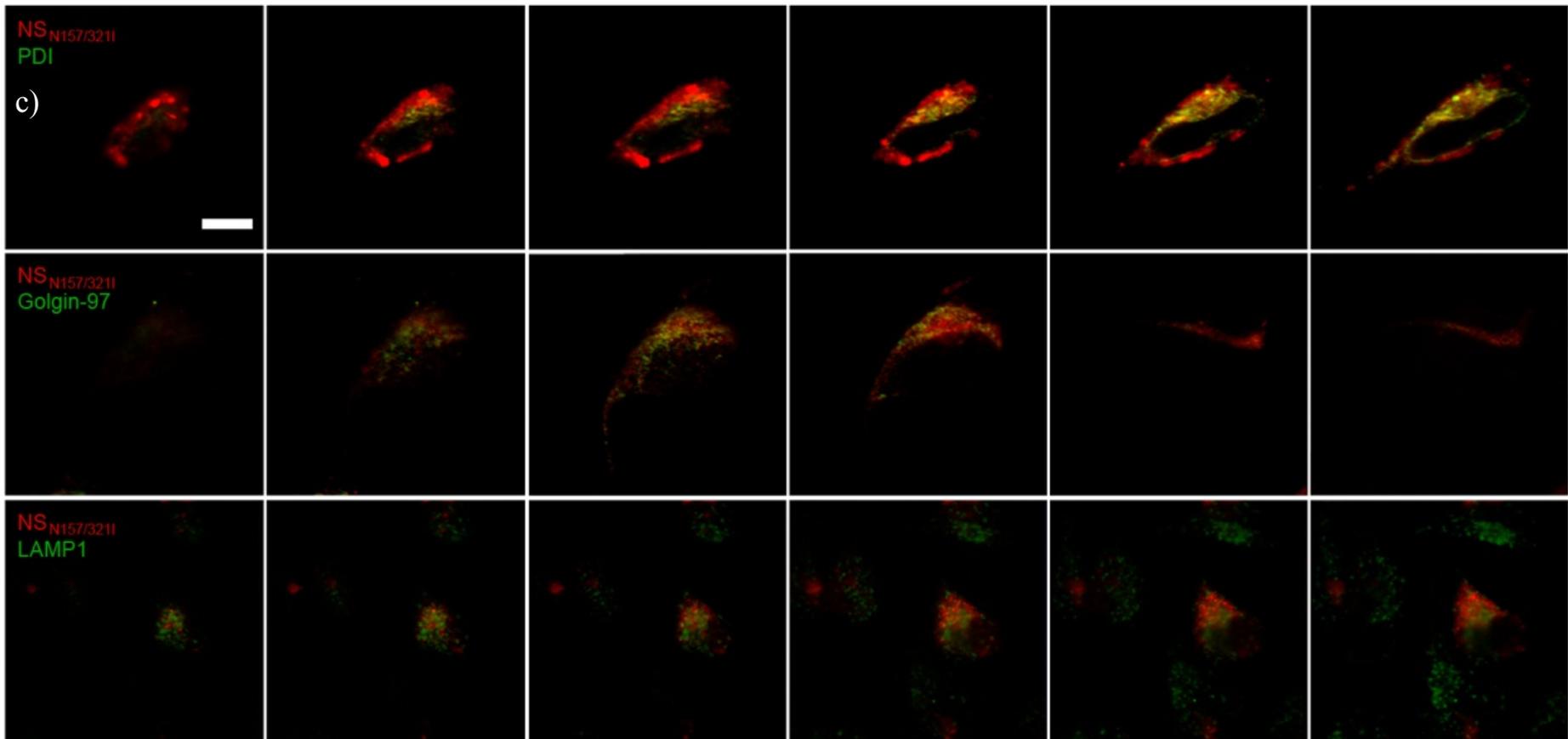


Abb. 13: Lokalisierung von NS_{N157/321I} in HEK-293 Zellen

a) Konfokale Mikroskopaufnahmen von NS_{N157/321I} Zellen nach Immunocytochemie für Neuroserpin (linke Reihe, rot, 1:50) und jeweils einem Zellorganell (mittlere Reihe, grün) sowie die dazugehörigen zusammengelegten Bilder (Merge) zeigen NS_{N157/321I} im ER (PDI, 1:300), im Golgi-Apparat (Golgin-97, 1:200), jedoch nicht in Lysosomen (LAMP-1, 1:150). Der Maßstab entspricht 10 µm.

b) Die Vergrößerung der in a) markierten Überlagerung zwischen rotem (Neuroserpin) und grünem (LAMP-1) Kanal zeigt kein NS_{N157/321I} in LAMP-1 positiven Vesikeln (Pfeil). Der Maßstab entspricht 5 µm.

c) Konfokale Z-stacks der in a) durchgeführten Färbungen (obere Zeile Neuroserpin + PDI, mittlere Zeile Neuroserpin + Golgin-97, untere Zeile Neuroserpin + LAMP-1). Der Maßstab entspricht 10 µm.



3.8. Glykosylierungsstatus und Sekretion von Neuroserpin *in vitro*

Aus dem durchgeführten Western Blot von Lysaten und Überständen von Zellen, die entweder NS_{w_t} oder eine der etablierten Glykomutanten des Neuroserpins mit entweder einer oder beiden fehlenden Man6P-Resten (NS_{N157I}, NS_{N321I}, NS_{N157;321I}) exprimierten, ließ sich auf die Bedeutung der Glykosylierung auf die Sekretion von Neuroserpin schließen (Abbildung 14). Die obere Bande im Medium von NS_{N157;321I} produzierenden HEK Zellen besaß eine Größe von 44 kDa. Dies entspricht der kalkulierten Größe von nicht glykosyliertem Neuroserpin abzüglich des 16 Aminosäuren langen Signalpeptids. Die von der durchgeführten Mutagenese nicht betroffene verbleibende Glykosylierungsstelle N401 wurde im Zellmodell somit nicht für die Glykosylierung verwendet. Die Glykosylierungsstellen N157 und N321 wurden gleichberechtigt genutzt. War eine dieser beiden Stellen mutiert, so wurde ein ein Mal glykosyliertes Neuroserpin sezerniert, welches eine Größe von 47 kDa besaß. Außerdem wurde ein bereits bekanntes Doppelbandenmuster von sämtlichen Neuroserpinformen unabhängig vom Glykosylierungsstatus im Überstand, nicht aber in den Zelllysaten beobachtet. Es handelte sich dabei wahrscheinlich um einen proteolytischen Prozess, der Neuroserpin extrazellulär um 4 kDa verkürzt, nachdem es mit einem seiner Partner interagiert hat (Makarova et al., 2003, Osterwalder et al., 2004). Sekretion und proteolytische Modifikation waren jeweils unabhängig von der Ausgangsglykosylierung von Neuroserpin.

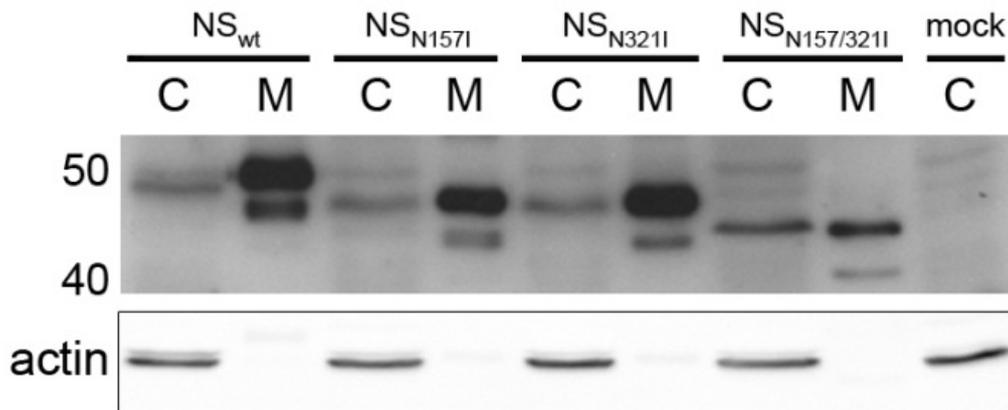


Abb.14: Expression verschiedener Neuroserpin-Glykomutanten in HEK-293 Zellen

Zellysate (C) und Überstände (M) von HEK-293 Zellen, die entweder humanes Wildtyp Neuroserpin (NS_{wt}) oder eine der Neuroserpin Glykomutanten (NS_{N157I} ; NS_{N321I} ; $NS_{N157/321I}$) exprimieren, wurden per Western Blot mit einem Antikörper gegen Neuroserpin untersucht. Das Zellysate von mock Zellen diente als Negativkontrolle, Aktin als Ladekontrolle. Alle Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

3.9. Charakterisierung der Glykosylierung von Neuroserpin *in vitro*

Nachdem gezeigt wurde, dass eine kleine Man6-phosphorylierte Neuroserpinfraktion in das Lysosom transportiert wurde, ergab sich die Frage, ob mannosereiches Neuroserpin auch sezerniert wird. Überstände und Zellysate von NS_{wt} oder $NS_{N157/321I}$ wurden entweder unbehandelt oder mit PNGase F bzw. Endo H behandelt und die Proben für eine SDS-Page Analyse vorbereitet. Die darauf folgende Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen Neuroserpin zeigte im Lysat von NS_{wt} Zellen eine Verschiebung der vorherrschenden 48 kDa Bande zugunsten einer 44 kDa Bande, sowohl nach Verdau mit PNGase F als auch mit Endo H (Abbildung 15). In Lysaten von $NS_{N157/321I}$ Zellen war bereits im unbehandelten Ansatz nur eine Bande von 44 kDa zu sehen, die nach der Behandlung mit einem der beiden Enzyme auch unverändert verblieb. Dies war eine weitere Bestätigung dafür, dass die Glykosylierungsstelle N401 von den Zellen nicht verwendet wurde. Die vorherrschende intrazelluläre Form von Wildtyp Neuroserpin bestand aus Endo H sensitiven mannosereichen Glykanen. Da der Hauptteil von Neuroserpin im späten Golgi-Apparat für die Sekretion modifiziert wird, indem die bis dahin vorhandenen Zuckerreste zu komplexen Zuckern umgestaltet werden, überraschte, dass Endo H resistente Formen an Wildtyp Neuroserpin nicht in einer zu detektierenden Konzentration im Zellysate vorzufinden waren. Anscheinend wurde Neuroserpin in seiner reifen Form zügig sezerniert, nachdem es prozessiert und

die Glykane modifiziert wurden. Im Medium war NS_{wt} in einer Doppelbandenform von 50 und 46 kDa vorzufinden. Diese Form war gegenüber einem Verdau mit PNGase F sensitiv, der eine Verschiebung der Banden zu einer Größe von 48 und 44 kDa bewirkte. Gegenüber einem Verdau mit Endo H dagegen war sezerniertes Neuroserpin resistent. NS_{N157/321I} im Medium ist unglykosyliert und wird durch zwei Banden von 44 and 40 kDa repräsentiert (Abbildung 15). Sezerniertes Neuroserpin enthielt nur komplexe Zucker und die Proteolyse von sezerniertem Neuroserpin tauchte unabhängig von dessen Glykosylierung auf (Abbildung 14 + 15).

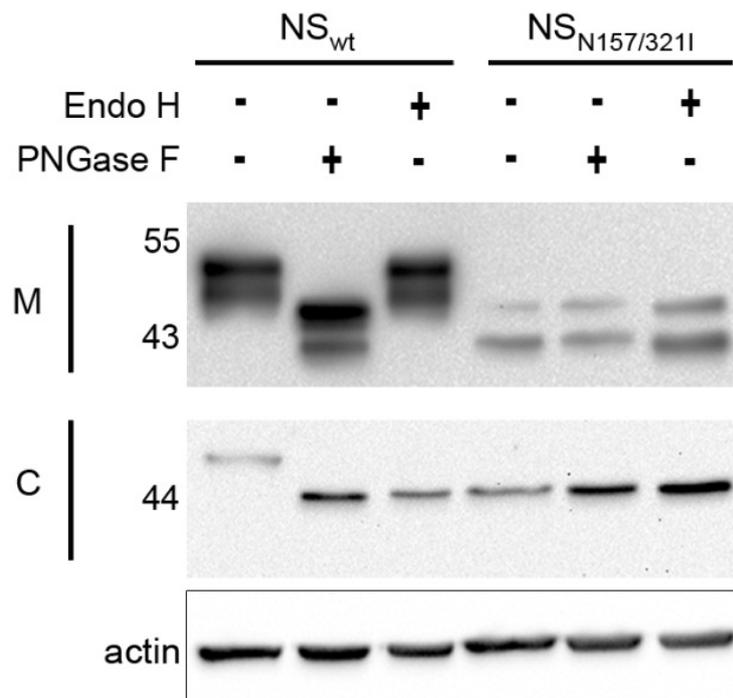


Abb.15: Untersuchung der Glykosylierung von Neuroserpin *in vitro*

Zellysate (C) und Überstände (M) von NS_{wt} oder NS_{N157/321I} exprimierenden HEK-293 Zellen wurden entweder mit (+) oder ohne (-) PNGase F oder Endo H behandelt. Nach einer SDS-Page, bei der die Proben aufgetrennt wurden, folgte eine Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen Neuroserpin (1:250) mit Aktin als Ladekontrolle. NS_{wt} lag im Medium komplex glykosyliert vor, da es sensitiv auf einen Verdau mit PNGase F, aber resistent auf einen Verdau mit Endo H reagierte. Für Lysate galt, dass NS_{wt} sowohl einem Verdau mit PNGase F als auch einem Verdau mit Endo H zugänglich war, während NS_{N157/321I} gegenüber dem Verdau mit beiden Enzymen resistent war. Alle Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

4. Diskussion

4.1. Fragestellung

Neuroserpin ist ein Serinproteaseinhibitor, der aus neuronalen Axonen sezerniert wird (Osterwalder et al., 1996). Dies geschieht vor allem im Neocortex und Hippocampus während der späten Entwicklungsphase des Gehirns und späteren strukturellen Veränderungen des Gehirns im Erwachsenenalter (Krueger et al., 1997). Neuroserpin spielt eine wichtige Rolle beim Lernen, dem Gedächtnis und in der synaptischen Plastizität (Hill et al., 2002, Galliciotti and Sonderegger, 2006, Hastings et al., 1997) Außerdem werden Neuroserpin neuroprotektive Eigenschaften zugesprochen, indem es den excitotoxisch vermittelten Zelltod inhibiert (Wu et al., 2010). Das Volumen von provozierten Schlaganfällen ist beispielsweise in Neuroserpin überexprimierenden Tieren geringer als in Wildtyp Mäusen (Cinelli et al., 2001).

Neuroserpin besitzt am N-Terminus ein 16 Aminosäuren langes Signalpeptid und galt lange als reines Sekretionsprotein (Berger et al., 1998, Ishigami et al., 2006). Als extrazelluläre Hauptinteraktionspartner von Neuroserpin sind bisher vor allem der gewebespezifische Plasminogenaktivator (t-PA) und die Urokinase (u-PA) entdeckt (Yepes et al., 2000, Krueger et al., 1997, Osterwalder et al., 1998). Da t-PA eine wichtige Rolle für die synaptische Plastizität und die Entwicklung des Gedächtnisses spielt (Qian et al., 1993, Frey et al., 1996, Calabresi et al., 2000), lassen sich einige Funktionen von Neuroserpin mit der extrazellulären Interaktion mit t-PA erklären. Es gibt jedoch auch die Beobachtung, dass der t-PA-Spiegel in Gehirnen von Neuroserpin-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Gehirnen von Neuroserpin exprimierenden Mäusen nicht wesentlich steigt (Madani et al., 2003). Auch sind t-PA unabhängige Funktionen von Neuroserpin gezeigt (Lee et al., 2008). Zudem wurde ein 130 kDa großer Komplex bestehend aus Neuroserpin und einem unbekanntem Protein innerhalb von Hypophysenzellen in Krallenfröschen entdeckt (de Groot and Martens, 2005, Ragg, 2007). Die beschriebenen Beobachtungen lassen vermuten, dass Neuroserpin andere wichtige Zielproteine besitzen könnte, die sich intrazellulär befinden.

Eine weitere Arbeitsgruppe hat in humanen Gehirnen mit Hilfe eines immobilisierten Mannose-6-Phosphat-Rezeptors und einer nachfolgenden Massenspektrometrie nach lysosomalen Proteinen gesucht und dabei zwei Mannose-6-Phosphorylierungen im Neuroserpin entdeckt (Sleat et al., 2006). Da die Mannose-6-Phosphorylierung eines

Proteins im Regelfall die Direktion des Proteins in das Lysosom bewirkt (Braulke and Bonifacino, 2009), wurde vermutet, dass Neuroserpin eine lysosomale Serinprotease inhibieren könnte. Im Einklang zu der Vermutung steht die Entdeckung, dass der 130 kDa große Komplex aus Neuroserpin und einem unbekanntem intrazellulären Protein, der in Hypohysen von Krallenfröschen gefunden wurde, nur in einem sauren Milieu mit einem pH-Wert von ca. 5,2 stabil ist (de Groot and Martens, 2005). Lysosomen sind mit einem intraorganellen pH-Wert < 5 das einzige Zellkompartiment, das für die beschriebene Interaktion in Frage kommt. Die bisher für Neuroserpin *in vitro* beschriebenen Interaktionspartner t-PA, u-PA, Plasmin und Thrombin haben dagegen basische pI-Werte von 7,3–8,2 (de Groot and Martens, 2005) und kommen daher nicht als gesuchtes Protein im 130 kDa-Komplex in Frage.

Aus dem veröffentlichten Vorwissen um Neuroserpin ergab sich unsere Arbeitshypothese (1.9.).

Diese Hypothese sollte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* geprüft werden. Für den *in vivo* Teil standen einerseits C57BL/6 Mäuse (Nswt), andererseits transgene Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund, die humanes Neuroserpin überexprimieren (Tg(NS)) (Galliciotti et al., 2007), zur Verfügung. Die mit Hilfe eines Man6P-Rezeptors nachgewiesene Man6-Phosphorylierung von Neuroserpin in humanem Hirngewebe (Sleat et al., 2006) wurde durch eine Man6P-Affinitätschromatographie mit dem neu entwickelten Antikörperfragment scFv M6P-1, das hochspezifisch die Phosphorylierung von Mannose an Position 6 erkennt (Muller-Loennies et al., 2010), an unseren Mäusen untersucht. Weiterhin wurde über Immunhistochemie und Immunoelektronenmikroskopie morphologisch nach Neuroserpin in den neuronalen Lysosomen der verwendeten Mäuse gesucht.

Der *in vitro* Teil bestand aus einem Zellmodell, bei dem HEK-293 Zellen stabil mit humanem Neuroserpin transfiziert wurden. Auch hier erfolgte eine Man6P-Affinitätschromatographie sowie eine morphologische Untersuchung per Immunzytochemie.

Die Untersuchung der Glykosylierungen des Neuroserpins erfolgte einerseits per enzymatischem Verdau mit PNGase F und Endo H sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Zudem wurden erstmals Glykomutanten von Neuroserpin *in vitro* in HEK-293 Zellen etabliert, bei denen eine der beiden oder beide Glykosylierungen an den vermuteten Man6P-Stellen nicht mehr möglich war. Per Immunzytochemie konnte festgestellt

werden, welche Rolle die mutierten Glykosylierungen bei dem Transport von Neuroserpin spielen.

Im Folgenden sollen die Einzelergebnisse diskutiert werden.

4.2. Mannose-6-Phosphorylierung und lysosomale Lokalisierung von Neuroserpin *in vivo*

Es konnte per PNGase F Verdau bestätigt werden, dass Neuroserpin *in vivo* in wt und Tg(NS) Mäusen in einer glykosylierten Form vorliegt (Abbildung 2a)). Dieses Ergebnis genauso wie die Tatsache, dass Tg(NS) Mäuse wesentlich mehr Neuroserpin exprimieren als wt Mäuse, waren bereits bekannt (Galliciotti et al., 2007). Der Endo H Verdau dagegen zeigte, dass Neuroserpin sowohl in wt als auch in Tg(NS) über zwei mannosereiche Glykane verfügt (Abbildung 2b)). Diese sind unerlässlich für die Man6-Phosphorylierung eines Proteins (Pohl et al., 2009, Makrypidi et al., 2011) (1.7.). Andererseits sind alle Proteine, die aus dem ER entlassen werden, mannosereich und die Mehrzahl von ihnen wird danach im Golgi-Apparat posttranslational modifiziert, indem Mannosereste entfernt und komplexe Zucker angebracht werden (Kornfeld and Kornfeld, 1985). Ein Hauptteil von Neuroserpin wiederum konnte selbst nach vier Stunden nicht von Endo H verdaut werden (Abbildung 2b)). Es könnte sein, dass zu wenig Enzym verwendet wurde und der Verdau nicht vollständig war; um dies auszuschließen wurde allerdings der Endo H Verdau von denselben Proben auch auf Cathepsin D untersucht und es konnte gezeigt werden, dass der Verdau bereits nach einer Stunde vollständig war. Bei dem größten Anteil an Neuroserpin, der gegenüber einem Endo H Verdau resistent war, handelte es sich wahrscheinlich um im Golgi-Apparat fertig modifiziertes, komplex glykosyliertes Protein, das sich intrazellulär auf dem Weg zur Sekretion befand und um bereits sezerniertes Neuroserpin. Bei dem Endo H sensiblen Neuroserpin lässt sich nicht differenzieren, ob es sich um unreifes Neuroserpin handelt, dem die Mannosereste noch abgespalten werden und das noch komplex glykosyliert wird, um dann sezerniert zu werden oder um nahezu reifes, mannosereiches Neuroserpin, das noch im Golgi-Apparat Man6-phosphoryliert werden muss. Da Neuroserpin vor allem ein Sekretionsprotein ist und die weiteren Ergebnisse gezeigt haben, dass nur ein geringer Anteil Man6-phosphoryliert ist, wird es sich bei dem Endo H sensitiven Neuroserpin vor allem um unreifes Neuroserpin handeln. Dass

sich darunter jedoch auch mannosereiches Neuroserpin befindet, welches für den anschließenden Man6P abhängigen Transport zum Lysosom bestimmt ist, ist aufgrund der weiteren Erkenntnisse dieser Arbeit anzunehmen.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass Neuroserpin aus den Hirnhomogenaten von wt und Tg(NS) Mäusen an die Säule der Man6P-Affinitätschromatographie gebunden hat. Es konnte die bereits vermutete Man6-Phosphorylierung von humanem Neuroserpin (Sleat et al., 2006), wie es auch in Tg(NS) Mäusen exprimiert wird, mit einer neuen Methode bestätigt werden. In der gleichen Arbeit von 2006 kann eine Man6-Phosphorylierung von murinem Neuroserpin weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Die von uns eingesetzten C57BL/6 Mäuse (wt) exprimieren ausschließlich murines Neuroserpin und auch dieses war nach Man6P-Affinitätschromatographie Man6-phosphoryliert. Welche physiologische Bedeutung die Man6-Phosphorylierung eines Neuroserpinanteils von 0,13–0,45 % hat, lässt sich kritisch hinterfragen. Dass nur ein sehr geringer Anteil von Neuroserpin überhaupt Man6P abhängig in das Lysosom transportiert werden kann, war aus dem Wissensstand über Neuroserpin, das bisher als reines Sekretionsprotein gesehen wurde, bekannt und auch so in unserer Arbeitshypothese formuliert. *In vivo* konnten wir nicht endgültig klären, ob Neuroserpin Man6P abhängig in das Lysosom transportiert wird; dafür müssten die Man6P-Phosphorylierungen von Neuroserpin entfernt und eine Lokalisierung zwischen Wildtyp und mutiertem Neuroserpin im Lysosom morphologisch verglichen werden. Solche Mauslinien herzustellen wäre sehr aufwändig und nicht gerechtfertigt, da ein *in vitro* Zellmodell keine Tiere erfordert und auch über viel Aussagekraft verfügt. *In vivo* konnten wir zumindest zeigen, dass Neuroserpin Man6-phosphoryliert ist. Morphologisch wurde untersucht, ob Neuroserpin in Lysosomen von Neuronen in Tg(NS) Mäusen vorzufinden war. Die Immunhistochemie konnte eine Kollokalisierung zwischen dem Lysosomenmarker Cathepsin D und Neuroserpin zeigen. Einige typische Neurone, bei denen diese Kollokalisierung zu sehen ist, sind in Abbildung 4 gezeigt. Immuno-elektronenmikroskopisch konnte HRP-markiertes Neuroserpin vor allem im ER von Neuronen aus Tg(NS) Hirnen gefunden werden. In einigen wenigen Schnitten war Neuroserpin in vesikulären, von einer Membran umgebenen Zellorganellen umgeben, die auch von der Größe zu Lysosomen (Durchmesser: 100-1000 nm) passen (Abbildung 5). Somit konnte mit zwei verschiedenen Methoden gezeigt werden, dass Neuroserpin *in vivo* im Lysosom vorzufinden war. Ob dieser Prozess Man6P abhängig

ist, konnte nicht geklärt werden, da beschrieben ist, dass extrazelluläres Neuroserpin auch über LRP in die Zellen aufgenommen und ein anschließender Abbau im Lysosom vermutet wird (Makarova et al., 2003). Um also den Man6P abhängigen Transport von Neuroserpin in das Lysosom nachzuweisen wie er aus den *in vivo* Daten angenommen wurde, war es notwendig ein *in vitro* Zellmodell zu etablieren.

4.3. Mannose-6-Phosphorylierung und lysosomale Lokalisierung von Neuroserpin *in vitro*

HEK-293 Zellen wurden stabil mit Neuroserpin-cDNA transfiziert; die Expression wurde per Western Blot mit einem Antikörper gegen Neuroserpin bestätigt (Abbildung 9). Intrazelluläres Neuroserpin war nur in einer sehr geringen Menge vorhanden, während auch in unserem Zellmodell Neuroserpin vor allem sezerniert wurde. Dementsprechend zeigten die anschließenden Immunfluoreszenzaufnahmen Neuroserpin vor allem in den Zellorganellen, in denen sich Sekretionsproteine befinden. Nachdem Sekretionsproteine an der äußeren Membran des rauen ER synthetisiert werden, werden sie bereits im ER vorglykosyliert. In Transportvesikeln gelangen sie in den Golgi-Apparat, wo die Zucker modifiziert werden und die Proteine in Sekretionsvesikeln zur Zellmembran transportiert werden (1.6.). Dementsprechend verwundert nicht, dass auch in unserem Zellmodell Neuroserpin vor allem im ER und Golgi-Apparat vorzufinden war (Abbildung 10), wie es auch schon in einem anderen Neuroserpin-Zellmodell beschrieben ist (Miranda and Lomas, 2006).

Mit unseren Aufnahmen haben wir zusätzlich die bisher nicht gezeigte Lokalisierung von Wildtyp Neuroserpin in Lysosomen demonstriert (Abbildung 10). Inwieweit dies einem in unserer Fragestellung formulierten Man6P abhängigen Transport und nicht etwa dem vermuteten Abbau von extrazellulärem Neuroserpin entspricht (Makarova et al., 2003), versuchten wir mit zwei weiteren Experimenten zu klären.

Zunächst führten wir die bereits im *in vivo* Teil beschriebene Man6P-Affinitätschromatographie mit unseren Zellen als Ausgangsmaterial durch. Der anschließende Neuroserpin Western Blot (Abbildung 11) zeigte, dass eine geringe Neuroserpinfraktion im Man6P-Eluat und somit Man6-phosphoryliert war. Dass es sich dabei um spezifisch gebundenes Neuroserpin und nicht um falsch oder an ein anderes Man6-phosphoryliertes Protein gebundenes Neuroserpin handelte, wurde durch

adäquate Kontrollen überprüft. Auf der einen Seite ist das verwendete Antikörperfragment hochspezifisch für Man6P wie es eine Überprüfung mit strukturell ähnlichen Gruppen gezeigt hat (Muller-Loennies et al., 2010), auf der anderen Seite wurde die Säule wie beschrieben (2.3.7.) zehnmal nach dem flow through ausgewaschen, bevor die Man6P enthaltenden Proteine mit Man6P eluiert wurden. Falsch gebundenes Neuroserpin wäre mit großer Sicherheit nach so vielen Waschschritten von der Säule entfernt worden (Abbildung 11). Von daher ist intrazelluläres Neuroserpin mit großer Sicherheit zu einem geringen Anteil in unserem Zellmodell Man6-phosphoryliert. Nun musste geprüft werden, ob diese Man6-Phosphorylierung ursächlich für den beobachteten Transport von Neuroserpin in das Lysosom ist (Abbildung 10). Die beiden mutmaßlichen Man6P-Stellen am Neuroserpin wurden per Site-Directed Mutagenese (2.2.11.) mutiert und dieses Genprodukt erneut stabil in HEK-293 Zellen transfiziert. Die Expression wurde erneut per Western Blot mit einem Antikörper gegen Neuroserpin geprüft (Abbildung 12) und nachdem festgestellt wurde, dass das mutierte Protein stabil synthetisiert und sezerniert wird sowie über die korrekte Größe verfügt, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (Abbildung 13). Diese offenbarten, dass das unglykosylierte Neuroserpin NS_{N157/321I} in der Tat den beschriebenen Sekretionspfad über das ER und Golgi-Apparat durchläuft und dann sezerniert werden kann. Allerdings konnten wir mit dem Konfokalmikroskop kein NS_{N157/321I} in lysosomalen Vesikeln nachweisen. Somit liegt es nahe, dass der beobachtete Transport von Wildtyp Neuroserpin in das Lysosom über eine Man6-Phosphorylierung im cis-Golgi und eine anschließende Bindung an den Man6P-Rezeptor verläuft (Pohl et al., 2009, Braulke and Bonifacino, 2009). Dieser Transport wird nicht mehr möglich, wenn die N-Glykosylierungsstellen wie in NS_{N157/321I} nicht mehr vorhanden sind, an denen die beschriebenen Modifikationen im Golgi-Apparat durchgeführt werden sollen. Damit ist auch wahrscheinlich, dass das im Lysosom beobachtete Wildtyp Neuroserpin nicht über LRP dorthin gelangt ist, sondern über eine Bindung an den Man6P-Rezeptor. Denn dann sollte auch NS_{N157/321I} über LRP aufgenommen werden und in Lysosomen zu sehen sein. Dies war nicht der Fall. Zwar ist einerseits gezeigt, dass extrazelluläres Neuroserpin über LRP aufgenommen wird und andererseits ist auch über den Nachweis eines sauren Abbauprodukts gezeigt, dass so aufgenommenes Neuroserpin im Lysosom abgebaut wird (Makarova et al., 2003). Dieselbe Arbeit konnte aber keinen morphologischen Nachweis für Neuroserpin im

Lysosom liefern. Somit ist wahrscheinlich, dass Neuroserpin auch in unserem Zellmodell über LRP aufgenommen und danach eventuell für den Abbau zum Lysosom transportiert wird. Allerdings findet der Abbau durch lysosomale Enzyme ziemlich schnell statt und hydrolysierte Neuroserpinfragmente werden rasch ausgeschleust (Makarova et al., 2003), so dass über LRP aufgenommenes Neuroserpin im Lysosom morphologisch kaum nachweisbar ist. Bei dem Wildtyp Neuroserpin, das von uns im Lysosom nachgewiesen wurde, handelt es sich somit höchstwahrscheinlich um Man6-phosphoryliertes Neuroserpin, welches den Transportweg für lysosomale Proteine beschreitet.

4.4. Glykosylierung von Neuroserpin

Die Glykosylierung von Neuroserpin wurde mit Hilfe eines Zellmodells untersucht, bei dem HEK-293 Zellen entweder Wildtyp Neuroserpin oder ein „glykomutiertes“ Neuroserpin, bei dem eine der beiden oder beide potentiell Man6P enthaltenden Glykosylierungsstellen N157 und N321 zu einem Isoleucin mutiert wurden, stabil exprimierten. Erste Erkenntnisse über die Glykosylierung von Neuroserpin ließen sich bereits aus dem Western Blot von Lysaten und Überständen der verwendeten Zellen gewinnen (Abbildung 14). Interessanterweise wurden sämtliche Glykomutanten trotz fehlender Glykosylierungen von den Zellen stabil synthetisiert und sezerniert. Intrazellulär war immer nur eine Bande zu sehen. Jede Neuroserpinmutante wurde von den Zellen in einer dominanten Glykosylierungsform synthetisiert, obwohl bis zu drei Glykosylierungsstellen zur Verfügung standen und somit auch unterschiedliche Glykosylierungsmuster vorstellbar wären. Da das Molekulargewicht von 44 kDa der intrazellulären Form von NS_{N157/321I} unglykosyliertem Neuroserpin entspricht, wird die dritte, nicht mutierte N-Glykosylierungsstelle N401 in unserem Zellmodell von den Zellen nicht genutzt. Bisherige Sequenzanalysen und Untersuchungen durch Massenspektrometrie sagten eine gleichberechtigte Benutzung der N-Glykosylierungsstellen von Neuroserpin an den Positionen N157, N321 und N401 voraus (Hill et al., 2001, Yazaki et al., 2001). Unsere Ergebnisse widerlegen diese Voraussage zumindest für unser Zellmodell. Wenn NS_{N157/321I} intrazellulär unglykosyliert in einer Größe von 44 kDa vorliegt, so ergibt sich weiter aus Abbildung 14, dass NS_{N157I} und NS_{N321I} intrazellulär jeweils einfach glykosyliert in

einer Größe von 47 kDa synthetisiert werden, während intrazelluläres Wildtyp Neuroserpin eine Größe von 50 kDa hat und zweifach glykosyliert ist. Extrazellulär lag Neuroserpin immer in einem Doppelbandenmuster vor. Die obere Bande war dabei entweder genauso groß wie die intrazelluläre Form (NS_{N157/3211}) oder um 1-2 kDa größer (NS_{wt}, NS_{N157L}, NS_{N3211}), was mit der Modifizierung der Glykane im Golgi-Apparat zu erklären ist. Die untere Bande dagegen kann nur aus einem extrazellulären proteolytischen Prozess stammen. Denn einerseits ist dieses extrazelluläre Neuroserpin kleiner als intrazellulär synthetisiertes Neuroserpin, womit es also nicht von Zellen sezerniert wurde, sondern erst postsekretorisch entstand. Und andererseits ist ja bereits 44 kDa großes Neuroserpin unglykosyliert, sodass die kleinere Form von 40 kDa nur durch eine kürzere Aminosäuresequenz erklärt werden kann. Auch die ein- und zweifach glykosylierten Formen von Neuroserpin unterlagen diesem extrazellulären, proteolytischen Prozess, der das Protein jeweils um 4 kDa verkürzte.

Bei der weiteren Untersuchung der Glykosylierung von Neuroserpin im Zellmodell fiel auf, dass intrazelluläres Wildtyp Neuroserpin gegenüber einem Verdau mit Endo H und PNGase F sensibel war, während es sich bei bereits sezerniertem Neuroserpin um PNGase F sensibles und Endo H resistentes komplex glykosyliertes Neuroserpin handelte. Dass es sich bei der intrazellulären Form genauso wie bereits *in vivo* beschrieben (4.2.) größtenteils um Neuroserpinvorstufen aus dem ER handelt, ist anzunehmen. Ein minimaler mannosereicher Anteil, der später Man6-phosphoryliert wird und in das Lysosom transportiert wird, sollte auch darunter sein. Fertig modifiziertes, Endo H resistentes Neuroserpin wird rasch sezerniert und ist daher nicht mehr im Zelllysate zu finden. Komplex glykosyliertes, sezerniertes Neuroserpin kann entsprechend nicht mehr über den Man6P-Rezeptor an der Zellmembran internalisiert werden, was mit der Erkenntnis vereinbar ist, dass extrazelluläres Neuroserpin über LRP internalisiert wird (Makarova et al., 2003).

4.5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die N-Glykosylierung und der Transport von Neuroserpin untersucht. Wir konnten zeigen, dass zwei N-Glykosylierungen intrazellulär mannosereiche Oligosaccharide enthalten, die für eine anschließende Man6-Phosphorylierung von Proteinen notwendig sind. Diese Erkenntnis steht im

Einklang zu einer vorangegangenen Studie, die eine Man6-Phosphorylierung von Neuroserpin unter Verwendung von Massenspektrometrie vermutete (Sleat et al., 2006). Unsere Daten zeigen weiterhin, dass Man6P-Reste Neuroserpin in das Lysosom leiten, während das Fehlen an mannosereichen Oligosacchariden zu einem Fehlen von Neuroserpin im Lysosom führt. Das passt zu Ergebnissen, die eine Interaktion zwischen Neuroserpin und einer intrazellulären Zielprotease postulieren (de Groot and Martens, 2005). Eine saure Umgebung unterstützt dabei diese Interaktion (de Groot and Martens, 2005). Da Lysosomen die einzigen Zellorganellen mit einem sauren pH-Wert von ca. 4,5–5 sind, erscheint eine Interaktion von Neuroserpin mit einer lysosomalen Protease plausibel. Somit hätte Neuroserpin sowohl bei intra- als auch extrazellulären Prozessen eine Bedeutung, womit einige beobachteten Prozesse in neuroserpindefizienten Mäusen oder Zellen, die nicht an t-PA gebunden sein können, erklärt werden könnten (Wu et al., 2010, Madani et al., 2003, Lee et al., 2008). Deswegen wären weitere Studien notwendig, um Interaktionen zwischen Neuroserpin und lysosomalen Proteasen zu identifizieren.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse einen neuartigen Man6P abhängigen, intrazellulären Transportweg für Neuroserpin in das Lysosom. Obwohl das in das Lysosom transportierte Neuroserpin nur eine kleine Fraktion am gesamt synthetisierten Neuroserpin darstellt und der Hauptanteil von Neuroserpin dem Sekretionspfad folgt, glauben wir, dass eine mögliche lysosomale Funktion von Neuroserpin weiterführenden Untersuchungen verdient.

5. Zusammenfassung

Neuroserpin ist ein Protein aus der Familie der Serinproteaseinhibitoren, das aus neuronalen Axonen während der späten Entwicklungsphase des Gehirns sezerniert wird und eine wichtige Rolle bei der Reifung des Gehirns und der synaptischen Plastizität spielt.

Neue Erkenntnisse deuten daraufhin, dass Neuroserpin nicht wie bisher postuliert ein reines Sekretionsprotein ist, sondern auch intrazelluläre Funktionen erfüllt, die über eine Markierung mit Mannose-6-Phosphat (Man6P), dem Erkennungsmolekül für lysosomale Enzyme, vermittelt sein könnten.

In dieser Arbeit konnte sowohl *in vivo* in einem Mausmodell mit Neuroserpin überexprimierenden Mäusen als auch *in vitro* in einem Zellkulturmodell mit Neuroserpin exprimierenden HEK-293 Zellen mit der Man6P-Affinitätschromatographie gezeigt werden, dass Neuroserpin ein Mannose-6-phosphoryliertes Protein ist.

Die Bedeutung dieser Modifikation für den intrazellulären Transport des Proteins konnte morphologisch im Mausgewebe per Immuno-Elektronenmikroskopie und Immunhistochemie sowie in Zellkultur mit Hilfe von Immunocytochemie gezeigt werden. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wurden so geringe Mengen an Neuroserpin im Lysosom entdeckt.

Erstmals wurden Punktmutationen an den N-Glykosylierungsstellen N157 und N321 erstellt, an denen eine Man6-Phosphorylierung postuliert wurde. In Lysosomen von HEK-293 Zellen, die Neuroserpin exprimierten, das nicht mehr Man6-phosphoryliert werden kann, konnte immunozytochemisch kein Neuroserpin nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass der Transport von Neuroserpin in das Lysosomen Man6-Phosphat abhängig ist.

Die Tatsache, dass Neuroserpin einen weiteren, bisher nicht bekannten Transportweg nutzt, legt nahe, nach einer Serinprotease im Lysosom zu suchen, die von Neuroserpin gehemmt wird.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AC	Affinitätschromatographie
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Asn	Asparagin
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C-Terminus	Carboxyterminus einer Proteinkette
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
dd	bidestilliert
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhancedchemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
Endo H	Endo-β-N-acetylglucosaminidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Foetal Bovine Serum
FENIB	Familial Encephalopathy with Neuroserpin Inclusion Bodies
g	Gramm oder Normal-Fallbeschleunigung

GDP	Guanosindiphosphat
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
h	Stunde
HEK	Human Embryonic Kidney
HRP	Meerrettichperoxidase
I	Isoleucin
IH	Immunhistochemie
IZ	Immunozytochemie
k	kilo
K	Lysin
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAMP	lysosome-associated membrane protein
LB	Luria Broth
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related protein
m	milli oder Meter
M	molar
mA	Milliampere
Man	Mannose
Man6P	Mannose-6-Phosphat
min	Minute
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	nano
N	Asparagin
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
N-Glykosilierung	Glykosylierung eines Proteins an einem Asparagin
NP-40	Nonidet P-40
NS	Neuroserpin
N-Terminus	Aminoterminus einer Proteinkette

NTP	Nukleosidtriphosphat
O-Glykosilierung	Glykosylierung eines Proteins an einem Serin oder Threonin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Protein Disulfid Isomerase
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PI	Protease- und Phosphataseinhibitoren
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
PNS	Peripheres Nervensystem
R	Arginin
RCL	reactive center loop
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
Ser	Serin
SRP	Signalerkennungspartikel
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
t-PA	gewebespezifische Plasminogenaktivator
UDP	Uridindiphosphat
UK	Verinigtes Königreich
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
u-PA	Urokinase
USA	Vereinigte Staaten von Amerika

UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Glykosylierung von Neuroserpin	39
Abbildung 2: Charakterisierung der Glykosylierung von Neuroserpin <i>in vitro</i>	41
Abbildung 3: Man6P-Affinitätschromatographie für Neuroserpin <i>in vivo</i>	42
Abbildung 4: Immunhistochemie von Tg(NS) Hirngewebe	42
Abbildung 5: Immuno-Elektronenmikroskopie von Tg(NS) Hirngewebe.....	43
Abbildung 6: Agarosegelelektrophorese vom Ausgangsplasmid für folgende Mutagenesen und Transfektionen	44
Abbildung 7: Agarosegelelektrophorese von mutagenisierten Neuroserpin-Plasmiden	45
Abbildung 8: Agarosegelelektrophorese von Neuroserpin-Plasmiden zur Zelltransfektion	46
Abbildung 9: Expression von Neuroserpin in HEK-293 Zellen	47
Abbildung 10: Lokalisierung von Wildtyp Neuroserpin in HEK-293 Zellen.....	50
Abbildung 11: Man6P-Affinitätschromatographie für Neuroserpin <i>in vitro</i>	52
Abbildung 12: Expression von NSN157/321I in HEK-293 Zellen.....	53
Abbildung 13: Lokalisierung von NSN157/321I in HEK-293 Zellen	55
Abbildung 14: Expression verschiedener Neuroserpin-Glykomutanten in HEK-293 Zellen	57
Abbildung 15: Untersuchung der Glykosylierung von Neuroserpin <i>in vitro</i>	58

6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequenzierungs-Primer für Neuroserpin	13
Tabelle 2: Mutagenese-Primer für Neuroserpin	13
Tabelle 3: Restriktionsendonukleasen	14
Tabelle 4: Endoglykosidasen	14
Tabelle 5: Primärantikörper	14
Tabelle 6: Sekundärantikörper	15
Tabelle 7: Chemikalien	16
Tabelle 8: Puffer und Lösungen	18
Tabelle 9: Verwendete Kits	22
Tabelle 10: Verwendete Bakterienstämme	22
Tabelle 11: Verwendete Zelllinien	22
Tabelle 12: Verwendete Mäuselinien	22
Tabelle 13: Verbrauchsmittel	23
Tabelle 14: Geräte	23
Tabelle 15: PCR-Programm	29
Tabelle 16: Zusammensetzung von SDS-Gelen	32

7. Literaturverzeichnis

- BELORGEY, D., IRVING, J. A., EKEOWA, U. I., FREEKE, J., ROUSSEL, B. D., MIRANDA, E., PEREZ, J., ROBINSON, C. V., MARCINIAK, S. J., CROWTHER, D. C., MICHEL, C. H. & LOMAS, D. A. 2011. Characterisation of serpin polymers in vitro and in vivo. *Methods*, 53, 255-66.
- BELORGEY, D., SHARP, L. K., CROWTHER, D. C., ONDA, M., JOHANSSON, J. & LOMAS, D. A. 2004. Neuroserpin Portland (Ser52Arg) is trapped as an inactive intermediate that rapidly forms polymers: implications for the epilepsy seen in the dementia FENIB. *Eur J Biochem*, 271, 3360-7.
- BERGER, P., KOZLOV, S. V., KRUEGER, S. R. & SONDEREGGER, P. 1998. Structure of the mouse gene for the serine protease inhibitor neuroserpin (PI12). *Gene*, 214, 25-33.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRADSHAW, C. B., DAVIS, R. L., SHRIMPTON, A. E., HOLOHAN, P. D., REA, C. B., FIEGLIN, D., KENT, P. & COLLINS, G. H. 2001. Cognitive deficits associated with a recently reported familial neurodegenerative disease: familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies. *Arch Neurol*, 58, 1429-34.
- BRAULKE, T. & BONIFACINO, J. S. 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 605-14.
- CALABRESI, P., NAPOLITANO, M., CENTONZE, D., MARFIA, G. A., GUBELLINI, P., TEULE, M. A., BERRETTA, N., BERNARDI, G., FRATI, L., TOLU, M. & GULINO, A. 2000. Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *Eur J Neurosci*, 12, 1002-12.
- CINELLI, P., MADANI, R., TSUZUKI, N., VALLET, P., ARRAS, M., ZHAO, C. N., OSTERWALDER, T., RULICKE, T. & SONDEREGGER, P. 2001. Neuroserpin, a neuroprotective factor in focal ischemic stroke. *Mol Cell Neurosci*, 18, 443-57.
- COUTELIER, M., ANDRIES, S., GHARIANI, S., DAN, B., DUYCKAERTS, C., VAN RIJCKEVORSEL, K., RAFTOPOULOS, C., DECONINCK, N., SONDEREGGER, P., SCARAVILLI, F., VIKKULA, M. & GODFRAIND, C. 2008. Neuroserpin mutation causes electrical status epilepticus of slow-wave sleep. *Neurology*, 71, 64-6.
- CUOZZO, J. W. & SAHAGIAN, G. G. 1994. Lysine is a common determinant for mannose phosphorylation of lysosomal proteins. *J Biol Chem*, 269, 14490-6.
- DAVIES, M. J. & LOMAS, D. A. 2008. The molecular aetiology of the serpinopathies. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 1273-86.
- DAVIES, M. J., MIRANDA, E., ROUSSEL, B. D., KAUFMAN, R. J., MARCINIAK, S. J. & LOMAS, D. A. 2009. Neuroserpin Polymers Activate NF- κ B by a Calcium Signaling Pathway That Is Independent of the Unfolded Protein Response. *J Biol Chem*, 284, 18202-9.

- DAVIS, R. L., HOLOHAN, P. D., SHRIMPTON, A. E., TATUM, A. H., DAUCHER, J., COLLINS, G. H., TODD, R., BRADSHAW, C., KENT, P., FEIGLIN, D., ROSENBAUM, A., YERBY, M. S., SHAW, C. M., LACBAWAN, F. & LAWRENCE, D. A. 1999a. Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies. *Am J Pathol*, 155, 1901-13.
- DAVIS, R. L., SHRIMPTON, A. E., CARRELL, R. W., LOMAS, D. A., GERHARD, L., BAUMANN, B., LAWRENCE, D. A., YEPES, M., KIM, T. S., GHETTI, B., PICCARDO, P., TAKAO, M., LACBAWAN, F., MUENKE, M., SIFERS, R. N., BRADSHAW, C. B., KENT, P. F., COLLINS, G. H., LAROCCA, D. & HOLOHAN, P. D. 2002. Association between conformational mutations in neuroserpin and onset and severity of dementia. *Lancet*, 359, 2242-7.
- DAVIS, R. L., SHRIMPTON, A. E., HOLOHAN, P. D., BRADSHAW, C., FEIGLIN, D., COLLINS, G. H., SONDEREGGER, P., KINTER, J., BECKER, L. M., LACBAWAN, F., KRASNEWICH, D., MUENKE, M., LAWRENCE, D. A., YERBY, M. S., SHAW, C. M., GOOPTU, B., ELLIOTT, P. R., FINCH, J. T., CARRELL, R. W. & LOMAS, D. A. 1999b. Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. *Nature*, 401, 376-9.
- DE GROOT, D. M. & MARTENS, G. J. 2005. Expression Of Neuroserpin Is Linked To Neuroendocrine Cell Activation. *Endocrinology*.
- DELBRUCK, R., DESEL, C., VON FIGURA, K. & HILLE-REHFELD, A. 1994. Proteolytic processing of cathepsin D in prelysosomal organelles. *Eur J Cell Biol*, 64, 7-14.
- ELLIOTT, P. R., ABRAHAMS, J. P. & LOMAS, D. A. 1998. Wild-type alpha 1-antitrypsin is in the canonical inhibitory conformation. *J Mol Biol*, 275, 419-25.
- FREY, U., MULLER, M. & KUHL, D. 1996. A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *J Neurosci*, 16, 2057-63.
- GALLICIOTTI, G., GLATZEL, M., KINTER, J., KOZLOV, V. K., CINELLI, P., RÜLICHE, T. & SONDEREGGER, P. 2007. Accumulation of mutant Neuroserpin precedes development of clinical symptoms in familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies. *Am J Pathol*, in press.
- GALLICIOTTI, G. & SONDEREGGER, P. 2006. Neuroserpin. *Front Biosci*, 11, 33-45.
- HASILIK, A. & VON FIGURA, K. 1981. Oligosaccharides in lysosomal enzymes. Distribution of high-mannose and complex oligosaccharides in cathepsin D and beta-hexosaminidase. *Eur J Biochem*, 121, 125-9.
- HASTINGS, G. A., COLEMAN, T. A., HAUDENSCHILD, C. C., STEFANSSON, S., SMITH, E. P., BARTHLOW, R., CHERRY, S., SANDKVIST, M. & LAWRENCE, D. A. 1997. Neuroserpin, a brain-associated inhibitor of tissue plasminogen activator is localized primarily in neurons. Implications for the regulation of motor learning and neuronal survival. *J Biol Chem*, 272, 33062-7.
- HEDSTROM, L. 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev*, 102, 4501-24.
- HILL, R. M., BRENNAN, S. O. & BIRCH, N. P. 2001. Expression, purification, and functional characterization of the serine protease inhibitor neuroserpin expressed in Drosophila S2 cells. *Protein Expr Purif*, 22, 406-13.

- HILL, R. M., COATES, L. C., PARMAR, P. K., MEZEY, E., PEARSON, J. F. & BIRCH, N. P. 2002. Expression and functional characterization of the serine protease inhibitor neuroserpin in endocrine cells. *Ann N Y Acad Sci*, 971, 406-15.
- HILL, R. M., PARMAR, P. K., COATES, L. C., MEZEY, E., PEARSON, J. F. & BIRCH, N. P. 2000. Neuroserpin is expressed in the pituitary and adrenal glands and induces the extension of neurite-like processes in AtT-20 cells. *Biochem J*, 345 Pt 3, 595-601.
- HUANG, Y. Y., BACH, M. E., LIPP, H. P., ZHUO, M., WOLFER, D. P., HAWKINS, R. D., SCHOONJANS, L., KANDEL, E. R., GODFRAIND, J. M., MULLIGAN, R., COLLEN, D. & CARMELIET, P. 1996. Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 8699-704.
- HUNT, L. T. & DAYHOFF, M. O. 1980. A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 95, 864-71.
- HUNTINGTON, J. A., FAN, B., KARLSSON, K. E., DEINUM, J., LAWRENCE, D. A. & GETTINS, P. G. 1997. Serpin conformational change in ovalbumin. Enhanced reactive center loop insertion through hinge region mutations. *Biochemistry*, 36, 5432-40.
- ISHIGAMI, S., SANDKVIST, M., TSUI, F., MOORE, E., COLEMAN, T. A. & LAWRENCE, D. A. 2006. Identification of a novel targeting sequence for regulated secretion in the serine protease inhibitor neuroserpin. *Biochem J*.
- KIM, S., WOO, J., SEO, E. J., YU, M. & RYU, S. 2001. A 2.1 Å resolution structure of an uncleaved alpha(1)-antitrypsin shows variability of the reactive center and other loops. *J Mol Biol*, 306, 109-19.
- KORNFELD, R. & KORNFELD, S. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*, 54, 631-64.
- KORNFELD, S. & MELLMAN, I. 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol*, 5, 483-525.
- KRUEGER, S. R., GHISU, G. P., CINELLI, P., GSCHWEND, T. P., OSTERWALDER, T., WOLFER, D. P. & SONDEREGGER, P. 1997. Expression of neuroserpin, an inhibitor of tissue plasminogen activator, in the developing and adult nervous system of the mouse. *J Neurosci*, 17, 8984-96.
- KUKURUZINSKA, M. A. & LENNON, K. 1998. Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9, 415-48.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAW, R. H., ZHANG, Q., MCGOWAN, S., BUCKLE, A. M., SILVERMAN, G. A., WONG, W., ROSADO, C. J., LANGENDORF, C. G., PIKE, R. N., BIRD, P. I. & WHISSTOCK, J. C. 2006. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol*, 7, 216.
- LEBEURRIER, N., LIOT, G., LOPEZ-ATALAYA, J. P., ORSET, C., FERNANDEZ-MONREAL, M., SONDEREGGER, P., ALI, C. & VIVIEN, D. 2005. The brain-

specific tissue-type plasminogen activator inhibitor, neuroserpin, protects neurons against excitotoxicity both in vitro and in vivo. *Mol Cell Neurosci*, 30, 552-8.

- LEE, T. W., COATES, L. C. & BIRCH, N. P. 2008. Neuroserpin regulates N-cadherin-mediated cell adhesion independently of its activity as an inhibitor of tissue plasminogen activator. *J Neurosci Res*, 86, 1243-53.
- LOMAS, D. A. 2005. Molecular mousetraps, alpha1-antitrypsin deficiency and the serpinopathies. *Clin Med*, 5, 249-57.
- LOMAS, D. A., BELORGEY, D., MALLYA, M., MIRANDA, E., KINGHORN, K. J., SHARP, L. K., PHILLIPS, R. L., PAGE, R., ROBERTSON, A. S. & CROWTHER, D. C. 2005. Molecular mousetraps and the serpinopathies. *Biochem Soc Trans*, 33, 321-30.
- LOMAS, D. A. & CARRELL, R. W. 2002. Serpinopathies and the conformational dementias. *Nat Rev Genet*, 3, 759-68.
- MADANI, R., KOZLOV, S., AKHMEDOV, A., CINELLI, P., KINTER, J., LIPP, H. P., SONDEREGGER, P. & WOLFER, D. P. 2003. Impaired explorative behavior and neophobia in genetically modified mice lacking or overexpressing the extracellular serine protease inhibitor neuroserpin. *Mol Cell Neurosci*, 23, 473-94.
- MAKAROVA, A., MIKHAILENKO, I., BUGGE, T. H., LIST, K., LAWRENCE, D. A. & STRICKLAND, D. K. 2003. The low density lipoprotein receptor-related protein modulates protease activity in the brain by mediating the cellular internalization of both neuroserpin and neuroserpin-tissue-type plasminogen activator complexes. *J Biol Chem*, 278, 50250-8.
- MAKRYPIDI, G., DAMME, M., MULLER-LOENNIES, S., TRUSCH, M., SCHMIDT, B., SCHLUTER, H., HEEREN, J., LUBKE, T., SAFTIG, P. & BRAULKE, T. 2011. Mannose 6-phosphorylation of lysosomal proteins mediated by acid phosphatases Acp2 and Acp5. *Mol Cell Biol*.
- MIRANDA, E. & LOMAS, D. A. 2006. Neuroserpin: a serpin to think about. *Cell Mol Life Sci*, 63, 709-22.
- MULLER-LOENNIES, S., GALLICIOTTI, G., KOLLMANN, K., GLATZEL, M. & BRAULKE, T. 2010. A novel single-chain antibody fragment for detection of mannose 6-phosphate-containing proteins: application in mucopolidosis type II patients and mice. *Am J Pathol*, 177, 240-7.
- OSTERWALDER, T., CINELLI, P., BAICI, A., PENNELLA, A., KRUEGER, S. R., SCHRIMPF, S. P., MEINS, M. & SONDEREGGER, P. 1998. The axonally secreted serine proteinase inhibitor, neuroserpin, inhibits plasminogen activators and plasmin but not thrombin. *J Biol Chem*, 273, 2312-21.
- OSTERWALDER, T., CONTARTESE, J., STOECKLI, E. T., KUHN, T. B. & SONDEREGGER, P. 1996. Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *Embo J*, 15, 2944-53.
- OSTERWALDER, T., KUHNEN, A., LEISERSON, W. M., KIM, Y. S. & KESHISHIAN, H. 2004. Drosophila serpin 4 functions as a neuroserpin-like inhibitor of subtilisin-like proprotein convertases. *J Neurosci*, 24, 5482-91.

- POHL, S., MARSCHNER, K., STORCH, S. & BRAULKE, T. 2009. Glycosylation- and phosphorylation-dependent intracellular transport of lysosomal hydrolases. *Biol Chem*, 390, 521-7.
- QIAN, Z., GILBERT, M. E., COLICOS, M. A., KANDEL, E. R. & KUHL, D. 1993. Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature*, 361, 453-7.
- RAGG, H. 2007. The role of serpins in the surveillance of the secretory pathway. *Cell Mol Life Sci*, 64, 2763-70.
- ROTH, J., ZUBER, C., PARK, S., JANG, I., LEE, Y., KYSELA, K. G., LE FOURN, V., SANTIMARIA, R., GUHL, B. & CHO, J. W. 2010. Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control. *Mol Cells*, 30, 497-506.
- RUEGG, C. R., CHIQUET-EHRISMANN, R. & ALKAN, S. S. 1989. Tenascin, an extracellular matrix protein, exerts immunomodulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 7437-41.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SCHRIMPF, S. P., BLEIKER, A. J., BRECEVIC, L., KOZLOV, S. V., BERGER, P., OSTERWALDER, T., KRUEGER, S. R., SCHINZEL, A. & SONDEREGGER, P. 1997. Human neuroserpin (PI12): cDNA cloning and chromosomal localization to 3q26. *Genomics*, 40, 55-62.
- SEEDS, N. W., BASHAM, M. E. & FERGUSON, J. E. 2003. Absence of tissue plasminogen activator gene or activity impairs mouse cerebellar motor learning. *J Neurosci*, 23, 7368-75.
- SEEDS, N. W., WILLIAMS, B. L. & BICKFORD, P. C. 1995. Tissue plasminogen activator induction in Purkinje neurons after cerebellar motor learning. *Science*, 270, 1992-4.
- SILVERMAN, G. A., BIRD, P. I., CARRELL, R. W., CHURCH, F. C., COUGHLIN, P. B., GETTINS, P. G., IRVING, J. A., LOMAS, D. A., LUKE, C. J., MOYER, R. W., PEMBERTON, P. A., REMOLD-O'DONNELL, E., SALVESEN, G. S., TRAVIS, J. & WHISSTOCK, J. C. 2001. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem*, 276, 33293-6.
- SLEAT, D. E., ZHENG, H., QIAN, M. & LOBEL, P. 2006. Identification of sites of mannose 6-phosphorylation on lysosomal proteins. *Mol Cell Proteomics*, 5, 686-701.
- SLOT, J. W. & GEUZE, H. J. 2007. Cryosectioning and immunolabeling. *Nat Protoc*, 2, 2480-91.
- SOMERS, W. S., TANG, J., SHAW, G. D. & CAMPHAUSEN, R. T. 2000. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell*, 103, 467-79.
- STOECKLI, E. T., LEMKIN, P. F., KUHN, T. B., RUEGG, M. A., HELLER, M. & SONDEREGGER, P. 1989. Identification of proteins secreted from axons of embryonic dorsal-root-ganglia neurons. *Eur J Biochem*, 180, 249-58.

- VAN MEIJER, M., SMILDE, A., TANS, G., NESHEIM, M. E., PANNEKOEK, H. & HORREVOETS, A. J. 1997. The suicide substrate reaction between plasminogen activator inhibitor 1 and thrombin is regulated by the cofactors vitronectin and heparin. *Blood*, 90, 1874-82.
- VARKI, A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3, 97-130.
- WU, J., ECHEVERRY, R., GUZMAN, J. & YEPES, M. 2010. Neuroserpin protects neurons from ischemia-induced plasmin-mediated cell death independently of tissue-type plasminogen activator inhibition. *Am J Pathol*, 177, 2576-84.
- YAZAKI, M., LIEPNIKS, J. J., MURRELL, J. R., TAKAO, M., GUENTHER, B., PICCARDO, P., FARLOW, M. R., GHETTI, B. & BENSON, M. D. 2001. Biochemical characterization of a neuroserpin variant associated with hereditary dementia. *Am J Pathol*, 158, 227-33.
- YEPES, M. & LAWRENCE, D. A. 2004a. Neuroserpin: a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. *Thromb Haemost*, 91, 457-64.
- YEPES, M. & LAWRENCE, D. A. 2004b. Tissue-type plasminogen activator and neuroserpin: a well-balanced act in the nervous system? *Trends Cardiovasc Med*, 14, 173-80.
- YEPES, M., SANDKVIST, M., WONG, M. K., COLEMAN, T. A., SMITH, E., COHAN, S. L. & LAWRENCE, D. A. 2000. Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis. *Blood*, 96, 569-76.

8. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Markus Glatzel für die Bereitstellung der interessanten Fragestellung, der Möglichkeit zur Verwirklichung dieser Dissertation sowie für die ausgezeichnete Betreuung.

Herrn PD Dr. H.-J. Kreienkamp sowie PD Dr. Christian Bernreuther danke ich mich als Gutachter zur Verfügung gestellt zu haben.

Bei Frau Dr. Angela Schipanski und Frau Beata Szalay bedanke ich mich für die sehr gute persönliche Betreuung, viele praktische Ratschläge und nicht zuletzt den sehr freundlichen Umgang miteinander. Allen Kollegen innerhalb des Instituts für Neuropathologie möchte ich für die freundschaftliche Atmosphäre danken.

Herrn Professor Dr. Thomas Braulkes Arbeitsbereich Molekularbiologie an der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin am UKE, hier insbesondere Frau Dr. Georgia Makrypidi, danke ich für die wissenschaftliche Kooperation, der Unterstützung bei der Planung und der Durchführung insbesondere der Mannose-6-Phosphat-Affinitätschromatographie. Bei Frau Dr. Michaela Schweizer aus der Servicegruppe Morphologie des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg bedanke ich mich für die Unterstützung bei den morphologischen Untersuchungen.

Frau Professor Dr. Giesa Tiegs danke ich stellvertretend für das Graduiertenkolleg „Entzündung und Regeneration“. Ohne das umfangreiche Studienprogramm, den Austausch untereinander sowie die finanzielle Förderung wäre diese Arbeit in ihrer jetzigen Form nicht möglich gewesen. Innerhalb des Graduiertenkollegs gilt mein Dank auch Herrn PD Dr. Johannes Herkel und Herrn PD Dr. Tim Magnus, die innerhalb einer Betreuungskommission den Fortschritt dieser Arbeit kritisch evaluierten.

Für ihre Unterstützung bedanke ich mich bei meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinen Freunden.

9. Lebenslauf

aus Datenschutzgründen nicht veröffentlicht

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: