

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Neuropathologie

Prof. Dr. med. Markus Glatzel

The regulatory role of neuroserpin in the developing neocortex

Dissertation

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

vorgelegt von:

Dilara Hamid, geb. Kement
aus Hamburg

Hamburg, 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.02.2024**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Tim Magnus

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Markus Glatzel

Inhaltsverzeichnis

1. Artikel: Neuroserpin Is Strongly Expressed in the Developing and Adult Mouse Neocortex but Its Absence Does Not Perturb Cortical Lamination and Synaptic Proteome	4
2. Darstellung der Publikation	22
2.1. Einleitung	22
2.2. Ziel der Arbeit	32
2.3. Material und Methode	34
2.4. Ergebnisse und Diskussion	37
3. Zusammenfassung	44
4. Summary	45
5. Erklärung des Eigenanteils	46
6. Abkürzungsverzeichnis	47
7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	49
8. Literaturverzeichnis	50
9. Danksagung	55
10. Eidesstattliche Versicherung	56



Neuroserpin Is Strongly Expressed in the Developing and Adult Mouse Neocortex but Its Absence Does Not Perturb Cortical Lamination and Synaptic Proteome

Dilara Kement¹, Rebecca Reumann¹, Katrin Schostak¹, Hannah Voß², Sara Douceau³, Matthias Dottermusch¹, Michaela Schweizer⁴, Hartmut Schlüter², Denis Vivien^{3,5}, Markus Glatzel¹ and Giovanna Galliciotti^{1*}

¹Institute of Neuropathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ²Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Mass Spectrometric Proteomics Group, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ³Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, Université Caen Normandie, INSERM U1237, Normandie Université, Caen, France, ⁴Department of Electron Microscopy, Center for Molecular Neurobiology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ⁵Department of Clinical Research, Caen-Normandie University Hospital, Centre Hospitalier Universitaire, Caen, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Zoltan Molnar,
University of Oxford, United Kingdom

Reviewed by:

Zdravko Petanjek,
University of Zagreb, Croatia
Istvan Adorjan,
University of Oxford, United Kingdom

*Correspondence:

Giovanna Galliciotti
g.galliciotti@uke.de

Received: 10 November 2020

Accepted: 02 February 2021

Published: 23 February 2021

Citation:

Kement D, Reumann R, Schostak K, Voß H, Douceau S, Dottermusch M, Schweizer M, Schlüter H, Vivien D, Glatzel M and Galliciotti G (2021) Neuroserpin Is Strongly Expressed in the Developing and Adult Mouse Neocortex but Its Absence Does Not Perturb Cortical Lamination and Synaptic Proteome. *Front. Neuroanat.* 15:627896. doi: 10.3389/fnana.2021.627896

Neuroserpin is a serine protease inhibitor that regulates the activity of tissue-type plasminogen activator (tPA) in the nervous system. Neuroserpin is strongly expressed during nervous system development as well as during adulthood, when it is predominantly found in regions eliciting synaptic plasticity. In the hippocampus, neuroserpin regulates developmental neurogenesis, synaptic maturation and in adult mice it modulates synaptic plasticity and controls cognitive and social behavior. High expression levels of neuroserpin in the neocortex starting from prenatal stage and persisting during adulthood suggest an important role for the serpin in the formation of this brain region and in the maintenance of cortical functions. In order to uncover neuroserpin function in the murine neocortex, in this work we performed a comprehensive investigation of its expression pattern during development and in the adulthood. Moreover, we assessed the role of neuroserpin in cortex formation by comparing cortical lamination and neuronal maturation between neuroserpin-deficient and control mice. Finally, we evaluated a possible regulatory role of neuroserpin at cortical synapses in neuroserpin-deficient mice. We observed that neuroserpin is expressed starting from the beginning of corticogenesis until adulthood throughout the neocortex in several classes of glutamatergic projection neurons and GABA-ergic interneurons. However, in the absence of neuroserpin we did not detect any alteration either in cortical layer formation, or in neuronal soma size and dendritic length. Furthermore, no significant quantitative changes were observed in the proteome of cortical synapses upon neuroserpin deficiency. We conclude that, although strongly expressed in the neocortex, absence of neuroserpin does not lead to gross developmental abnormalities, and does not perturb the composition of the cortical synaptic proteome.

Keywords: neuroserpin, tissue-type plasminogen activator, nervous system development, cerebral cortex, synapse

INTRODUCTION

Cognition, sensation, perception, voluntary movements are higher-order brain functions that rely on the ordered architecture of the cerebral cortex. The neocortex is organized into six histologically distinct layers containing two main classes of neurons: excitatory glutamatergic projection neurons and inhibitory GABA-ergic, mainly local circuit interneurons (Molyneaux et al., 2007). The first projection neurons appear at embryonic day (E) 10.5 in the mouse brain, during the following seven days projection neurons populating layers II–VI are generated in the ventricular zone and subventricular zone and migrate radially along radial glia into the cortical plate so that later born neurons pass earlier born neurons in the deeper layers V–VI to reach the more superficial layers II–IV in an “inside-out” fashion (Rakic, 1974; Molyneaux et al., 2007; Greig et al., 2013). GABA-ergic interneurons are generated from progenitors located in the ganglionic eminence during the same embryonic period as glutamatergic projection neurons and migrate tangentially into the neocortex (de Carlos et al., 1996; Tamamaki et al., 1997; Sultan et al., 2013). Once they reach their terminal destination, neurons undergo maturation by extending dendrites and establishing synaptic contacts with other cells, thereby forming neural circuits (Ohtaka-Maruyama and Okado, 2015). The coordinated generation and migration of cortical neurons is crucial for proper formation and functioning of the neocortex, as impairment of corticogenesis may lead to brain malformations or psychiatric disorders.

Neuroserpin is a serine protease inhibitor of the nervous system, regulating the activity of tPA in the brain (Galliciotti and Sonderegger, 2006). Dysregulated levels of neuroserpin have been observed in brain of patients affected by schizophrenia (Hakak et al., 2001; Vawter et al., 2004; Brennard et al., 2011; Wen et al., 2014). Neuroserpin expression is detected as early as E13 in the developing brain, first weakly and homogeneously throughout most central nervous system regions, then starting from E15 neuroserpin levels rise, especially in neocortex, hippocampus, cerebellar primordium, pons and medulla (Krueger et al., 1997). In the adult brain, neuroserpin expression is more restricted to areas where synaptic changes are associated with learning and memory. In the last years we uncovered an essential role of neuroserpin in the hippocampus. During developmental neurogenesis the serpin regulates neuronal precursor's proliferation and differentiation, and during the critical period it plays a role in synaptic maturation (Hermann et al., 2020). Moreover, in the adult brain, absence of neuroserpin is responsible for reduction of synapse density, deficits in synaptic plasticity, and alterations in hippocampal-dependent behavioral tasks (Reumann et al., 2017).

Recently, neuroserpin has been shown to reduce tPA-dependent Reelin cleavage in HEK293 cells (Krstic et al., 2012).

Abbreviations: AU, arbitrary unit; CP, cortical plate; E, embryonic day; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GFP, green fluorescence protein; Ns, neuroserpin; Ns^{-/-}, neuroserpin-deficient mice; P, postnatal day; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PNN, perineuronal net; PV, parvalbumin; RFP, red fluorescence protein; RT, room temperature; SP, subplate; SST, somatostatin; tPA, tissue-type plasminogen activator; wt, wild-type.

Reelin is produced and secreted from Cajal-Retzius cells in the marginal zone of the developing cortex where it plays a fundamental role in neuronal migration and cortical lamination (Trotter et al., 2014; Jossin, 2020). Furthermore, it promotes growth of axons and dendrites as well as synaptogenesis. During adulthood, Reelin is expressed by GABA-ergic interneurons and controls synaptic plasticity. Several proteases cleave Reelin at different positions, producing proteolytic fragments that diffuse to distant brain regions, thereby regulating duration and range of Reelin signaling (Ranaivoson et al., 2016). For these reasons, regulation of Reelin cleavage by neuroserpin could represent a possible mechanism by which the serpin controls development and maintenance of the nervous system, including corticogenesis.

In this work, we present a detailed analysis of neuroserpin expression in the neocortex during brain formation. In particular, we performed immunohistochemical stainings to map cells expressing the neuroserpin protein (glutamatergic projection neurons, GABA-ergic interneurons, or glial cells) and investigate colocalization with its putative target, tPA. Moreover, to find out if neuroserpin influences cortical development by affecting Reelin proteolysis *in vivo*, we compared lamination, Reelin cleavage, neuronal morphology and perineuronal net composition between neuroserpin-deficient mice and control littermates. Finally, to gain insights into neuroserpin involvement at cortical synapses, we investigated the proteome of synaptosomes derived from the adult neocortex of mice lacking neuroserpin. We found a robust expression of neuroserpin in the somatosensory cortex starting from E13 until adulthood in several classes of projection neurons and interneurons, but no colocalization with GFAP-, Iba1- and Olig2-positive glial cell, indicating a specific neuronal source of neuroserpin. We localized tPA, the main target of neuroserpin, in the same cortical region expressing the serpin, however we never observed colocalization of both proteins within the same cells. Furthermore, we did not detect differences between neuroserpin-deficient mice and controls either in corticogenesis or in neuronal maturation and at the adult synapses. Expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), another serpin known to inhibit the proteolytic activity of tPA and possibly compensating for neuroserpin absence, was not altered in neuroserpin-deficient mice. Taken together, these results suggest that, despite its strong presence in the neocortex, neuroserpin is not indispensable for normal formation of this brain region.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Neuroserpin knockout mice (Ns^{-/-}) have been described before (Madani et al., 2003), they were backcrossed to a C57BL/6J background for at least ten generations and wild-type (wt) littermates were used as controls. For the Golgi-Cox staining, C57BL/6J mice were used as control. Animals were generated in the animal facility of the University Medical Center Hamburg Eppendorf, Germany, and maintained in groups of 2–4 littermates under standard housing conditions with food and water *ad libitum*. Mice of both sexes were used

(unless stated otherwise). Animal procedures were performed in accordance with the ARRIVE guidelines, the institutional guidelines from the animal facility of the University Medical Center Hamburg Eppendorf, Germany, and were registered at the local animal care agency (Behörde für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, registration number ORG-739). For neuroserpin-tPA colocalization study, pregnant C57BL/6J mice were in utero electroporated at E14 with pPlat-GFP and pCAG-RFP plasmids at the animal facility of the University of Caen, France, as previously published (Pasquet et al., 2019). The pCAG-RFP plasmid was purchased from Addgene. The pPlat-GFP plasmid (1.2-kb sequence of the human Plat promoter, spanning from -1035 to +207 base pairs from the transcription start codon) was purchased from GeneCopoeia (pPlat-GFP; Catalog No.: HPRM12655-PF02). Both constructs were amplified in *Escherichia coli* JM109 cells and purified by a Nucleobond endotoxin-free plasmid DNA PC 2000 kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. Mouse protocols were performed in accordance with the French (Decree 87/848) and the European Communities Council (Directive 86/609) guidelines. The project was approved by the ethical committee CENOMEXA (under the identification number #10638). Information about animal used in this study can be found in **Supplementary Table 1**.

Immunohistochemical Analysis of Brain Tissue

Mice were sacrificed at different time points (E13, E16, P0, 1, 3, and 13 weeks of age, three animals per group), for stages E13 and E16 the whole head was used, while for P0, 1, 3, and 13 weeks of age the brain was dissected before fixation. Tissues were post-fixed in 4% formaldehyde, cryoprotected in 30% sucrose and frozen in tissue freezing medium. For Nissl staining, 10 μ m cryosections were processed according to standard protocols. For immunohistochemical staining, 10 μ m cryosections were boiled for 10 min in 10 mM citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.05% Tween-20, pH 6.0) for antigen retrieval, permeabilized in PBS-0,2 % Triton X-100 and blocked in PBS-0,4% Triton X-100-5% BSA. Sections were incubated overnight at 4°C with affinity-purified anti-neuroserpin goat polyclonal antibody (1:50) (Galliciotti et al., 2007), primary antibody against Reelin (1:600, Merck Millipore MAB5364), Cux1 (1:300, Proteintech 11733-1-AP), Ctip2 (1:600, abcam ab18465), Tbr1 (1:1000, abcam ab31940), Parvalbumin (1:1,000, Sigma P3088), Somatostatin (1:50, Santa Cruz Biotechnology sc-74556), GFAP (1:500, Merck Millipore MAB360), Iba1 (1:500, abcam ab5076), Olig2 (1:200, Merck Millipore AB9610), aggrecan (1:50, Merck Millipore AB1031), MAP2 (1:100, Sigma M3696) or GFP (1:500, Clontech 632380) in blocking buffer containing 0,2 % Triton X-100. Anti-rabbit, anti-mouse, anti-rat or anti-goat conjugated to Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 647 (1:500, Thermo Fisher) were used as secondary antibodies. Sections were covered (Fluoromount-G with DAPI, SouthernBiotech), dried and pictures were taken using a Leica TCS SP5 or SP8 confocal microscope, the Plan-APOCHROMAT 40x or 63x oil-immersion lens and 1,024 \times 1,024 pixels for frame. For quantification

of cortical immunofluorescence signal, digital image analysis of anatomically matched control and mutant mice cortices was performed using ImageJ/Fiji software (Schindelin et al., 2012). Positive fluorescence signal was detected by consistent automatic global thresholding. Improper pixels corresponding to background noise were removed by median filtering. Cortical images were subsequently divided into 10 equally sized bins, in each of which the percentage of positive signal per area was measured. The quantification described was applied consistently to all images. Three animals per condition were analyzed.

Golgi-Cox Staining

Brains (three animals per group) were collected from mice at 3 weeks of age, quickly rinsed with double-distilled water and stained using the FD Rapid GolgiStain Kit (FD NeuroTechnologies) following the manufacturer's instructions. Briefly, tissues were immersed in impregnation solution (A+B) at room temperature (RT) in the dark. After overnight incubation the solution was replaced, and brains further incubated for 1 week. Afterwards, tissues were transferred into solution C and stored 24 h at 4°C in the dark. Solution C was refreshed, and incubation prolonged for another 24 h. Brains were then embedded in 4% low melting point agarose and 100 μ m sections were cut with a vibratome. Slices were rinsed with distilled water, incubated 10 min in staining solution (D + E) and after a last washing step with distilled water mounted on a slide with Mowiol and stored at 4°C in the dark. Pictures were taken using a Zeiss AxioVision light microscope. Soma size and dendrite length were measured using Stereo Investigator (MBF Bioscience). Length of dendrites was measured under the microscope at 20 \times magnification starting at the base of the soma and along all protrusions until the tip. Thirty cells per mouse from layers IV–VI were analyzed, average of soma size and average of all dendrites per animal were calculated (wt: 386, 406, and 439 dendrites; Ns-/-: 322, 384, and 418 dendrites per animal were quantified).

Electron Microscopy

Brains were collected from Ns-/- mice and wt littermates (three animals per group, all males, 60 weeks of age). Sagittal vibratome sections of the primary somatosensory cortex were collected and prepared for electron microscopy as described (Koster et al., 2016). Ultrathin sections (60 nm) were examined in an EM902 (Zeiss). Pictures (15/animal) were taken from cortical layer IV with a MegaViewIII digital camera (A. Tröndle).

Synaptosome Isolation

Brains were collected from Ns-/- mice and wt littermates (four animals per group, all males, 60 weeks of age), the neocortex was dissected and directly processed. Synaptosomes were prepared following the protocol published in (Phelan and Gordon-Weeks, 1997) with some modifications: Tissues were homogenized in solution A containing protease inhibitor cocktail (complete, Mini, EDTA-free, Roche) using a dounce homogenizer. After the isolation, synaptosomes were recovered from the sucrose gradient, diluted in four volumes of solution A-protease inhibitor cocktail and pelleted by centrifugation for

30 min at 26'000×g, 4°C. The synaptosome pellet was snap-frozen and stored at -80°C. After thawing, samples were centrifuged for 30 min at 20'000×g, 4°C and the pellet was subjected to mass spectrometric analysis.

Tryptic Digestion for Mass Spectrometric Analysis

Protein pellets from cortical synaptosomes were lysed in triethylammonium hydrogen carbonate buffer (TEAB, Thermo Fisher) with 1% w/w sodium deoxycholate (SDC, Sigma Aldrich), boiled at 95°C for 5 min and sonicated five times at 30% using a probe sonicator to destroy DNA/RNA. 30 µg protein were used for tryptic digestion. Disulfide bridges were reduced in the presence of 10 mM dithiothreitol (DTT, Sigma Aldrich) at 60°C for 30 min and alkylated with 20 mM iodoacetamide (IAA, Sigma Aldrich) for 30 min in the dark at 37°C. Trypsin (sequencing grade, Promega) was added at a 1:100 ratio (enzyme to protein) and digestion was performed overnight at 37°C. The reaction was quenched and SDC was precipitated using 1% formic acid (FA, Fluka). Samples were centrifuged for 5 min at 14,000×g, the supernatant was transferred into a new tube and lyophilized using a SpeedVac™ vacuum concentrator.

Mass Spectrometric Measurements and Data Analysis

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium *via* the PRIDE (<https://www.ebi.ac.uk/pride/>) partner repository with the dataset identifier PXD022371.

Prior to mass spectrometric analyses, peptides were resuspended in 0.1% FA to a final concentration of 1 µg/µl. LC-MS/MS measurements were performed on a quadrupole-iontrap-orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Fusion, Thermo Fisher) coupled to a nano-UPLC (Dionex Ultimate 3000 UPLC system, Thermo Fisher). One micro gram of tryptic peptides were injected into the chromatographic system *via* an autosampler, purified and desalted using a reversed phase trapping column (Acclaim PepMap 100 C18 trap; 100 µm × 2 cm, 100 Å pore size, 5 µm particle size; Thermo Fisher) and transferred to a reversed phase column for chromatographic separation (Acclaim PepMap 100 C18; 75 µm × 50 cm, 100 Å pore size, 2 µm particle size, Thermo Fisher). Trapping was done for 5 min at a flow rate of 15 µl/min with 99% solvent A (0.1% FA) and 1% solvent B (0.1% FA in ACN). Separation and elution of peptides were achieved by a linear gradient from 1 to 30% solvent B in 70 min at a flow rate of 3 µl/min. Eluted peptides were ionized using a nano-electrospray ionization source (nano-ESI) with a spray voltage of 1,800, transferred into the mass spectrometer and analyzed in data dependent acquisition (DDA) mode. For each MS1 scan, ions were accumulated for a maximum of 120 ms or until a charge density of 2 × 10⁵ ions (AGC Target) was reached.

Fourier-transformation-based mass analysis of the data from the orbitrap mass analyser was performed covering a mass range of 400–1,300 m/z with a resolution of 120,000 at m/z = 200. Peptides with charge states between 2+ and 5+ above an intensity threshold of 1,000 were isolated within a 1.6 m/z isolation window in Top speed mode for 3 s from each

precursor scan and fragmented with a normalized collision energy of 30% using higher energy collisional dissociation (HCD). MS2 scanning was performed using an orbitrap mass analyser, covering a mass range of 380–1,500 m/z with a resolution of 15'000 at m/z = 200 and accumulated for 60 ms or to an AGC target of 1 × 10⁵. Dynamic exclusion of fragmented peptides was applied for 15 s after precursor selection.

Raw data obtained from LC-MS/MS measurements were processed with MaxQuant version 1.6.2.10 (Max Plank Institute for Biochemistry, Version 1.6.2.10) using the integrated Andromeda algorithm. For protein identification, measured MS2 spectra were searched against theoretical fragment-spectra of tryptic peptides, generated from a reviewed murine Swissprot FASTA database obtained in February 2020, containing 17,015 entries. All samples were handled as individual experiments.

The Carbamylation of cysteine residues was set as a fixed modification. Methionine oxidation, protein N-terminal acetylation, removal of the initiator methionine at the protein N-terminus and the conversion of glutamine to pyroglutamate were set as variable modifications. Peptides with a minimum length of six amino acids and a maximum mass of 6,000 Da were identified with a mass tolerance of 10 ppm. Only peptides with maximum of two missed trypsin cleavage sites were considered. For peptide identification, matching between runs was included, using a match time window of 0.7 min and an alignment time window of 20 min between individual runs. The error tolerance was set to 20 ppm for the first precursor search and to 4.5 ppm for the following main search. Fragment spectra were matched with 20 ppm error tolerance. A false discovery rate (FDR) value threshold <0.01, using a reverted decoy peptide databases approach was set for peptide identification. Label free quantification was performed with an LFQ minimum ratio count of 1. For quantification, all identified razor and unique peptides were considered. The label minimum ratio count was set to 1.

Protein Extraction

Tissues (whole brain for stages E13 and E16, neocortex for P0, 1, 3, and 13 weeks of age, 3 animals per group) were homogenized in 10 volumes of 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 150 mM NaCl, protease inhibitor cocktail (complete, Mini, EDTA-free, Roche) and PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (Roche) using a dounce homogenizer (Reumann et al., 2017). Proteins were solubilized by the addition of Triton X-100 to a final concentration of 1%. Extracts were cleared from insoluble material by centrifugation for 30 min at 20'000×g, 4°C. For analysis of perineuronal net (PNN), extracts were digested with 0.05 U Chondroitinase ABC (Sigma) for 2 h at 37°C (Hermann et al., 2020). Protein concentration was determined with Quick Start Bradford 1 × Dye Reagent (BioRad Laboratories) as described by the manufacturer.

Western Blotting and Densitometry

Mouse cortical extracts (80 µg total protein) were electrophoretically separated on 8% (for Reelin, ADAMTS-4 and aggrecan) or 10% (for PAI-1) SDS-PAGE under reducing conditions. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories) and membranes were blocked for 1 h at RT with Roti^R-ImmunoBlock (Carl Roth) in

Tris-buffered saline. Primary antibodies [anti-Reelin, 1:1,000, MAB5364 Merck Millipore; anti-ADAMTS-4, 1:500, abcam ab185722; anti-PAI-1, 1:1,000, abcam ab222754; anti-aggregan, 1:1,000, AB1031 Merck Millipore; anti-beta-actin clone C4, 1:4,000, MAB1501 Merck Millipore; affinity-purified anti-neuroserpin goat polyclonal antibody, 0.5 µg/ml, (Galliciotti et al., 2007)] were incubated overnight at 4°C in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween-20 and Roti[®]-ImmunoBlock. Secondary antibodies conjugated with IRDye[®] 800CW or IRDye[®] 680RD (1:10'000) (LI-COR Biosciences) were incubated in the same buffer for 1 h at RT. Membranes were scanned using an Odyssey[®] Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). Densitometric quantification was performed with LI-COR[®] Odyssey Software, version 2.0 (LI-COR Biosciences) and local background subtraction. Band intensity was normalized to beta-actin expression, and values for the wt group were arbitrarily set to 1.

Statistical Analysis

For quantification of Reelin, ADAMTS-4, PAI-1, and aggregan expression and cleavage, soma size and dendrite length, statistical comparison among groups was determined using two-tailed Student's *t*-test (wt vs. Ns/-). For statistical analysis of quantified cortical immunofluorescence, signal detection fractions in matching bins were compared between control and mutant mice using two-tailed Student's *t*-test. *p* values were adjusted for multiple comparisons using the Holm-Sidak-method. Means \pm SD are reported, statistical significance was set at **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01 and ****p* ≤ 0.001. The following statistical softwares were used: GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software) and Excel (Microsoft-Office). For mass spectrometric analysis, the ProteinGroups.txt result file from MaxQuant was loaded into Perseus software (Max Plank Institute for Biochemistry, Version 1.5.8.5). The quantitative LFQ Intensity values for protein groups were used as main columns. The relative protein abundance for each protein was transformed into log₂ values and normalized by subtraction of the median for each column. Protein lists were filtered for proteins, quantifiable in at least three samples of each group of wt and Ns/-. Euclidian distance based unsupervised clustering as well as principle component analysis was performed to estimate the distinguishability of compared groups. Student's *t*-test was performed to identify statistically differential abundant proteins between wt and neuroserpin-deficient mice (*p*-value <0.05). Only proteins exceeding a cutoff of 1.5-fold change difference between the queried groups were classified as differences of biological origin and considered in further analysis.

RESULTS

Immunohistochemical Analysis of Neuroserpin Expression During Development of the Neocortex

We analyzed the distribution of neuroserpin expression in the somatosensory cortex during development and in the adulthood. We found neuroserpin immunoreactivity as early

as E13 (Figure 1A). At this stage, Reelin-positive Cajal-Retzius cells were present in the marginal zone, however, they did not express neuroserpin, as no colocalization was observed between the two proteins. Instead, neuroserpin expression was clearly visible in the developing cortical plate at E13, where it was found around the nuclei of Tbr1-positive projection neurons. Three days later, at E16, the cortical plate has expanded and neuroserpin was expressed homogeneously at low levels throughout it (Figure 1B). Neuroserpin immunoreactivity was present around Cux1-positive pyramidal neuron nuclei of the newly formed layers II–IV and it persisted in the Tbr1-positive deep-layer neurons. Again, no colocalization could be observed between neuroserpin and Reelin in neurons of the marginal zone. At birth [postnatal day (P) 0] (Figure 1C) and in young 1 week-old animals (Figure 1D), when lamination of the neocortex is completed, neuroserpin was still localized throughout all layers of the cerebral cortex. However, in contrast to prenatal stages E13 and E16, at early postnatal stages during maturation of the neocortex neuroserpin immunoreactivity was predominantly present at high level in distinct cells. Reelin-positive Cajal-Retzius cells were still devoid of neuroserpin immunoreactivity, however Reelin-positive interneurons were now present in all cortical layers, and some showed immunoreactivity for neuroserpin. Moreover, neuroserpin immunostaining was again found in Cux1-positive pyramidal neurons of the upper layers. In deep cortical layers, although neuroserpin staining was visible, neurons expressing both Tbr1 and the serpin could hardly be found at 1 week of age, only few cells at the bottom of layer VI were double-positive for both proteins. Next, we studied neuroserpin localization in adult animals at 13 weeks of age (Figure 2). Neuroserpin expression was strongly detected throughout the cortex. Again, presence of neuroserpin was rather concentrated at high level in distinct cells, with the remaining cortical cells bearing low to undetectable levels of the serpin. In order to determine which cells express neuroserpin in the adult cortex, we performed colocalization with markers of projection neurons, interneurons and glial cells. Although in the superficial layers Cux1-positive neurons expressing neuroserpin were frequently detected, neurons expressing both Tbr1 and neuroserpin were rarely found in the deep cortical layers, in a pattern similar to the one observed in 1 week-old mice. Furthermore, neuroserpin immunoreactivity was observed in several Reelin-, somatostatin (SST)-, and parvalbumin (PV)-positive interneurons throughout the neocortex (Figure 2). Finally, neither glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive astrocytes, nor Iba1-positive microglia, nor Olig2-positive oligodendrocytes expressed neuroserpin, suggesting that neuroserpin expression is restricted to neuronal cells (Figure 2). Lastly, we investigated colocalization of neuroserpin with its target protease, tPA. Since neuroserpin expression is at most during the first postnatal week (Krueger et al., 1997), we chose the P0 time point for this analysis (Supplementary Figure 1). We examined the somatosensory cortex of mice previously in utero electroporated at E14 with a plasmid encoding for green fluorescence protein (GFP) under the control of the tPA promoter (Lenoir et al., 2019), resulting in a strong green fluorescence in tPA-expressing cells. We observed expression

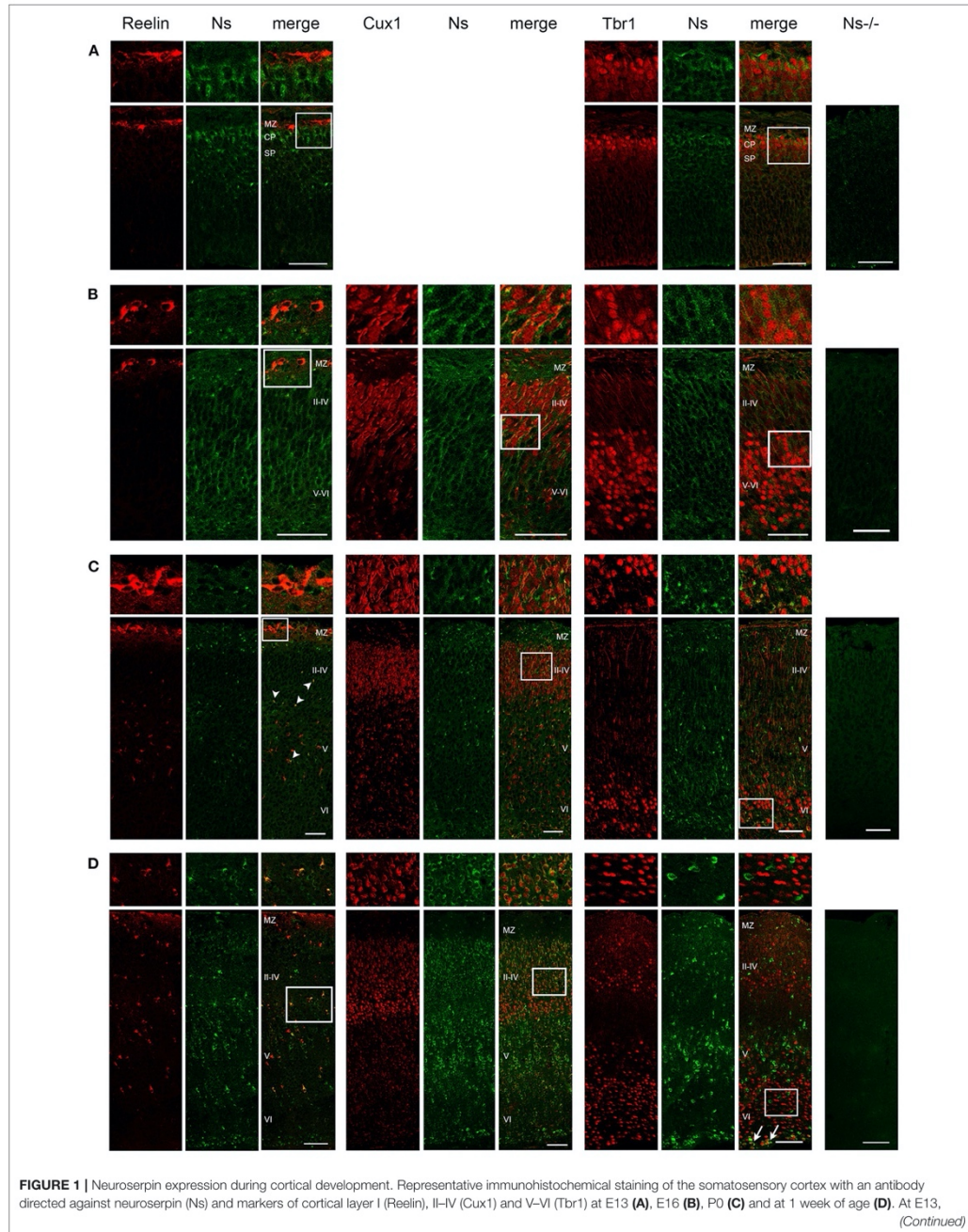


FIGURE 1 | upper cortical layers with Cux1-positive neurons have not yet been generated. Neuroserpin immunoreactivity is homogeneously observed throughout the developing cortical plate, whereas the Reelin-positive marginal zone is devoid of neuroserpin. In the postnatal period, neuroserpin-immunopositive cells are still distributed throughout cortical layer II–VI, around many Cux1-positive nuclei, whereas most Tbr1-positive neurons in the deeper layers do not express neuroserpin (arrows in **D**). Moreover, colocalization with Reelin-positive interneurons is observed starting from P0 (arrowheads in **C**). Staining of a cortical section from a Ns^{-/-} mouse demonstrates specificity of the neuroserpin immunohistochemistry. White boxes represent the area shown at higher magnification in the top row. Scale bars: 50 μ m in (**A–C**), 100 μ m in (**D**). *n* = 3. MZ, marginal zone; CP, cortical plate; SP, subplate.

of both neuroserpin and tPA-GFP throughout all layers of the cerebral cortex. However, we never detected cells positive for both proteins. Thus, we concluded that neuroserpin and its target protease tPA are present in the same cortical region but are produced by different cells.

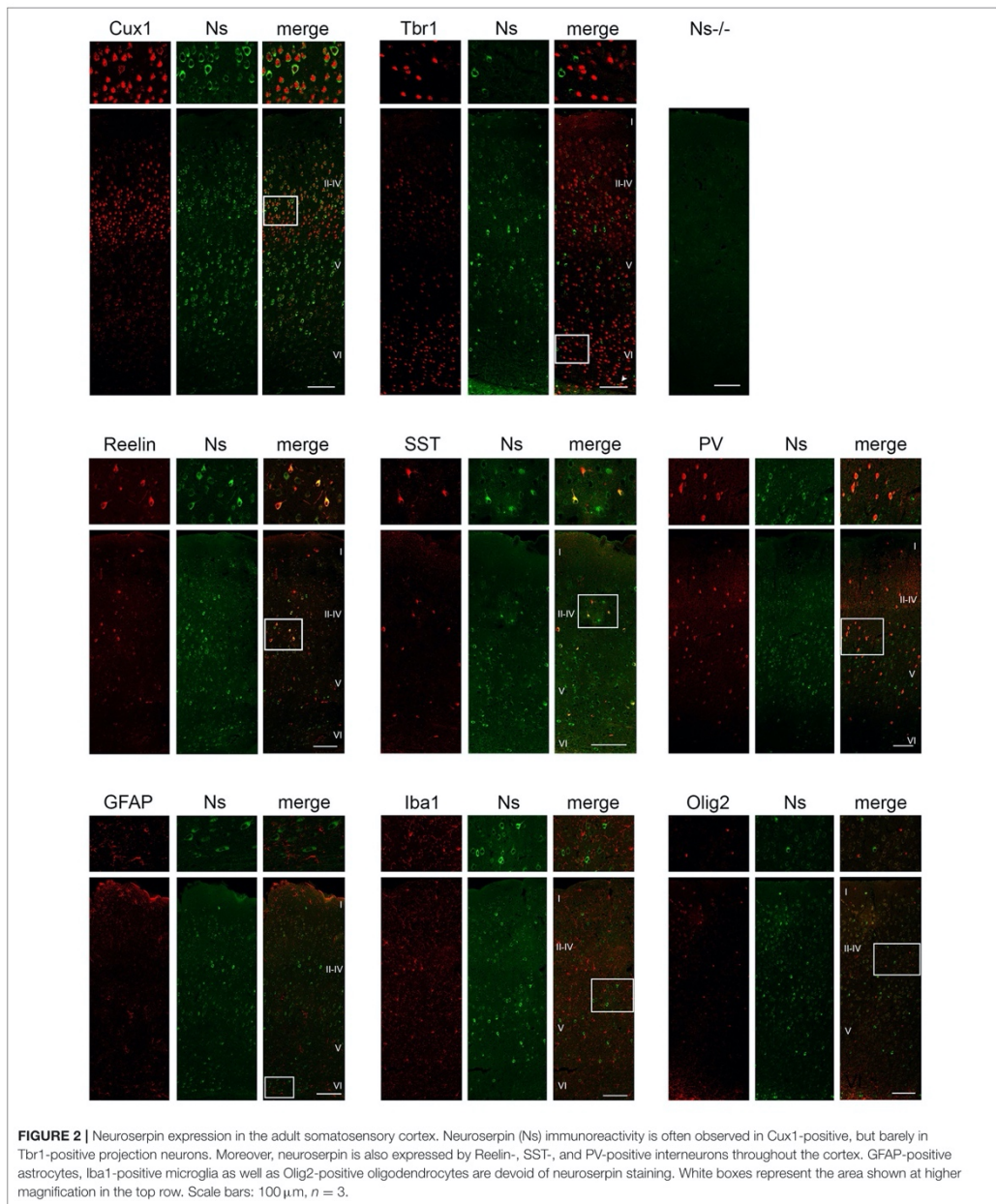
Absence of Neuroserpin Does Not Alter Lamination of the Neocortex

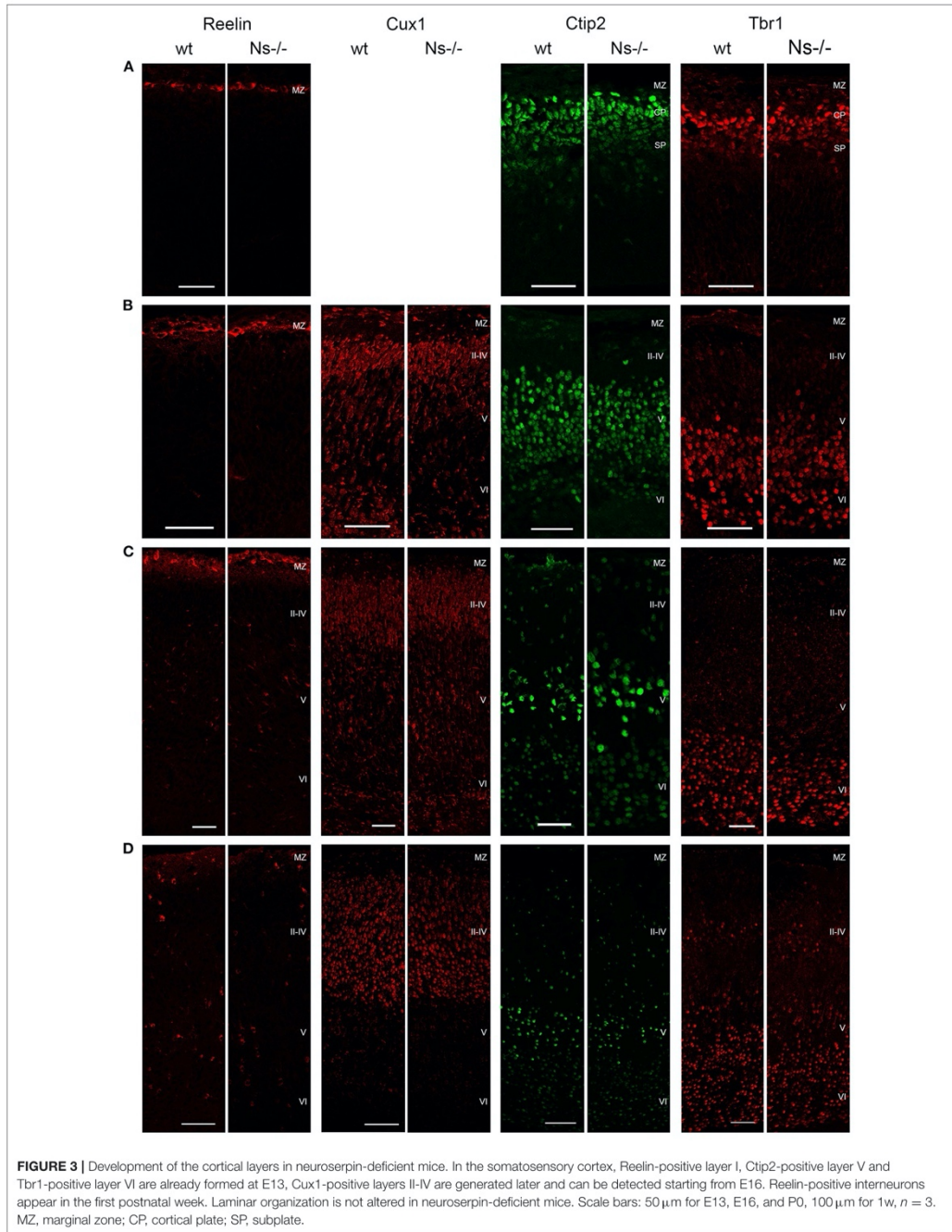
Because of the widespread expression of neuroserpin throughout the neocortex starting from early stages of development, and because of neuroserpin's role in formation of the hippocampus, we postulated a possible function of the serpin in corticogenesis. To investigate that, we analyzed cortex formation by comparing lamination between neuroserpin-deficient mice (Ns^{-/-}) and wild-type littermates. Again, we concentrated on the somatosensory cortex and started our analysis at E13. At this stage, beside the marginal zone only the deep layers could be observed in the cortical plate (**Figure 3A**). Immunohistochemical staining with an antibody directed against Reelin allowed visualization of Cajal-Retzius cells of layer I. In both Ns^{-/-} and wild-type groups we found an intact Reelin-positive marginal zone. Moreover, presence of Ctip2-positive and Tbr1-positive nuclei in layer V and VI, respectively, demonstrated completion of deep layer formation. No differences could be quantified in the distribution of these two classes of projection neurons between Ns^{-/-} and wild-type counterparts (**Supplementary Figure 2**). In E16 brain sections, in addition to the immunostainings that we performed at E13, we also visualized Cux1-positive neurons in the newly formed upper layers II–IV (**Figure 3B**). Again, we did not detect any alteration in the distribution of the stained neurons throughout the neocortex between mouse groups (**Supplementary Figure 2**). During the first postnatal week, migration of the projection neurons within the cortex was completed. Similar staining patterns were detected in presence and absence of neuroserpin at P0 (**Figure 3C**), as well as at one week of age (**Figure 3D**) (**Supplementary Figure 2**). Here, the Reelin-positive staining of Cajal-Retzius cells had disappeared, stainings for Cux1, Ctip2, and Tbr1 demonstrated normal cortical lamination in wild-type as well as Ns^{-/-} brains. In the adult mouse, besides visualization of the cortical lamination by staining Cux1, Ctip2, and Tbr1, we investigated the distribution of inhibitory GABAergic interneurons that tangentially migrate into the cortical plate (**Figure 4**). Similar to the situation observed in younger animals, immunoreactivity of projection neuron markers suggested intact laminar architecture in adult Ns^{-/-} mice (**Supplementary Figure 2**). Furthermore, cells positive for interneuron markers Reelin, SST, and PV were detected throughout all cortical layers, with no obvious difference between mouse groups. Finally, we tested the integrity of the subplate in

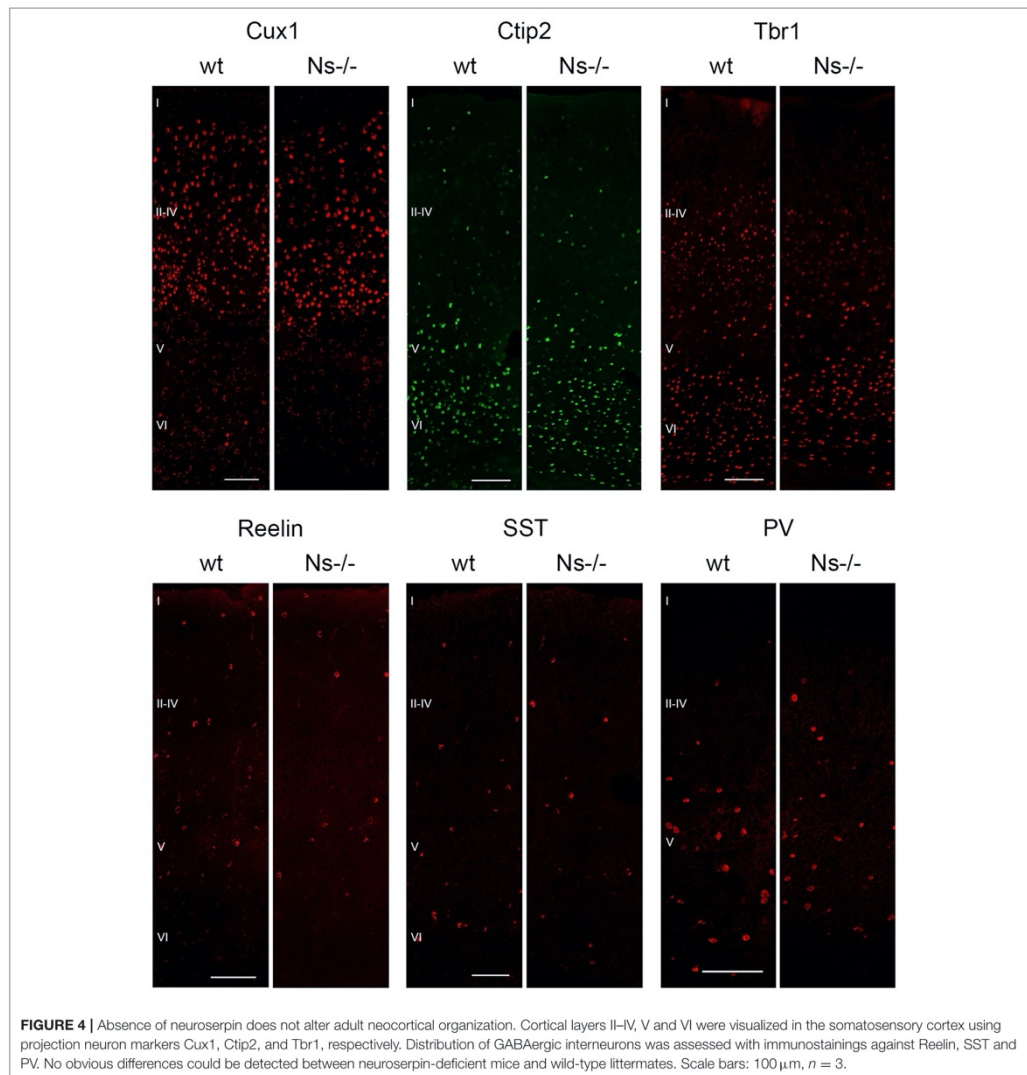
the somatosensory cortex of neuroserpin-deficient mice at E16 (**Supplementary Figure 3**). Nissl staining showed the presence of a well-developed subplate zone, and MAP2-immunostaining of cortical and subplate neurons revealed a cytoarchitecturally distinct subplate. Taken together, these data provide evidence for a normal laminar organization and GABAergic interneurons distribution in the neocortex of Ns^{-/-} mice.

Intact Proteolytic Processing of Reelin in Neuroserpin-Deficient Mice

Reelin is a regulator of neuronal migration and cortical lamination in the developing brain, whose function is controlled by proteolytic processing. Reelin is cleaved by two proteases: tPA, the main target of neuroserpin, and ADAMTS-4, a metalloprotease activated by tPA (Krstic et al., 2012; Lemarchant et al., 2014; Lussier et al., 2016). Since a previous study has proven an inhibitory effect of neuroserpin on tPA-dependent Reelin processing in HEK293 cells (Krstic et al., 2012), we assessed if this effect is also true *in vivo*. To this purpose, we collected brains from mice at prenatal stages (E13 and E16), and the neocortex at birth, at one week of age as well as during adulthood and compared proteolytic processing of Reelin between Ns^{-/-} mice and wild-type littermates by Western blot (**Figure 5A**). Using an antibody directed against the N-Terminus of Reelin, in all five stages we detected three Reelin-positive bands: Full-length Reelin at 460 kDa, the C-terminal and the N-terminal cleaved forms at 380 and 160 kDa, respectively. Quantification of band intensity demonstrated that neither Reelin expression nor its cleavage were altered by the absence of neuroserpin at any developmental stage tested (**Supplementary Figure 4**). Furthermore, since tPA directly activates ADAMTS-4 (Lemarchant et al., 2014), we considered the possibility that neuroserpin could influence Reelin proteolysis by regulating tPA-dependent cleavage of the metalloprotease. In order to explore this hypothesis, we extended the Western blot analysis mentioned above to detect the different forms of ADAMTS-4, i.e., the full-length zymogen and the p75, p60, and p50 cleavage products. Whereas the band representing the full-length zymogen was particularly strong during early developmental stages and its intensity declined in the adulthood, the p50 cleavage product showed an opposite trend, with a weak band at E13 and E16 increasing in intensity in the postnatal period (**Figure 5B**). In contrast, production of the p60 and p75 fragments was constant over time. Importantly, we did not detect any difference in band intensity for all fragments tested between neuroserpin-deficient and wild-type cortices at any developmental stage (**Supplementary Figure 4**). These data demonstrate that in the absence of neuroserpin, neither cleavage of Reelin, nor activation of ADAMTS-4 are impaired. This is in





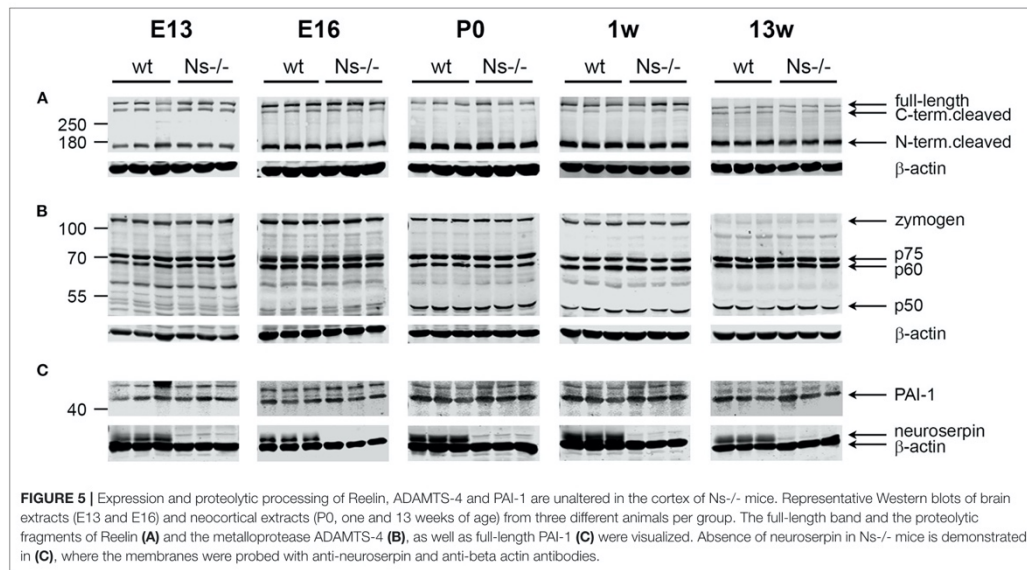


line with lack of developmental abnormalities in the cortex of neuroserpin-deficient mice.

Unaltered Levels of the Serine Protease Inhibitor PAI-1 in the Absence of Neuroserpin

PAI-1 is a serine protease inhibitor known to regulate the proteolytic function of tPA, e.g., during fibrinolysis. PAI-1 has

been often discussed as a possible candidate compensating for the loss of neuroserpin in the brain of *Ns-/-* mice. We hypothesized that, if PAI-1 would counterbalance neuroserpin's depletion, its expression would rise in *Ns-/-* mouse brains. In order to test this possibility, we analyzed PAI-1 expression in the same cortical extracts mentioned above by Western blot. A band representing full-length PAI-1 was detected at 45 kDa at all developmental stages tested, in both wild-type and neuroserpin-deficient mice (Figure 5C). Importantly, quantification of band intensity did



not reveal differences in PAI-1 expression between mouse groups (Supplementary Figure 4). Therefore, we conclude that absence of neuroserpin does not lead to a compensatory rise in PAI-1 synthesis.

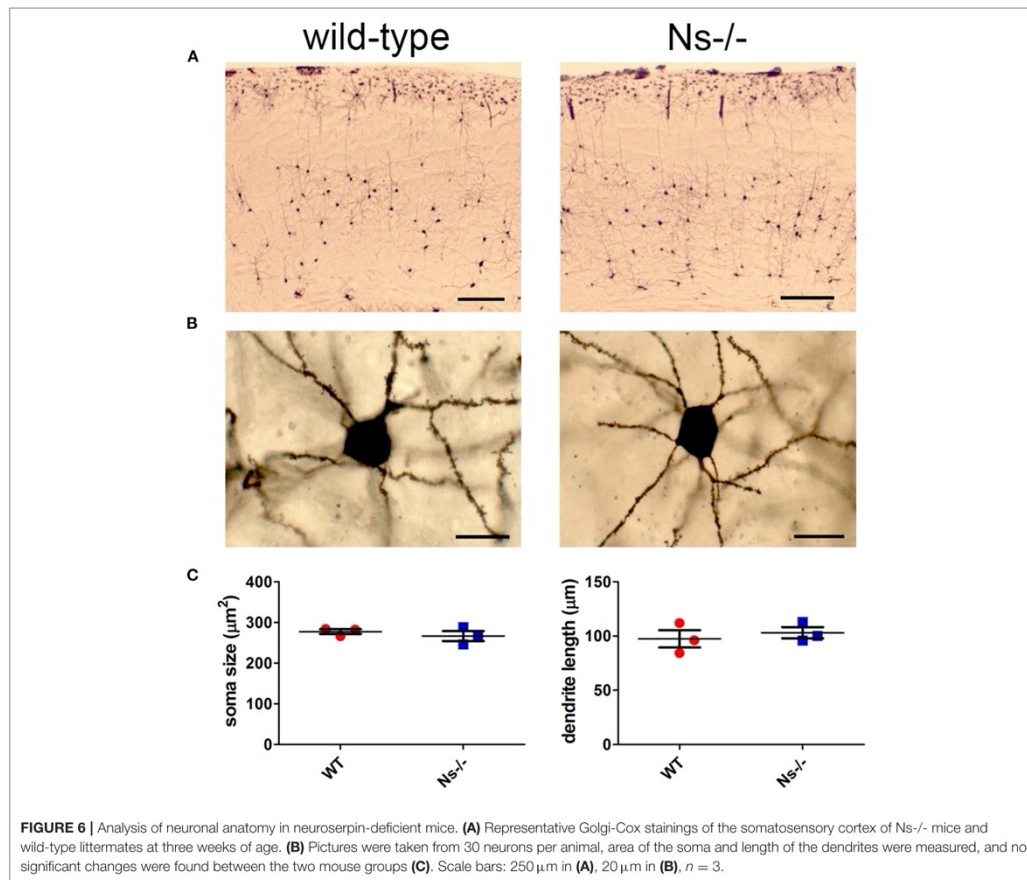
No Alterations Have Been Observed in Neuronal Anatomy and Perineuronal Net Composition in Neuroserpin-Deficient Mice

Since neuroserpin is known to regulate dendritic arborization *in vitro* (Borges et al., 2010), we assessed if its absence is responsible for similar alterations in the neocortex *in vivo*. Therefore, we collected brains from wild-type and neuroserpin-deficient mice at 3 weeks of age, i.e., when neuronal migration and differentiation are completed, and the newly formed neurons have developed dendritic arbors and have assembled into circuits. We restricted our analysis to the somatosensory cortex, the same region examined in the previous experiments. Golgi-Cox impregnation allowed visualization of neurons and their dendritic branches in the deeper layers of the neocortex (Figure 6A). No gross anatomical alterations were observed between wild-type and *Ns*^{-/-} mice. To further look into details of the neuronal structure, pictures were taken from 30 cells per mouse (15 per hemisphere) (Figure 6B). Surface area of the soma and average length of dendrites were measured, but no significant change was detected between the two mouse groups (Soma size: wt 277,67 ± 10,05 μm²; *Ns*^{-/-} 266,76 ± 20,96 μm²; *p* = 0,4619. Dendrite length: wt 97,44 ± 13,85 μm; *Ns*^{-/-} 103,09 ± 8,92 μm; *p* = 0,5848) (Figure 6C). Furthermore, we investigated aggrecan, a chondroitin sulfate proteoglycans

and main components of the mature perineuronal net (PNN), specialized extracellular matrix structures found around distinct neurons and implicated in synaptic maturation (Frischknecht and Gundelfinger, 2012). Since we found altered expression and proteolytic cleavage of aggrecan in the hippocampus of juvenile neuroserpin-deficient mice, we assessed if this dysfunction is also present in the neocortex. Immunohistochemical stainings showed presence of aggrecan throughout the somatosensory cortex, especially in lower layers, strongly concentrated around the soma of certain neurons, the pattern being very similar in mice belonging to both groups (Figure 7A). Western blot analysis of cortical extracts revealed both full-length aggrecan and 150 kDa band representing the main proteolytic fragment, but no difference in expression and cleavage could be detected between neuroserpin-deficient and control mice at three as well as at 13 weeks of age (Figure 7B).

Analysis of Neocortical Synapses in Adult *Ns*^{-/-} Mice

Since absence of neuroserpin alters synaptic morphology and plasticity in the adult mouse hippocampus (Reumann et al., 2017), we hypothesized that, despite normal cortical development, in the neocortex as well neuroserpin could exert a regulatory function at synaptic level in the adult. In order to investigate this, we performed ultrastructural analysis of synapses of the primary somatosensory cortex in adult neuroserpin-deficient mice and wild-type littermates (Figure 8A). Electron micrographs revealed a heterogenic population of regularly formed synapses in both mouse groups. Synaptic contacts showed typical asymmetric postsynaptic

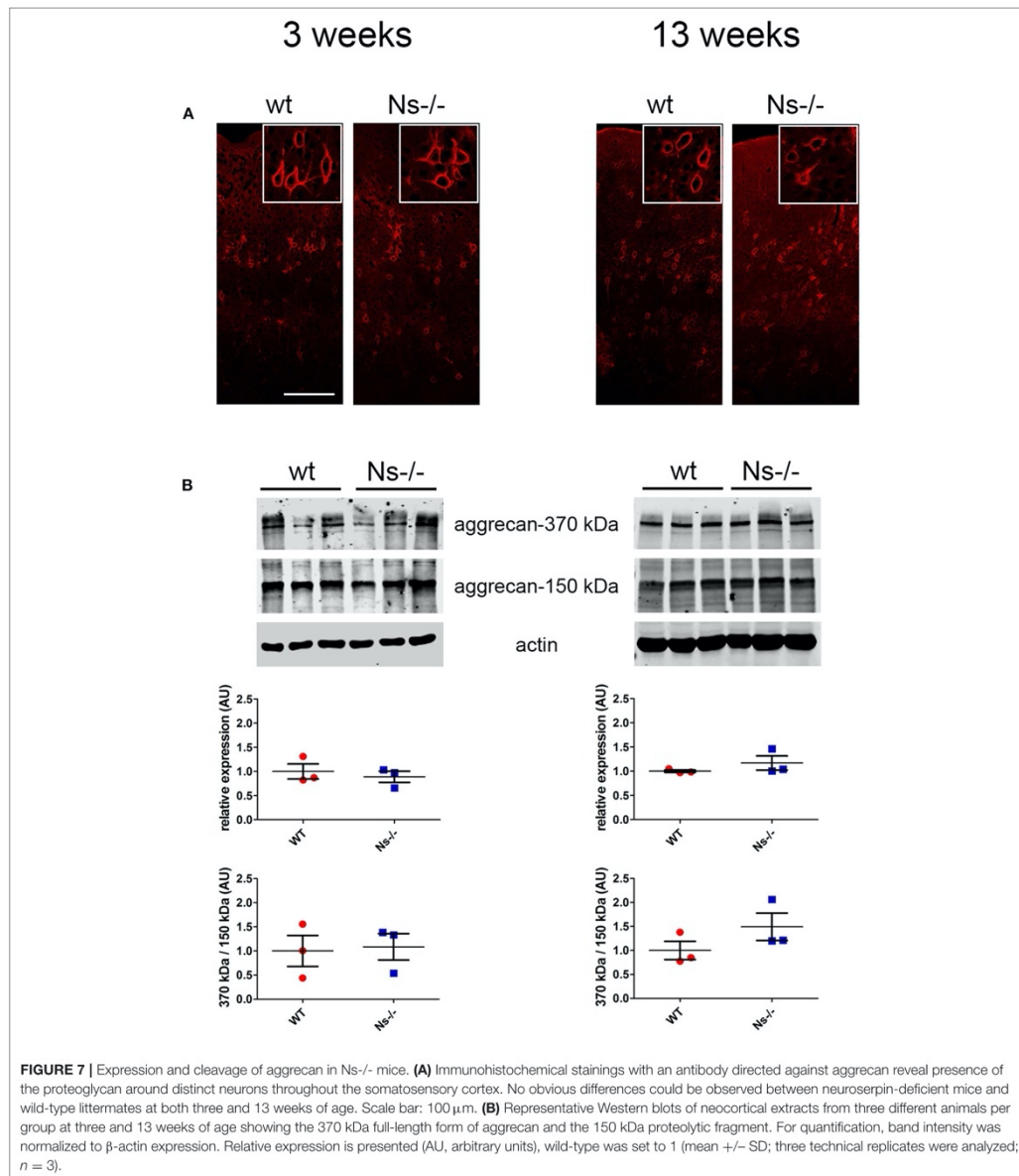


densities and presynaptic boutons. Many densely packed vesicles, and occasionally mitochondria, were detected in the presynaptic terminals. All in all, no obvious difference in the overall morphology of synaptic contacts was observed. Furthermore, although cortical synaptic morphology is preserved in the absence of neuroserpin, we considered the possibility that neuroserpin deficiency could lead to synaptic dysfunction at protein level. To evaluate this, we isolated synaptosomes from the neocortex of adult neuroserpin-deficient mice and control littermates and subjected them to differential quantitative proteomics to compare the synaptic proteome between both mouse groups. A total number of 1,715 proteins were identified, of which 1,268 were found in at least three out of four animals of both wt and *Ns*^{-/-} group (**Supplementary Table 2**). Brain and synaptic proteins, as well as extracellular matrix components and proteins involved in vesicular trafficking processes, were found to be highly represented among the identified proteins

(**Supplementary Table 2**). Principle component analysis as well as unsupervised hierarchical clustering revealed no clear distinguishability between *Ns*^{-/-} and wt mice at the proteomic level (**Figure 8B**). T-testing revealed only eight proteins significantly differentially abundant between both compared groups at a p -value < 0.05 . However, no protein exceeded a 1.5-fold change difference cutoff between the queried groups, indicating that neuroserpin deficiency does not significantly alter the composition of the synaptic proteome in the neocortex region.

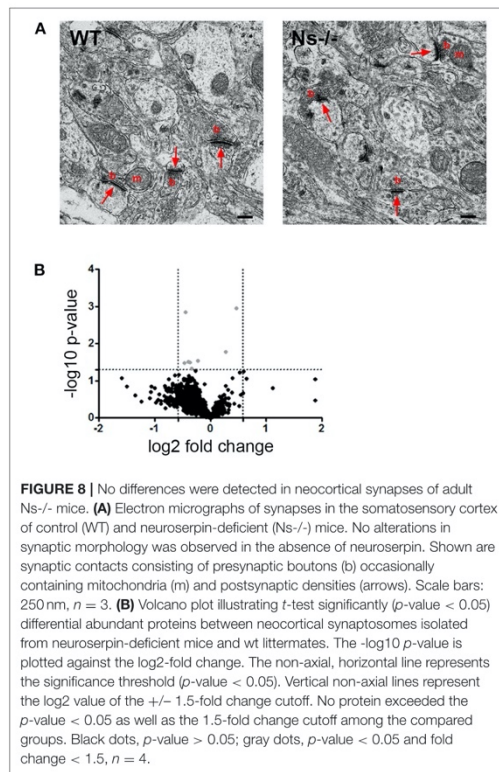
DISCUSSION

In recent years, investigations have examined the role of neuroserpin in the hippocampus and demonstrated its indispensable function in the proper formation of this brain region (Hermann et al., 2020). In the adulthood, lack



of neuroserpin is responsible for altered spine-synapse density and synaptic plasticity in the hippocampus. Consistent with this, neuroserpin-deficient mice show cognitive and sociability deficits in hippocampal-dependent behavioral tasks (Reumann

et al., 2017). In view of its key role in the hippocampus, we extended the analysis of neuroserpin function to the neocortex, a region presenting strong expression of the serpin and critical for encoding and retrieval of memories.



First, we performed an accurate investigation of neuroserpin expression in the neocortex. We observed a broad expression at low levels during development being distributed more differentially in the mature tissue. This expression pattern has already been described for the hippocampus (Hermann et al., 2020) and is in line with the observation made by Krueger and colleagues using *in situ* hybridization according to which neurons migrating in the cortical plate express neuroserpin weakly, but once they have settled in the cortical plate and have differentiated they contain larger amounts of neuroserpin mRNA (Krueger et al., 1997). Based on this observation we hypothesized that, in contrast to a ubiquitous role throughout the tissue during development, in the adult cortex neuroserpin could be specifically involved in regulating proteolytic processes in a particular subset of cells, therefore elucidating the nature of cells producing neuroserpin could provide further insight into its function. To find out which cells express neuroserpin, we analyzed colocalization with different neuronal and glial markers by immunohistochemistry. Similar to the situation in the hippocampus (Hermann et al., 2020), we did not detect expression of neuroserpin in GFAP-positive astrocytes,

Iba1-positive microglia and Olig2-positive oligodendrocytes, suggesting a neuronal origin. Still, since investigated markers do not represent the entirety of glial cells, we cannot exclude neuroserpin expression by further non-neuronal subpopulations. We found neuroserpin immunoreactivity in excitatory projection neurons of upper (Cux1-positive) and deep (Tbr1-positive) layers during development, but in the mature cortex colocalization with Tbr1 was restricted to few cells located at the bottom of layer VI. Although a colocalization study would be necessary to draw conclusions, we postulate that these Tbr1-neuroserpin-double positive cells could reside in the subplate, a region known to express high levels of the serpin during cortical development (Kondo et al., 2015). Moreover, neuroserpin reactivity was observed in PV-, SST-, and Reelin-positive GABAergic interneurons throughout the cerebral cortex. This broad expression of neuroserpin in both inhibitory interneurons and excitatory pyramidal neurons is in line with the observations previously described in human tissue by Adorjan et al. (2019), but unfortunately it does not allow to draw any conclusion about a possible role for neuroserpin in the cerebral mouse cortex. Still, since our investigation included only few markers for projection neurons and interneurons, we cannot exclude that further examinations will reveal specific neuroserpin functions linked to non-tested neuronal subtypes.

Next, we assessed a possible colocalization of neuroserpin and its target protease, tPA, in the somatosensory cortex at P0, the developmental stage at which the expression of neuroserpin reaches its highest level (Krueger et al., 1997). We found tPA-expressing cells throughout the cortex, in line with previous works describing presence of the serine protease in layers II–VI in glutamatergic pyramidal neurons, as well as endothelial cells and some glial cells (Louessard et al., 2016; Stevenson and Lawrence, 2018). Although co-expression of neuroserpin and tPA in the human central nervous system, in particular in regions with neuronal plasticity and motor learning, has previously been reported (Teesalu et al., 2004), the possibility that both proteins are produced by the same cell has never been investigated. We show here that, although a strong immunoreactivity for neuroserpin and its target is observed in the somatosensory cortex, we did not detect cells producing both proteins. This does not exclude that the proteins, after being secreted from neighboring cells, interact in the extracellular environment, where neuroserpin could regulate the proteolytic activity of tPA.

Having observed the presence of neuroserpin in the neocortex starting from early developmental stages, and knowing its key role in hippocampal development, we asked if its absence would influence corticogenesis. Therefore, we analyzed formation of the cortex histologically by staining markers of pyramidal neurons located in the different layers and of inhibitory interneuron in neuroserpin-deficient mice and wild-type littermates, and we did not detect any difference between mouse groups. Moreover, since the subplate exerts a key function during corticogenesis, e.g., in controlling migration of cortical neurons (Wang et al., 2010) we tested its integrity, but we failed to observe obvious changes in its cytoarchitecture. Though a more in-depth analysis will be necessary to exclude defects in the functionality of the subplate in the absence of neuroserpin, the data presented here argue for

a normal lamination of the neocortex in neuroserpin-deficient mice. Interestingly, lack of tPA, the main target of neuroserpin, results in deficits in neuronal migration and positioning at very early developmental stages, thereby highlighting the essential role of this serine protease in cortical formation (Pasquet et al., 2019). However, the same phenotype is observed in the presence of a mutant form of tPA that cannot bind NMDAR, suggesting that NMDAR binding, more than the proteolytic function of tPA, is necessary to control neuronal migration during corticogenesis. If this is true, neuroserpin function as tPA inhibitor would be dispensable in this context, a finding which is in line with data presented here. Though, we cannot exclude that during cortical development neuroserpin could inhibit serine proteases other than tPA or act independently from its function as a serpin. An alternative non-inhibitory mechanism through which neuroserpin may act could be by binding to a transmembrane receptor. Neuroserpin is known to bind to and be internalized by the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) (Makarova et al., 2003), a protein that plays a role during brain development and in synaptic functions (Narita et al., 1997; May et al., 2004). Moreover, lack of lamination defects in neuroserpin-deficient mice could be due to compensatory effects by other proteins. In this respect we investigated the expression of PAI-1, another regulator of tPA activity. Lack of an overexpression of PAI-1 in the neocortex of neuroserpin-deficient mice speaks against a compensatory inhibition by PAI-1. Still, further investigations are needed to study the compensatory effect more closely, since it could be detectable only by a conditional knockout of neuroserpin at a later developmental stages.

Reelin is a glycoprotein expressed and secreted in many organs (Forster et al., 2010). Interestingly, only the brain is affected by mutations leading to loss of function of the protein (D'Arcangelo et al., 1995). The most striking phenotype is a defect in lamination of cerebellum and neocortex due to incorrect neuronal migration. In the cerebral cortex, Reelin is cleaved by different proteases at two specific sites, leading to the production of three major fragments that, together with the full-length variant, have been observed in the developing as well as in the adult brain (Trotter et al., 2014). Recently, a study by Krstic et al. demonstrated that tPA cleaves Reelin at the C-terminus *in vitro* and in HEK293 cells and this proteolytic step can be inhibited by co-expressing neuroserpin (Krstic et al., 2012). We tested this *in vivo* in mouse cortical extracts, but we could not detect changes in Reelin expression or cleavage between neuroserpin-deficient mice and wild-type littermates. Moreover, in the same study Krstic and colleagues proved cleavage of Reelin at both N- and C-terminus by ADAMTS-4, a metalloprotease activated by tPA (Lemarchant et al., 2014). Although this finding could not be confirmed in cultured cerebral cortical neurons (Hisanaga et al., 2012), it offers another regulatory mechanism how neuroserpin could control Reelin cleavage. Again, we checked this by analyzing ADAMTS-4 by Western blot in cortical extracts from neuroserpin-deficient mice. We did not detect any alteration in the abundance of full-length and proteolytic fragments of ADAMTS-4, suggesting that either ADAMTS-4 cleavage by tPA is not taking place in the cortex under physiological conditions,

or another serpin regulates this process, thus compensating for neuroserpin absence in knockout mice. Taken together, unaltered Reelin expression and cleavage in the cortex of mice deficient in neuroserpin is in agreement with absence of deficits in corticogenesis detected in this work. Our data contradict the inhibitory effect of neuroserpin on Reelin cleavage observed in HEK293 cells. It is conceivable that this could be relevant in other brain regions, e.g., in the adult hippocampus in the context of synaptic plasticity, a process regulated by neuroserpin. Moreover, it could be hypothesized that neuroserpin function on Reelin cannot be observed under basal conditions but only after synaptic potentiation. A similar situation has been described in mice lacking tPA, where upregulation of tPA-dependent Reelin processing is observed only after induction of NMDAR-independent long-term potentiation with a potassium channel blocker (Trotter et al., 2014).

Although neuroserpin-deficient mice do not show deficits in cortical layer formation, we assessed the possibility that, similarly to the situation in the hippocampus, neuroserpin could control neuronal maturation and synaptic phenotype in the neocortex as well. Therefore, we concentrated our analysis on postnatal development. We examined average length of dendrites and soma size in mice at this stage by staining brains with the Golgi-Cox method and quantifying these parameters morphologically, but we did not find any difference between neuroserpin-deficient and control mice. Based on observations from an *in vitro* study with cultured hippocampal neurons, where increased dendritic protrusion has been detected in neuroserpin-overexpressing cells (Borges et al., 2010), we would have expected a dendritic phenotype in mice lacking the serpin. So again, this either speaks for a hippocampal-specific effect, or it may be caused by protein overexpression. Another reason for the lack of a dendritic phenotype could be due to the limitations of our analysis. The Golgi-Cox protocol impregnates randomly neurons, and different cell types have different propensity to stain (Pasternak and Woolsey, 1975; Shimono and Tsuji, 1987). Moreover, neurons in the upper layers are spared from the staining, and our analysis was restricted to the somatosensory cortex, therefore our results may not be representative and thus do not allow a general statement on the dendritic phenotype in neuroserpin-deficient mice. Furthermore, we did not detect any difference in expression and proteolytic cleavage of aggrecan in the neocortex at three weeks of age. Aggrecan is the main component of PNN, extracellular matrix structures of the central nervous system typically localized around some parvalbumin-positive, GABAergic inhibitory interneurons in the cerebral cortex. Aggrecan expression gradually increases postnatally and correlates with the process of synaptic maturation and stabilization observed at the end of the critical period (Frischknecht and Gundelfinger, 2012). We previously reported that neuroserpin influences aggrecan expression and cleavage at three weeks of age in the hippocampus (Hermann et al., 2020), however, again, this role does not seem to be exerted in the cerebral cortex.

Lastly, we analyzed cortical synapses in adult mice by a quantitative proteomic analysis of synaptosomes, structures consisting of a pre-synaptic terminal containing synaptic

vesicles, dense-core vesicles and mitochondria, and a post-synaptic density attached to the pre-synaptic active zone (Phelan and Gordon-Weeks, 1997). This analysis allowed to quantify 1,268 proteins in at least three out of four tested animals for every group. The dominant presence of many brain- and synapse-specific proteins, indicated by the statistically significant enrichment of brain and synapse specific gene sets, argues for successful sample preparation. However, the composition of the synaptic proteome was not significantly altered by the loss of neuroserpin. Together with normal morphology of synaptic contacts observed at electron microscopic levels and with unaltered expression and processing of aggrecan in the adult cortex, these data speak against a role of neuroserpin in regulation of cortical synaptic composition. However, we cannot exclude that subtler changes could be present. A more in-depth analysis of the synapses involving 3D-reconstruction may reveal minor morphological alterations. Moreover, analysis of the proteome of the neocortex without synaptic enrichment *via* synaptosome isolation could disclose mechanisms of action that take place beyond the synaptic compartment.

CONCLUSIONS

The present work shows that neuroserpin is strongly expressed in the neocortex starting from early developmental stages until adulthood. We observed expression in Cux1- and Tbr1-positive excitatory glutamatergic projection neurons and PV-, SST- and Reelin-positive inhibitory GABA-ergic interneurons but not in glial cells. During formation of the neocortex, neuroserpin does not contribute to cortical lamination and does not regulate cleavage of Reelin. Furthermore, under physiological conditions, with all limitations of our methods, we did not detect alterations in neuronal maturation and synaptic protein composition. This does not exclude that a phenotype could be revealed under stressful conditions, like ischemia or a viral infection, and may be responsible for neurological dysfunction later in life. Therefore, further work is needed to explore the presence of subtle, yet undetected alterations in the neocortex of neuroserpin-deficient mice.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repository. The name of the repository and accession number can be found in the article.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Behörde für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, Hamburg, Germany (registration number ORG-739) and ethical committee CENOMEXA, Caen, France (identification number #10638).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GG and MG designed the study, GG conceived and planned the experiments, DK, RR, KS, HV, SD, MS, and GG carried out the experiment. MD analyzed the experimental data. GG supervised the project. GG and DK wrote the paper with input from all authors. All authors contributed to the interpretation of the results.

FUNDING

DK and MG was supported by DFG Grant SFB877.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Antonio Virgilio Failla and Bernd Zobiak of the UKE microscopy imaging facility, Hamburg, Germany; Kristin Hartmann of the UKE mouse pathology facility, Hamburg, Germany; Chudamani Raithore of the ZMNH morphology and electron microscopy facility, Hamburg, Germany; and Yannick Hommet and Laurent Lebouvier of the Department of Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, Normandie Université, Caen, France for technical assistance. A special thanks to Renato Frischknecht, Department of Biology and Animal Physiology, Friedrich Alexander University Erlangen-Nürnberg, Germany, for his suggestions during the elaboration of this work.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2021.627896/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Colocalization of neuroserpin and its target protease tPA. Pregnant mice were in utero electroporated at E14 with the pPlat-GFP plasmid, resulting in detection of the GFP in cells expressing tPA. Co-electroporation with the pCAG-RFP plasmid allowed localization of the electroporated area (RFP staining). Mice were killed at P0, brains were fixed and sections of the somatosensory cortex stained with an anti-neuroserpin antibody. Visualization of tPA-positive cells was enhanced by staining with an anti-GFP antibody. Both neuroserpin (Ns) and tPA are expressed throughout the cerebral cortex, however cells expressing both proteins cannot be observed. White box represents the area shown at higher magnification in the top row. Scale bar: 50 μ m.

Supplementary Figure 2 | Quantification of cortical immunofluorescence signal. Cortices were divided into 10 equally sized bins, the percentage of positive immunofluorescence to bin area was calculated for the cortical markers Cux1, Ctip2, and Tbr1 at E13, E16, P0, one and 13 weeks of age. Values of wt mice (red bars) were compared to Ns^{-/-} (blue bars), no significant difference was observed at any stage. $n = 3$ animals, bars indicate mean, error bars indicate SD.

Supplementary Figure 3 | Analysis of the subplate in Ns^{-/-} mice at E16. **(A)** Nissl staining of the developing cortex of wild-type and Ns^{-/-} mice at E16. **(B)** The same region was stained with an antibody directed against the neuronal marker MAP2 (green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). CP, cortical plate; SP, subplate. Scale bar: 50 μ m.

Supplementary Figure 4 | Quantification of Reelin, ADAMTS-4, and PAI-1 expression and cleavage. Intensity of each band was normalized to β -actin expression. Relative expression is presented (AU, arbitrary units), expression for

the wt group was set to 1. $n = 3$ animals; three technical replicates were analyzed; bars indicate mean, error bars indicate SD.

Supplementary Table 1 | Animals used in this study. Number and age of the mice included in this study are listed, as well as brain area and analysis that has been performed with the tissues.

Supplementary Table 2 | List of proteins identified by differential quantitative proteomics. Synaptosomes were isolated from the neocortex of adult neuroserpin-deficient mice and control littermates and analyzed by differential quantitative proteomics to assess synaptic alterations between both mouse groups ($n = 4$). In red are proteins with p -value < 0.05 .

REFERENCES

- Adorjan, I., Tyler, T., Bhaduri, A., Demharter, S., Finszter, C. K., Bako, M., et al. (2019). Neuroserpin expression during human brain development and in adult brain revealed by immunohistochemistry and single cell RNA sequencing. *J. Anat.* 235, 543–554. doi: 10.1111/joa.12931
- Borges, V. M., Lee, T. W., Christie, D. L., and Birch, N. P. (2010). Neuroserpin regulates the density of dendritic protrusions and dendritic spine shape in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* 88, 2610–2617. doi: 10.1002/jnr.22428
- Brennan, K. J., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhardt, C., Tran, N., Sangar, S., et al. (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 473, 221–225. doi: 10.1038/nature09915
- D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S. C., Soares, H. D., Morgan, J. I., and Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374, 719–723. doi: 10.1038/374719a0
- de Carlos, J. A., Lopez-Masaraque, L., and Valverde, F. (1996). Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J. Neurosci.* 16, 6146–6156. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-19-06146.1996
- Forster, E., Bock, H. H., Herz, J., Chai, X., Frotscher, M., and Zhao, S. (2010). Emerging topics in Reelin function. *Eur. J. Neurosci.* 31, 1511–1518. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07222.x
- Frischknecht, R., and Gundelfinger, E. D. (2012). The brain's extracellular matrix and its role in synaptic plasticity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 970, 153–171. doi: 10.1007/978-3-7091-0932-8_7
- Galliciotti, G., Glatzel, M., Kinter, J., Kozlov, S. V., Cinelli, P., Rulicke, T., et al. (2007). Accumulation of mutant neuroserpin precedes development of clinical symptoms in familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies. *Am. J. Pathol.* 170, 1305–1313. doi: 10.2353/ajpath.2007.060910
- Galliciotti, G., and Sonderegger, P. (2006). Neuroserpin. *Front. Biosci.* 11, 33–45. doi: 10.2741/1778
- Greig, L. C., Woodworth, M. B., Galazo, M. J., Padmanabhan, H., and Macklis, J. D. (2013). Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 755–769. doi: 10.1038/nrn3586
- Hakak, Y., Walker, J. R., Li, C., Wong, W. H., Davis, K. L., Buxbaum, J. D., et al. (2001). Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 4746–4751. doi: 10.1073/pnas.081071198
- Hermann, M., Reumann, R., Schostak, K., Kement, D., Gelderblom, M., Bernreuther, C., et al. (2020). Deficits in developmental neurogenesis and dendritic spine maturation in mice lacking the serine protease inhibitor neuroserpin. *Mol. Cell Neurosci.* 102:103420. doi: 10.1016/j.mcn.2019.103420
- Hisanaga, A., Morishita, S., Suzuki, K., Sasaki, K., Koie, M., Kohno, T., et al. (2012). A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4) cleaves Reelin in an isoform-dependent manner. *FEBS Lett.* 586, 3349–3353. doi: 10.1016/j.febslet.2012.07.017
- Jossin, Y. (2020). Reelin functions, mechanisms of action and signaling pathways during brain development and maturation. *Biomolecules* 10:964. doi: 10.3390/biom10060964
- Kondo, S., Al-Hasani, H., Hoerder-Suabedissen, A., Wang, W. Z., and Molnar, Z. (2015). Secretory function in subplate neurons during cortical development. *Front. Neurosci.* 9:100. doi: 10.3389/fnins.2015.00100
- Koster, J. D., Leggewie, B., Blechner, C., Brandt, N., Fester, L., Rune, G., et al. (2016). Inositol-1,4,5-trisphosphate-3-kinase-A controls morphology of hippocampal dendritic spines. *Cell Signal.* 28, 83–90. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.10.016
- Krstic, D., Rodriguez, M., and Knuesel, I. (2012). Regulated proteolytic processing of Reelin through interplay of tissue plasminogen activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5, and their modulators. *PLoS ONE* 7:e47793. doi: 10.1371/journal.pone.0047793
- Krueger, S. R., Ghisu, G. P., Cinelli, P., Gschwend, T. P., Osterwalder, T., Wolfer, D. P., et al. (1997). Expression of neuroserpin, an inhibitor of tissue plasminogen activator, in the developing and adult nervous system of the mouse. *J. Neurosci.* 17, 8984–8996. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-23-08984.1997
- Lemarchant, S., Pruvost, M., Hebert, M., Gauberti, M., Hommet, Y., Briens, A., et al. (2014). tPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* 66, 28–42. doi: 10.1016/j.nbd.2014.02.005
- Lenoir, S., Varangot, A., Lebouvier, L., Galli, T., Hommet, Y., and Vivien, D. (2019). Post-synaptic release of the neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA). *Front. Cell Neurosci.* 13:164. doi: 10.3389/fncel.2019.00164
- Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., et al. (2016). Tissue plasminogen activator expression is restricted to subsets of excitatory pyramidal glutamatergic neurons. *Mol. Neurobiol.* 53, 5000–5012. doi: 10.1007/s12035-015-9432-7
- Lussier, A. L., Weeber, E. J., and Rebeck, G. W. (2016). Reelin proteolysis affects signaling related to normal synapse function and neurodegeneration. *Front. Cell Neurosci.* 10:75. doi: 10.3389/fncel.2016.00075
- Madani, R., Kozlov, S., Akhmedov, A., Cinelli, P., Kinter, J., Lipp, H. P., et al. (2003). Impaired explorative behavior and neophobia in genetically modified mice lacking or overexpressing the extracellular serine protease inhibitor neuroserpin. *Mol. Cell Neurosci.* 23, 473–494. doi: 10.1016/S1044-7431(03)00077-0
- Makarova, A., Mikhailenko, I., Bugge, T. H., List, K., Lawrence, D. A., and 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, 50250–50258. doi: 10.1074/jbc.M309150200
- May, P., Rohlmann, A., Bock, H. H., Zuhrove, K., Marth, J. D., Schomburg, E. D., et al. (2004). Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice. *Mol. Cell Biol.* 24, 8872–8883. doi: 10.1128/MCB.24.20.8872-8883.2004
- Molyneux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R., and Macklis, J. D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 427–437. doi: 10.1038/nrn2151
- Narita, M., Bu, G., Holtzman, D. M., and Schwartz, A. L. (1997). The low-density lipoprotein receptor-related protein, a multifunctional apolipoprotein E receptor, modulates hippocampal neurite development. *J. Neurochem.* 68, 587–595. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.68020587.x
- Ohtaka-Maruyama, C., and Okado, H. (2015). Molecular pathways underlying projection neuron production and migration during cerebral cortical development. *Front. Neurosci.* 9:447. doi: 10.3389/fnins.2015.00447
- Pasquet, N., Douceau, S., Naveau, M., Lesept, F., Louessard, M., Lebouvier, L., et al. (2019). Tissue-type plasminogen activator controlled corticogenesis through a mechanism dependent of NMDA receptors expressed on radial glial cells. *Cereb. Cortex* 29, 2482–2498. doi: 10.1093/cercor/bhy119
- Pasternak, J. F., and Woolsey, T. A. (1975). On the “selectivity” of the Golgi-Cox method. *J. Comp. Neurol.* 160, 307–312. doi: 10.1002/cne.901600304
- Phelan, P., and Gordon-Weeks, P. R. (1997). “Isolation of synaptosomes, growth cones and their subcellular components,” in *Neurochemistry, A Practical Approach, 2nd Edn.* eds. A. J. Turner and H. S. Bachelard (Oxford, NY: Oxford University Press).
- Rakic, P. (1974). Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183, 425–427. doi: 10.1126/science.183.4123.425
- Ranaivoson, F. M., Von Daake, S., and Comoletti, D. (2016). Structural Insights into Reelin function: present and future. *Front. Cell Neurosci.* 10:137. doi: 10.3389/fncel.2016.00137

- Reumann, R., Vierk, R., Zhou, L., Gries, F., Kraus, V., Mienert, J., et al. (2017). The serine protease inhibitor neuroserpin is required for normal synaptic plasticity and regulates learning and social behavior. *Learn Mem.* 24, 650–659. doi: 10.1101/lm.045864.117
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019
- Shimono, M., and Tsuji, N. (1987). Study of the selectivity of the impregnation of neurons by the Golgi method. *J. Comp. Neurol.* 259, 122–130. doi: 10.1002/cne.902590108
- Stevenson, T. K., and Lawrence, D. A. (2018). Characterization of tissue plasminogen activator expression and trafficking in the adult murine brain. *eNeuro* 5. doi: 10.1523/ENEURO.0119-18.2018
- Sultan, K. T., Brown, K. N., and Shi, S. H. (2013). Production and organization of neocortical interneurons. *Front. Cell. Neurosci.* 7:221. doi: 10.3389/fncel.2013.00221
- Tamamaki, N., Fujimori, K. E., and Takauji, R. (1997). Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J. Neurosci.* 17, 8313–8323. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-21-08313.1997
- Teesalu, T., Kulla, A., Simisker, A., Siren, V., Lawrence, D. A., Asser, T., et al. (2004). Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *Thromb. Haemost.* 92, 358–368. doi: 10.1160/TH02-12-0310
- Trotter, J. H., Lussier, A. L., Psilos, K. E., Mahoney, H. L., Sponaugle, A. E., Hoe, H. S., et al. (2014). Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. *Neuroscience* 274, 299–307. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.05.046
- Vawter, M. P., Shannon Weickert, C., Ferran, E., Matsumoto, M., Overman, K., Hyde, T. M., et al. (2004). Gene expression of metabolic enzymes and a protease inhibitor in the prefrontal cortex are decreased in schizophrenia. *Neurochem. Res.* 29, 1245–1255. doi: 10.1023/B:NERE.0000023611.99452.47
- Wang, W. Z., Hoerder-Suabedissen, A., Oeschger, F. M., Bayatti, N., Ip, B. K., Lindsay, S., et al. (2010). Subplate in the developing cortex of mouse and human. *J. Anat.* 217, 368–380. doi: 10.1111/j.1469-7580.2010.01274.x
- Wen, Z., Nguyen, H. N., Guo, Z., Lalli, M. A., Wang, X., Su, Y., et al. (2014). Synaptic dysregulation in a human iPS cell model of mental disorders. *Nature* 515, 414–418. doi: 10.1038/nature13716

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Kement, Reumann, Schostak, Vof, Douceau, Dottermusch, Schweizer, Schlüter, Vivien, Glatzel and Galliciotti. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

2. Darstellung der Publikation

2.1. Einleitung

Neuroserpin und seine physiologische Rolle als tPA-Inhibitor

Neuroserpin ist ein Serinprotease-Inhibitor (Serpine), der erstmals von Stoeckli et al. (1989) als Protein isoliert und charakterisiert wurde, welches am Axonenwachstum beteiligt ist. Seither konnte die physiologische Rolle von Neuroserpin vielfach beleuchtet werden (D'Acunzio et al. 2021).

So konnte in verschiedenen In-vitro-Studien bereits eine Komplexbildung von Neuroserpin mit verschiedenen Serinproteasen, wie z.B. Tissue-type Plasminogen Activator (tPA), Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) und Plasmin, aufgezeigt werden. Dabei zeigte Neuroserpin im Gegensatz zu anderen bekannten Plasminogen-Aktiva-tor-Inhibitoren eine höhere inhibitorische Wirksamkeit auf tPA als uPA (Hastings et al. 1997).

tPA ist eine Serinprotease, die hauptsächlich von Endothelzellen, Gliazellen und Neuronen im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert wird (Louessard et al. 2016, Stevenson und Lawrence 2018). Im Allgemeinen ist tPA für seine Rolle in der Blutgerinnung und Fibrinolyse bekannt, in der es die Konversion von Plasminogen zu Plasmin und so die Auflösung von Thromben fördert (Rijken et al. 1982). Daneben steuert die Protease jedoch auch viele weitere Gehirnfunktionen wie neuronale Plastizität, Lern- und Gedächtnisprozesse sowie Angstverhalten (Melchor und Strickland 2005, Samson und Medcalf 2006).

Die inhibitorische Wirkung von Neuroserpin auf tPA wurde in verschiedenen Studien belegt. So gelang der Forschungsgruppe um Osterwalder et al. (1998) mehrfach der Nachweis über die kovalente Komplexbildung zwischen Neuroserpin und tPA in-vitro. Auch zeigten sie, dass die Exposition mit rekombinantem Neuroserpin zu einer Hemmung der amidolytischen Aktivität vor allem von tPA im Vergleich zu uPA und Plasmin führt (Krueger et al. 1997). Außerdem konnte in einem transgenen Mausmodell auch in-vivo nachgewiesen werden, dass Neuroserpin-überexprimierende Mäuse eine Verringerung der tPA-Aktivität um 70 % zeigen (Cinelli et al. 2001). Diese Hemmung konnte in-vivo ebenso in den weiter unten beschriebenen Experimenten von Yepes et al. (2000, 2002) dargestellt werden.

Die funktionelle Rolle von Neuroserpin wird jedoch kontrovers diskutiert, da es auch Studien gibt, die dieser Ansicht widersprechen. Weitere Ergebnisse von Cinelli et al. (2001) beschrieben nämlich, dass Neuroserpin-Knockout (NSKO) Mäuse ebenso eine

normale tPA-Aktivität zeigen können. Auch gibt es in-vitro-Untersuchungen anderer Forscher, die eher auf einen vorübergehenden Charakter der Hemmung von tPA durch Neuroserpin hindeuten: so kam es nach Komplexbindung zunehmend zu einer Spaltung von Neuroserpin. Mit einer Halbwertszeit von zehn Minuten erwies sich der gebildete Komplex dabei eher als instabil. Diese Annahme wurde weiterführend durch kinetische Experimente untermauert, die aufzeigten, dass tPA im Anschluss der Komplexbildung und Hydrolyse seine Aktivität wiedererlangt. So konnte die Konversion seines Substrats Plasminogen durch Neuroserpin kaum gehemmt werden, selbst wenn das Serpin in einem tausendfachen molaren Überschuss gegenüber tPA vorhanden war. Im Gegensatz dazu war Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), ein anderer Serinprotease-Hemmer, dazu in der Lage, einen über Wochen stabilen Komplex mit tPA zu bilden und seine Aktivität effizient zu hemmen, ohne dass sich diese erneut regenerieren konnte (Barker-Carlson et al. 2002, Lee et al. 2017).

Neuroserpin und seine Verbindung zu verschiedenen Pathologien

Erstmalig für ein Serpin konnte die Beteiligung von Neuroserpin an der Stimmungsregulation nachgewiesen werden. Verhaltensstudien illustrierten, dass Mäuse mit einer fehlregulierten Neuroserpin-Expression zu angstähnlichem Verhalten neigten. Hierbei führte der Knockout von Neuroserpin zu einer verminderten motorischen Aktivität, insbesondere bei Exposition mit neuen Reizen. Die Überexpression hingegen führte sogar zu einer leichten Aktivitätssteigerung (Madani et al. 2003). Darüber hinaus zeigte sich bei Mäusen, die einer verringerten Kalorienzufuhr exponiert wurden, dass eine Überexpression von Neuroserpin zusätzlich mit einer Verbesserung der psychomotorischen Leistung einherging (Koubova und Guarente 2003). Eine Fehlregulation der Neuroserpin-Spiegel konnte auch bei Patienten mit Schizophrenie beobachtet werden (Vawter et al. 2004).

Daneben gelang Forschern auch der Nachweis einer neuroprotektiven Rolle von Neuroserpin sowohl im Rahmen von Schlaganfällen als auch Krampfanfällen. Mehrere Studien zeigten auf, dass Neuroserpin den Schaden begrenzen konnte, der sowohl durch die plasminogen-abhängige, proteolytische Aktivität von tPA (Yepes et al. 2000, Zhang et al. 2002) als auch durch die plasminogen-unabhängigen, postischämischen und proinflammatorischen Wirkungen von tPA mittels Mikroglia-Aktivierung (Yepes et al. 2002, Yepes et al. 2003, Gelderblom et al. 2013) ausgelöst wird. Yepes et. al (2000) induzierten eine fokale zerebrale Ischämie durch Okklusion der mittleren zerebralen

Arterie (MCAO) bei Ratten, die zu einer vermehrten Expression sowohl von Neuroserpin als auch von tPA und uPA führte. Durch die intrazerebrale Verabreichung von Neuroserpin konnte der Anstieg der tPA-Synthese unterdrückt und so die Funktionalität der Basalmembran und Blut-Hirn-Schranke bewahrt werden. Dies führte zu einer Reduktion der Apoptose in der ischämischen Penumbra um mindestens 50 % und des Infarktvolumens insgesamt um 64 %. Diese Ergebnisse konnten von derselben Forschungsgruppe auch auf die Induktion von Anfällen bei Ratten durch Kainsäure (KA) reproduziert werden. Dabei zeigte sich, dass es nach KA-Injektion in die Amygdala gemäß der Impulsausbreitung zu einer Hochregulation von Neuroserpin und tPA im Hippocampus kommt. Durch eine zusätzliche ipsilaterale, hippocampale Neuroserpin-Injektion konnte sowohl die tPA-Aktivität als auch die Anfallsausbreitung und der neuronale Verlust im Hippocampus bilateral verringert werden (Yepes et al. 2002).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei Mäusen mit tPA-Mangel, die im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen nach MCAO ein etwa 50 % kleineres Infarktvolumen aufwiesen. Die intravenöse Injektion von tPA führte in beiden Mausgruppen zur Zunahme der Infarktgröße (Wang et al. 1998). Neuere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass auch tPA-unabhängige Mechanismen für die neuroprotektive Rolle von Neuroserpin verantwortlich sein könnten, z.B. durch Plasmin-vermittelten Excitotoxin-induzierten Zelltod (Wu et al. 2010).

Zuletzt wurde außerdem eine familiäre, neurodegenerative Erkrankung mit der Bezeichnung „FENIB“ (familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies) charakterisiert, bei denen die Patienten Symptome sowohl einer präsenilen Demenz, eines kognitiven Verfalls als auch zerebraler Anfälle zeigen können. Grundlage dieser Erkrankung ist die intrazelluläre Polymerisation und Akkumulation von mutierten Neuroserpin-Proteinen in Zellen des Nervensystems, die zu frühzeitigem neuronalen Tod führen (Davis et al. 1999).

Expression von Neuroserpin

Neuroserpin wird ausschließlich neuronal während der Entwicklung des ZNS als auch im Erwachsenenalter exprimiert. Auch lässt sich eine geringe extrazerebrale Produktion nachweisen beispielsweise in Herz, Niere und Hoden (Krueger et al. 1997). Das räumlich-zeitliche Expressionsmuster deutet auf eine Rolle des Serpins bei der Regulation extrazellulärer, proteolytischer Ereignisse hin, die in den späten Stadien der Neurogenese stattfinden, wenn die Axone ihr Ziel erreicht haben, als auch während

der Synaptogenese und den anschließenden Umbauprozessen einschließlich der Synapseneliminierung. So findet sich Neuroserpin im ZNS von Erwachsenen vorwiegend in Regionen, in denen synaptische Plastizität eine wichtige Rolle spielt, um die Verfeinerung von synaptischen Kontakten zu beeinflussen.

Das Expressionsmuster von Neuroserpin wurde im murinen Gehirn in der Vergangenheit bereits präsentiert: Die Proteinexpression startet, sobald die Neurone anfangen sich zu teilen und von der Ventrikulärzone (VZ) weg migrieren. So ließ sich in Gehirnextrakten verschiedener Entwicklungsstadien zeigen, dass die Expression an Embryonaltag 14 (E14) zunächst auf niedrigem Niveau und homogen in den meisten Gehirnregionen beginnt. Zwischen E14 und E17 nimmt die Expression zu, mit den höchsten Spiegeln im Neokortex und Hippocampus sowie mit abnehmender Intensität in Kleinhirn, Pons und Medulla. Perinatal erreicht die Proteinexpression ihren Höhepunkt und fällt danach langsam ab, sodass im Erwachsenenalter ein mittleres Expressionsniveau erreicht wird. In erwachsenen Mäusen wurden erneut sehr starke Ausprägungen im Neokortex und Hippocampus festgestellt sowie zusätzlich im Riechkolben und in der Amygdala. Die hohen Expressionsniveaus sind ein Hinweis dafür, dass Neuroserpin bei der Bildung der entsprechenden Gehirnregion und der Aufrechterhaltung kortikaler Funktionen eine wichtige Rolle spielen könnte (Hastings et al. 1997, Krueger et al. 1997).

Außerdem ließen die Untersuchungen von Krueger et al. (1997) erste Einblicke in Bezug auf die Zugehörigkeit der Neuroserpin-exprimierenden Zellen zu, die anhand ihrer spezifischen Ausprägung innerhalb der grauen Substanz sowie der Größe und Morphologie der gefärbten Zellen neuronalen Zellen zugeordnet werden konnten. Die Expression in neuronalen Zellen bestätigte sich ebenso in Untersuchungen menschlicher Gewebeproben, jedoch ohne die Zellen genauer zu identifizieren (Teesalu et al. 2004). Eine noch genauere Charakterisierung der Zellen konnte erneut in humanem Gehirngewebe durch Adorjan et al. (2019) erfolgen, die anhand der Morphologie Interneurone und Pyramidalzellen vor allem der unteren Kortexschichten als Hauptquellen der Neuroserpin-Expression identifizierten. Ein genauerer Aufschluss in Bezug auf einen bestimmten neuronalen Subtypus der Zellen konnte jedoch auch hier nicht gegeben werden.

Die Rolle von Neuroserpin im Hippocampus

Das hohe Expressionsniveaus von Neuroserpin im Hippocampus und die Rolle dieser Gehirnregion in Bezug auf Prozesse der Lern- und Gedächtnisentwicklung sowie des

kognitiven und sozialen Verhaltens (Wannier-Morino et al. 2003) bewegte Wissenschaftler in den letzten Jahren dazu, den Einfluss des Serpins auf die Entwicklung des Hippocampus und die hippocampale synaptische Plastizität genauer zu erforschen. So konnte mittels Analyse der Langzeitpotenzierung (LTP), einem zellulären Parameter für Lernen und Gedächtnis, ein Zusammenhang zwischen Neuroserpin-Expression und hippocampalen Defiziten hergestellt werden. In der CA1-Region des Hippocampus von erwachsenen NSKO-Mäusen konnte eine reduzierte LTP zusammen mit einer verringerten Synapsendichte nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit den Defiziten in der synaptischen Plastizität wiesen diese Mäuse ebenso Defizite in der Durchführung Hippocampus-abhängiger Verhaltensaufgaben auf (Reumann et al. 2017).

Darauf aufbauend wurde die Auswirkung des Fehlens von Neuroserpin in der Entwicklung des Hippocampus unter meiner Mitwirkung untersucht (Hermann et al. 2020). Zunächst gelang uns der Nachweis einer verminderten Proliferation von Stammzellen Neuroserpin-defizienter Mäuse, die in Neurosphären kultiviert wurden. Eine in-vivo-Ausweitung der Untersuchung bestätigte die verminderte Proliferation in der Subgranularzone des Gyrus dentatus in frühen postnatalen Stadien. Dies zeigte sich durch eine signifikante Verringerung der Anzahl Ki67-positiver proliferierender Zellen eine Woche und drei Wochen postnatal bei gleichbleibender Zelldichte. Gleichzeitig zeigten die Zellen eine beschleunigte neuronale Reifung eine Woche postnatal, angezeigt durch eine signifikante Zunahme NeuN-positiver Neurone. Daraus ergab sich eine verringerte Anzahl differenzierter Zellen 13 Wochen postnatal mit einem schmalen Gyrus dentatus des Hippocampus und einer verringerten Gesamtzellzahl im Vergleich zu WT-Mäusen. Ein möglicher pathophysiologischer Mechanismus hinter diesem Phänotyp könnte die Beeinflussung der Konversion von NGF (Nerve Growth Factor) darstellen. NGF ist als Neurotrophin an der Neurogenese und vor allem der Proliferation neuronaler Zellen beteiligt (Bernabeu und Longo 2010). Die Konversion und Aktivierung von NGF aus seiner Vorläuferform (proNGF) in seine reife Form (mNGF) erfolgt mitunter durch Plasmin, die durch Neuroserpin reguliert zu sein scheint (Bruno und Cuello 2006).

Kortikogenese

Die Entwicklung des Neokortex ist ein komplexes Phänomen und wird von verschiedenen genetischen und molekularen Prozessen beeinflusst. Die ordnungsgemäße Bildung und Architektur des Kortex ist wichtig, damit Gehirnfunktionen wie Kognition,

Empfindung, Gedächtnis, Wahrnehmung und willkürliche Bewegungen adäquat ablaufen können. Aus diesem Grunde können Störungen der Kortikogenese und damit der kortikalen Zytoarchitektur zu Fehlbildungen des Gehirns und psychiatrischen Störungen wie Schizophrenie, Epilepsie und Autismus führen (Lewis 2000, Powell et al. 2003). Histologisch ist der Neokortex in sechs unterschiedliche Schichten organisiert, die grob in die Marginalzone (MZ, Schicht I), sowie die oberen (II–IV) und unteren (V–VI) kortikalen Schichten aufgrund unterschiedlicher molekularer Schicksalsbestimmungen der Zellen unterteilt werden können. Der Kortex enthält die zwei Hauptklassen von Neuronen: die exzitatorischen, glutamatergen Projektionsneurone, darunter v.a. Pyramidal- und Körnerzellen, sowie die inhibitorischen GABA-ergen Interneurone. Daneben beherbergt er jedoch auch eine Vielzahl verschiedener Gliazellen (Molyneaux et al. 2007). Sowohl Projektions- und Interneurone als auch Gliazellen entstammen entwicklungs-geschichtlich den neuroepithelialen Vorläuferzellen der VZ, die zusammen mit den ersten gebildeten Neuronen die sogenannte Vorplatte bilden. Darunter befinden sich auch die Cajal-Retzius-Zellen (CRZ), die als nächstes ihren Platz in der MZ des Kortex einnehmen und eine Schlüsselrolle in der Kortikogenese spielen (García-Moreno et al. 2007).

Die ersten Projektionsneurone erscheinen im murinen Gehirn an Embryonaltag E10.5. Die in den folgenden sieben Tagen in der VZ und subventrikulären Zone (SVZ) gebildeten Projektionsneurone wandern radial in die kortikale Platte ein. Die Schichtung erfolgt dabei von innen nach außen, sodass früher geborene Neurone in den tieferen Schichten verbleiben und später geborene Neurone Schicht für Schicht an diesen vorbei in die nächsthöher gelegene Schicht des Kortex einwandern (Greig et al. 2013). Während dieser Wanderung in Richtung Oberfläche nehmen die Neurone zwei verschiedene Migrationsmodi ein: zum einen die multipolare Migration mit zufälliger Richtungs-bewegung und zum anderen die unidirektionale Migration entlang radialer Gliazell-Fasern (Ohtaka-Maruyama und Okado 2015).

Parallel dazu nimmt der Weg interneuronaler Vorläuferzellen seinen Ursprung in der ganglionischen Eminenz im Subpallium. Auf ihrem Weg in Richtung Kortex folgen die neugebildeten Interneurone über teilweise längere Distanzen zwei tangential orientierten Migrationsrouten: in kleineren Gruppen zunächst einer oberflächlich orientierten Route durch die MZ, sowie größer gruppiert einer tief orientierten Route, die sich ihren Weg durch die Intermediärzone und SVZ bahnt (Tamamaki et al. 1997, Sultan et al. 2013). Haben die Zellen ihr Ziel erreicht, wandern sie wie die Projektionsneurone radial in die kortikale Platte ein, um ihre endgültige Position einzunehmen und durchlaufen

von da an bis ins Erwachsenenalter ihre neuronale Reifung. Diese beinhaltet nicht nur die Differenzierung der Zellen, sondern maßgeblich die Bildung neuronaler Netzwerke durch Dendritenerweiterung und Herstellung synaptischer Kontakte (Ohtaka-Maruyama und Okado 2015).

Reelin als Leitprotein der kortikalen Migration

Reelin ist ein extrazelluläres Glykoprotein, das embryonal von CRZ der MZ exprimiert wird (Jossin 2020). Im Erwachsenenalter nimmt die Anzahl der CRZ ab und nunmehr wird die Reelin-Expression von GABA-ergen Interneuronen bestimmt (Pesold et al. 1998). In der Kortikogenese nimmt Reelin eine Schlüsselrolle als Leitprotein der radialen Migration und damit der Kortexlaminiierung ein. Genauer gesagt ist es an der terminalen Translokation der migrierenden Zellen beteiligt (Förster et al. 2010). Die Signalvermittlung erfolgt dabei in Abhängigkeit von der Interaktion zwischen Reelin und seinen Rezeptoren Very Low Density Lipoprotein Receptor (VLDLR) und ApoE Receptor 2 (APOER2) (Hiesberger et al. 1999). APOER2 wird im gesamten Kortex exprimiert und vermittelt ein anziehendes Signal, während VLDLR selektiv in der Nähe der MZ exprimiert wird und das Stoppsignal fördert. Nach Rezeptorbindung entfaltet Reelin seine Funktionen über eine Kaskade intrazellulärer Phosphorylierung, u.a. des Adapterproteins Disabled-1 (Dab-1) und von Tau (Hack et al. 2007).

Angesichts seiner Schlüsselrolle ist es nicht überraschend, dass sich eine Desorganisation des murinen Kortex mit teilweiser invertierter kortikaler Laminiierung in Abwesenheit von Reelin zeigt. Es kommt zu einer Auflösung der physiologischen Anordnung „von innen nach außen“, sodass sich stattdessen früh geborene, migrierende Neurone in der oberen Region des Kortex organisieren, während später geborene Neurone in tieferen Schichten verbleiben (Trommsdorff et al. 1999).

Kortikale Entwicklungsdefizite bei tPA-Mangel

Interessanterweise konnte erstmalig durch Pasquet et al. (2019) auch in Abwesenheit von tPA ein Defizit in der kortikalen Laminiierung in frühen Embryonalstadien sowie der Reifung und Orientierung von radialen Gliazellen nachgewiesen werden. Hierbei war zu beobachten, dass migrierende Neurone an E16 frühzeitig in der Intermediärzone gestoppt und positioniert wurden. Durch erneute Expression von WT-tPA an E14 konnte ein physiologischer Phänotyp wiederhergestellt werden, sodass sich tPA-defiziente kortikale Neurone erneut in den oberen Kortexschichten ansiedelten. Scheinbar hängt dieser Defekt jedoch weniger von der proteolytischen Aktivität von

tPA, sondern eher von seiner Fähigkeit an N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren zu binden ab, welche an der Oberfläche von radialen Gliazellen exprimiert werden. Dies deutete sich zum einen dadurch an, dass eine tPA-Mutante, die NMDAR nicht binden kann, den physiologischen Phänotyp nicht wiederherstellen konnte. Zum anderen führte umgekehrt auch die Überexpression einer NMDAR-Mutante an radialen Gliazellen, die tPA nicht binden können, zu einem entsprechenden Migrationsdefekt. Die Forscher stellten aus diesem Grunde die Hypothese auf, dass die kortikalen Neurone ihre eigene radiale Migration NMDAR-abhängig mittels tPA-Produktion kontrollieren können.

Spaltung von Reelin durch tPA und ADAMTS-4

Besondere Bedeutung nimmt die Spaltung von Reelin ein, da diese in mehreren Studien den Einfluss auf die Signalübertragung und damit auf die Ausführung seiner physiologischen Funktionen kontrovers beleuchtet hat. Mehrere Proteasen spalten Reelin und kontrollieren auf diese Weise seine Funktion. Dabei sind zwei Spaltstellen von besonderer Bedeutung, die zur Bildung von fünf möglichen Fragmenten führen, welche spezifische Funktionen im Neokortex einnehmen (s. Abb. 1) (Trotter et al. 2014). Die N-terminale Region ist wichtig für die Homodimerisierung des Moleküls und bestimmt die Dauer des Signals (Kubo et al. 2002), während die C-terminale Region primär eine Rolle bei der Faltung und Sekretion des Proteins spielt (de Bergueyck et al. 1997). Die zentrale Region (R3-R6), die durch Spaltung sowohl am N- als auch am C-Terminus gebildet wird, bindet an die Rezeptoren und erreicht so die vollständige Signalaktivität (Jossin et al. 2004).

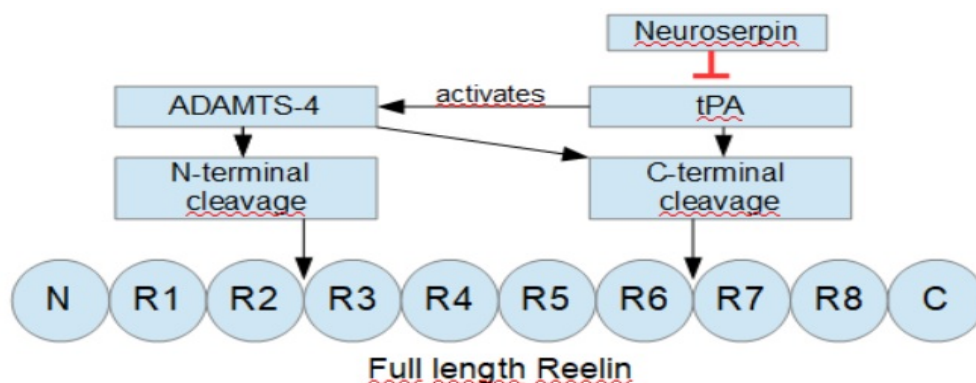


Abbildung 1: Prozessierung von Reelin durch ADAMTS-4 und tPA. ADAMTS-4 spaltet Reelin N-terminal zwischen der Repeatstelle R2 und R3 sowie C-terminal zwischen R6 und R7, tPA kann ADAMTS-4 aktivieren und Reelin spezifisch C-terminal spalten. Die tPA-abhängige Spaltung kann durch Neuroserpin in-vitro gehemmt werden).

Diese Arbeit fokussiert sich im Rahmen der Reelin-Prozessierung auf die im Schema zusammengefassten Proteasen (s. Abb. 1). Dazu gehören das oben bereits beschriebene tPA als auch ADAMTS-4, dessen Funktion und Prozessierungsfähigkeit im Folgenden genauer präsentiert wird.

Die Proteasen der ADAMTS-Familie (A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs) gehören zur Familie der Metalloproteasen, die extrazellulär wichtige Rollen einnehmen, beispielsweise in der Blutgerinnung, in Entzündungsprozessen und in der Bindegewebsorganisation durch Prozessierung und Degradierung von Prokollagenen und Proteoglykanen wie Aggrecan (Apte 2004). Aber auch in der Zellmigration spielen sie eine wichtige Rolle, die wie bereits erläutert in engem Zusammenhang mit der Prozessierung von Reelin steht. Krstic et al. (2012) konnten demonstrieren, dass ADAMTS-4 Reelin sowohl an der N- als auch an der C-terminalen Stelle spalten kann. Dies konnte bestätigt werden mittels rekombinanter Zugabe von ADAMTS-4 in Reelin-angereichertem Medium von Human Embryonic Kidney (HEK293)-Zellen sowie Hemmung der Protease durch Inhibitoren oder shRNA-vermittelten Knockdown in HeLa-Zellen. ADAMTS-4 wird als Zymogen der Masse 110 kDa synthetisiert. Die N-terminale Prozessierung beispielsweise durch Furin unter Entfernung der Prodomäne führt zur Bildung der sezernierten p75-Isoform. Erst durch die C-terminale Spaltung kommt es zur Aktivierung der proteolytischen Aktivität durch Veränderung der Lokalisierung und Substratspezifität. Je nach Verkürzung durch Matrix-Metalloproteasen entstehen dabei die p50 und p60-Isoformen (Gao et al. 2002). So führte auch die Zugabe von rekombinanten Matrix-Metalloproteasen in Reelin-angereichertem Medium zu einer erhöhten Aktivierung von ADAMTS-4 und entsprechender Zunahme der Reelin-Prozessierung (Krstic et al. 2012). Interessanterweise ist auch tPA unabhängig von Plasmin an der Aktivierung von ADAMTS-4 beteiligt (Lemarchant et al. 2014).

Die Spaltung von Reelin durch ADAMTS-4 erfolgt dabei isoformabhängig. So ist die p50-Isoform dazu in der Lage, Reelin effektiv nur an der N-terminalen Stelle zu spalten. Im Gegensatz dazu ist die p60-Isoform fähig, Reelin hauptsächlich an der C-terminalen Stelle zu spalten, während ebenso eine schwach ausfallende N-terminale Spaltung zu beobachten war. Schließlich kann die p75-Isoform das Protein an beiden Stellen effektiv spalten (Hisanaga et al. 2012). Weiterhin konnten Krstic et al. (2012) aufzeigen, dass rekombinantes tPA Reelin direkt und spezifisch an der C-terminalen Stelle spalten kann. Diese Spaltung konnte konzentrationsabhängig durch die Zugabe von PAI-1 inhibiert werden. Auch in HEK293-Zellen, die Reelin und tPA co-exprimieren, konnte die spezifische C-terminale Spaltung nachgewiesen werden. Interessant ist, dass die

zusätzliche Co-Expression von tPA und Neuroserpin oder PAI-1 nach 12-stündiger Inkubation sowohl die C- als auch N-terminale Spaltung von Reelin vermindern konnte.

Einfluss der Spaltung von Reelin auf die Signalaktivität

Die Frage, inwieweit die Spaltung von Reelin Einfluss auf die Signalaktivität nimmt, ist sehr umstritten. Viele Studien unterstützen die Ansicht, dass eine proteolytische Prozessierung von Reelin zur Initiierung der Funktionen erforderlich ist. Wissenschaftler führen dabei maßgeblich die Annahme, dass Reelin in der extrazellulären Matrix (EZM) verankert ist und nach der Sekretion durch CRZ inaktiv bleibt. Erst die proteolytische Prozessierung des Proteins kann die Signalgebung aktivieren, indem das zentrale Fragment freigesetzt wird und die Fragmente in weiter entfernte Gehirnregionen diffundieren und dadurch Dauer und Reichweite der Reelin-Signalgebung regulieren. Hierbei zeigt sich, dass ungespaltenes (FL = Full Length) Reelin vor allem in der MZ verbleibt, während das N-terminale und zentrale Fragment weiter diffundieren kann. Das C-terminale Fragment, das in diesem Modell vermutlich für die Matrixverankerung verantwortlich ist, ist somit nicht am Diffusionsgeschehen beteiligt. So ist es nicht verwunderlich, dass eine Hemmung der Reelin-Prozessierung durch die Blockade seiner Proteasen wie bereits erwähnt zu Störungen in der kortikalen Entwicklung führt. In-vitro-Analysen hingegen können konträre Ergebnisse darstellen, da die Reelin-Fragmente hier nicht diffundieren müssen (Jossin et al. 2007).

Die größte Bedeutung im Rahmen der Signalaktivität in-vivo nimmt für Jossin et al. das zentrale Fragment (R3-R6) ein. So konnten sie beispielsweise zeigen, dass die Metalloproteasen-abhängige Generierung und Endozytose von R3-R6 für eine adäquate Ausbildung der kortikalen Platte erforderlich ist. Die Inkubation von kultivierten Gehirnschnitten in-vitro mit einem R4B-Antikörper, der die Bindung von R3-R6 an seine Rezeptoren blockiert, führte zu keiner ausreichenden Dab-1-Phosphorylierung und unterbrach die Bildung der kortikalen Platte. Außerdem konnte eine selektive und starke Erhöhung der R3-R6-Konzentration im Gewebe von VLDLR- und APOER2-Knockout (KO)-Mäusen gemessen werden (Jossin et al. 2007). In einer anderen Studie konnte mittels R3-R6 außerdem der physiologische Phänotyp mit ausreichender Induktion der Dab-1-Phosphorylierung und Normalisierung der kortikalen Struktur an kortikalen Explantaten von Reelin-KO-Mäusen wiederhergestellt werden (Jossin et al. 2004).

Allerdings gibt es auch Studien, die die Relevanz der Reelin-Prozessierung in Bezug auf seine Signalaktivität negieren. So konnte bei N-terminaler Spaltung von Reelin

durchaus eine verringerte Signalaktivität beobachtet werden, da die verkürzten Fragmente keinen stabilen Komplex für die Homodimerisierung, sondern eher eine Aggregation von mehr als 40 Monomeren bildeten (Kubo et al. 2002). Dadurch konnte keine effiziente Induktion der Dab-1-Phosphorylierung in kultivierten kortikalen Neuronen erfolgen, während FL-Reelin eine 100-fache Phosphorylierung initiieren konnte (Kohno et al. 2009). Auch die Oligomerisierung spielt in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle, da daraus im Vergleich zu Monomeren ein 10-facher Anstieg der Signalaktivität resultiert. In diesem Setting zeigte sich außerdem, dass monomere R5-R6-Fragmente im Vergleich zu multimerem FL-Reelin eine 500-fach höhere Konzentration benötigen, um die entsprechende Dab1-Phosphorylierung zu initiieren (Yasui et al. 2007). Das widerspricht den Ergebnissen von Jossin et al. (2007), die dasselbe Ausmaß an Dab-1-Phosphorylierung bei gleicher Konzentration der verschiedenen Reelin-Fragmente illustrierten.

Auch die C-terminale Prozessierung konnte in Studien mit einer verminderten Signalaktivität in Verbindung gebracht werden. So führte die Deletion des C-Terminus *in vitro* und *in vivo* zu einer gestörten Interaktion mit dem VLDLR. Jedoch kommt es nicht zu einem kompletten Signalverlust, wie er bei Reelin-KO Mäusen zu erwarten ist, stattdessen zeigt sich ein hypomorpher Phänotyp mit übermigrierenden kortikalen Neuronen, die in die MZ eindringen. Vermutlich beruht diese abgeschwächte Form auf der noch funktionierenden Signalaktivität über den APOER2 (Ha et al. 2017).

2.2. Ziel der Arbeit

Welche Zellen exprimieren Neuroserpin im Neokortex während der Entwicklung?

Die genauen Subtypen der Neuroserpin exprimierenden Zellen konnte bisweilen nicht aufgedeckt werden, sondern lediglich ein Anhalt aufgrund ihrer Morphologie gegeben werden (Krueger et al. 1997, Teesalu et al. 2004, Adorjan et al. 2019). Eine präzisere Untersuchung dieser Zellen, die unterschiedliche Funktionen im Gehirn einnehmen können, könnte auch Hinweise auf die physiologische Funktion von Neuroserpin geben. Entsprechend führen wir eine detaillierte Analyse des Expressionsmusters von Neuroserpin im murinen Kortex durch, sowohl um die Verteilung im Laufe der neuronalen Entwicklung genauer zu beschreiben, aber auch um Neuroserpin-exprimierende Zellen zu identifizieren, zu charakterisieren und mit möglichen Funktionen zu verknüpfen. Hierfür führen wir immunhistochemische Färbungen in WT-Mäusen verschiedener

Entwicklungsstadien durch. Durch die parallele Färbung von verschiedenen neuronalen und glialen Markern mit einem Neuroserpin-Antikörper kann anhand der Co-Lokalisation genau erkennbar gemacht werden, welche Zellen das Serpin exprimieren. Untersucht wird hierbei die Co-Expression mit den in Tabelle 1 aufgelisteten Antikörpern für Projektionsneurone, Interneurone sowie Gliazellen. Für die Analyse wurden folgenden Stadien gewählt: E13 mit Start der Neuroserpin-Expression, E16 und der erste Tag postnatal (P0) mit der maximalen Neuroserpin-Expression, eine Woche alte Mäuse (1W) mit Abschluss der kortikalen Schichtbildung und der zusätzlichen Expression interneuronaler Marker sowie zuletzt das Stadium der erwachsenen Mäuse im Alter von 13 Wochen (13W).

Welche Rolle spielt Neuroserpin in der Entwicklung des Neokortex?

Aufgrund der hohen Expressionslevel von Neuroserpin im sich entwickelnden Neokortex wird eine Rolle des Serpins im Laminierungsprozess vermutet. Andere Faktoren unterstützen diese Hypothese: die Beteiligung von Neuroserpin an der Entwicklung anderer Hirnregionen (Hippocampus) (Hermann et al. 2020) sowie Defekte in der neokortikalen Laminierung bei Mäusen, denen tPA als Zielprotease von Neuroserpin (Pasquet et al. 2019) und Reelin als tPA-Substrat fehlt (Trommsdorff et al. 1999). Um die Rolle von Neuroserpin in der neokortikalen Laminierung zu beurteilen, erfolgt ein Vergleich der Schichtbildung und Signalintensität im somatosensorischen (SS) Kortex von WT- und NSKO-Mäusen der o.g. Entwicklungsstadien. Die Schichten des Neokortex werden durch immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen Schichtmarkern für Projektionsneurone identifiziert, daneben untersuchen wir jedoch auch einen möglichen Unterschied in Lokalisation von Interneuronen mittels entsprechender Marker (s. Tab. 1). Ein Entwicklungsdefekt des Kortex könnte je nach Ausprägung ebenso weitere Informationen über die physiologische Funktion von Neuroserpin im Kortex geben.

Welche Rolle spielt Neuroserpin in der Spaltung von Reelin?

Ein weiterer wichtiger Meilenstein unserer Versuchsplanung ist es, die Regulation der tPA- und ADAMTS-4-abhängigen proteolytischen Prozessierung von Reelin durch Neuroserpin zu durchleuchten. Die Proteine stehen wie in Abb.1 schematisch bereits dargestellt in enger Wechselwirkung zueinander. So könnte die kortikale Entwicklung durch Regulation der Prozessierung von Reelin als Schlüsselprotein der Kortikoge-

nese durch Neuroserpin moduliert werden. Bislang konnte der Einfluss von Neuroserpin durch Hemmung der Reelin-Spaltung nur in-vitro in Zellkulturen nachgewiesen werden (Krstic et al. 2012). Unser Ziel ist es, diesen Effekt auch in-vivo in kortikalem Gewebe zu untersuchen und so zu skizzieren, welche Proteasen involviert sein könnten. Dafür führen wir erneut Untersuchungen in Mäusen der verschiedenen o.g. Stadien durch und vergleichen die Expression von ADAMTS-4 und Reelin sowie ihrer Spaltprodukte in WT- und NSKO-Mäusen mittels Western Blot. Sollte kein kortikaler Laminierungsdefekt oder keine veränderte Prozessierung in Abwesenheit von Neuroserpin nachgewiesen werden, so ist es zuletzt unser Anliegen, zu untersuchen, ob es zu einer kompensatorischen Hochregulation von anderen Serpinen kommt. Hierfür vergleichen wir die kortikale Expression von PAI-1, ein weiterer tPA-Inhibitor, in WT- und NSKO-Mäusen mittels Western Blot.

2.3. Material und Methode

Im Folgenden werden die für diese Arbeit wichtigen Materialien und Methoden kurz beschrieben. Eine ausführliche Beschreibung, auch der Tiermodelle und statistischen Auswertung, erfolgte bereits im Paper von Kement et al. (2021).

Gewebevorbereitung für die Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurde bei den Mäusen der Entwicklungsstadien E13 und E16 der ganze Kopf und in den Stadien P0, 1W und 13W die Gehirne präpariert und in Formalin fixiert. Zur Kryokonservierung wurden die Präparate in eine Saccharose-PBS-Lösung gegeben. Anschließend wurde das Gewebe in Tissue-Tek O.C.T. Compound eingebettet und mittels 2-Methylbutan und Flüssigstickstoff schockgefroren. Zuletzt wurden an einem Kryostaten 10 µm dicke, koronale Schnitte auf Superfrostglas-Objektträgern angefertigt.

Etablierung des immunhistochemischen Färbeprotokolls

Um eine hochwertige Färbung für die verschiedenen Antikörper zu gewährleisten, wurden je Arbeitsschritt unterschiedliche Techniken und Reagenzien ausprobiert. Zunächst erfolgte ein Vergleich zwischen Färbungen an Paraffin- oder Kryoschnitten auf Objektträgern und Schnittfärbungen mittels der Free-Floating-Technik. Als nächstes wurden zur Fixation Formaldehyd-Lösungen und organische Lösungsmittel wie Aceton und Methanol, die gleichzeitig auch permeabilisierend wirken, miteinander verglichen.

Ein wichtiger Schritt in der Etablierung der Protokolle stellte das Antigen Retrieval zur Demaskierung der Epitope dar, um die Signalintensität zu verstärken. Dazu erfolgte ein Vergleich der Behandlung mit Citratpuffer (pH 6 und 9), Salzsäure (HCl), Glycin-HCl-Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Tris-EDTA, Citraconsäure, Ameisensäure, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) sowie proteolytisch mit Pepsin und Proteinase K. Zur Reduktion von Hintergrundfärbungen durch unspezifische Bindungen wurden verschiedene Blocking-Puffer verwendet, genauer fetales Kälberserum, Rinderalbumin (BSA), Eselserum und Gelatin. Weiterhin wurde versucht, eine unspezifische Färbung durch Natriumborhydrid, Glycin, Sudan Black sowie durch Blockade der endogenen Peroxidase-Aktivität mittels H_2O_2 zu verhindern. Für die Permeabilisation der Schnitte wurde die Inkubation mit Triton, Saponin und Polysorbat 20 miteinander verglichen. Nicht zuletzt wurden für die einzelnen Marker teilweise verschiedene Antikörper und Verdünnungen ausprobiert. Aus der vergleichenden Auswertung der Färbemuster dieser verschiedenen Methoden ergab sich das in dieser Forschungsarbeit angewendete immunhistochemische Färbeprotokoll.

Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemischen Färbungen wurden an Kryoschnitten auf Objektträgern durchgeführt. Für die Antigendemaskierung wurden die Schnitte bei $95^\circ C$ in Citratpuffer gekocht. Danach erfolgte die Permeabilisierung mittels Triton X-100 und die Blockierung mittels BSA-Blocking-Puffer. Im Anschluss wurden die Schnitte mit den primären Antikörpern (s. Tab. 1) verdünnt in Blocking-Puffer inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit einem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper. Zuletzt wurden die Schnitte getrocknet und mittels Fluoromount-G mit DAPI eingedeckt.

Bildanalyse und Akquisitionen

Zur anfänglichen Orientierung diente der Allen Brain Atlas für Mäusegehirne (<https://mouse.brain-map.org/>). Die gefärbten Schnitte wurden unter Verwendung eines konfokalen Leica TCS SP5 oder SP8 X-Mikroskops analysiert und Bilder mit der Software LAS X aufgenommen. Für die Gesamtaufnahme des Kortex wurden die Bilder via x2y-Scan automatisch zusammengefügt. Die Analyse des SS Kortex erfolgte für beide Genotypen an mindestens drei Tieren. Die Quantifizierung der kortikalen Immunfluoreszenzsignale erfolgte mittels Intensity-Plot-Analyse von ImageJ sowie ImageJ/Fiji (Schindelin et al. 2012).

Extraktion von Gehirngewebe für das Western Blotting

Für die Stadien E13 und E16 wurde das gesamte Hirngewebe und für die Stadien P0, 1W und 13W das kortikale Gewebe von drei Tieren pro Genotyp präpariert. Für die Extraktion wurde das Gewebe in Extraktionspuffer mechanisch homogenisiert und mittels Triton X-100 solubilisiert. Die Homogenate wurden zentrifugiert und die Konzentration der löslichen Proteine im Überstand mittels Bradford-Assay gemessen.

Gelelektrophorese und Western Blot

Für das Western Blotting wurden SDS-PAGE-Gele nach Lämmli hergestellt. Die Proteine wurden zusammen mit dem Prestained Protein Marker auf das Gel beladen und in Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurden die Proteine in Transferpuffer auf Nitrozellulosemembranen übertragen und die Transfereffizienz mittels Anfärbung mit Ponceau S geprüft. Im Anschluss wurden die Membranen mit Roti®-ImmunoBlock blockiert und die primären Antikörper (s. Tab. 1) über Nacht inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den farbstoff-konjugierten Sekundärantikörpern. Zuletzt wurden die Membranen unter Verwendung des Odyssey® Infrarot Imaging Systems von LI-COR® gescannt und densitometrisch quantifiziert.

Primärer Antikörper	Nachweis
Anti-Neuroserpin (Ziege, 1:50)	endogenes Neuroserpin (Galliciotti et al. 2007)
Anti-Reelin G10 (Merck Millipore, MAB5364, Maus, 1:600 – 1:1.000)	CRZ der MZ und neokortikale Interneurone (Pesold et al. 1998), N-Terminus enthaltende Reelin-Fragmente (de Bergueyck et al. 1997)
Anti-Cux1 (Proteintech, 11733-1-AP, Hase, 1:300)	Pyramidalneurone der Schichten II-IV, postmitotische kortikale Neurone, Zellen der VZ und SVZ (Nieto et al. 2004)
Anti-Ctip2 (abcam, ab18465, Ratte, 1:600)	Projektionsneurone der Schicht V, schwächer in Schicht VI (Cánovas et al. 2015)
Anti-Tbr1 (abcam, ab31940, Hase, 1:1.000)	Neurone der Schicht VI (Cánovas et al. 2015)
Anti-Parvalbumin (Sigma, P3088, Maus, 1:1.000)	ca. 40 % der neokortikalen Interneurone, Korb- und Kronleuchterzellen (Sultan et al. 2013)
Anti-Somatostatin (Santa Cruz Biotechnology, sc -74556, Maus, 1:50)	ca. 30 % der neokortikalen Interneurone, z. B. Martinotti-Zellen (Sultan et al. 2013)
Anti-GFAP (Merck Millipore, MAB360, Maus, 1:500)	Astrozyten (Jacque et al. 1978)
Anti-Iba1 (abcam, ab5076, Ziege, 1:500)	Mikrogliazellen (Ito et al. 1998)

Anti-Olig2 (Merck Millipore, AB9610, Hase, 1:200)	Oligodendrozyten (Zhou et al. 2000)
Anti-ADAMTS-4 (abcam, ab185722, Hase, 1:500)	ADAMTS-4 Zymogen und Isoformen (Gao et al. 2002)
Anti-PAI-1 (abcam, ab222754, Hase; 1:1.000)	PAI-1 (Sawada et al. 2022)
Anti-Actin clone C4 (Merck Millipore, MAB1501, Maus, 1:4.000)	Aktin als Haushaltsprotein in allen Zellen und Ladekontrolle (Hermann et al. 2020)

Tabelle 1: Liste der verwendeten Antikörper für die Immunhistochemie und Western Blot. Antikörper sind aufgeführt mit Hersteller, Nummer, Spezies und Verdünnung sowie einer Referenz der nachzuweisenden Struktur.

2.4. Ergebnisse und Diskussion

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte bereits im publizierten Artikel (Kement et al. 2021). Im Folgenden werden weiterführende Ergebnisse der Arbeit, die nicht im Paper vorzufinden sind, ergänzend abgebildet und jedes Ergebnis im Anschluss diskutiert.

Lokalisation der Neuroserpin-Immunreaktivität während der kortikalen Entwicklung

Pränatal ist die Immunreaktivität von Neuroserpin im SS Kortex vor allem extrazellulär auf hohem Niveau und sehr diffus zu beobachten. An E13 kann die höchste Expression unterhalb der MZ in der dicht besiedelten kortikalen Platte nachgewiesen werden mit nur geringer Expression in tieferen Regionen. Drei Tage später (E16) wird die Expression homogener und erstreckt sich weiterhin im Bereich der ausgedehnten kortikalen Platte. Nach der Geburt, wenn die kortikale Schichtbildung abgeschlossen ist, geht die Expression von einem eher diffusen Muster in ein Muster über, das von einzelnen, intensiv gefärbten Zellen geprägt ist, die sich über den gesamten Neokortex verteilen.

Genauer kann an E13 eine hohe Neuroserpin-Expression um die Kerne von Tbr1-positiven Projektionsneuronen wahrgenommen werden, die die ersten Neurone der sich neuformierenden kortikalen Platte abbilden. In den Reelin-positiven CRZ der MZ kann hingegen keine Neuroserpin-Expression nachgewiesen werden.

Drei Tage später (E16) lässt sich die Neuroserpin-Expression weiterhin um Tbr1+-Neurone der tiefen Schichten nachweisen. Weiterführend zum Paper konnte diese Expression auch in Ctip2+-Neuronen der tiefen Schichten dargestellt werden (s. Abb. 2).

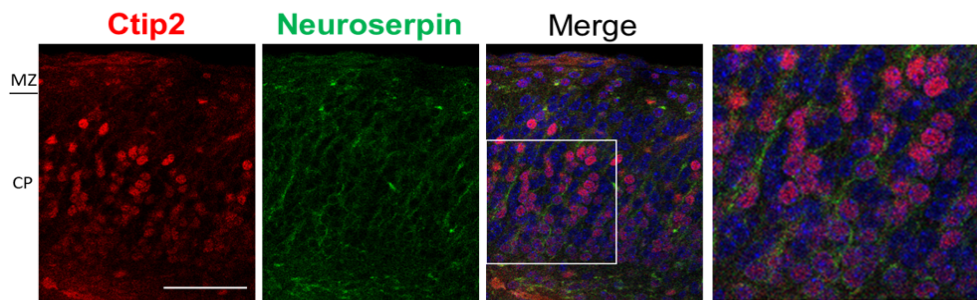


Abbildung 2: Co-Lokalisierung von Neuroserpin und Ctip2 in E16 Maus Neokortex. Neuroserpin-Immunreaktivität deutlich um einige Kerne Ctip2-positiver Neurone nachweisbar. Maßstab: 50 μ m. MZ = Marginalzone, CP = kortikale Platte.

Zusätzlich kommt es in diesem Stadium auch zur Einwanderung in die oberen kortikalen Schichten. Diese werden durch Cux1+-Pyramidalneurone abgebildet, die ebenfalls eine Neuroserpin-Immunreaktivität um ihre Kerne zeigen. Erneut konnte keine Co-Lokalisation zwischen Neuroserpin und Reelin in den CRZ der MZ beobachtet werden. Bei Geburt (P0) zeigt sich die Neuroserpin-Immunreaktivität weiterhin um die Kerne vieler Cux1+-Pyramidalneurone der Kortexschichten II–VI. In den meisten Tbr1+-Neuronen der tieferen Schichten hingegen lässt sich keine Neuroserpin-Expression nachweisen. Lediglich am Boden der Schicht VI, im Bereich der Subplatte, ließen sich einige wenige Tbr1+-Zellen nachweisen, die Neuroserpin exprimieren. Außerdem ist in diesem Stadium die Reelin-Expression nicht mehr nur auf CRZ der MZ beschränkt, sondern lässt sich von nun an innerhalb des Neokortex auch vereinzelt als interneuronaler Marker detektieren. Nach wie vor zeigen die CRZ keine Immunreaktivität für Neuroserpin, hingegen lässt sich bei Reelin+-Interneuronen eine starke Co-Expression beobachten.

Ein ähnliches Muster zeigt sich auch eine Woche postnatal. Zusätzlich zu dem Stadium P0 erstreckt sich die Co-Expression von Reelin und Neuroserpin in Interneuronen über den gesamten Kortex. Außerdem kann in diesem Stadium bereits ein weiterer interneuronaler Marker, nämlich Somatostatin (SOM), nachgewiesen werden, der weiterführend ebenfalls eine hohe Co-Expression mit Neuroserpin zeigt (s. Abb. 3).

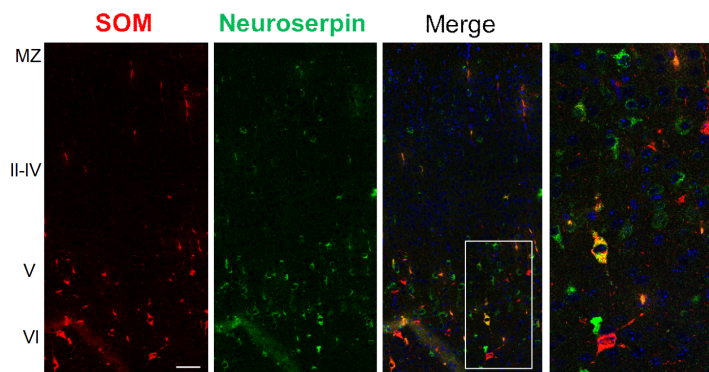


Abbildung 3: Co-Lokalisierung von Neuroserpin und Somatostatin in 1W Maus Neokortex. Neuroserpin-Immunreaktivität in SOM-positiven Interneuronen nachweisbar. Maßstab: 100 μ m. MZ = Marginalzone.

Das Expressionsmuster in erwachsenen Mäusen (13W) deckt sich weitestgehend mit dem vorher beschriebenen Stadium. Die Neuroserpin-Expression zeigt sich jedoch intensiver in einzelnen Zellen. So kann die Immunreaktivität deutlich im Soma Cux1+-Neurone detektiert werden. Tbr1+-Projektionsneurone hingegen zeigten weiterhin, bis auf wenige im Bereich der Subplatte lokalisierte Neurone, keine Neuroserpin-Expression. In der MZ lässt sich fast keine Reelin+-CRZ mehr nachweisen, während Reelin+-Interneurone weiterhin im gesamten Kortex eine hohe Neuroserpin-Expression aufweisen. In ähnlicher Weise exprimieren auch SOM- und Parvalbumin (PARV)-positive Interneurone Neuroserpin. Die PARV-Expression ist in diesem Stadium erstmalig nachweisbar. Zusätzlich konnten in diesem Stadium auch erstmalig Gliazell-Marker abgebildet werden mit Iba1 als Mikroglia-Marker, GFAP als Astrozytenmarker und Olig2 als Marker für Oligodendrozyten. In keiner dieser Gliazellen konnte eine Neuroserpin-Expression nachgewiesen werden.

Diskussion: Die Neuroserpin-Expression lässt sich im Neokortex panneuronal sowohl in Projektionsneuronen als auch Interneuronen nachweisen. Sie beschränkt sich in unserer Untersuchung somit spezifisch auf neuronale Zellen, da eine Expression in Gliazellen nicht nachgewiesen werden konnte. Somit können wir die Annahme einer neuronalen Expression von Neuroserpin im Hippocampus von Hermann et al. (2020), als auch von Krueger et al. (1997), die mittels in-situ-Hybridisierung eine initial schwache und diffuse und im Laufe der Entwicklung vereinzelt zunehmende mRNA-Expression in Zellen nachweisen konnten, die allein anhand der Morphologie als Neuronen charakterisiert wurden, bestätigen. Unsere Ergebnisse stehen außerdem in Einklang mit den Untersuchungen in humanem Gewebe von Teesalu et al. (2004) und Adorjan et al. (2019), die ebenso anhand der Morphologie neuronale Zellen als Quel-

len der Neuroserpin-Expression postulierten. Wir erweitern und bestätigen diese Auffassung mittels immunohistochemischer Marker, eine präzise Einschränkung auf einen spezifischen Zellsubtypen, der Neuroserpin exprimiert und somit mit seiner physiologischen Funktion verknüpft, ist jedoch nicht möglich. Gleichzeitig kann auch die Expression in Zellen, die andere von uns nicht untersuchte neuronale und nicht-neuronale Marker exprimieren, nicht ausgeschlossen werden.

Kortikale Entwicklung in Neuroserpin-defizienten Mäusen

In Stadium E13 ist neben der MZ die Bildung der kortikalen Platte erkennbar. Da diese zunächst mit Neuronen der späteren tieferen kortikalen Schichten dicht besiedelt wird, kann ihre Bildung mit den entsprechenden Markern Ctip2 und Tbr1 für die Schichten V und VI untersucht werden. Durch Vergleich von WT- und NSKO-Mäusen lässt sich kein Unterschied in der Formation der kortikalen Platte als auch der Reelin+-CRZ in der MZ nachweisen.

An E16 lassen sich zusätzlich Cux1+-Projektionsneurone detektieren, die sich radial organisieren, um ihren Platz in den oberen kortikalen Schichten (II-IV) einzunehmen. Auch hier zeigte die Visualisierung und Quantifizierung keinen Unterschied in der Organisation der Reelin-, Cux1-, Ctip2- und Tbr1-positiven Zellen bei Neuroserpin-Defizienz.

Bei Geburt (P0) und in der Woche danach wird die Migration und Schichtbildung im murinen Kortex schließlich vollendet. Zusätzlich tauchen neben den CRZ der MZ ab P0 auch Reelin+-Interneurone sowie SOM+-Interneurone eine Woche postnatal (s. Abb. 4) auf. In Abwesenheit von Neuroserpin zeigte sich auch in diesen Stadien weder für die projektionsneuronalen noch für die interneuronalen Zellen ein quantifizierbarer

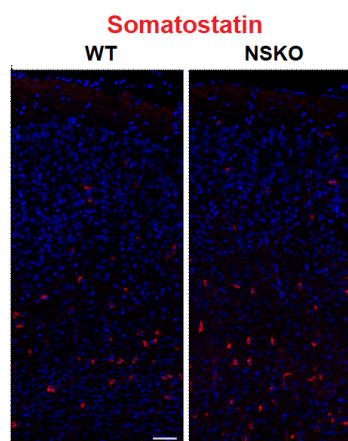


Abbildung 4: Kortikale Somatostatin-Expression von WT- und NSKO-Mäusen in 1W Maus Neokortex. Kein Unterschied in der Expression SOM-positiver Interneurone bei Neuroserpin-Defizienz erkennbar. Maßstab: 100 µm.

Unterschied in der Organisation. Zuletzt lässt sich zusätzlich im adulten Kortex von Mäusen Parvalbumin als weiterer interneuronaler Marker vergleichen. Jedoch zeigte sich auch im Erwachsenenalter weder visualisiert noch quantifiziert ein Unterschied in der Laminierung Cux1-, Ctip2- oder Tbr1-positiver Projektionsneurone, noch der Position der Reelin-, SOM- oder PARV-positiven Interneurone in Abwesenheit von Neuroserpin.

Diskussion: Trotz des hohen Expressionsniveaus von Neuroserpin im Neokortex und den bekannten Entwicklungsdefekten im Hippocampus in Abwesenheit des Serpins (Hermann et al. 2020), scheint seine Funktion für die kortikale Laminierung entbehrlich zu sein. Die tPA-Deletion hingegen führte zu einer verzögerten neuronalen Migration und schließlich zu einer veränderten kortikalen Laminierung (Pasquet et al. 2019). Es wurde jedoch nachgewiesen, dass dieser Defekt eher auf das Fehlen einer Wechselwirkung zwischen tPA und NMDAR als auf das Fehlen einer proteolytischen Aktivität von tPA zurückzuführen ist. Da die proteolytische Aktivität von tPA die kortikale Laminierung nicht zu kontrollieren scheint, ist es daher nicht überraschend, dass das Fehlen von Neuroserpin nicht zu Defekten in der Kortikogenese führt. Außerdem beschränken sich unsere Untersuchungen ebenso nur auf den SS Kortex, sodass der Einfluss durch Neuroserpin in anderen kortikalen oder zerebralen Regionen von Bedeutung sein kann. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass sich auch unter basalen Bedingungen ein Phänotyp im Hippocampus von Mäusen bei Neuroserpin-Mangel ausbildet.

Einfluss von Neuroserpin auf die tPA-abhängige ADAMTS-4- und Reelin-Spaltung während der kortikalen Entwicklung

Mittels Western Blot wurde die Bandenintensität von ADAMTS-4 und Reelin in Ganzhirn-Extrakten (E13 und E16) und kortikalen Extrakten (P0, 1W, 13W) zwischen WT- und Neuroserpin-defizienten Mäusen verglichen.

Der Antikörper gegen ADAMTS-4 lässt die Detektion des Zymogens (110 kDA) sowie seiner Isoformen (p75, p60 und p50 mit entsprechendem Molekulargewicht) zu. Das Zymogen zeigte eine niedrige Expression in erwachsenen Mäusen, während die Expression der p50-Isoform vor allem postnatal zunahm. Die Expression der p75- und p60-Isoformen blieb hingegen in den analysierten Stadien konstant. Weder das Zymogen von ADAMTS-4 noch seine Isoformen zeigten einen signifikanten Unterschied in der Expression in Abwesenheit von Neuroserpin in allen Entwicklungsstadien.

Weiterhin konnten wir mittels des G10-Antikörpers sowohl Reelin in vollständiger Länge als auch die Fragmente nachweisen, die den N-Terminus des Proteins auch in der gespaltenen Form aufweisen. Es konnte kein Unterschied in der Expression von FL-Reelin (460 kDa), dem C-terminal gespaltenem Fragment N-R6 (380 kDa) oder dem N-terminal gespaltenem Fragment N-R2 (160 kDa) in Abwesenheit von Neuroserpin quantifiziert werden.

Zuletzt führten wir als weiterführendes Ergebnis der Arbeit eine statistische Analyse durch, in der jeweils alle Proteinfragmente aufaddiert wurden, um damit die totale Expression der jeweiligen Proteine quantifizieren zu können. Auch kumuliert ergab sich kein Unterschied in der totalen Expression der jeweiligen Proteine und Fragmente bei Neuroserpin-Mangel (s. Abb. 5).

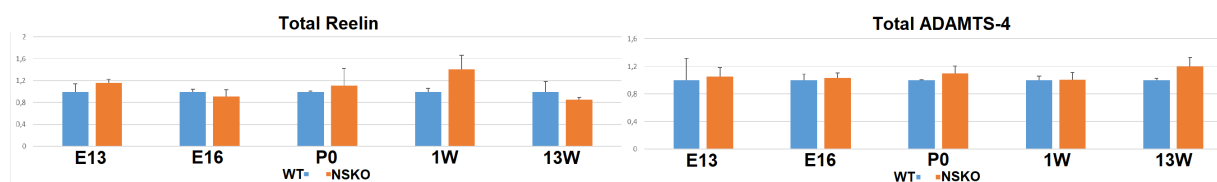


Abbildung 5: Quantifizierung der totalen Reelin- und ADAMTS-4-Expression in WT- und NSKO-Mäusen der verschiedenen Entwicklungsstadien. Normalisierung der Bandenintensität auf die Expression von β -Aktin, zur Darstellung der relativen Expression wurde WT auf 1 gesetzt (Mittelwert \pm SD, $n = 3$).

Diskussion: Im Gegensatz zu den Ergebnissen in HEK293-Zellkulturen (Krstic et al. 2012) konnte in unserer Studie in-vivo kein Einfluss auf die Reelin-Spaltung durch Neuroserpin nachgewiesen werden. Das steht in Einklang mit Ergebnissen aus tPA-KO Mäusen, die ebenso unter basalen Bedingungen keinen Unterschied in der Reelin-Prozessierung aufzeigen konnten (Trotter et al. 2014). So scheinen andere Proteasen in-vivo die Reelin-Prozessierung unter basalen Bedingungen zu übernehmen. Erst im Anschluss an eine durch Kaliumkanalblocker ausgelöste synaptischen Potenzierung konnten Trotter et al. eine erhöhte C-terminale Reelin-Spaltung detektieren. Da dieser Effekt in tPA-KO-Mäusen ausblieb, kann von einer tPA-spezifischen C-terminalen Prozessierung von Reelin in Stresssituationen ausgegangen werden. Dieser Ansatz limitiert unsere Ergebnisse, die unter physiologischen Aspekten erfolgt sind. Gleichzeitig eröffnen sie jedoch die Hypothese, dass die Regulation der tPA- und ADAMTS-4-abhängigen Prozessierung von Reelin durch Neuroserpin in Stresssituationen, wie zerebralen Infarkten oder Infektionen, von Bedeutung sein kann. Grund dafür könnte beispielsweise eine sterische Blockade der Reelin-Spaltstellen im Gewebe oder eine

stressinduzierte Mehrproduktion, Freisetzung oder Aktivierung der beteiligten Proteasen sein. Der Einfluss von pathologischen Situationen auf die Expression und Signalgebung von Neuroserpin und tPA konnte bereits in Ratten dargestellt werden, die chronischem Stress sowie Entzündungsreaktionen ausgesetzt waren (Han et al. 2019). Nicht zuletzt wirkt sich limitierend auf die Interpretation unserer Ergebnisse aus, dass wir die reine Expression der Substrate von tPA in Abhängigkeit von Neuroserpin untersuchten. Ein direkter Rückschluss auf die funktionelle Aktivität kann damit nicht gezogen werden. So ließe sich beispielsweise über eine zymographische Aktivitätsbestimmung eine genauere Aussage darüber treffen, ob Neuroserpin die tPA-Aktivität in kortikalem Gewebe beeinflusst.

Expression von PAI-1 in Abwesenheit von Neuroserpin

Auch in der Bandenintensität und Expression von PAI-1 (45 kDa) lässt sich kein signifikanter Unterschied in den verschiedenen Entwicklungsstadien zwischen WT- und NSKO-Mäusen nachweisen. Somit zeigt sich keine kompensatorische Zunahme von PAI-1 in Abwesenheit von Neuroserpin.

Diskussion: Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um den kompensatorischen Effekt genauer zu untersuchen, da er nur durch einen konditionalen Knockout von Neuroserpin in einem späteren Entwicklungsstadium nachweisbar sein könnte. In diesem Zusammenhang muss auch die kompensatorische Beteiligung anderer Serpine und Proteasen an diesen Prozessen in Betracht gezogen werden, die einen fehlenden Laminierungsdefekt begründen könnten. Neben PAI-1 kommt beispielsweise auch PN-1 (Protease Nexin-1) als mögliches Serpin in Betracht, den Funktionsverlust in Neuroserpin-defizienten Mäusen zu kompensieren. PN-1 ähnelt Neuroserpin und PAI-1 in der Exon-Intron-Organisation und hat eine inhibitorische Funktion auf Plasmin und ihre Aktivatoren wie auch tPA (Galliciotti und Sonderegger 2006, Boulaftali et al. 2011). Weiterführend wäre also auch eine Untersuchung der PN-1-Expression in Abwesenheit von Neuroserpin interessant sowohl unter basalen als auch pathologischen Bedingungen.

3. Zusammenfassung

Neuroserpin ist ein Serinproteaseinhibitor (Serpine), der die Aktivität von tPA im Zentralnervensystem reguliert und im Hippocampus und Neokortex in hohen Mengen exprimiert wird. Obwohl seine Rolle bei der Bildung des Hippocampus bereits hervorgehoben wurde, ist die Funktion von Neuroserpin im Neokortex noch nie untersucht worden. Um dies herauszufinden, führten wir zunächst eine detaillierte Analyse durch, um Neuroserpin-exprimierende Zellen mit Hilfe immunhistochemischer Marker von Projektions- und Interneuronen und Gliazellen im somatosensorischen Kortex von WT-Mäusen in verschiedenen Entwicklungsstadien zu identifizieren. Um den Einfluss von Neuroserpin auf die kortikale Entwicklung zu untersuchen, verglichen wir die Laminierung des SS-Kortex von WT- und NSKO-Mäusen mit Hilfe immunhistochemischer Marker. Außerdem untersuchten wir die Rolle von Neuroserpin bei der Prozessierung von Reelin, einem Protein, das die neuronale Migration und die kortikale Laminierung während der Entwicklung reguliert. Zu diesem Zweck analysierten wir mittels Western Blot die Expression und Spaltung von Reelin und von ADAMTS-4, einer Protease, die durch tPA aktiviert wird und bekanntermaßen Reelin spaltet. Schließlich analysierten wir die mögliche kompensatorische Hochregulierung eines anderen Serpins, PAI-1, in Abwesenheit von Neuroserpin. Pränatal konnte eine homogene und diffuse schwache Expression von Neuroserpin in der gesamten kortikalen Platte nachgewiesen werden. Postnatal hingegen wurde Neuroserpin spezifisch in hohen Konzentrationen in wenigen Projektionsneuronen und Interneuronen, nicht aber in Gliazellen exprimiert. In Abwesenheit von Neuroserpin konnte in keinem Entwicklungsstadium ein Unterschied in der kortikalen Laminierung festgestellt werden. In Übereinstimmung damit wurde in kortikalen Extrakten zwischen WT- und NSKO-Mäusen kein Unterschied in der kortikalen Expression und Prozessierung von Reelin und ADAMTS-4 sowie keine Hochregulierung der PAI-1-Expression festgestellt. Somit scheint Neuroserpin trotz seiner hohen Expression weder für die normale Bildung des murinen Neokortex noch für die Spaltung von Reelin unter basalen Bedingungen unerlässlich zu sein.

4. Summary

Neuroserpin is a serine protease inhibitor (serpin) regulating the activity of tPA in the central nervous system and is expressed at high levels in the hippocampus and neocortex. Although its role in the formation of the hippocampus has been highlighted, the function of neuroserpin in the neocortex has never been investigated. To uncover this, we first performed a detailed analysis to identify neuroserpin-expressing cells using immunohistochemical markers of projection and interneurons and glial cells in the somatosensory cortex of WT mice at different developmental stages. Next, to investigate the influence of neuroserpin on cortical development, we compared lamination of the SS cortex in WT and NSKO mice using immunohistochemical markers. Furthermore, we investigated neuroserpin role in the processing of Reelin, a protein regulating neuronal migration and cortical lamination during development. For this purpose, we analyzed by Western blot the expression and cleavage of Reelin and of ADAMTS-4, a protease activated by tPA and known to process Reelin. Last, we analyzed the possible compensatory upregulation of another serpin, PAI-1, in the absence of neuroserpin. Prenatally, a homogeneous and diffuse weak expression of neuroserpin could be detected all over the cortical plate. Postnatally, however, neuroserpin was specifically found at high levels in few projection neurons and interneurons, but not in glial cells. In the absence of neuroserpin, no difference in cortical lamination could be detected at any developmental stage. Consistent with this, no difference in cortical expression and processing of Reelin and ADAMTS-4 was detected in cortical extracts between WT and NSKO mice, and no upregulation of PAI-1 expression was identified. Thus, despite its high expression, neuroserpin does not appear to be indispensable for normal formation of murine neocortex, nor for cleavage of Reelin under basal conditions.

5. Erklärung des Eigenanteils

Die grundlegende Idee der Forschungsarbeit basiert auf Überlegungen in Bezug auf die Neuroserpin-Forschung von Prof. Dr. Markus Glatzel und Dr. Giovanna Galliciotti. Eine Promotionskizze wurde zusammen mit Prof. Dr. Markus Glatzel und Dr. Giovanna Galliciotti erstellt und die Versuche mit Dr. Giovanna Galliciotti zusammen konzipiert.

Zur erfolgreichen Durchführung der Experimente wurde ich im Labor insbesondere von Dr. Giovanna Galliciotti und Beata Szalay betreut. Das Töten der Mäuse und die Präparation der Gehirne übernahm Dr. Giovanna Galliciotti. Die Genotypisierung mittels der Polymerasenkettenreaktion und DNA-Agarose-Elektrophorese wurde selbstständig von mir durchgeführt. Ebenso eigenständig erfolgte die Datenerhebung, welche die Gewebeverarbeitung für die Immunhistochemie, Etablierung und Durchführung der Färbungen, Bildanalyse und Bildaufnahme am Konfokalmikroskop sowie die nachfolgende Bildauswertung über die Image J Software umfasste. Zudem wurde ebenso die Gewebeverarbeitung und Proteinanalyse mittels Gelelektrophorese und Western-Blot eigenständig von mir durchgeführt. Die deskriptive und statistische Datenauswertung erfolgte mit Unterstützung von Dr. Giovanna Galliciotti. Eine erneute korrigierende Quantifizierung erfolgte durch Dr. Matthias Dottermusch. Die Literaturrecherche, die graphische Darstellung der Ergebnisse und der zusammenfassende Erstentwurf meines Eigenanteils für das Manuskript führte ich ebenso selbstständig durch. Die Abfassung der endgültigen Publikation erfolgte in Zusammenarbeit mit den Mitautoren.

Für die Publikation erfolgte weiterführend auch eine Analyse der Reifung der neuronalen Zellen mittels Golgi-Cox-Färbung durch Rebecca Reumann. Die Analyse des perineuronalen Netzes mittels immunhistochemischer Färbung und Western-Blot von Aggrecan wurde von Katrin Schostak durchgeführt. Zuletzt erfolgte eine Untersuchung der Synaptosomen, die von Dr. Giovanna Galliciotti isoliert wurden. Die Elektronenmikroskopie hierfür wurden von Dr. Michaela Schweizer und die Massenspektrometrie von Hannah Voß und Prof. Dr. Hartmut Schlüter durchgeführt.

Die supplementären Ergebnisse im Anhang der Publikation beinhalten außerdem die Analyse der Subplatte, die von Dr. Giovanna Galliciotti durchgeführt wurde, sowie die Co-Lokalisations-Analyse von tPA und Neuroserpin. Für den letzteren Versuch wurde die Maus von Sara Douceau und Dr. Denis Vivien generiert und die Schnitte durch Dr. Giovanna Galliciotti gefärbt.

6. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
1W	Eine Woche
13W	13 Wochen
ADAMTS	A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs
APOER2	ApoE Receptor 2
BSA	Bovine Serum Albumin
CRZ	Cajal-Retzius-Zellen
CTIP2	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting proteins 2
CUX1	CUT-like homeobox 1
Dab-1	Disabled-1
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	Extrazelluläre Matrix
FENIB	Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies
FL	Full length
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEK	Human Embryonic Kidney
HeLa	Henrietta Lacks
Iba-1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
KA	Kainsäure
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LTP	Langzeitpotenzierung
MCAO	Okklusion der mittleren zerebralen Arterie
mNGF	Mature Nerve Growth Factor
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MZ	Marginalzone
n	Anzahl
NGF	Nerve Growth Factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSKO	Neuroserpin-Knockout
o.g.	Oben genannte(n)

Olig2	Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor 2
P0	Erster Tag postnatal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PARV	Parvalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PN-1	Protease Nexin-1
proNGF	Pro Nerve Growth Factor
R	Repeatstelle
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Serpin	Serinprotease-Inhibitor
shRNA	Small hairpin RNA
SOM	Somatostatin
SS	Somatosensorisch
SVZ	Subventrikuläre Zone
TBR1	T-Box Brain Transcription Factor 1
tPA	Tissue-type Plasminogen Activator
u.a.	Unter anderem
uPA	Urokinase-type Plasminogen Activator
VLDLR	Very Low Density Lipoprotein Receptor
VZ	Ventrikulärzone
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<u>Abbildungen</u>		Seite
Abb. 1	Prozessierung von Reelin durch ADAMTS-4 und tPA	29
Abb. 2	Co-Lokalisierung von Neuroserpin und Ctip2 in E16 Maus Neokortex	38
Abb. 3	Co-Lokalisierung von Neuroserpin und Somatostatin in 1W Maus Neokortex	39
Abb. 4	Kortikale Somatostatin-Expression von WT- und NSKO-Mäusen in 1W Maus Neokortex	40
Abb. 5	Quantifizierung der totalen Reelin- und ADAMTS-4-Expression in WT- und NSKO-Mäusen der verschiedenen Entwicklungsstadien	42
<u>Tabellen</u>		
Tab. 1	Liste der verwendeten Antikörper für die Immunhistochemie und Western Blot	36

8. Literaturverzeichnis

- Adorjan I, Tyler T, Bhaduri A, Demharter S, Finszter CK, Bako M, Sebok OM, Nowakowski TJ, Khodosevich K, Møllgård K, Kriegstein AR, Shi L, Hoerder-Sua-bedissen A, Ansorge O, Molnár Z. Neuroserpin expression during human brain development and in adult brain revealed by immunohistochemistry and single cell RNA sequencing. *J Anat.* 2019 Sep;235(3):543-554.
- Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospon din type 1 motifs: the ADAMTS family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Jun;36(6):981-5.
- Barker-Carlson K, Lawrence DA, Schwartz BS. Acyl-enzyme complexes between tissue-type plasminogen activator and neuroserpin are short-lived in vitro. *J Biol Chem.* 2002 Dec 6;277(49):46852-7.
- Bernabeu RO, Longo FM. The p75 neurotrophin receptor is expressed by adult mouse dentate progenitor cells and regulates neuronal and non-neuronal cell genesis. *BMC Neurosci.* 2010 Oct 20;11:136.
- Boulaftali Y, Ho-Tin-Noe B, Pena A, Loyau S, Venisse L, François D, Richard B, Arocas V, Collet JP, Jandrot-Perrus M, Bouton MC. Platelet protease nexin-1, a serpin that strongly influences fibrinolysis and thrombolysis. *Circulation.* 2011 Mar 29;123(12):1326-34.
- Bruno MA, Cuello AC. Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 25;103(17):6735-40.
- Cánovas J, Berndt FA, Sepúlveda H, Aguilar R, Veloso FA, Montecino M, Oliva C, Maass JC, Sierralta J, Kukuljan M. The Specification of Cortical Subcerebral Projection Neurons Depends on the Direct Repression of TBR1 by CTIP1/BCL11a. *J Neurosci.* 2015 May 13;35(19):7552-64.
- Cinelli P, Madani R, Tsuzuki N, Vallet P, Arras M, Zhao CN, Osterwalder T, Rüllicke T, Sonderegger P. Neuroserpin, a neuroprotective factor in focal ischemic stroke. *Mol Cell Neurosci.* 2001 Nov;18(5):443-57.
- D'Acunto E, Fra A, Visentin C, Manno M, Ricagno S, Galliciotti G, Miranda E. Neuserpin: structure, function, physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci.* 2021 Oct;78(19-20):6409-6430.
- Davis RL, Shrimpton AE, Holohan PD, Bradshaw C, Feiglin D, Collins GH, Sonderegger P, Kinter J, Becker LM, Lachawan F, Krasnewich D, Muenke M, Lawrence DA, Yerby MS, Shaw CM, Gooptu B, Elliott PR, Finch JT, Carrell RW, Lomas DA. Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. *Nature.* 1999 Sep 23;401(6751):376-9.
- de Bergeyck V, Nakajima K, Lambert de Rouvroit C, Naerhuyzen B, Goffinet AM, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K. A truncated Reelin protein is produced but not secreted in the 'Orleans' reeler mutation (Reln[rl-Orl]). *Brain Res Mol Brain Res.* 1997 Oct 15;50(1-2):85-90.
- Förster E, Bock HH, Herz J, Chai X, Frotscher M, Zhao S. Emerging topics in Reelin function. *Eur J Neurosci.* 2010 May;31(9):1511-8.
- Galliciotti G, Sonderegger P. Neuroserpin. *Front Biosci.* 2006 Jan 1;11:33-45.
- Galliciotti G, Glatzel M, Kinter J, Kozlov SV, Cinelli P, Rüllicke T, Sonderegger P. Accumulation of mutant neuroserpin precedes development of clinical symptoms in familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies. *Am J Pathol.* 2007 Apr;170(4):1305-13.

- Gao G, Westling J, Thompson VP, Howell TD, Gottschall PE, Sandy JD. Activation of the proteolytic activity of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by C-terminal truncation. *J Biol Chem*. 2002 Mar 29;277(13):11034-41.
- García-Moreno F, López-Mascaraque L, De Carlos JA. Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells. *J Comp Neurol*. 2007 Jan 20;500(3):419-32.
- Gelderblom M, Neumann M, Ludewig P, Bernreuther C, Krasemann S, Arunachalam P, Gerloff C, Glatzel M, Magnus T. Deficiency in serine protease inhibitor neuroserpin exacerbates ischemic brain injury by increased postischemic inflammation. *PLoS One*. 2013 May 3;8(5):e63118.
- Greig LC, Woodworth MB, Galazo MJ, Padmanabhan H, Macklis JD. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Nov;14(11):755-69.
- Ha S, Tripathi PP, Mihalas AB, Hevner RF, Beier DR. C-Terminal Region Truncation of RELN Disrupts an Interaction with VLDLR, Causing Abnormal Development of the Cerebral Cortex and Hippocampus. *J Neurosci*. 2017 Jan 25;37(4):960-971.
- Hack I, Hellwig S, Junghans D, Brunne B, Bock HH, Zhao S, Frotscher M. Divergent roles of ApoER2 and Vldlr in the migration of cortical neurons. *Development*. 2007 Nov;134(21):3883-91.
- Han W, Dang R, Xu P, Li G, Zhou X, Chen L, Guo Y, Yang M, Chen D, Jiang P. Altered fibrinolytic system in rat models of depression and patients with first-episode depression. *Neurobiol Stress*. 2019 Jul 26;11:100188.
- Hastings GA, Coleman TA, Haudenschild CC, Stefansson S, Smith EP, Barthlow R, Cherry S, Sandkvist M, Lawrence DA. 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*. 1997 Dec 26;272(52):33062-7.
- Hermann M, Reumann R, Schostak K, Kement D, Gelderblom M, Bernreuther C, Frischknecht R, Schipanski A, Marik S, Krasemann S, Sepulveda-Falla D, Schweizer M, Magnus T, Glatzel M, Galliciotti G. Deficits in developmental neurogenesis and dendritic spine maturation in mice lacking the serine protease inhibitor neuroserpin. *Mol Cell Neurosci*. 2020 Jan;102:103420.
- Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J. Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron*. 1999 Oct;24(2):481-9.
- Hisanaga A, Morishita S, Suzuki K, Sasaki K, Koie M, Kohno T, Hattori M. A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4) cleaves Reelin in an isoform-dependent manner. *FEBS Lett*. 2012 Sep 21;586(19):3349-53.
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998 Jun 1;57(1):1-9.
- Jacque CM, Vinner C, Kujas M, Raoul M, Racadot J, Baumann NA. Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *J Neurol Sci*. 1978 Jan;35(1):147-55.
- Jossin Y, Ignatova N, Hiesberger T, Herz J, Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM. The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. *J Neurosci*. 2004 Jan 14;24(2):514-21.

- Jossin Y, Gui L, Goffinet AM. Processing of Reelin by embryonic neurons is important for function in tissue but not in dissociated cultured neurons. *J Neurosci*. 2007 Apr 18;27(16):4243-52.
- Jossin Y. Reelin Functions, Mechanisms of Action and Signaling Pathways During Brain Development and Maturation. *Biomolecules*. 2020 Jun 26;10(6):964.
- Kement D, Reumann R, Schostak K, Voß H, Douceau S, Dottermusch M, Schweizer M, Schlüter H, Vivien D, Glatzel M, Galliciotti G. Neuroserpin Is Strongly Expressed in the Developing and Adult Mouse Neocortex but Its Absence Does Not Perturb Cortical Lamination and Synaptic Proteome. *Front Neuroanat*. 2021 Feb 23;15:627896.
- Kohno S, Kohno T, Nakano Y, Suzuki K, Ishii M, Tagami H, Baba A, Hattori M. Mechanism and significance of specific proteolytic cleavage of Reelin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Feb 27;380(1):93-7.
- Koubova J, Guarente L. How does calorie restriction work? *Genes Dev*. 2003 Feb 1;17(3):313-21.
- Krstic D, Rodriguez M, Knuesel I. Regulated proteolytic processing of Reelin through interplay of tissue plasminogen activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5, and their modulators. *PLoS One*. 2012;7(10):e47793.
- Krueger SR, Ghisu GP, Cinelli P, Gschwend TP, Osterwalder T, Wolfer DP, Sonderegger P. Expression of neuroserpin, an inhibitor of tissue plasminogen activator, in the developing and adult nervous system of the mouse. *J Neurosci*. 1997 Dec 1;17(23):8984-96.
- Kubo K, Mikoshiba K, Nakajima K. Secreted Reelin molecules form homodimers. *Neurosci Res*. 2002 Aug;43(4):381-8.
- Lee TW, Tsang VW, Loeff EJ, Birch NP. Physiological and pathological functions of neuroserpin: Regulation of cellular responses through multiple mechanisms. *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Feb;62:152-159.
- Lemarchant S, Pruvost M, Hébert M, Gauberti M, Hommet Y, Briens A, Maubert E, Gueye Y, Féron F, Petite D, Mersel M, do Rego JC, Vaudry H, Koistinaho J, Ali C, Agin V, Emery E, Vivien D. tPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury. *Neurobiol Dis*. 2014 Jun;66:28-42.
- Lewis DA. GABAergic local circuit neurons and prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000 Mar;31(2-3):270-6.
- Louessard M, Lacroix A, Martineau M, Mondielli G, Montagne A, Lesept F, Lambolez B, Cauli B, Mothet JP, Vivien D, Maubert E. Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Mol Neurobiol*. 2016 Sep;53(7):5000-12.
- Madani R, Kozlov S, Akhmedov A, Cinelli P, Kinter J, Lipp HP, Sonderegger P, Wolfer DP. Impaired explorative behavior and neophobia in genetically modified mice lacking or overexpressing the extracellular serine protease inhibitor neuroserpin. *Mol Cell Neurosci*. 2003 Jul;23(3):473-94.
- Melchor JP, Strickland S. Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb Haemost*. 2005 Apr;93(4):655-60.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Jun;8(6):427-37.
- Nieto M, Monuki ES, Tang H, Imitola J, Haubst N, Khoury SJ, Cunningham J, Gotz M, Walsh CA. Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and

- upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 2004 Nov 8;479(2):168-80.
- Ohtaka-Maruyama C, Okado H. Molecular Pathways Underlying Projection Neuron Production and Migration during Cerebral Cortical Development. *Front Neurosci.* 2015 Dec 17;9:447.
- Osterwalder T, Cinelli P, Baici A, Pennella A, Krueger SR, Schrimpf SP, Meins M, Sonderegger P. The axonally secreted serine proteinase inhibitor, neuroserpin, inhibits plasminogen activators and plasmin but not thrombin. *J Biol Chem.* 1998 Jan 23;273(4):2312-21.
- Pasquet N, Douceau S, Naveau M, Lesept F, Louessard M, Lebouvier L, Hommet Y, Vivien D, Bardou I. Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. *Cereb Cortex.* 2019 Jun 1;29(6):2482-2498.
- Pesold C, Impagnatiello F, Pisu MG, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A, Caruncho HJ. Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 17;95(6):3221-6.
- Powell EM, Campbell DB, Stanwood GD, Davis C, Noebels JL, Levitt P. Genetic disruption of cortical interneuron development causes region- and GABA cell type-specific deficits, epilepsy, and behavioral dysfunction. *J Neurosci.* 2003 Jan 15;23(2):622-31.
- Reumann R, Vierk R, Zhou L, Gries F, Kraus V, Mienert J, Romswinkel E, Morellini F, Ferrer I, Nicolini C, Fahnstock M, Rune G, Glatzel M, Galliciotti G. The serine protease inhibitor neuroserpin is required for normal synaptic plasticity and regulates learning and social behavior. *Learn Mem.* 2017 Nov 15;24(12):650-659.
- Rijken DC, Hoylaerts M, Collen D. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J Biol Chem.* 1982 Mar 25;257(6):2920-5.
- Samson AL, Medcalf RL. Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. *Neuron.* 2006 Jun 1;50(5):673-8.
- Sawada H, Katsumata Y, Higashi H, Zhang C, Li Y, Morgan S, Lee LH, Singh SA, Chen JZ, Franklin MK, Moorleggen JJ, Howatt DA, Rateri DL, Shen YH, LeMaire SA, Aikawa M, Majesky MW, Lu HS, Daugherty A. Second Heart Field-Derived Cells Contribute to Angiotensin II-Mediated Ascending Aortopathy. *Circulation.* 2022 Mar 29;145(13):987-1001.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jun 28;9(7):676-82.
- Stevenson TK, Lawrence DA. Characterization of Tissue Plasminogen Activator Expression and Trafficking in the Adult Murine Brain. *eNeuro.* 2018 Aug 6;5(4):ENEURO.0119-18.2018.
- Stoeckli ET, Lemkin PF, Kuhn TB, Ruegg MA, Heller M, Sonderegger P. Identification of proteins secreted from axons of embryonic dorsal-root-ganglia neurons. *Eur J Biochem.* 1989 Mar 15;180(2):249-58.
- Sultan KT, Brown KN, Shi SH. Production and organization of neocortical interneurons. *Front Cell Neurosci.* 2013 Nov 21;7:221.

- Tamamaki N, Fujimori KE, Takauji R. Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci*. 1997 Nov 1;17(21):8313-23.
- Teesalu T, Kulla A, Simisker A, Sirén V, Lawrence DA, Asser T, Vaheri A. Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *Thromb Haemost*. 2004 Aug;92(2):358-68.
- Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J. Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell*. 1999 Jun 11;97(6):689-701.
- Trotter JH, Lussier AL, Psilos KE, Mahoney HL, Sponaugle AE, Hoe HS, Rebeck GW, Weeber EJ. Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. *Neuroscience*. 2014 Aug 22;274:299-307.
- Vawter MP, Shannon Weickert C, Ferran E, Matsumoto M, Overman K, Hyde TM, Weinberger DR, Bunney WE, Kleinman JE. Gene expression of metabolic enzymes and a protease inhibitor in the prefrontal cortex are decreased in schizophrenia. *Neurochem Res*. 2004 Jun;29(6):1245-55.
- Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA. Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med*. 1998 Feb;4(2):228-31.
- Wannier-Morino P, Rager G, Sonderegger P, Grabs D. Expression of neuroserpin in the visual cortex of the mouse during the developmental critical period. *Eur J Neurosci*. 2003 May;17(9):1853-60.
- Wu J, Echeverry R, Guzman J, Yepes M. Neuroserpin protects neurons from ischemia-induced plasmin-mediated cell death independently of tissue-type plasminogen activator inhibition. *Am J Pathol*. 2010 Nov;177(5):2576-84.
- Yasui N, Nogi T, Kitao T, Nakano Y, Hattori M, Takagi J. Structure of a receptor-binding fragment of reelin and mutational analysis reveal a recognition mechanism similar to endocytic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 12;104(24):9988-93.
- Yepes M, Sandkvist M, Wong MK, Coleman TA, Smith E, Cohan SL, Lawrence DA. Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis. *Blood*. 2000 Jul 15;96(2):569-76.
- Yepes M, Sandkvist M, Coleman TA, Moore E, Wu JY, Mitola D, Bugge TH, Lawrence DA. Regulation of seizure spreading by neuroserpin and tissue-type plasminogen activator is plasminogen-independent. *J Clin Invest*. 2002 Jun;109(12):1571-8.
- Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest*. 2003 Nov;112(10):1533-40.
- Zhang Z, Zhang L, Yepes M, Jiang Q, Li Q, Arniago P, Coleman TA, Lawrence DA, Chopp M. Adjuvant treatment with neuroserpin increases the therapeutic window for tissue-type plasminogen activator administration in a rat model of embolic stroke. *Circulation*. 2002 Aug 6;106(6):740-5.
- Zhou Q, Wang S, Anderson DJ. Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron*. 2000 Feb;25(2):331-43.

9. Danksagung

In erster Instanz gilt mein Dank Dr. Giovanna Galliciotti, die mich tatkräftig und pausenlos in jeder Situation mit Ratschlägen unterstützt, stetig motiviert und das Beste aus mir herausgeholt hat. Eine bessere Betreuung hätte ich mir keineswegs wünschen können.

Selbstverständlich möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Prof. Dr. Markus Glatzel für das Ermöglichen der Arbeit und das stets offene Ohr bei Unklarheiten bedanken.

Während meiner Labortätigkeit hatte ich weiterhin das Vergnügen zusammen mit Beata Anderson als Labormanagerin arbeiten zu dürfen. Mein Dank gilt auch ihr, da die Arbeit sich mit ihr stets angenehm und mit viel Freude gestaltete. Möge sie in Frieden ruhen.

Auch bei den restlichen Mitgliedern des Labors möchte ich mich bedanken, die meine Arbeit, vor allem im Rahmen der regelmäßig stattfindenden Progress Reports, stets kritisch begutachteten und mit Tipps bereicherten.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich ebenso beim SFB 877 bedanken.

Ich danke außerdem meiner Familie, vor allem meinen Eltern, die nach Deutschland gekommen sind, um mir diese akademische Ausbildung erst zu ermöglichen, sowie meinen Geschwistern Sara und Talha, die in jeder Lebenslage für mich da waren und weiterhin sind.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Ehemann Hassib bedanken, der mich nicht nur in der Zeit meines Studiums bedingungslos unterstützt hat, sondern mich auch privat hat alle Sorgen vergessen lassen, um so mit neuer Motivation starten zu können.

Danke für alles.

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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: *D. Hamid*