

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Neuropathologie  
des Diagnostikzentrums  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor Prof. Dr. med. Markus Glatzel

**Beteiligung von OS-9 an der ER-assoziierten Degradation (ERAD) bei familiärer  
Enzephalopathie mit Neuroserpin-Einschlüssen (FENIB)**

**Dissertation**

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

von

Felix Oberhauser

aus Speyer

Hamburg 2013

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 6.5.2014**

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

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Herr Prof. Dr. M. Glatzel**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Herr PD Dr. T. Magnus**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>8</b>
2.1 Serpine.....	8
2.1.1 Struktur, Stabilität und Inhibitionsmechanismus von Serpinen.....	8
2.1.2 Konformationserkrankungen und Serpinopathien.....	11
2.1.3 Modelle der Polymerbildung bei Serpinopathien.....	13
2.2 Neuroserpin.....	15
2.2.1 Familiäre Enzephalopathie mit Neuroserpin-Einschlüssen (FENIB).....	19
2.3 Endoplasmatisches Retikulum und ER-assoziiertes Proteinabbau (ERAD).....	23
2.3.1 ER-Lektin OS-9 und Substraterkennung in ERAD.....	25
<b>3 Material</b>	<b>28</b>
3.1 Geräte.....	28
3.2 Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	29
3.2.1 DNA-Analytik.....	29
3.2.2 Proteinanalytik.....	31
3.2.3 Zellkultur.....	32
3.2.4 Fluoreszenzfärbung.....	33
<b>4 Methoden</b>	<b>34</b>
4.1 Molekularbiologische Methoden.....	34
4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
4.1.2 Aufreinigung von Produkten der Polymerase-Kettenreaktion.....	34
4.1.3 Ortsgerichtete Mutagenese.....	34
4.1.4 Restriktionsverdau mit Endonukleasen.....	35
4.1.5 DNA-Agarosegelelektrophorese.....	35
4.1.6 DNA-Konzentrationsmessung mittels photometrischer Bestimmung.....	36
4.1.7 Herstellung von Plasmid-Konstrukten zur Transfektion von Zellen.....	36
4.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien.....	37
4.1.9 Isolation von Plasmid-DNA.....	37
4.1.10 DNA-Sequenzierung.....	38

4.2	Zellkultur .....	39
4.2.1	Zellbiologische Arbeitstechniken.....	39
4.2.2	Kontinuierliche Kultivierung von HEK-293-Zellen.....	39
4.2.3	Langzeitlagerung von Zellen .....	39
4.2.4	Auftauen von konservierten Zellen.....	40
4.2.5	Zellzahlbestimmung.....	40
4.2.6	Transfektion von HEK-293-Zellen .....	40
4.2.7	Präparation von Zelllysaten und Zellkulturüberständen zur Aufbereitung von Proteinen .....	41
4.2.8	Zusammensetzung des Lysepuffers zur Herstellung von Zelllysaten.....	41
4.2.9	Zusammensetzung des 6x Laemmli-Puffers: .....	41
4.3	Proteinbiochemische Untersuchungen .....	42
4.3.1	Proteinauftrennung durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese nach Laemmli (SDS-PAGE).....	42
4.3.2	Herstellung und Zusammensetzung von Polyacrylamid-Gelen zur SDS-PAGE .....	42
4.3.3	Western-Blot .....	43
4.3.4	Immundetektion .....	44
4.3.5	Verdau von Zelllysaten mit EndoH und PNGaseF .....	44
4.3.6	Co-Immunpräzipitation (Co-IP).....	45
4.3.7	Fluoreszenzfärbung (IHC) .....	45
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
5.1	Intrazelluläre Akkumulation von mutiertem Neuroserpin .....	47
5.2	Intrazelluläre Akkumulation von mutiertem eGFP-markiertem Neuroserpin.....	47
5.3	Lokalisation intrazellulärer Akkumulationen.....	48
5.4	Intrazelluläres mutiertes Neuroserpin besitzt Glykosylierung vom mannosereichen Typ ..	49
5.5	Expression von ER-Lektin OS-9 in HEK-293-Zellen.....	50
5.6	Intrazelluläre Lokalisation von OS-9 in HEK-293-Zellen.....	51
5.7	Co-Transfektion von OS-9 und Neuroserpin in HEK-293-Zellen .....	52
5.8	Kokalisation von ER-Lektin OS-9 mit Wildtyp-Neuroserpin oder Mutante .....	53
5.9	Mutiertes Neuroserpin bindet an OS-9.....	55
5.10	Überexpression von OS-9 senkt Akkumulation von intrazellulärem mutiertem Neuroserpin .....	56
5.11	Mutiertes Neuroserpin mit nichtfunktionalen N-Glykosylierungsstellen zeigt eine stärkere Tendenz zur intrazellulären Aggregation. ....	57
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>

<b>7</b>	<b>Appendix</b>	<b>65</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	65
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	66
7.3	Tabellenverzeichnis .....	67
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>68</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>81</b>

### 1 Zusammenfassung

FENIB ist eine autosomal dominant vererbte Demenzerkrankung, bei der Mutationen im Gen für Neuroserpin, einem neuronalen Serinprotease-Inhibitor, zur Aggregation von Neuroserpin innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und in der Folge zu Neurodegeneration und vorzeitiger Demenz führen. Bei den Betroffenen findet sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der destabilisierenden Wirkung der Mutation auf die Struktur des Serpins und der Menge des aggregierten Proteins, sowie Beginn und Schwere der Symptomatik. Diese Genotyp-Phänotyp-Korrelation macht FENIB zu einer idealen Modellerkrankung zur Untersuchung von neurodegenerativen Erkrankungen, bei denen es durch intrazelluläre Aggregation von Proteinen zu einer Störung der Proteostase kommt, die letztlich zu einem Zelltod führt. Ein Abbauweg für fehlgefaltete Glykoproteine innerhalb des ERs ist die ER-assoziierte Degradation (ERAD), die einer intrazellulären Aggregation von Proteinen entgegenwirkt. Dabei wird das Substrat durch Lektine am Status der gebundenen Oligosaccharide erkannt, anschließend erfolgt die Translokation in das Zytosol und der proteasomale Abbau. In dieser Arbeit wurde die Beteiligung des ER-Lektins OS-9 am Abbau von mutiertem Neuroserpin via ERAD anhand eines HEK-293-Zellmodells der schnell akkumulierenden FENIB-Mutation G392E untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass mutiertes Neuroserpin Glykosylierungen vom mannosereichen Typ besitzt und Aggregate innerhalb des ERs bildet. Nach Deletion der Glykosylierungsstellen zeigte mutiertes Neuroserpin eine stärkere Tendenz zur intrazellulären Aggregatbildung. Weiter wurde eine Kollokalisierung und selektive Bindung von OS-9 an mutiertes Neuroserpin gefunden. Funktionell konnte der Spiegel an intrazellulärem, mutiertem Neuroserpin durch eine Überexpression von OS-9 gesenkt werden. Diese Untersuchungen an einem HEK-293-Zellmodell weisen auf eine Beteiligung des ER-Lektins OS-9 am Umsatz von mutiertem Neuroserpin hin.

### **Involvement of OS-9 in the ER-associated degradation (ERAD) pathway in familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies (FENIB)**

Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies (FENIB) is an autosomal dominantly inherited dementia caused by mutations in the gene coding for neuroserpin, a neuronal serine protease inhibitor, leading to the formation of aggregates within the endoplasmic reticulum (ER) and subsequent to neurodegeneration and dementia. There is a striking relationship between the destabilizing effect of the different mutations and the number of inclusions as well as the onset and the severity of symptoms. This genotype-phenotype correlation renders FENIB an ideal model to investigate neurodegenerative disorders with intracellular protein aggregation and breakdown of proteostasis leading to cell death. ER-associated degradation (ERAD) is a cellular transport mechanism that counteracts aggregation of proteins within the ER by recognizing the oligosaccharide residues of glycoprotein substrate via specific lectines. Subsequently the misfolded substrate is translocated to the cytosolic compartment and guided to the proteasome for degradation.

In my thesis I investigated the involvement of the ER-lectin OS-9 in the degradation of mutant neuroserpin via ERAD. Therefore, a HEK-293 cell model of the fast polymerizing G392E FENIB-mutant was used. In this model system, aggregates of mutant Neuroserpin are formed within the ER, carrying high-mannose type N-glycans. After deleting different N-glycosylation sites, mutated neuroserpin showed an increase in intracellular aggregates. Finally, microscopy studies and co-immunoprecipitation showed colocalisation and selective binding of the ER-lectin OS-9 to mutant neuroserpin. Overexpression of OS-9 was followed by a significant decrease in intracellular mutant neuroserpin levels. This study indicates OS-9 to be involved in mutant neuroserpin degradation in a HEK-293 cell model.

## 2 Einleitung

### 2.1 Serpine

Das Akronym Serpin stellvertretend für **Ser**inprotease-**In**hibitor beschreibt die größte Superfamilie von Proteaseinhibitoren, deren Zugehörigkeit über die Kernstruktur des Proteins und den gemeinsamen Mechanismus der Inaktivierung von Proteasen definiert wird (Silverman et al. 2001). Serpine sind phylogenetisch hochkonserviert und finden sich bei Eukaryonten, Prokaryonten, Viren und höheren Pflanzen (Irving et al. 2000). Abhängig von ihrer vorwiegenden Lokalisation unterscheidet man extra- und intrazelluläre Formen, wobei auch Mischformen existieren (Lomas et al. 2002). Das namensgebende Akronym sollte jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass einige Serpine auch andere Proteasetypen wie Cysteinproteasen inhibieren (Schick et al. 1998) und einzelne Vertreter der Familie ohne inhibitorische Funktion sind (Doolittle 1983). Aktuell sind 36 humane Serpine bekannt, diese zeigen überwiegend proteaseinhibitorische Funktion. Vertreter ohne diese Wirkung sind Hormontransporter wie zum Beispiel das Thyroxinbindende Globulin (TBG) oder übernehmen selbst die Rolle eines Prohormons wie Angiotensinogen (Gettins 2002). Serpine sind an einer Vielzahl von biologischen Systemen wie der Kreislaufregulation, der Blutgerinnung und der Abwehr von Krankheitserregern beteiligt (Law et al. 2006). Antithrombin III (AT III) ist im Zusammenspiel mit Heparin einer der wichtigsten Regulatoren der Koagulation, während Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) die Aktivität der Fibrinolyse überwacht. Als Teil des angeborenen Immunsystems regelt C1-Esterase-Inhibitor die Aktivierung der Komplementkaskade.  $\alpha$ 1-Antitrypsin, welches etwa 1–2 % des Serumgesamtproteins ausmacht, inhibiert die von neutrophilen Granulozyten sezernierte Elastase und schützt umliegendes Gewebe vor der Destruktion (Lomas et al. 2002; Gooptu et al. 2009). Das im zentralen und peripheren Nervensystem vorkommende Neuroserpin wird in späten Stadien der Neurogenese exprimiert und kommt im adulten Gehirn in Regionen mit starker synaptischer Plastizität vor (Hastings et al. 1997).

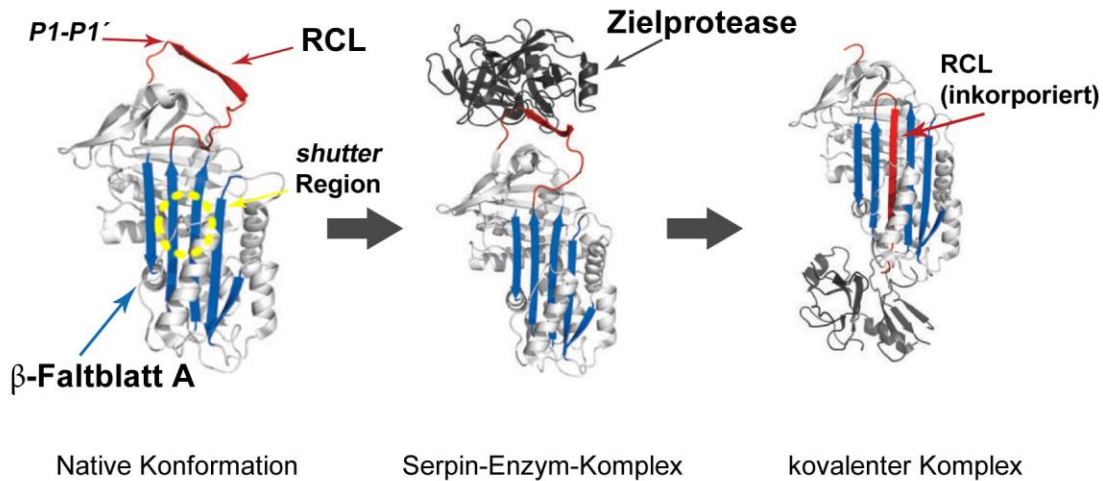
#### 2.1.1 Struktur, Stabilität und Inhibitionsmechanismus von Serpinen

Die einzelnen Vertreter der Serpin-Familie zeigen einen vergleichbaren Aufbau ihres Grundgerüsts von etwa 350 Aminosäuren Länge, welches aus drei  $\beta$ -Faltblatt-



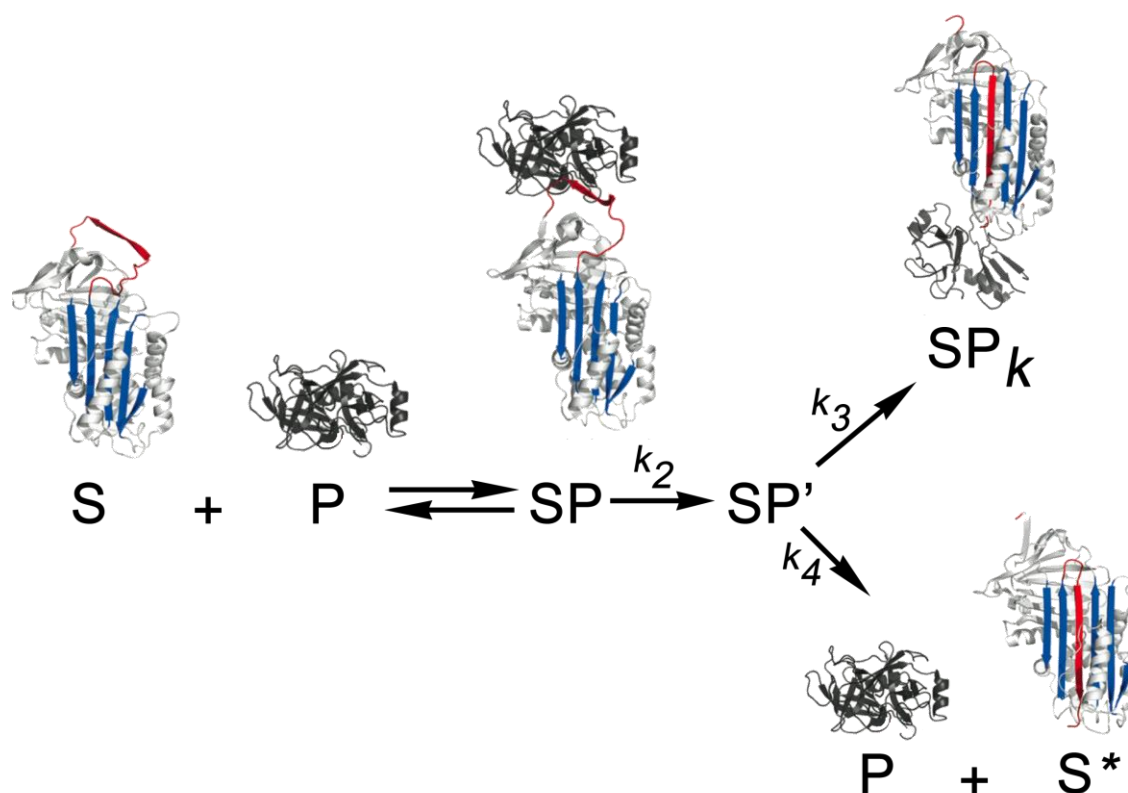
Strukturen (A, B, C), 8-9  $\alpha$ -Helices (hA bis hI) und einer exponierten, reaktiven Schleife (reactive center loop, RCL) von etwa 20 Aminosäuren Länge besteht (Abb. 1). Dieses aktive Zentrum befindet sich im nativen Zustand des Serpins am oberen Pol des Moleküls und ragt gewissermaßen wie eine ausgelassene Schlinge aus der Tertiärstruktur des übrigen Moleküls heraus, um als Köder für die Zielprotease zu dienen. (Loebermann et al. 1984; Elliott et al. 1996; Gettins 2002). Dabei ist es erstaunlich, dass die native Konformation des Serpins nicht das niedrigste mögliche Energieniveau darstellt. Es handelt sich bei dieser Konformation vielmehr um einen metastabilen Zustand, dessen Energiedifferenz beim Durchlaufen des Inhibitionsmechanismus abgebaut werden kann (Whisstock et al. 2006) (Abb. 1, links). Zunächst bilden die reaktive Schleife des Serpins und die Zielprotease einen nicht-kovalenten Serpin-Protease-Anlagerungskomplex (Michaelis-Komplex, Abb. 1). Die Protease trennt im Anschluss eine Peptidbindung in der Mitte der reaktiven Schleife zwischen Position P1 und P1' und bindet kovalent an das Serpin. Dadurch wird die anschließende Konformationsänderung des Serpin-Protease-Komplexes ermöglicht, bei der die RCL zum unteren Pol umgelagert wird und als zusätzlicher Strang im Bereich der Shutter-Region in das  $\beta$ -Faltblatt A inseriert wird (Abb. 1). Durch diese drastische Änderung der Tertiärstruktur geht das Serpin-Molekül von einer gespannten in eine entspannte Konformation über und transportiert dabei die gebundene Protease vom oberen zum unteren Pol (Silverman et al. 2001; Gettins 2002). Ein Teil der durch diese Transformation freiwerdenden Energie führt zur Deformierung der gebundenen Protease, damit wird eine finale proteolytische Spaltung des Serpins durch die Protease erschwert (Carrell et al. 2003). In der Zeit zwischen der Bildung des kovalenten Serpin-Protease-Komplexes und der finalen Inhibition durch die Konformationsänderung behält die Protease eine Restaktivität bei und könnte das Serpin als Substrat umsetzen, um anschließend befreit aus der Komplexstruktur wieder vollständig aktiv zu sein. Somit teilt sich der Mechanismus der Serpin-Protease-Reaktion in eine inhibitorische und eine Substratreaktion, deren Gleichgewicht durch die Affinität der beiden Partner bestimmt wird (Olson et al. 2011) (Abb. 2). Bei hoher Affinität und ungehinderter Konformationsänderung liegt das Gleichgewicht auf der Seite des inhibitorischen Mechanismus und der finale Serpin-Protease-Komplex zeigt eine hohe Stabilität mit einer Halbwertszeit *in vitro* von Tagen bis Wochen (Silverman et al. 2001). *In vivo* wurde eine geringere Halbwertszeit der Komplexe gefunden, da es zu einer Entfernung

der Serpin-Protease-Komplexe unter Beteiligung von Rezeptoren der LDL-Familie und clathrin-abhängiger Endozytose kommt (Makarova et al. 2003)



### Abbildung 1: Inhibitionsmechanismus der Serpine

Mechanismus der Inhibition von Proteasen durch Serpine am Beispiel von  $\alpha$ 1-Antitrypsin. Grundstruktur von  $\alpha$ 1-Antitrypsin (links) mit reaktiver Schleife (RCL),  $\beta$ -Faltblatt A (blau) und Shutter-Region (gelb). Die Zielprotease bindet an RCL (Mitte), schneidet die benachbarte Peptidbindung an P1-P1' und löst damit eine Konformationsänderung des Serpin-Moleküls aus. Durch die Umlagerung des RCL vom oberen Pol und der anschließenden Inkorporation in das  $\beta$ -Faltblatt A des Serpins kommt es zur Inaktivierung der Protease (rechts) [modifiziert nach (Gooptu et al. 2009)].



**Abbildung 2: Mögliche Reaktionen bei der Inhibition von Proteasen durch Serpine**

Bei der Inaktivierung einer Protease (P) durch ein Serpin (S) bildet sich initial ein nichtkovalenter Michaelis-Komplex (SP), welcher im Anschluss an die Hydrolyse der Peptidbindung P1-P1' (siehe Abbildung 1) zu einem kovalent gebundenen Serpin-Protease-Komplex (SP') reagiert. Die Reaktion kann nun je nach Affinität der beiden Substrate nach dem inhibitorischen Mechanismus ( $k_3$ ) ablaufen, bei der sich durch Konformationsänderung ein stabiler Serpin-Protease-Komplex (SP<sub>k</sub>) bildet. Alternativ kann bei verzögerter Konformationsänderung des Komplexes die Protease das Serpin schneiden, bevor sie deformiert wird ( $k_4$ ); diese Reaktion resultiert in einem gespaltenen und inaktiven Serpin (S\*) und einer funktionsfähigen Protease (P) [modifiziert nach (Silverman et al. 2001; Gooptu et al. 2009)].

### 2.1.2 Konformationserkrankungen und Serpinopathien

Unter dem Begriff Konformationserkrankungen (engl.: conformational diseases) werden eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen zusammengefasst, deren gemeinsame Pathologie in der Akkumulation von Proteinen begründet ist. Dabei werden definitionsgemäß Krankheiten gruppiert, bei denen Veränderungen in der Größe oder Form eines Proteins zur Polymerbildung und Gewebeablagerung führen (Carrell et al. 1997). Die einzelnen Vertreter dieser Erkrankungsgruppe unterscheiden sich dabei im

Hinblick auf den molekularen Mechanismus der Aggregation, dennoch gibt es wiederkehrende Motive, wie die Formation von intermolekularen Verbindungen durch Wasserstoffbrücken zwischen Faltblattstrukturen und Proteinschleifen. Auffällig viele Vertreter dieser neuen Gruppierung von Krankheiten sind neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimerkrankheit, Morbus Parkinson, Chorea Huntington, Tauopathien oder Prionen-Erkrankungen (Gooptu et al. 2009). Diesen Erkrankungen ist gemeinsam, dass sie gewöhnlich erst sehr spät symptomatisch werden und eine Proteinakkumulation im Verlauf auftritt. Bei den vererblichen Vertretern der Konformationserkrankungen, wie Chorea Huntington und familiären Formen der Alzheimerkrankheit, findet sich häufig ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Aggregation und dem Beginn der Symptome. Klinische Zeichen einer Demenzerkrankung sind dabei ein spätes Indiz für den ausgeprägten Verlust von Neuronen, welcher Einfluss auf höhere Hirnfunktionen hat (Carrell 2005). Jedoch ist nicht nur der Schweregrad einer Konformationsänderung und die daraus resultierende Neigung zur Aggregation entscheidend, auch die Regenerationsfähigkeit des betroffenen Organs und die zellulären Mechanismen, welche der Ablagerung entgegenwirken, sind entscheidend für den Verlauf (Crowther 2002; Carrell 2005). Serpinopathien sind eine Gruppe von Erkrankungen, bei denen bereits kleinste Änderungen in der Konformation von Serpinprotease-Inhibitoren zur intrazellulären Aggregation des Serpins führen (Lomas et al. 2002). Der Inhibitionsmechanismus der Serpine mit seiner Umlagerung von Strukturelementen des Moleküls ist für die besondere Anfälligkeit dieser Familie gegenüber Mutationen, welche die Konformation destabilisieren, verantwortlich (Abb. 1). Punktmutationen, welche zum Austausch einer Aminosäure in kritischen Elementen der Serpinstruktur führen, können zur Bildung von Polymeren führen und somit Erkrankungen verursachen, die entweder durch die Abwesenheit des funktionstüchtigen Serpins gekennzeichnet sind („loss of function“), oder durch die Effekte der Aggregation („gain of function“) (Lomas et al. 2002; Belorgey et al. 2007). Einige Serpinopathien wie Varianten des  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Mangels oder familiäre Enzephalopathie mit Neuroserpin-Einschlüssen (FENIB) dienen als Modellerkrankung zum besseren Verständnis anderer Konformationserkrankungen (Carrell 2005). Von Vorteil ist dabei die Kenntnis der ursächlichen Mutation, der Kristallstruktur und der Mechanismen, welche zur Polymerbildung der Serpine führen (Briand et al. 2001; Crowther 2002; Gooptu et al. 2009).

AS Position	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	Effekte der Polymerbildung
Aminosäure	Asn	Ile	Phe	Phe	Ser	Pro	Val	Ser	Ile	Ala	
$\alpha_1$ -Antitrypsin				$\Delta$ Phe	Phe						Akkumulation: Zirrhose Fehlende Inhibition: Lungenemphysem
Neuroserpin					Pro			Arg			Akkumulation: Demenz Fehlende Inhibition: Epileptische Anfälle
C1 inhibitor				Ser		Leu					Fehlende Inhibition: Angioödem
Antithrombin						Thr					Fehlende Inhibition: Thrombosen
$\alpha_1$ -Antichymotrypsin							Pro				Fehlende Inhibition: Emphysem

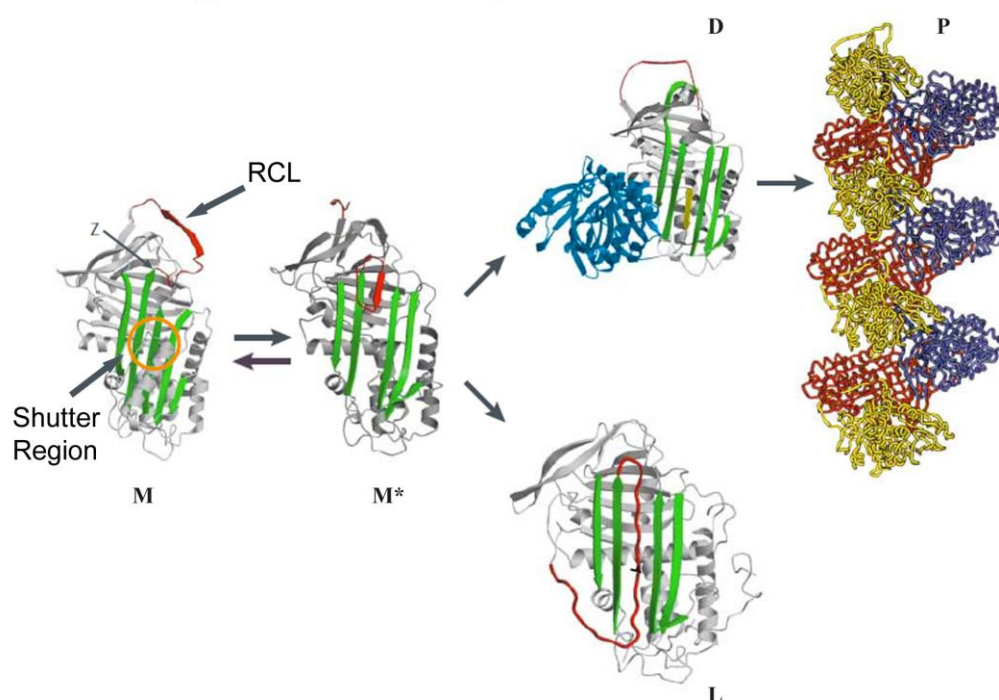
**Abbildung 3: Verteilung pathogener Mutationen bei verschiedenen Serpinopathien**

Verschiedene Serpinopathien sowie Position der jeweiligen Mutation und resultierende Symptome. Auffällig ist die Häufung krankheitsrelevanter Mutationen im Bereich der Shutter-Region der jeweiligen Serpine. Bei den gefundenen Effekten der Polymerbildung unterscheidet man zwischen Folgen durch Mangel an funktionellem Serpinprotease-Inhibitor und Folgen der Akkumulation. [Modifiziert nach (Gooptu et al. 2009)]

**2.1.3 Modelle der Polymerbildung bei Serpinopathien**

Der Inhibitionsmechanismus der Serpine mit seiner drastischen Änderung der räumlichen Anordnung des Moleküls ist besonders anfällig für Mutationen, welche die metastabile Konformation weiter schwächen, indem sie die Wasserstoffbrückenbindungen im Bereich der Shutter-Region destabilisieren (Lomas et al. 1992; Carrell et al. 1997) (Abb. 1, 3). Zwei unterschiedliche Modelle beschreiben die molekularen Vorgänge, welche zur Polymerbildung mutierter Serpine führen (Roussel et al. 2011). Im klassischen Modell der Polymerisierung (Abb. 4), der sogenannten „Loop-Sheet-Polymerisierung“, erodieren Mutationen im Bereich der Shutter-Region die Struktur des  $\beta$ -Faltblatt A, dabei kommt es zur Öffnung des Strukturelementes und zur Bildung eines instabilen Intermediates (Abb. 4, M\*) (Gooptu et al. 2009). In das veränderte  $\beta$ -Faltblatt A kann nun die reaktive Schleife eines anderen Serpin-Moleküls inserieren und ein Dimer bilden. Durch Repetition dieses Vorgangs kommt es zur

Bildung großer Polymere und zur Aggregation des Serpins (Lomas et al. 1992; James et al. 1998).

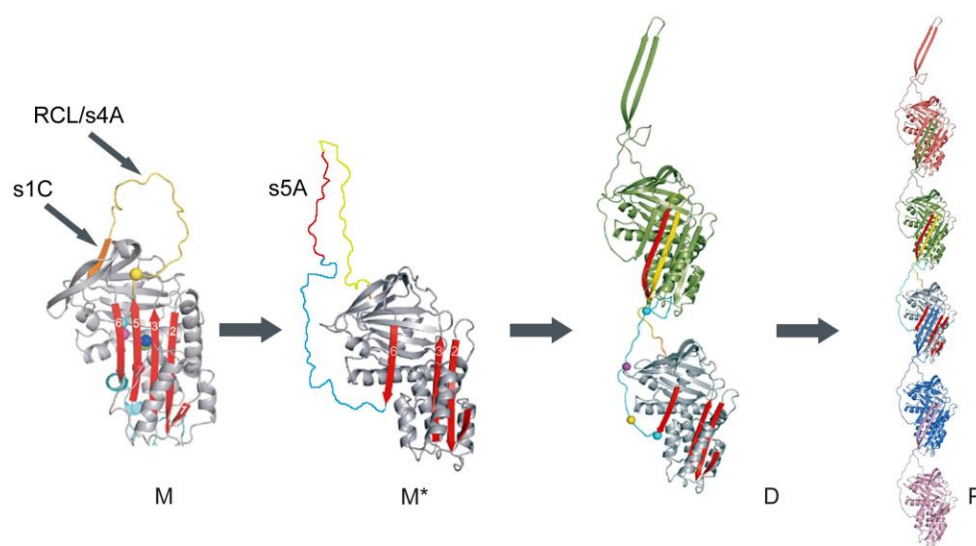


### Abbildung 4: Klassisches Modell der Polymerbildung bei Serpinopathien

Schematische Darstellung der Polymerisation von Serpinen am Beispiel von  $\alpha$ 1-Antitrypsin. Mutationen im Bereich der Shutter-Region (gelber Kreis) destabilisieren die Struktur des  $\beta$ -Faltblatt A und führen zur Bildung eines Intermediates (M\*) (Gooptu et al. 2009). Dabei kommt es zur Öffnung der Faltblattstruktur des Zwischenproduktes, die eine Insertion der reaktiven Schleife eines anderen Serpin-Moleküls ermöglicht und in einer Dimerbildung (D) resultiert. Durch Wiederholung dieses Vorgangs kommt es zur Polymerbildung (P) (Lomas et al. 1992). Alternativ zur Dimerbildung kann das Intermediat (M\*) auch zu einer latenten Form (L) reagieren. Dabei kommt es zur temporären Insertion des eigenen RCL in die Struktur des geöffneten  $\beta$ -Faltblatts A (Lomas 2005). [modifiziert nach (Lomas et al. 2002)]

Ein zweites Modell der Polymerbildung geht von der Bildung eines Intermediates im Faltungsprozess des Serpins aus, bei dem sich das Serpin-Molekül weit öffnet und eine größere Domäne aus der Struktur des Moleküls herausragt (Yamasaki et al. 2008). Diese ausgelagerte Teilstruktur, Haarnadel-Domäne (engl.: hairpin domain) genannt, wird aus dem Strang s5A des  $\beta$ -Faltblatts A und der reaktiven Schleife gebildet. Die Polymerbildung findet durch die Insertion einer Haarnadel-Domäne in das  $\beta$ -Faltblatt A eines anderen Serpin-Moleküls statt (Yamasaki et al. 2008; Ekeowa et al. 2010) (Abb.

5). Beide Modelle sehen, trotz unterschiedlicher Zwischenprodukte und Teilstrukturen die an der Polymerbildung beteiligt sind, die Ursache der Aggregation in Mutationen im Bereich der Shutter-Region der Serpine, die zu einer Destabilisierung des  $\beta$ -Faltblatts A führen (Yamasaki et al. 2008; Ekeowa et al. 2010). Unterschiedliche Aussagen machen beide Modelle in Bezug auf den Faltungszustand des Eduktes. Das neuere Haarnadel-Modell sieht die Ursache der Polymerbildung in fehlgefalteten Intermediaten, welche eine höhere Tendenz zur Aggregation innerhalb des ERs besitzen als das final gefaltete Serpin (Takehara et al. 2010).



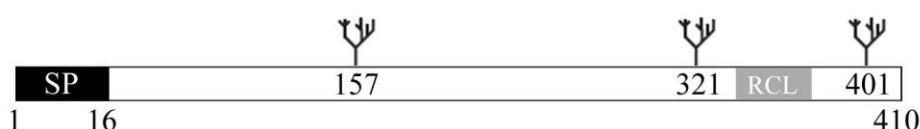
### Abbildung 5: Alternatives Modell der Polymerbildung bei Serpinopathien

Nach diesem Modell werden Serpin-Polymere eher durch Faltungsintermediate gebildet als durch das fertig gefaltete Protein (Takehara et al. 2010). Mutation im Bereich der Shutter-Region können die korrekte Insertion von Strang S5A während des Faltungsprozesses verhindern und somit die Bildung einer Haarnadel-Domäne mit der reaktiven Schleife (RCL) begünstigen (Yamasaki et al. 2008). Die Polymerisation erfolgt durch repetitive Einlagerung der Haarnadelstruktur eines Moleküls in das  $\beta$ -Faltblatt A eines anderen (Yamasaki et al. 2008) [modifiziert nach (Yamasaki et al. 2008)].

## 2.2 Neuroserpin

Neuroserpin ist ein etwa 55 bis 60 kDa schweres, axonal sezerniertes Protein, welches in Neuronen des peripheren und zentralen Nervensystems exprimiert wird (Osterwalder et al. 1996). Es wurde erstmals in einem Screening-Verfahren beschrieben, welches zur Identifikation von neuronalen Proteinen diente, die am Prozess der Synapsenbildung

und des Axonwachstums beteiligt sind (Stoeckli et al. 1989). Wegen der topischen Expression und der geringen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit bereits bekannten Vertretern der Serpine, wurde das entdeckte Protein Neuroserpin benannt und in die Terminologie der Superfamilie als SERPINI1, Proteaseinhibitor 12 (PI12) aufgenommen (Silverman et al. 2001). Die beiden Serpine des Genstammes Clade I, Neuroserpin (SERPINI1) und Pancpin (SerpIn2) befinden sich beide auf Chromosom 3q26 (Schrumpf et al. 1997; Olson et al. 2011). Das humane Neuroserpin-Gen beinhaltet neun Exons, der resultierende offene Leserahmen (engl.: open reading frame) der mRNA erstreckt sich über einen Bereich von 1230 Basenpaaren und kodiert für ein Protein von 410 Aminosäuren Länge (Hastings et al. 1997; Schrumpf et al. 1997). Die in der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese gefundene Masse von Neuroserpin differiert von der berechneten Molekülmasse, am wahrscheinlichsten ist dies durch Glykosylierung an den 3 potenziellen N-Glykosylierungsstellen an Position 157, 321 und 410 zu erklären. Die ersten 16 Aminosäuren dienen als ER-Signalsequenz und markieren Neuroserpin als sekretorisches Protein (Schrumpf et al. 1997) (Abb. 6). Die reaktive Schleife (RCL) befindet sich im Molekül in Richtung des C-Terminus. In ihrem Bereich befinden sich an den mit P1 und P1' benannten Positionen ein Arginin und ein Methionin, welche sich an vergleichbaren Lokalisationen auch bei anderen inhibitorischen Serpinen, wie PAI-1 und alpha2-Antiplasmin finden und deren Beteiligung an der Bildung des Serpin-Protease-Komplexes eminent ist (Silverman et al. 2001; Galliciotti et al. 2006) (Abb. 1 und Abb. 6).



### **Abbildung 6: Schematische Darstellung von humanem Neuroserpin**

Humanes Neuroserpin mit einer Primärstruktur aus 410 Aminosäuren und drei potenziellen N-Glykosylierungsstellen mit Asparaginsgruppen an Position 157, 321 und 401. N-Terminal befindet sich die ER-Signalsequenz von 16 Aminosäuren (SP), welche Neuroserpin als sekretorisches Protein markiert. Die reaktive Schleife (RCL) befindet sich in der Nähe des C-Terminus. [modifiziert nach (Davies et al. 2009)].



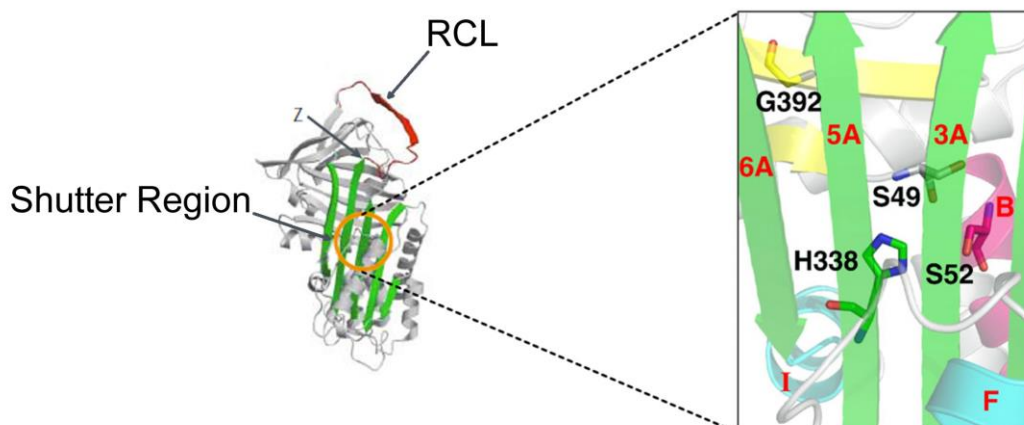
Die Expression von Neuroserpin in der Ontogenese beginnt mit der postmitotischen Phase, in der es zur Auswanderung von Neuronen aus der ventrikulären Zone kommt und vermehrt Synapsen gebildet werden. In diesem Stadium der Neurogenese und auch im adulten Hirn findet sich eine topische Neuroserpin-Expression besonders in Zentren gesteigerter synaptischer Plastizität wie Neokortex, Bulbus olfactorius, Amygdala und Hippokampus, deren Funktion eng mit Prozessen der Lern- und Gedächtnisleistung verknüpft sind (Hastings et al. 1997; Osterwalder et al. 1998). Ebenfalls wurde in Zellkulturexperimenten eine axonale Sekretion sowie eine aktivitätsabhängige Steigerung der Expression durch repetitive Depolarisation der Neurone gefunden (Hastings et al. 1997; Berger et al. 1999). *In vitro* wurde der gewebespezifische Plasminogenaktivator (tPA) als Zielmolekül von Neuroserpin identifiziert. Schwächere Interaktionen zeigten sich mit Urokinase-Plasminogenaktivator (uPA) und Plasmin (Hastings et al. 1997; Osterwalder et al. 1998). Die Hauptfunktion von tPA, welches überwiegend in Endothelzellen der Gefäße exprimiert wird, ist die Aktivierung der Fibrinolyse durch Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin. Daneben ist tPA auch im Nervensystem an unterschiedlichen Prozessen wie der synaptischen Plastizität, dem exzitatorischen Zelltod und der postischämischen Schädigung beteiligt (Yepes et al. 2002; Seeds et al. 2003; Yepes et al. 2004). Diese Effekte werden von tPA unter anderem durch eine Modifikation an NMDA-Rezeptoren verursacht, welche zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt. Die Expression von tPA in Neuronen ist ebenfalls aktivitätsabhängig und kann durch Langzeit-Potenzierung (LTP) selektiv gesteigert werden (Qian et al. 1993). Interessant in diesem Zusammenhang ist die Koexpression von tPA und seinem designierten Antagonisten Neuroserpin in gleichen Regionen des Zentralnervensystems (Hastings et al. 1997). Die topische Expression, die axonale Sekretion und die Interaktion mit dem gewebespezifischen Plasminogenaktivator (tPA) sprechen für die Beteiligung von Neuroserpin als Regulator einer gerichteten Proteolyse der extrazellulären Matrix (EZM) (Osterwalder et al. 1996). Dabei handelt es sich um Prozesse, die an der Entstehung neuer synaptischer Verbindungen, Lernleistung und Gedächtnisfunktion beteiligt sind (Hastings et al. 1997; Krueger et al. 1997; Yepes et al. 2004). Umbauprozesse an der EZM erfordern eine Balance zwischen den für den Abbau benötigten Proteasen, welche beispielsweise durch tPA aktiviert werden, und deren Inhibitoren (Muller et al. 1998; Yepes et al. 2004).

Exzitotoxizität ist ein Prozess, der dieses sensible Gleichgewicht empfindlich stören kann. Unter diesem Begriff versteht man eine molekulare Reizüberflutung der Neurone durch eine erhöhte Ausschüttung von erregenden Neurotransmittern während pathologischer Ereignisse wie zerebraler Ischämie oder epileptischen Anfällen. Diese Übererregung löst intrazelluläre Signalkaskaden aus, durch die es zu Zellschäden oder gar Zelluntergang kommen kann (Santangelo et al. 2012). In Experimenten an Mäusen mit genetischer Defizienz für tPA und nach Injektionen von Neuroserpin konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber Exzitotoxizität festgestellt werden (Tsirka et al. 1995; Yepes et al. 2002). Ein vergleichbarer neuroprotektiver Effekt findet sich auch in einem Mausmodell für Schlaganfallerkrankung, in dem nach erfolgter Okklusion der Arteria cerebri media das resultierende Schlaganfallvolumen durch Injektion von Neuroserpin signifikant gesenkt werden konnte, beziehungsweise bei tPA-Knockout-Tieren in geringerem Umfang gefunden wurde (Vivien et al. 2000; Yepes et al. 2000; Cinelli et al. 2001; Gelderblom et al. 2013). Die Komplexe von Neuroserpin und tPA, welche bisher ausschließlich in *in-vitro*-Untersuchungen detektiert werden konnten, zeichnen sich durch eine kurze Halbwertszeit aus (Barker-Carlson et al. 2002). Im Vergleich hierzu bilden Serpin und Zielprotease im Fall von tPA und PAI-1 einen langlebigen Komplex, der unter physiologischen Bedingungen irreversibel ist und über rezeptorvermittelte Endozytose entfernt wird (Barker-Carlson et al. 2002). Die Reaktion von Neuroserpin und tPA scheint überwiegend dem nicht-inhibitorischen Mechanismus zu folgen, bei dem es der Protease vor Bildung des finalen Acyl-Enzym-Komplexes gelingt, Neuroserpin zu spalten und so dem Suizid-Inhibitor zu entkommen, wobei die Funktionsfähigkeit von tPA vollständig erhalten bleibt (Gettins 2002) (Abb. 2). Eine weitere Auffälligkeit ist der enorme Überschuss an Neuroserpin-Molekülen, welcher *in vitro* zur Inhibition von tPA benötigt wird. Selbst bei einem tausendfachen molaren Überschuss an Neuroserpin war die *in vitro* gefundene Inhibitionseffizienz gering (Barker-Carlson et al. 2002). In einer aktuellen Veröffentlichung wird die neuroprotektive Wirkung von Neuroserpin eher im Zusammenhang mit der Inhibition von Plasmin gesehen, welches ebenfalls exzitotoxisches Potenzial besitzt und neurotoxisch wirken kann (Wu et al. 2010). Als ein Argument für die tPA-unabhängige neuroprotektive Wirkung von Neuroserpin wird angeführt, dass bei Mäusen mit genetischer Defizienz für Neuroserpin eine unveränderte Aktivität von tPA gemessen

werden kann. Andererseits finden sich bei Mäusen, welche Neuroserpin überexprimieren, verminderte Konzentrationen an tPA (Madani et al. 2003).

### **2.2.1 Familiäre Enzephalopathie mit Neuroserpin-Einschlüssen (FENIB)**

Familiäre Enzephalopathie mit Neuroserpin-Einschlüssen (FENIB) ist eine autosomal dominant vererbliche Demenzerkrankung, welche durch die Aggregation von Neuroserpin in Neuronen des Kortex, Hippocampus und Amygdala verursacht wird. Die Akkumulationen aus Neuroserpin-Polymeren werden intrazellulär in Collins-Körperchen im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums (ER) eingelagert (Davis et al. 1999; Davis et al. 1999). Diese Collins-Körperchen haben eine Größe von 5-50 µm im Durchmesser und bestehen aus PAS-positiven (engl.: Periodic acid-Schiff reaction) Inklusionen. Ursächlich für die Aggregation in den Neuronen sind Punktmutationen im Neuroserpin-Gen der betroffenen Patienten. Bisher wurden sechs verschiedene humane Mutationen beschrieben: Serin zu Prolin an Position 49 (S49P, Syracuse-Mutation), Serin zu Arginin an Position 52 (S52R, Portland-Mutation), Histidin zu Arginin an Position 338 (H338R), Glycin zu Glutaminsäure an Position 392 (G392E), an gleicher Position Glycin zu Arginin (G392R) und Leucin zu Prolin an Position 47 (L47P) (Davis et al. 1999; Davis et al. 1999; Takao et al. 2000; Davis et al. 2002; Coutelier et al. 2008; Hagen et al. 2011). Diese Mutationen befinden sich in der Shutter-Region des Neuroserpin-Moleküls und führen durch Austausch der jeweiligen Aminosäure zu einer Destabilisierung der Konformation (siehe Abb. 7).



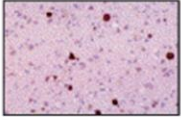
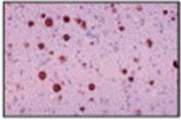
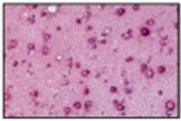
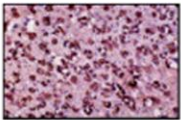
**Abbildung 7: Lokalisation pathogener Mutationen verschiedener FENIB-Varianten**

In der Übersicht ist ein kristallographisches Modell des Neuroserpin-Moleküls mit der Shutter Region und der reaktiven Schleife (RCL) dargestellt. In der Vergrößerung der Shutter-Region sind einige Substitutionsloki, welche zur familiären Enzephalopathie mit Neuroserpin-Einschlüssen (FENIB) führen mit den sie besetzenden Aminosäuren in Struktur abgebildet. [modifiziert nach (Gooptu et al. 2009; Takehara et al. 2010)]

Die veränderten Eigenschaften der substituierten Aminosäure beeinflussen die stabilisierenden Wasserstoffbrücken des  $\beta$ -Faltblattes A und dadurch die Tendenz zur Polymerbildung (Takehara et al. 2010).

Auffällig ist die Abhängigkeit zwischen dem Beginn und der Schwere der Symptome zur Neigung der unterschiedlichen Mutationen zur Polymerbildung. Betrachtet man die beiden ersten Familien, bei denen FENIB diagnostiziert wurde, so wird dieser Zusammenhang bestätigt. Zunächst wurde die heterozygote S49P-Mutation bei einer Familie aus Syracuse (New York, USA) festgestellt. Bei den Familienmitgliedern traten Symptome wie kognitive Beeinträchtigung, Gedächtnisverlust und Beeinträchtigung des räumlichen Sehens erstmalig in der fünften Dekade auf (Davis et al. 1999). Mitglieder einer anderen Familie aus Portland sind Träger der heterozygoten Mutation S52R, welche eine stärkere, destabilisierende Wirkung auf das Neuroserpin-Molekül hat (Davis et al. 2002). Bei dieser Familie traten eine fortschreitende Demenz und epileptische Anfälle bereits im Alter von 20-30 Jahren auf und es zeigte sich post mortem eine höhere Anzahl an intrazellulären Inklusionen (Takao et al. 2000). Dieser Effekt wurde auch in Zellkulturexperimenten bestätigt, in denen sich nach Transfektion

mit mutiertem Neuroserpin eine geringere Sekretion der Portland-Variante (S52R) im Vergleich zur Syracuse-Variante (S49P) zeigte. Die S52R-Mutation zeigte dabei eine deutlichere Akkumulation in den Zellen und unterlag einem höheren Umsatz durch proteasomale Abbauvorgänge, was ein Hinweis für das Auftreten höhergradiger Fehlfaltung bei dieser Variante ist (Miranda et al. 2004). Später fanden sich weitere pathogene Mutationen im Neuroserpin-Gen, deren Krankheitsverlauf deutlich schwerwiegender ist. So kommt es durch die Mutation H338R und G392E zu einer frühen Form der progressiv myoklonischen Epilepsie, Tremor und Dysarthrie im Alter von 15 Jahren (Davis et al. 2002), bei der Mutation G392R kommt es bereits im Alter von 8 Jahren zu ersten Symptomen (Davis et al. 2002; Coutelier et al. 2008). Es zeigt sich somit ein Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Genotyp der Mutation und dem Phänotyp der Erkrankungsschwere und Dichte an Inklusionen (siehe Abb. 8). Der Schweregrad der destabilisierenden Wirkung der Mutationen ist dabei: G392R>G392E>H338R>S52R>S49P (Davis et al. 2002; Galliciotti et al. 2006).

Mutation	Neigung zur Polymerbildung	Patientenalter bei Symptombeginn	Symptome	Histologie der Inklusionen (post mortem)
S49P	+	45-63	Demenz, epileptische Anfälle	
S52R	++	20-40	Demenz, Myoklonien	
H338R	+++	15	ausgeprägte Myoklonien epileptische Anfälle	
G392E	++++	13	ausgeprägte Myoklonien epileptische Anfälle	
G392R	+++++	8	Demenz, Epilepsie vom „slow waves“-Typ	

### Abbildung 8: Übersicht der Eigenschaften verschiedener FENIB-Mutationen

Darstellung verschiedener Mutationen im Neuroserpin-Gen im Bereich der Shutter-Region an den Positionen Ser49, Ser52, His338 und Gly392 und die resultierenden klinischen Symptome sowie Tendenz der Proteinaggregation und histologische Korrelate. [modifiziert nach (Lomas et al. 2002; Gooptu et al. 2009; Schipanski 2011)]

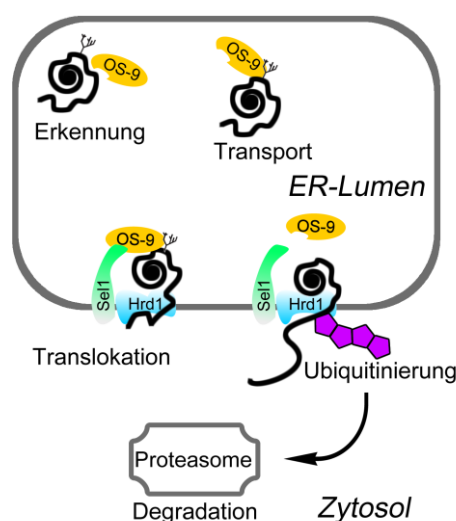
Ob die Symptomatik bei FENIB durch die intraneuronalen Inklusionen oder durch den Mangel an sezerniertem Neuroserpin verursacht wird, ist bisher nicht geklärt. Als „gain of function“ würde in diesem Fall ein neurotoxischer Effekt bezeichnet werden, welcher ursächlich durch die Bildung von intrazellulären Polymeren ausgelöst wird. Im Gegensatz dazu beschreibt der Begriff „loss of function“ eine mögliche Zellschädigung, welche nach Enthemmung proteolytischer Kaskaden durch mangelnde Sezernierung von funktionsfähigem Neuroserpin resultiert (Davis et al. 1999; Davis et al. 1999; Lomas et al. 2002). Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden unterschiedlichen Kausalitäten gestaltet sich bei FENIB schwierig, da die geschädigten Neurone sowohl der Ort der Aggregation, als auch für Produktion von Neuroserpin sind. Um diesen Aspekt weiter zu untersuchen, wurden zwei transgene Mausmodelle entwickelt, welche eine Überexpression von Neuroserpin zeigen, beziehungsweise denen es vollständig fehlt (Madani et al. 2003). Tiere beider Gruppen zeigen eine herabgesetzte motorische Aktivität, Neophobie und eingeschränktes exploratives Verhalten (Madani et al. 2003; Galliciotti et al. 2006). Versuche mit transgenen Mäusen, die humanes Neuroserpin mit FENIB-Mutationen exprimieren, zeigen den gleichen Zusammenhang zwischen Alter der Tiere und Inklusionsdichte in Neuronen sowie Inklusionsdichte und Schwere der Symptome, wie er bei den humanen Fallbeschreibungen gefunden wurde (Galliciotti et al. 2007). Die Mäuse zeigen dabei progrediente Symptome wie ein verlangsamtes Gangbild, Ataxie, Tremor und epileptische Anfälle. Mikroskopische Analysen und Untersuchung der subzellulären Struktur weisen auf das ER als Ort der Proteinakkumulation bei FENIB hin. (Miranda et al. 2004; Galliciotti et al. 2007). Generell kann die Ansammlung von fehlgefalteten Proteinen innerhalb des ERs zur Aktivierung eines stressinduzierten Signalwegs, der sogenannten „unfolded protein response“ (UPR) führen (Kaufman 1999; Bernales et al. 2006). Ziel der UPR ist die Reduktion der Proteinbiosynthese und eine Steigerung der Kapazität der ER-Qualitätskontrolle, um vermehrt fehlgefaltete Proteine unter Beihilfe von Chaperonproteinen in ihre korrekte Konformation zu überführen (Kaufman 2002; Ron et al. 2007). In einem Mausmodell mit transgenen Tieren, welche humanes Neuroserpin mit FENIB-Mutation S49P exprimieren, konnte eine transiente und selektive Aktivierung zweier Arme der UPR gezeigt werden. Dabei ging die temporäre Aktivierung von PERK und ATF6 mit einer Reduktion der mutierten Neuroserpin-

Oligomere einher (Schipanski et al. 2013). Diese Reduktion kann einerseits durch eine globale Hemmung der Proteinsynthese durch die UPR erfolgen, oder ist die Folge eines erhöhten Umsatzes mutierten Neuroserpins durch den ER-assoziierten Proteinabbau.

### **2.3 Endoplasmatisches Retikulum und ER-assoziiertes Proteinabbau (ERAD)**

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein weit verzweigtes Membrannetzwerk innerhalb eukaryotischer Zellen und steht mit dem perinukleären Raum in Kontakt.

Sekretorische und Membranproteine, die eine spezifische Signalsequenz (SS) tragen, werden co- oder posttranslational in ungefaltetem Zustand in das ER transportiert. Faltung der sekretorischen Proteine, Qualitätskontrolle und posttranslationale Modifikation, wie Abspaltung der SS und N-Glykosylierung, finden anschließend innerhalb des ERs statt, bevor es zu einem Weitertransport kommt (Gething et al. 1992). Nur in korrekt gefaltetem Zustand können sekretorische Proteine das ER in Richtung Golgi-Apparat verlassen. Wird die native Konformation nicht erreicht, führt dies zum Abbau des Proteins in einem Prozess, der ER-assoziierte Degradation (ERAD) genannt wird (Chevet et al. 2001). Dabei kommt es zunächst zur Erkennung des fehlgefalteten Proteins durch ER-ständige Proteine, wie dem ER degradation enhancing alpha-mannosidase-like protein (EDEP) und Lektinen, wie OS-9 und XTP3-B (Hosokawa et al. 2001; Christianson et al. 2008; Hosokawa 2011). Im Anschluss erfolgt der Transport zu einem in der ER-Membran befindlichen Translokationsapparat (engl.: translocon), durch den die Translokation des fehlgefalteten Proteins in das Zytosol erfolgt. Die dortige Konjugation mit Ubiquitin durch E3-Ligasen, markiert das Substrat für den Abbau durch das 26S-Proteasom (Ellgaard et al. 2003) (siehe Abb. 9).



**Abbildung 9: Übersicht der verschiedenen Teilabschnitte bei ERAD**

Zunächst werden fehlgefaltete Glykoproteine durch ER-ständige Lektine, hier am Beispiel von OS-9 (in gelb), erkannt und gebunden. Danach erfolgt der Transport zum Translokationsapparat, welcher in der ER-Membran verankert ist (hier am Beispiel von HRD1, in blau dargestellt). Durch diesen Komplex erfolgt die Translokation in das Zytosol und die Konjugation mit Ubiquitin durch die E3-Ligaseaktivität von HRD1. Die zum Abbau markierten terminal fehlgefalteten Glykoproteine werden dem 26S-Proteasom zugeführt.

Die Beteiligung von ERAD am Abbau von mutiertem Neuroserpin wurde erstmals in einem COS-7 Zellmodell der G392-Mutante gezeigt. Dabei wurde nach Proteasom-Blockade eine Zunahme sowohl der Monomere, als auch der polymeren Form mutierten Neuroserpins gefunden (Kroeger et al. 2009). Die intrazellulären Spiegel der Wildtyp-Varianten wurden hingegen nicht beeinflusst, was auf einen selektiven Clearance-Effekt von ERAD für mutiertes Neuroserpin hinweist (Kroeger et al. 2009). Weiter konnten Kroeger et al. zeigen, dass induzierte Autophagozytose nur nach Proteasom-Blockade den Spiegel von Neuroserpin senken kann und dieser Abbauweg Einfluss auf die Wildtyp-Form und mutiertes Neuroserpin nimmt. Die Autoren vermuten daher, dass ERAD selektiv für die Clearance von Monomeren mutierter Serpine verantwortlich ist, während Autophagozytose am konstitutiven Umsatz teilnimmt (Kroeger et al. 2009). Der Abbau von nicht membranverankerten Glykoproteinen via ERAD benötigt die E3-Ubiquitin-Ligase HRD1 und das ER-Lektin OS-9, welches als Shuttle für das Substrat zum Translocon fungiert (Bernasconi et al. 2010). Während der Entstehung dieser



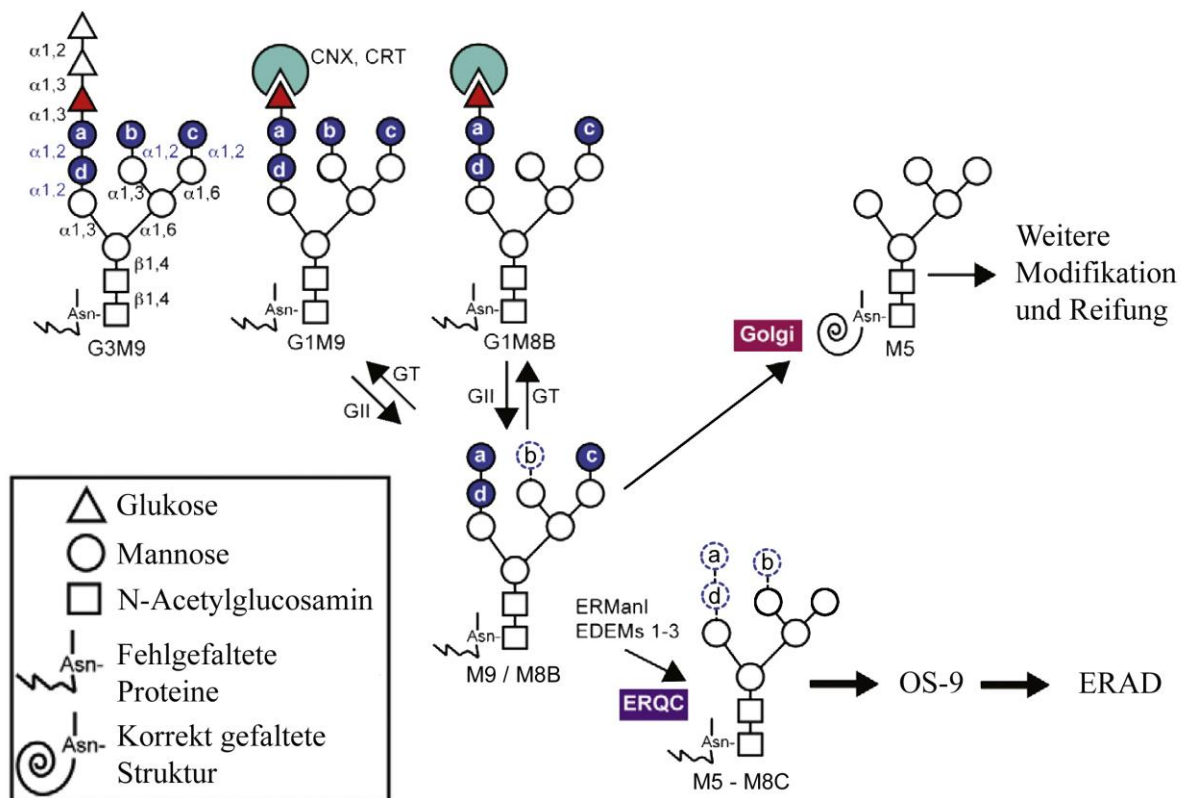
Arbeit wurde gezeigt, dass HRD1 an der Ubiquitinierung und am Abbau mutierten Neuroserpins beteiligt ist. In einem HEK-293-Zellmodell führte eine Überexpression von HRD1 zu verringerten Ablagerungen von mutiertem Neuroserpin, während ein „knock down“ dieses Translocons in einem starken Anstieg resultierte (Ying et al. 2011). Bisher nicht untersucht ist der genaue Mechanismus der Erkennung von mutiertem Neuroserpin als Substrat für ERAD.

### **2.3.1 ER-Lektin OS-9 und Substraterkennung in ERAD**

Bevor es zum proteasomalen Abbau der fehlgefalteten Proteine kommen kann, müssen diese im Lumen des ERs erkannt werden und zum Translokationsapparat transportiert werden. Dieser Erkennungsschritt wird von ER-Lektinen ausgeführt, die den Faltungszustand der Glykoproteine an der Zusammensetzung der an Asparagin gebundenen Oligosaccharide erkennen. Zunächst werden nascente Glykoproteine durch das Trägermolekül Dolichol-Phosphat mit einer uniformen Oligosaccharidstruktur Glc3Man9GlcNAc2 verbunden. Glukosidase I (GI) und Glukosidase II (GII) spalten zwei Glukosereste ab und lassen die Glc1Man9GlcNAc2-Struktur entstehen, welche nun an die Chaperone Calnexin (CNX) und Calreticulin (CRT) binden kann (Helenius et al. 2001; Caramelo et al. 2008). Entfernt GII auch die dritte Glukose von der Zuckerstruktur, so dissoziiert CNX/CRT vom Glykoprotein ab. Kommt es durch Hilfe der Chaperone zur Ausbildung der nativen Konformation, kann ein Weitertransport in den Golgiapparat unter Beteiligung der Lektine ERGIC53, VIPL und VIP36 erfolgen (Kamiya et al. 2008). Wurde die korrekte Konformation nach Durchlaufen des Calnexin-Calreticulin-Zyklus nicht erreicht, so kann das Glykoprotein als Substrat der UDP-Glukose:Glykoprotein Glukosyltransferase (GT) wieder mit einem Glukoserest verbunden werden, was eine erneute Interaktion mit diesen Chaperonen ermöglicht (Helenius et al. 2001; Helenius et al. 2004; Caramelo et al. 2008). Im Falle einer persistierenden Fehlfaltung des Glykoproteins erlaubt die prolongierte Verweildauer innerhalb des ER-Lumens Mannosidasen und Homologen wie EDEM 1-3 oder ER-Mannosidase I (ERManI) die Abspaltung von  $\alpha$ 1,2-gebundenen Mannoseresten von der Oligosaccharidstruktur (Lederkremer et al. 2005; Hebert et al. 2007). Diese als „Trimmen“ bezeichnete Prozessierung der mannosereichen Oligosaccharide ist das Signal für den anschließenden Abbau via ERAD (Quan et al. 2008). Mannosidasen

haben somit eine „Timer-Funktion“ und markieren Glykoproteine, die definitiv fehlgefaltet sind (Helenius 1994; Ellgaard et al. 1999). Nach dem Trimmen der Mannosestrukturen innerhalb des ER-Protein-Qualitätskontrolle-Kompartimentes (ERQC), in dem eine hohe Konzentration an Mannosidasen vorhanden ist, können ER-Lektine wie OS-9 an die fehlgefalteten Glykoproteine binden und sie der ERAD zuführen (Hosokawa et al. 2009) (siehe Abb. 10).

OS-9 und XTP3-B (transactivated protein B, Erlectin) sind Homologe des in Hefen vorkommenden Lektins yeast osteosarcoma 9 (Yos9p), welches ebenfalls am Abbau fehlgefalteter Glykoproteine beteiligt ist (Cheret et al. 2012). OS-9 wurden initial in einer genetischen Screening-Untersuchung zur Identifikation von Genen, welche bei Patienten mit Osteosarkomen und anderen Tumoren hochreguliert sind, entdeckt (Su et al. 1996; Kimura et al. 1998). Es finden sich drei unterschiedliche Varianten des Glykoproteins OS-9, die durch alternatives Spleißen entstehen und alle eine Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-homologe Domäne (MRH-Domäne) und eine N-terminale ER-Signalsequenz tragen (Kimura et al. 1998). Eine Herunterregulierung der OS-9-Expression zeigte eine stabilisierende Wirkung auf eine fehlgefaltete Variante von  $\alpha$ -Antitrypsin-NHK (NHK), bei der ein vorzeitiges Stop-Codon zur Trunkierung und ER-Retention des Serpins führt (Christianson et al. 2008). Die genaue Funktion der MRH-Domäne von OS-9 ist noch nicht abschließend geklärt. Während einerseits die Notwendigkeit dieser Domäne für eine Bindung von OS-9 am Translokationsapparat via SEL1 postuliert wird (Christianson et al. 2008), zeigen andere Autoren die Bindung von OS-9 Varianten deren MRH-Domäne durch Mutationen (R188A) verändert wurden an diesem Komplex (Bernasconi et al. 2008; Hosokawa et al. 2009). Allerdings hatte eine Überexpression der R188A-Mutation von OS-9 eine eingeschränkte Degradation des ERAD-Substrats NHK zur Folge, was auf die Notwendigkeit der MRH-Domäne für einen effizienten Proteinabbau hinweist (Hosokawa et al. 2009). Es wird vermutet, dass OS-9, vergleichbar mit seinem Hefe-Homolog Yos9p, ebenfalls an fehlgefaltete Proteine ohne N-Glykosylierung binden kann (Hosokawa et al. 2009; Noto et al. 2012). Diese Interaktion führt jedoch nicht zu einem produktiven Abbau des ERAD-Substrats (Bernasconi et al. 2008; Hosokawa et al. 2009).



**Abbildung 10: Substraterkennung bei ERAD und Aufgabe von OS-9**

Der Zustand von Oligosacchariden auf sekretorischen Proteinen beeinflusst deren Weitertransport oder dient als Erkennungsmerkmal, um fehlgefaltete Proteine via ERAD dem Proteasom zuzuführen. Die Abspaltung von Glukose durch Glukosidase II (GII) führt zunächst zur Bindung des noch ungefalteten, sekretorischen Proteins an die Chaperone Calnexin (CNX) und Calreticulin (CRT), die den Faltungsprozess unterstützen. Erhält das Glykoprotein seine korrekte Konformation, kann es zum Weitertransport in den Golgi-Apparat kommen. Verbleibt das Glykoprotein weiter fehlgefaltet, so kann durch erneute Glykosylierung eine weitere Bindung der Chaperone erfolgen. Prolongierte Fehlfaltung führt zur Trimmung von Mannoseresten durch Mannosidasen wie EDEM 1-3 oder ER-Mannosidase I (ERManI). Diese Abspaltung von Mannoseresten ermöglicht die Bindung von ER-Lektinen wie OS-9, die das fehlgefaltete Glykoprotein der ER-assoziierten Degradation zuführen. [modifiziert nach (Lederkremer 2009)]

### 3 Material

#### 3.1 Geräte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 alphabetisch geordnet aufgelistet.

**Tabelle 1: Laborgeräte und Software**

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Absauggerät Miniport (Zellkultur)	Hassheider Medizintechnik, Köln
Abzug Tec-Onomic, AZ 1500	C+P Möbelsysteme GmbH & Co KG,
Autoklav	Memmert, Schwabach
Blot-Kammer, Mini Trans-Blot	Biorad, München
Brutschrank (Zellkultur)	Heraeus electronic, Hanau
ECL-Kamera (Chemidoc)	Biorad, München
Elektrophoreseapparatur DCX-700	C.B.S. Scientific, Del Mar, USA
Entwickler für Röntgenfilme Curix 60	AGFA, Düsseldorf
Folienschweißautomat FS 40	Petra-electric GmbH, Burgau
Gefrierschrank -20 °C	Bosch, Gerlingen
Gefrierschrank -80 °C UF80-450S	Colora Messtechnik GmbH, Lorch/Württ.
Geldokumentationsgerät Chemi Doc™ XRS	Biorad, München
Gelkamm	Biorad, München
Gelkammer, Minisub DNA, Cell	Biorad, München
Halterahmen für DNA-Gele	Biorad, München
Kippschüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Kippschüttler Plattform Shaker STR 6	Stuart Scientific, Essex, England
Konfokalmikroskop Leica TCS SP2	Leica, Wetzlar
Kühlschränke	Liebherr, Kirchdorf
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Laborwaage Shinko Denshi	Vibra, Tokyo, Japan
Magnetthermorührer RCT basic IKAMAG®	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon, Melville, USA
Mikrowelle Micromat	AEG, Frankfurt am Main
Netzgerät Electrophoresis Supply, EPS 200	Pharmacia Biotech, Freiburg
Netzgerät Power Supply, Power Pac Basic	Biorad, München
Neubauer-Zählkammer, 0,1mm	Assistent, Sondheim
Papierschnidemaschine	ROTH, Karlsruhe
PCR-Gerät (MyCycler)	Biorad, München
pH-Meter CG 840	Schott, Mainz
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipette reference 0,1-2,5 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette reference 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg

## Material

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Pipette reference 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette reference 1-10 µl	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen
Printer P93D	Mitsubishi, Ratingen
Quantity One - Software	Biorad, München
Spektrophotometer µQuant	Biotek, Bad Friedrichshall
Sterilbank Thermo Electron Corporation Herasafe	Heraeus electronic, Hanau
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Sarstedt, Nümbrecht
Vakuumpumpe Vario	Vacuubrand, Wertheim
Volocity (Confocal Software)	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA
Vortexer VF2	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft mbH, Dresden
Zellkulturzentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

### 3.2 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Oligonukleotide, Antikörper und Verbrauchsmittel sind nach Methodenfeldern geordnet und alphabetisch sortiert in den Tabellen 2 bis 9 aufgeführt.

#### 3.2.1 DNA-Analytik

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmittel für die DNA-Analytik**

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
Agarose Gel, Ultra-Pure	Invitrogen, Darmstadt
DNA-Marker, TrackIt 1 Kb DNA Ladder	Invitrogen, Darmstadt
DreamTaq-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethidiumbromid	Sigma, Hamburg
OS9 cDNA clone MGC:12783	Imagenes, Berlin
p3xFLAG-CMV-9	Sigma, Aldrich, Hamburg
pcDNA 3.0 Vektor	Invitrogen, Darmstadt
PCR Purification Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Plasmid-DNA-Aufreinigungs-Kit (Mini-Präp)	Invitex, Berlin
Plasmid-DNA Aufreinigungs-Kit (Midi-Präp)	Macherey-Nagel, Düren
Restriktionsenzyme, FastDigest	Fermentas, St. Leon-Rot
Site-Directed Mutagenesis Kit: QuikChange Lightning	Firma Stratagene, Waldbronn
XL10-Gold Ultracompetent Cells (Stratagene, 200315)	Firma Stratagene, Waldbronn

### 3.2.1.1 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma Sigma-Aldrich bestellt. Sämtliche Oligonukleotide sind in 5'-3'Richtung angegeben. Die Endkonzentration der Vorratslösung von 100 µM wurde durch Verdünnung mit autoklaviertem, destilliertem Wasser eingestellt. Für DNA-Sequenzierungen und die PCR-Analysen wurde diese Vorratslösung 1:10 verdünnt und je 1 µl der jeweiligen Oligonukleotidlösung zum Reaktionsansatz zugegeben.

**Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion**

Gen	Sequenz	Bezeichnung
OS-9	5'-AGCCCAAGCTTGGCGGTGTCGGGAGCCTGAACC-3'	OS9-HindIII-For
OS-9	5'-GTGGTACCTCAGAA GTCAAATTCGTCCA GGTCC-3'	OS9-KpnI-Rev
OS-9	5'-CTTCGACTGGGATGATGAAACAGCC-3'	OS9-Sequencing 1
OS-9	5'-CTGTGGATGATGCTGCA GAA GTCCC-3'	OS9-Sequencing 2
OS-9	5'-ATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGC-3'	CMV30- Sequencing
Neuroserpin	5'-TCCCCA CCACA GAATCCAA GTCG-3'	hNS-F
Neuroserpin	5'-CACCCACTTATTGATGTA GTTGG-3'	hNS-R
Neuroserpin G392E	5'-GGTACAATTCTATTTCATGGAACGAGTCATGCATCCTG -3'	Mut-392-F
Neuroserpin G392E	5'-GTCCTACGTA CTGAGCAAGGTA CTTATCTTAACATGG -3'	Mut-392-R

### 3.2.1.2 Plasmide

**Tabelle 4: Verwendete Plasmide**

Vektor	Insert
pcDNA3.0	Humanes WT-Neuroserpin
pcDNA3.0	Humanes WT-Neuroserpin mit eGFP-Tag (C-Terminal)
pcDNA3.0	Humanes G392E-Neuroserpin
pcDNA3.0	Humanes G392E-Neuroserpin mit eGFP-Tag (C-Terminal)
p3xFLAG-CMV-9	Humanes OS-9 mit Flag-Tag (N-Terminal)
pcDNA3.0	Leervektorkontrolle
p3xFLAG-CMV-9	Leervektorkontrolle

### 3.2.2 Proteinanalytik

**Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmittel für die Proteinanalytik**

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
Accutase	Sigma, München
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bis-Acrylamid, Rotiphorese® Gel 30	ROTH, Karlsruhe
Cumarsäure 90mM	Sigma, München
Endoglycosidase H (EndoH)	Roche, Mannheim
Gel releaser	Biorad, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kosmetiktuch 100er Box Samtess Clou Prestige	Wepa, Arnsberg-Müschede
Luminol 250mM	Sigma, München
Magermilchpulver Reform Instant „Frema“	Granovita GmbH, Lüneburg
Magnet Dynal MPC-E	Dynal AS, Oslo, Norway
Methanol	J. T. Baker, Griesheim
Natriumazid	Fluka Biochemika, Deisenhofen
Natriumcitrat	Sigma, München
Natriumhydroxid	ROTH, Karlsruhe
Nitrozellulosemembran 0,2 µM	Biorad
NP40 (Nonidet™ P 40 Substitute)	Sigma, München
Page Ruler™, Prestained Protein Ladder 250 µl	Fermentas, St. Leon-Rot
Peptid N-glycosidase F (PNGaseF)	Roche, Mannheim
Pierce ECL Western-Blotting-Substrate	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Sodiumdodecyl sulfate (SDS)	Sigma, München
SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma, München
Trizma base, minimum, 99,9 % titration	Sigma, München
Trizma hydrochlorid	Sigma, München
Trizma hydrochloride	Sigma, München
Trypsin-EDTA (1x)	PAA, Pasching, Österreich
Tween® 20	ROTH, Karlsruhe
Whatman® Paper 3MM (Blotting-Papier)	Schleicher & Schuell, Dassel

### 3.2.2.1 Antikörper

**Tabelle 6: Verwendete primäre Antikörper für Immundetection**

Antikörper	Wirt	Firma	Verdünnung
Beta-Aktin	Maus	Sigma-Aldrich, Hamburg	WB: 1:5000
FLAG-Tag	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Hamburg	WB: 1:5000, IF:1:500
KDEL	Maus	Enzo Life Sciences, Lörrach	IF: 1:50
Living Colors	Maus	Clontech, Mountain View, USA	WB: 1:5000
Neuroserpin	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK	WB: 1:250
OS-9	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK	WB: 1 µg/ml
PDI	Kaninchen	Stressgen, Victoria, Kanada	IF: 1:300

**Tabelle 7: Verwendete sekundäre Antikörper für die Immundetection**

Antikörper	Wirt	Firma
Alexa Fluor® 555 Donkey Anti-Mouse	Esel	Invitrogen, Darmstadt
Alexa Fluor® 555 Donkey Anti-Rabbit	Esel	Invitrogen, Darmstadt
Donkey anti-mouse HRP	Esel	Promega, Mannheim
Donkey anti-rabbit HRP	Esel	Promega, Mannheim
Donkey anti-goat HRP	Esel	Promega, Mannheim

### 3.2.3 Zellkultur

**Tabelle 8: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmittel für die Zellkultur**

Produkt	Firma
Cryovial®-Einfriertubes, PK/100, steril	ROTH, Karlsruhe
Curcuminpulver (TRS Tumeric Powder)	India Express Food, Hamburg
Deckgläser	Assistent, Sondheim
DMEM Medium high-glucose (4,5g/l) with L-glutamine	PAA, Pasching, Österreich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, München
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching, Österreich
Dynalbeads G	Invitrogen, Darmstadt
Flüssigkeitsbassin (Abwurf) für 8-Kanal-Pipette	Labcor Products, San Diego, USA
Foetal Bovine Serum (FBS), standard quality	PAA, Pasching, Österreich
G418 (Gentamycin) supliate solution (50mg/ml)	PAA, Pasching, Österreich
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Darmstadt
Opti-MEM® reduced serum medium (1x)	Invitrogen, Darmstadt



## Material

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
Pasteurpipette Glas 230mm Advantage™, steril	Becton Dickinson Labware,
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
Pipetten Serol 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Proteaseinhibitor Complete Mini	Roche, Mannheim
Reaktionsgefäß (Tube) 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß (Tube) 2ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen PP 50ml konisch, Cellstar®tubes	Greiner bio-one, Essen
Rotilabo®-Spritzenfilter, steril	ROTH, Karlsruhe
Sealing tapes für multi-well-Platten	Nunc, Langenselbold
Texan™ Reagent Reservoir steril, 175ml	EXCEL Scientific, Victorville, USA
Trypsin-EDTA (1x)	PAA, Pasching, Österreich
Zellkratzer, cell scraper	Sarstedt, Newton, USA
Zellkulturflaschen steril, 25cm <sup>2</sup> und 75cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte, 12 wells, steril	Nunc, Langenselbold
Zellkulturplatte, 24 wells, steril	Nunc, Langenselbold
Zellkulturplatte, 6 wells, steril	Nunc, Langenselbold

### 3.2.4 Fluoreszenzfärbung

**Tabelle 9: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmittel für die Fluoreszenzfärbung**

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
Deckgläser	Glaswarenfabrik K. Hecht, Sondheim
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching, Österreich
Ethanol	Hausapotheke, UKE, Hamburg
Fluoromount-G	Southern Biotech, Birmingham, USA
Formaldehydlösung 3,5 %	BÜFA Chemikalien GmbH, Hude
Glycin	Sigma, München
Objektträger	Glaswarenfabrik K. Hecht, Sondheim
Saponin	Sigma, München

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen genutzt. Dabei werden zwei Oligonukleotide verwendet, die als Primer bezeichnet werden und deren Sequenz komplementär zu einem Abschnitt der Ziel-DNA ist. Unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase wird der durch die Primer eingegrenzte DNA-Abschnitt unter Einbau von Desoxyribonukleotide (dNTPs) vervielfältigt. Die PCR wurde zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten verwendet, die für eine spätere Klonierung in Vektoren benötigt wurden.

**Tabelle 10: Zusammensetzung eines Standard-Ansatzes zur Polymerase-Kettenreaktion**

Material	Menge
Genspezifischer 5'-und 3'- Primer	1 µl
dNTPs (10 mM)	4x 0.25 µl
10x Reaktionspuffer	2.5 µl
Destilliertes Wasser	15.375 µl
DreamTaq-Polymerase (5 U/µl)	0.125µl

**Tabelle 11: Reaktionsbedingungen für die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion**

Funktion	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	94 °C	5 Minuten
Denaturierung	94 °C	30 Sekunden
Primerhybridisierung	55 °C	30 Sekunden
Elongation	72 °C	1 Minute
Finale Elongation	72 °C	10 Minuten
Kühlen	4 °C	Bis zum Entfernen der Proben

#### 4.1.2 Aufreinigung von Produkten der Polymerase-Kettenreaktion

Zur Aufreinigung der Produkte nach PCR wurde das GeneJet PCR Kit der Firma Fermentas benutzt. Die Verwendung erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.

Die Aufreinigung beruht auf der Bindung der negativ geladenen DNA an Silikatmembranen. Die Elution der DNA erfolgte nach Waschung durch Aufnahme in destilliertem Wasser.

#### 4.1.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde stets ein Gerät der Firma Biorad (MyCycler) genutzt. Für die Durchführung von ortsgerechter Mutagenese an Plasmid DNA, wurde

das QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Um eine gezielte Mutation zu erreichen, werden zwei komplementäre Oligonukleotidprimer verwendet, die jeweils die gewünschte Mutation enthalten. Nach Amplifikation durch eine Polymerase wird Matrizen-DNA, welche methyliert vorliegt durch das Enzym Dpn1 verdaut. Die amplifizierte Plasmid-DNA wird danach in kompetente Bakterien transformiert.

**Tabelle 12: Reaktionsbedingungen für die Durchführung der ortsgerichteten Mutagenese**

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95 °C	2 Minuten
18	95 °C	20 Sekunden
	60 °C	10 Sekunden
	68 °C	30 Sekunden/kb Plasmid
1	68 °C	5 Minuten

#### 4.1.4 Restriktionsverdau mit Endonukleasen

Um gezielt DNA-Fragmente für die spätere Klonierung zu erhalten, wurden DNA-Proben mit „FastDigest“ Restriktionsenzymen der Firma Fermentas, St. Leon-Rot, verdaut. Durch diese Enzyme werden sequenzspezifische Abschnitte mit palindromischer Anordnung innerhalb der DNA erkannt und geschnitten.

**Tabelle 13: Reaktionsbedingungen für die Durchführung eines Restriktionsverdaus mit Endonukleasen**

Material	Menge
10x FastDigest-Puffer	4 µl
FastDigest-Enzym (1U/µl)	1 µl
Plasmid-DNA	1 µg
Destilliertes Wasser	34 µl

Der Verdau erfolgte bei 37 °C für 30 Minuten

#### 4.1.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Durch Elektrophorese in 1 % Agarose-Gelen wurden DNA-Proben (aus Restriktionsverdau oder PCR-Amplifikation) mittels elektrischer Spannung aufgetrennt. Im Vergleich mit einem DNA-Marker (TrackIt 1 Kb DNA Ladder, Invitrogen, Darmstadt) können Rückschlüsse auf die Größe des jeweiligen Fragmentes gezogen werden. Die Signalintensität der Bande nach Inkubation des Gels in einer

Ethidiumbromidlösung gibt eine quantitative Aussage über die Menge an vorhandener DNA.

### **4.1.6 DNA-Konzentrationsmessung mittels photometrischer Bestimmung**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in einer Lösung lässt sich mittels UV-Photometrischer Messung vornehmen. Dafür wurden die Proben 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen. Als Vergleichsprobe zur Eichung diente reines destilliertes Wasser. Für Doppelstrang-DNA wurde für eine  $OD_{260}$  von 1 als Referenz eine DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  angenommen. Die Berechnung der vorliegenden DNA-Konzentration wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{DNA-Konzentration} = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ } (\mu\text{g/ml})$$

### **4.1.7 Herstellung von Plasmid-Konstrukten zur Transfektion von Zellen**

Der pcDNA3.0-Vektor der Firma Invitrogen, Darmstadt, wurde für die Klonierung verschiedener Neuroserpin-Konstrukte verwendet. Dabei wurde das jeweilige Konstrukt zwischen EcoRI und XhoI in die Klonierungsstelle eingebracht. Die Sequenz des verwendeten humanen Neuroserpin-Gens ist bei NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) unter BC018043.1 gespeichert. Gezielte Mutation ausgehend von dieser Sequenz, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese eingebracht. Alle pcDNA3.0-Konstrukte wurden im Labor von Herrn Prof. Glatzel von Beata Szalay, Dr. Markus Geissen und Dr. Sascha Lange hergestellt.

#### **4.1.7.1 OS-9 Flag**

Um ein Plasmidkonstrukt für OS-9 herzustellen, wurde cDNA von humanem OS-9 bei der Firma Imagenes, Berlin (Bestellnummern: MGC:12783 IMAGE:4123782) gekauft und Bakterienkulturen auf Chloramphenicolplatten angelegt. Einzelne Klone wurden gepickt und in Chloramphenicolmedium kultiviert, die Plasmid-DNA des Shuttle-Vektors mittels Mini-Präp isoliert und die Sequenz verifiziert. Um OS-9 ohne die natürliche ER-Signalsequenz zu isolieren, wurden die Primer OS9-HindIII-For und OS9-KpnI-Rev, welche jeweils Restriktionsstellen für HindIII und KpnI enthalten, für eine PCR genutzt. Das PCR-Produkt wurde mit einem PCR-Purification-Kit behandelt. Die amplifizierte DNA wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und KpnI verdaut

und in den p3xFLAG-CMV<sup>TM</sup>-9 Expressionsvektor kloniert, der ein N-terminales Flag-Tag, sowie eine vorgelagerte ER-Signalsequenz enthält.

### **4.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien**

Der Begriff Transformation beschreibt die Übertragung von freier Plasmid-DNA in aufnahmefähige Bakterien. Als kompetenten Bakterienstamm wurde XL10-Gold (Stratagene, 200315) verwendet. Nach dem Protokoll des Herstellers wurden zunächst 50 µl Bakterien aufgetaut und je 100 ng DNA zugegeben. Danach wurden die Bakterien für 30 Minuten auf Eis gekühlt und im Anschluss für 30 Sekunden einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt. Nach Lagerung für 2 Minuten auf Eis wurden 450 µl von sterilem NZY+ Medium zugegeben und die Zellen für eine Stunde bei 37 °C unter Rotation von 300 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden 200 µl der Zellsuspension auf LB Agarplatten (LB: engl.: lysogeny broth) plattiert und für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde aus einzelnen Kolonien Plasmid-DNA gewonnen und untersucht.

#### **Zusammensetzung des NZY+ Mediums**

Bacto-Tryptone	10 g
Bacto-Hefeextrakt	5 g
NaCl	5g
Destilliertes Wasser	1 l
Ampicillin	100 µg/ml

Im Anschluss wurde das Medium autoklaviert und der pH mittels NaOH auf 7,5 eingestellt. Vor Verwendung wurden 20 ml Glukose 20 %, 12,5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> und 12,5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> zugegeben.

### **4.1.9 Isolation von Plasmid-DNA**

Folgende zwei Verfahren wurden zur Isolierung von Plasmid-DNA eingesetzt.

#### **4.1.9.1 „Mini“-Präparation von Plasmid-DNA**

Die „Mini“-Präparation dient der Gewinnung von kleinen Mengen an Plasmid-DNA, um den Erfolg einer Klonierung schnell und direkt überprüfen zu können. Die Ausbeute an DNA reicht aus, um durch Sequenzierung eine Kontrolle auf Mutationen

vorzunehmen. Hierfür wurden Kolonien von einer LB Agar-Platte steril gepickt und mit 3 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt. Nach einer Inkubation von 16 Stunden bei 37 °C und 300 rpm Rotation wurde die Plasmid-DNA mittels eines Plasmid-DNA-Aufreinigungs-Kit der Firma Invitex, Berlin, isoliert. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

### **4.1.9.2 „Midi“-Präparation von Plasmid-DNA**

Größere Mengen von Plasmid-DNA wurden mittels „Midi“-Präparation gewonnen. Hierfür wurde ein Plasmid-DNA-Aufreinigungs-Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Etwa 20 µl Zellen einer 2 ml Starter-Kultur wurden 16 Stunden bei 300 rpm Rotation und 37 °C in 100 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin kultiviert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit 6000 x G für 10 Minuten bei 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 8 ml Resuspensions-Puffer aufgenommen und mittels Vortexer gemischt. Danach wurde 8 ml Lysis-Puffer für 5 Minuten zugegeben und durch fünfmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes vermischt. Durch Zugabe von Neutralisationspuffer wurde die Lyse unterbunden und das Gemisch auf NucleoBond-Säulen aufgetragen. Die Säulen wurden vorher mit Equilibration-Puffer gespült. Nach zwei Waschschrritten wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 5 ml Elutionspuffer von der Säule gelöst und in 15 ml Reaktionsgefäßen aufgesammelt. Die gelöste DNA wurde anschließend durch Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und 15000 x G pelletiert. Das DNA-Pellet wurde abschließend mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut für 5 Minuten zentrifugiert, an einem Sterilarbeitsplatz für 10 Minuten luftgetrocknet und in 500 µl destilliertem Wasser aufgenommen.

### **4.1.10 DNA-Sequenzierung**

Die hergestellten Plasmid-Konstrukte wurden durchsequenziert, um eventuell spontan aufgetretene Mutationen während der Polymerase-Kettenreaktion auszuschließen und um die korrekte Sequenz des Konstrukts zu verifizieren. Hierfür wurden Proben der jeweiligen Konstrukte mit den spezifischen Primern versetzt an die Firma Eurofins, Ebersberg, versendet.

### **4.2 Zellkultur**

#### **4.2.1 Zellbiologische Arbeitstechniken**

Die Arbeit mit Zellkulturen wurde stets unter Sterilarbeitsplätzen der Firma Heraeus, Modell Herasafe, verrichtet. Die Arbeitsplätze wurden regelmäßig mit UV-Licht bestrahlt und mit Desinfektionsmittel gereinigt. Alle Materialien zur Arbeit am Sterilarbeitsplatz wurden vor Benutzung autoklaviert und Verpackungen äußerlich mit Desinfektionsmittel gereinigt, bevor sie am Arbeitsplatz geöffnet wurden. Die verwendeten Zusatzstoffe für die Zellmedien wurden steril filtriert. Alle Medien oder Zusätze, welche direkten Kontakt mit lebenden Zellen bekommen sollten, wurden vor Benutzung mittels Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

#### **4.2.2 Kontinuierliche Kultivierung von HEK-293-Zellen**

Die HEK-293-Zellen (human embryonic kidney cells, HEK) (Man et al. 2012) sind adhärent wachsend und wurden im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97 % kultiviert. Als Medium wurde DMEM mit L-Glutamin und einem Glukosegehalt von 4,5 g/L unter Zusatz von 10 % Rinderserum verwendet. Die Zellen wurden in T75-Flaschen kultiviert. Morphologie und Dichte des Zellrasens wurden regelmäßig überprüft und die Kultur bei einer Konfluenz von etwa 90 % geteilt. Für die Teilung der Zellkultur wurde der Überstand mit einer Vakuumpumpe abgesaugt, der Zellrasen wurde mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA pro T75-Flasche inkubiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von etwa 10 ml DMEM abgelöst und anschließend im jeweils gewünschten Verhältnis auf neue Kulturflaschen oder Mehrfachplatten verteilt. Im Anschluss wurden die Kulturflaschen oder Mehrfachplatten mit frischem DMEM aufgefüllt.

#### **4.2.3 Langzeitlagerung von Zellen**

Ein Teil der mit Neuroserpinkonstrukten stabil transfizierten HEK-293-Zellen wurde zur späteren Verwendung konserviert. Dazu wurden nahezu konfluente Zellen mit 0,2 ml Trypsin-EDTA abgelöst und die Suspension in 2,8 ml kaltem Einfriermedium aufgenommen. Davon wurden jeweils 1,5 ml in ein Einfrierrohrchen überführt und sofort bei -80 °C eingefroren.

### 4.2.4 Auftauen von konservierten Zellen

Die bei -80 °C gelagerten Zellen wurden durch Erwärmen des Einfrierröhrchens im Wasserbad bei 37 °C unter stetiger Bewegung aufgetaut. Anschließend wurde die flüssige Zellsuspension in vorgewärmtes Kulturmedium aufgenommen und in T75-Flaschen gefüllt. Das Kulturmedium wurde nach 24 Stunden erneuert und die Zellen bis zur Verwendung in Experimenten mindestens eine Woche passagiert.

### 4.2.5 Zellzahlbestimmung

Das Zählen der Zellen in Suspension wurde mit einer Neubauer-Zählkammer vorgenommen. Zunächst wurde die Zählkammer vorbereitet und ein Deckglas auf die Glasstege gelegt. Etwa 10 µl der jeweiligen Zellsuspension wurden an den Rand des Deckglases pipettiert und durch Kapillarkräfte in der Kammer verteilt. Nach kurzer Wartezeit erfolgte die Bestimmung der Zellzahl innerhalb der 4 Großquadranten der Zählkammer mittels Lichtmikroskop und Zählhilfe. Die in der Suspension vorliegende Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl Zellen}}{\text{Fläche}(\text{mm}^2) \times \text{Kammertiefe}(\text{mm}) \times \text{Verdünnung}} = \text{Zellen pro ml}$$

### 4.2.6 Transfektion von HEK-293-Zellen

Die Transfektion der HEK-293-Zellen erfolgte mit Lipofectamin 2000 der Firma Invitrogen und wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgenommen. Für eine Transfektion von HEK-293-Zellen in einer 6-Well-Zellkulturplatte wurden am Vortag  $5 \times 10^5$  Zellen plattiert. Für die Transfektion von einem Well dieser Platte wurden 4 µg Plasmid DNA und 10 µl Lipofectamin 2000 in je 250 µl Opti-MEM gelöst und nach 5 Minuten zusammenpipettiert. Nach einer Wartezeit von 20 Minuten wurden die gebildeten DNA-Lipofectamin-Komplexe auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 4 Stunden bei 37 °C wurde das Kulturmedium gewechselt.



### **4.2.7 Präparation von Zelllysaten und Zellkulturüberständen zur Aufbereitung von Proteinen**

Für die Untersuchung von Zellüberständen wurden im Anschluss an den jeweiligen Versuch oder Transfektion der Zellen mit einem Konstrukt Zellmedium entnommen. Der Überstand wurde dann bei etwa 1000 rpm und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert, um eventuell vorhandene Zellen oder Debris zu entfernen. Für die Herstellung von Zelllysaten wurde zunächst eine definierte Menge Zellen auf Mehrfachplatten plattiert. Nach Durchführung des Versuchs oder Transfektion der Zellen mit einem Konstrukt wurden die Zellen zunächst drei mal mit PBS gewaschen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis oder bei 4 °C. Für die Herstellung von Zelllysaten von Zellen auf einer 6-Well-Zellkulturplatte, wurde pro Well 50 µl Lysepuffer zugegeben und die Zellen mit einem Zellkratzer von der Unterlage gelöst. Das primäre Zelllysate wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt und 20 Minuten auf Eis gelassen. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß 5 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um vorhandene Zelldebris zu entfernen. Der klare Überstand wurde danach mit der entsprechenden Menge Laemmli-Puffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C zur Denaturierung erhitzt.

### **4.2.8 Zusammensetzung des Lysepuffers zur Herstellung von Zelllysaten**

150 µM NaCl

20 µM Tris pH=7,5

1 % Triton X100

1 Tablette Proteaseinhibitor Complete Mini der Firma Roche wurde zu jeweils 10 ml Lösung frisch zugegeben.

### **4.2.9 Zusammensetzung des 6x Laemmli-Puffers:**

Tris HCL                    300 mM, pH=6,8

Glycerol                    60 %

SDS                            12 %

DTT                            600 mM

Bromphenoiblauf        0,5 %

### 4.3 Proteinbiochemische Untersuchungen

#### 4.3.1 Proteinauftrennung durch Natriumdocecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (SDS-PAGE)

Die Proteinanalyse der Zellysate und Überstände wurde mittels Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli durchgeführt (Lee et al. 2012). Diese Methode dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse. Zur Durchführung wurden 10 % Polyacrylamidgele von 1,5 mm Dicke hergestellt.

In die 10 Taschen mit je einem Fassungsvermögen von etwa 40 µl wurden die zuvor vorbereiteten Proteinproben aus Zellysat oder Zellüberstand pipettiert, wobei die erste Tasche mit 5 µl Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder für den Molekulargewichtsbereich von 10 kDa bis 170 kDa gefüllt wurde. Die Gelelektrophorese erfolgte in Laufpuffer und mit einer Spannung von etwa 80 V bis 110 V. Die Elektrophorese der Proteine wurde angehalten, wenn die Lauffront den Rand des Gels erreicht hatte.

#### Zusammensetzung des 10x Laufpuffers

250 mM Tris Base  
1,92 M Glycin  
0,1 % SDS  
pH= 8,3 - 8,8

#### 4.3.2 Herstellung und Zusammensetzung von Polyacrylamid-Gelen zur SDS-PAGE

Zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele wurden Rahmen, Haltevorrichtung und Käme der Firma Biorad benutzt.

#### Zusammensetzung der 10 % Acrylamid-Trenngele:

Acrylamid/Bisacrylamid	2,5 ml
Steriles Wasser	3 ml
1,5 M Tris HCL (pH= 8,8)	1,9 ml
10 % SDS	75 µl
10 % APS	75 µl
TEMED	3 µl

Nach dem Gießen des Trenngels wurde die Oberfläche mit Isopropanol bedeckt, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern. Nach erfolgter Polymerisation wurde das übrige Isopropanol entfernt und das Sammelgel direkt auf das Trenngel gegossen.

### **Zusammensetzung der 5 % Acrylamid-Sammelgele:**

Acrylamid/Bisacrylamid	650 µl
Steriles Wasser	2,75 ml
0,5 M Tris HCL (pH= 6,8)	500 µl
10 % SDS	40 µl
10 % APS	40 µl
TEMED	4 µl

Nach erfolgter Polymerisation wurden die Rahmen mit den Gelen in den Halteapparat eingesetzt und mit Laufpuffer aufgefüllt.

### **4.3.3 Western-Blot**

Nach Durchführung der SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels einer Blotkammer auf eine Nitrocellulose-Membran mit 0,2 µm Porengröße transferiert. Die Stromstärke betrug 400 mA für eine Dauer von 70 Minuten. Das Protein-Gel und die Membran wurden zwischen mehrere Lagen Whatman-Papier und zwei mit Transferpuffer getränkten Schwämme gelegt und in die Haltevorrichtung eingespannt. Um die Transfereffizienz zu prüfen, wurde eine Färbung mit Ponceau-Lösung durchgeführt und im Anschluss mit destilliertem Wasser gespült. Die Detektion der Proteine erfolgte durch spezifische Antikörper

### **Zusammensetzung des 10x Transferpuffers:**

250 mM Tris Base

1,92 M Glycin

Mit destilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt.

Für die Detektion von Proteinen >30 kDa wurde ein Methanolgehalt von 10 % verwendet. Für die Detektion von Proteinen ≤ 30 kDa wurde ein Methanolgehalt von 20 % verwendet. Der pH wurde mittels HCL auf pH=8,3 – 8,8 eingestellt

### 4.3.4 Immundetektion

Um unspezifische Bindungsstellen für eine mögliche Interaktion mit den zur Detektion eingesetzten Antikörpern abzudecken, wurde die Membran nach Durchführung des Blottens für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % PBST-Milch blockiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des jeweils zur Detektion gewünschten spezifischen Antikörpers, gelöst in 5 % PBST-Milch, bei 4 °C über Nacht. Am Folgetag wurde die Membran dreimal für 15 Minuten mit PBST gewaschen und eine Stunde mit einem HRP-gekoppelten Antikörper, gelöst in 5 % PBST-Milch, inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal für 15 Minuten mit PBST gewaschen und im Anschluss mit einem Chemilumineszenz-Reagenz detektiert. Die Membran wurde mit einer ECL-Kamera (Chemidoc, Biorad) detektiert und mit einer Software (Quantity One, Biorad) dargestellt und ggf. quantifiziert.

#### **Zusammensetzung der 10x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):**

NaCl	1,37 M
KCl	26,8 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	64,6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,7 mM
pH 7.2	

#### **Zusammensetzung der 10x PBST-Lösung**

10x PBS	10 %
Tween 20	1 %
Destilliertes Wasser	89 %

#### **Zusammensetzung der 5 % PBST-Milch-Lösung**

Bio-Milchpulver	5 %
-----------------	-----

Das Bio-Milchpulver wurde in 1X PBST-Lösung aufgelöst.

### 4.3.5 Verdau von Zelllysate mit EndoH und PNGaseF

Zum Verdau mit EndoH wurde Zelllysate von HEK-293-Zellen benutzt und mit Lysepuffer auf ein Volumen von 80 µl aufgefüllt. Danach erfolgte die Zugabe von 8 µl

Denaturierungspuffer und Erhitzen auf 95 °C für 10 Minuten. Anschließend wurde EndoH-Puffer und 5 µl EndoH (40 U/mg, Roche, München) zugegeben und die Probe bei 37 °C über Nacht inkubiert. Für den Verdau mit PNGaseF wurde das Zellysate auf ein Volumen von 80 µl mit Lysepuffer aufgefüllt. Danach wurde 2 µl 10 % SDS zugegeben und die Probe für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Für den anschließenden Verdau wurde 10 µl 10 % NP40 sowie 5 µl PNGaseF (1 U/µl, Roche, München) zu den Proben zugegeben und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Western-Blot.

### **Zusammensetzung des Denaturierungspuffers für Verdau mit EndoH und PNGaseF**

0,5 % SDS, 1 % 2-Mercaptoethanol in PBS

### **Zusammensetzung des EndoH-Puffers**

0,5 mM Natriumcitrat in PBS

### **4.3.6 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)**

Zunächst wurde das Zellysate mit Lysepuffer auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt. Um unspezifische Bindungsstellen zu decken, wurde pro Probe 50 µl einer Protein G Beads Suspension (Dynalbeads G, Invitrogen) mit Lysepuffer dreimalig gewaschen und anschließend zu den Proben pipettiert und für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach diesem Reinigungsschritt wurden die Beads mit einem Magneten heruntergezogen und der Überstand für die Co-IP genutzt. Danach wurde die Probe für 16 Stunden bei 4 °C auf einem Drehrad mit dem Primärantikörper inkubiert. Im Anschluss wurden je Probe 50 µl Beads zugegeben und für eine Stunde bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Vor Verwendung wurden die Beads stets dreimal mit Lysepuffer gewaschen. Abschließend wurden die Beads mit dem Magneten heruntergezogen und vorsichtig viermalig mit Lysepuffer gewaschen und mit 2x-Laemmli-Laufpuffer bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt. Danach wurden die Beads mit Hilfe des Magneten heruntergezogen und die Probe durch SDS-PAGE aufgetrennt.

### **4.3.7 Fluoreszenzfärbung (IHC)**

Um die räumliche Verteilung und Interaktionen von bestimmten Proteinen innerhalb der Zelle darzustellen, wurden Fluoreszenzfärbungen vorgenommen. Dafür wurden

zunächst HEK-293-Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten mit Deckgläsern ausplattiert. 24 Stunden nach Transfektion der Zellen wurden diese dreimal mit PBS gewaschen und mit 3,5 % Formaldehydlösung für 20 Minuten fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen für eine Stunde mit IHC-Blockpuffer geblockt und im Anschluss mit dem Primäantikörper, gelöst in IHC-Inkubationspuffer, in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen mit den jeweiligen fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper, gelöst in IHC-Inkubationspuffer, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend, nach erneutem Waschen mit PBS, wurden die Deckgläser mit den Zellen mittels speziellem Deckmedium (Fluoromount-G, Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) auf Objektträgern fixiert und über Nacht getrocknet. Die Aufnahmen der immunhistochemischen Färbungen erfolgte an einem Konfokalmikroskop (Leica TCS SP2, Wetzlar). Die Aufnahmen wurden für jeden Anregungslaser getrennt angefertigt, mit Limitierung des Detektors auf das jeweils der Anregung entsprechende Emmissionsmuster.

### **Zusammensetzung des IHC-Blockpuffers**

1xPBS	89,9 %
FBS	10 %
Glycin	0,1 %

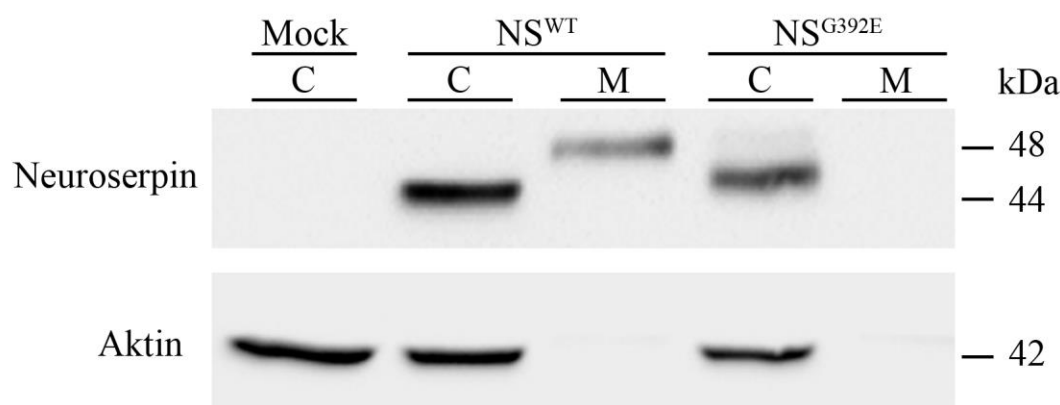
### **Zusammensetzung des IHC-Inkubationspuffers**

1xPBS	98,8 %
FBS	1 %
Glycin	0,1 %
Sarponin	0,1 %

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Intrazelluläre Akkumulation von mutiertem Neuroserpin

Um die intrazelluläre Aggregation von mutiertem Neuroserpin und deren Folgen zu untersuchen, wurde ein Zellmodell für FENIB erstellt. Zunächst wurden HEK-293-Zellen mit Neuroserpin-Wildtyp ( $NS^{WT}$ ) oder Neuroserpin-G392E-Mutant ( $NS^{G392E}$ ) transfiziert. Transfektion mit einem Leervektor als Kontrolle zeigt kein Signal für Neuroserpin (Abb. 11, Mock).  $NS^{WT}$  wird in das Zellkulturmedium sezerniert und läuft dann nach der Auftrennung durch SDS-Gelelektrophorese in einer Fraktion mit höherem Molekulargewicht (Abb. 11,  $NS^{WT}$ , M). Die FENIB-Mutante wird nicht in das Medium sezerniert (Abb. 11,  $NS^{G392E}$ , M) und zeigt intrazellulär eine Auftrennung in gleicher Höhe wie intrazelluläres  $NS^{WT}$  (Vgl. Abb. 11,  $NS^{WT}$ , C und  $NS^{G392E}$ , C).



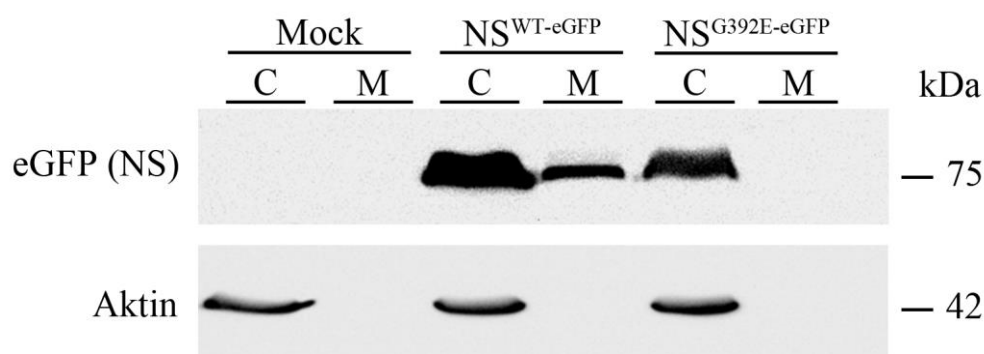
#### Abbildung 11: Mutiertes Neuroserpin wird nicht sezerniert

Zellysate (C) von HEK-293-Zellen und Überstand (M) wurden 24 Stunden nach Transfektion mit Neuroserpin-Wildtyp ( $NS^{WT}$ ) bzw. G392E-Mutante ( $NS^{G392E}$ ) auf ihren Gehalt an Neuroserpin mittels einer Western-Blot-Analyse untersucht.  $NS^{WT}$  wird in das Kulturmedium (M) sezerniert.  $NS^{G392E}$  wird nicht in das Medium (M) sezerniert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von intrazellulärem Aktin (Aktin).

### 5.2 Intrazelluläre Akkumulation von mutiertem eGFP-markiertem Neuroserpin

Um die Eigenschaften von Neuroserpin mit einem Fluoreszenzmikroskop untersuchen zu können und um ein Antigen mit guten Bindungseigenschaften an Neuroserpin zu koppeln, wurden die eGFP-markierten Konstrukte für Neuroserpin-Wildtyp ( $NS^{WT-eGFP}$ )

und G392E-Mutante-Neuroserpin (NS<sup>G392E-eGFP</sup>) hergestellt. Die eGFP-Markierung wurde dabei C-Terminal eingefügt um die Sekretion des Proteins nicht zu beeinflussen. Nach Auftrennung durch SDS-Gelelektrophorese zeigt sich für NS<sup>WT-eGFP</sup> sowohl ein intrazelluläres Signal (Abb. 12, NS<sup>WT-eGFP</sup>, C) als auch eine Sekretion in das Medium (Abb. 12, NS<sup>WT-eGFP</sup>, M). Im Fall von NS<sup>G392E-eGFP</sup> findet keine Sekretion in das Medium statt (Abb. 10, NS<sup>G392E-eGFP</sup>, M). Die Kontrolle mit Transfektion eines Leervektors zeigt kein Signal für Neuroserpin (Abb. 12, Mock).



**Abbildung 12: Mutiertes Neuroserpin mit eGFP-Tag wird nicht in das Zellmedium sezerniert**

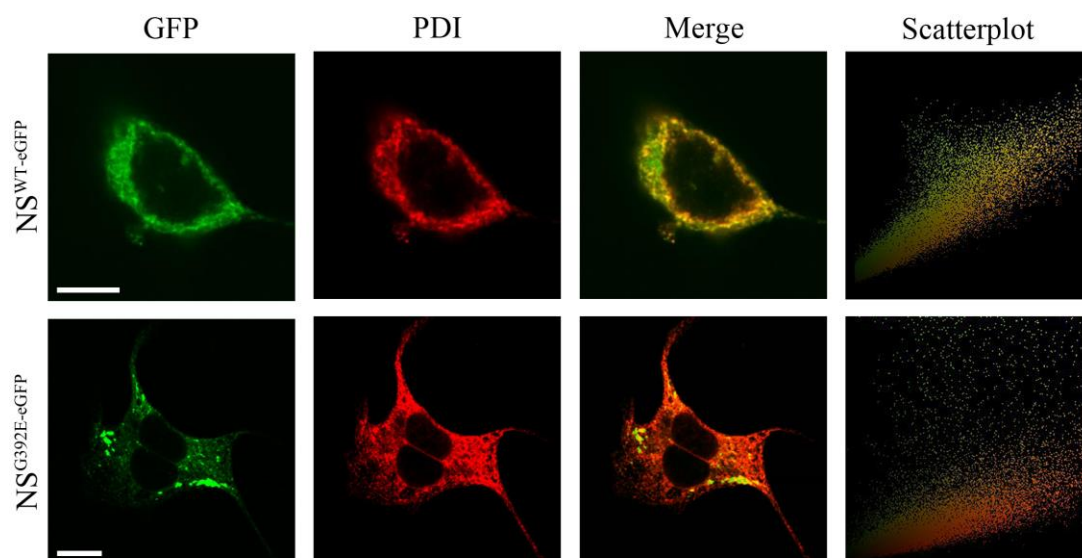
Zellysate (C) von HEK-293-Zellen und Überstand (M) wurden 24 Stunden nach Transfektion mit eGFP-markiertem Neuroserpin-Wildtyp (NS<sup>WT-eGFP</sup>) bzw. G392E-Mutante (NS<sup>G392E-eGFP</sup>) auf ihren Gehalt an eGFP-markiertem Neuroserpin (eGFP(NS)) untersucht. Die Immundetektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen eGFP. Im Gegensatz zu NS<sup>G392E-eGFP</sup> wird NS<sup>WT-eGFP</sup> in das Kulturmedium (M) sezerniert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von intrazellulärem Aktin (Aktin).

### 5.3 Lokalisation intrazellulärer Akkumulationen

Um die Lokalisation von Neuroserpin innerhalb der Zelle zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. HEK-293-Zellen mit einer stabilen Expression von NS<sup>WT-eGFP</sup> oder NS<sup>G392E-eGFP</sup> wurden fixiert und Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) als ER-Marker mit einem polyklonalen Antikörper angefärbt und mit einem Konfokalmikroskop analysiert. NS<sup>WT-eGFP</sup> zeigt eine regelmäßige Verteilung innerhalb der Zelle, während NS<sup>G392E-eGFP</sup> Aggregate bildet (Abb. 13, links). Die Färbung mit einem Antikörper gegen PDI zeigt die Verteilung des ER (Abb. 13, PDI). Die Überlagerung beider Bilder (Abb. 13, Merge) zeigt eine Kolo-kalisation von Neuroserpin mit dem ER-Marker PDI. Das Streudiagramm (Abb. 13, Scatterplot) zeigt die



Verteilung der Bildpunkte des grünen und roten Kanals. Bei einer idealen Übereinstimmung würde sich eine Gerade der Steigung 1 ergeben.



**Abbildung 13: Neuroserpin zeigt Kolokalisation mit dem ER-Marker PDI**

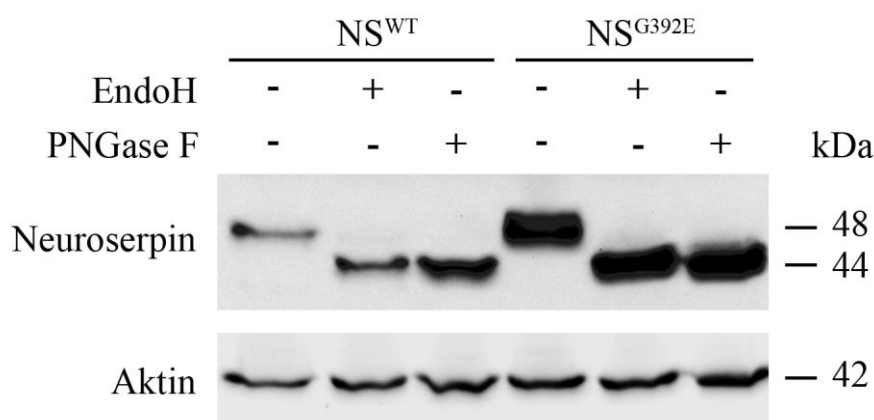
Zellen, die eine stabile Expression von NS<sup>WT-eGFP</sup> oder NS<sup>G392E-eGFP</sup> zeigen (grün), wurden fixiert und mit einem Antikörper gegen den ER-Marker PDI gefärbt (rot). Die Überlagerung beider Bilder (Merge) zeigt die Kolokalisation beider Proteine. NS<sup>G392E-eGFP</sup> zeigt eine Aggregation innerhalb des ERs. Das Streudiagramm (Scatterplot) zeigt die Verteilung der Bildpunkte des grünen (Ordinate) und roten Kanals (Abszisse). (Maßstabsbalken entspricht 10 µm)

### 5.4 Intrazelluläres mutiertes Neuroserpin besitzt Glykosylierung vom mannosereichen Typ

Da der Abbauweg von fehlgefalteten Proteinen via ERAD abhängig vom Status der Glykosylierung eines Substrates ist, wurde untersucht, ob intrazelluläres Neuroserpin Zuckerreste trägt. Dafür wurde Zelllysate von HEK-293-Zellen, welche 24 Stunden vorher transient mit NS<sup>WT</sup> oder NS<sup>G392E</sup> transfiziert wurden, mit EndoH oder PNGaseF verdaut und mittels Western-Blot analysiert (Abb. 14). Als Kontrollen wurden Zelllysate mit NS<sup>WT</sup> oder NS<sup>G392E</sup> wie für den Verdau mit EndoH behandelt, jedoch ohne Enzym inkubiert (Abb. 14, Spur 1 und 4). Die resultierenden Banden dieser unverdauten Kontrollen finden sich nach Auftrennung durch SDS-Page auf gleicher Höhe bei 48 kDa. Nach Behandlung mit EndoH, welches mannosereiche Zuckerstrukturen verdaut, resultiert für NS<sup>WT</sup> und NS<sup>G392E</sup> eine Bande geringerer Molekülmasse bei 44

## Ergebnisse

kDa (Abb. 14, Spur 2 und 5). Eine Bande gleicher Laufhöhe (44 kDa) findet sich auch nach Verdau mit PNGaseF, welches alle Zuckerreste verdaut (Abb. 14, Spur 3 und 6).



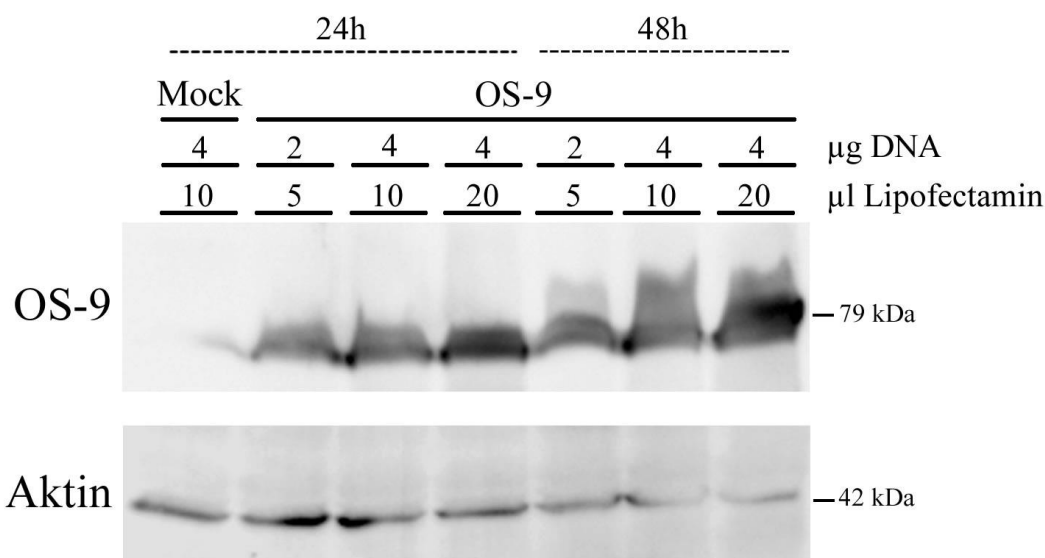
### Abbildung 14: Mutiertes Neuroserpin besitzt Glykosylierung vom mannoreichen Typ

Zelllysate von HEK-293-Zellen wurden 24 Stunden nach transienter Transfektion mit Neuroserpin-Wildtyp (NS<sup>WT</sup>) bzw. G392E-Mutante (NS<sup>G392E</sup>) entweder mit EndoH oder mit PNGaseF verdaut. Als Vergleich erfolgte Behandlung ohne Enzym (Spur 1 und 4).

Anschließend wurden alle Proben auf ihren Gehalt an Neuroserpin mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von intrazellulärem Aktin (Aktin).

## 5.5 Expression von ER-Lektin OS-9 in HEK-293-Zellen

Um die Expression des Plasmidkonstruktes für Flag-markiertes, humanes OS-9 zu untersuchen, wurden HEK-293-Zellen mit verschiedenen Mischungsverhältnissen von Menge an Plasmid-DNA zu Volumen Lipofectamin 2000 transfiziert und in einer Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 15, Spur 2-7). Als negative Kontrolle wurde eine Transfektion mit Leervektor durchgeführt (Abb. 15, Mock). Als Ladekontrolle diente der Nachweis von intrazellulärem Aktin (Abb. 15, Aktin). Es zeigt sich ein mit der eingesetzten Plasmid-DNA-Menge ansteigendes Signal in der Immundetektion mit einem anti-Flag-Antikörper. Die detektierten Banden lagen nach SDS-PAGE in einer Fraktion von 79 kDa Molekülmasse.

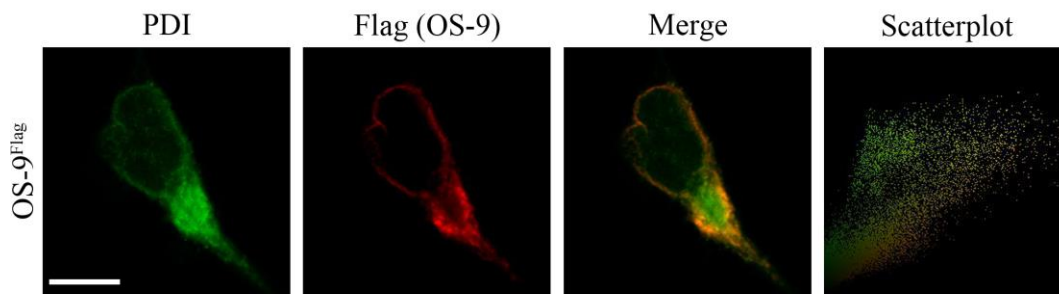


**Abbildung 15: Expression von OS-9 in HEK-293-Zellen nach transients Transfektion**

HEK-293-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen an Lipofectamin (µl Lipofectamin) und Plasmid-DNA (µg DNA) für Flag-markiertes OS-9 transfiziert. 24 oder 48 Stunden nach Transfektion wurde das Zellysate auf den Gehalt an OS-9 mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von intrazellulärem Aktin (Aktin). Als negative Kontrolle diente die Transfektion mit Leervektor: p3xFLAG-CMV-9 (Mock).

**5.6 Intrazelluläre Lokalisation von OS-9 in HEK-293-Zellen**

Um die intrazelluläre Lokalisation von OS-9 zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. HEK-293-Zellen wurden transient mit Flag-markiertem OS-9 transfiziert, nach 24 Stunden fixiert und mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Flag-Tag sowie einem Antikörper gegen das ER-Marker-Protein PDI gefärbt und mit einem Konfokalmikroskop analysiert (Abb. 16). Die Lokalisation von OS-9 zeigte in der Überlagerung mit PDI eine Kolokalisation mit randbetonter Verteilung innerhalb des ERs (Abb. 16, Merge).



**Abbildung 16: OS-9 zeigt Kolokalisation mit dem ER-Marker PDI**

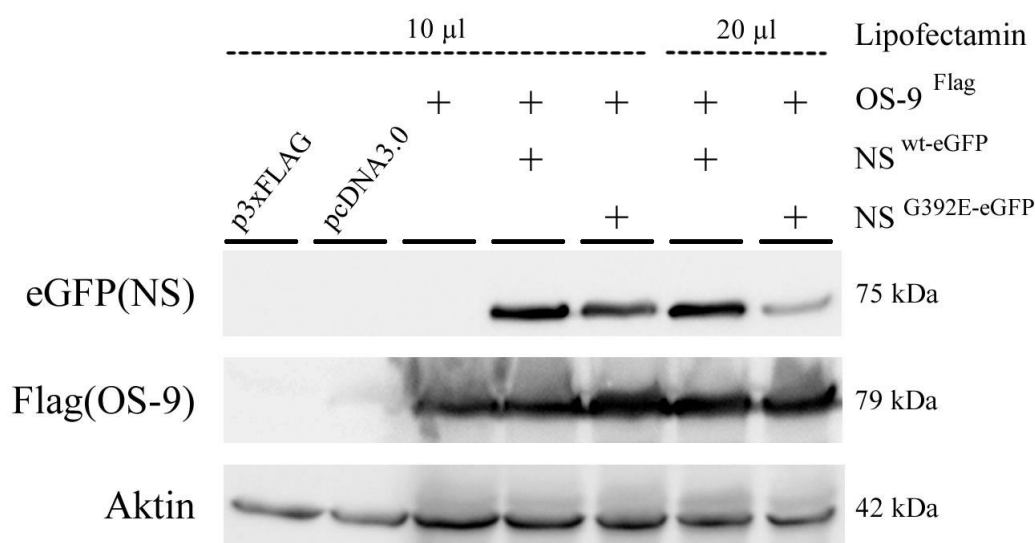
HEK-293-Zellen wurden transient mit Flag-markiertem OS-9 transfiziert, fixiert und mit Antikörpern gegen Flag-Tag (rot) und PDI (grün) gefärbt. Die Überlagerung beider Bilder (Merge) zeigt die Kolokalisation beider Proteine (gelb). Das Streudiagramm (Scatterplot) zeigt die Verteilung der Bildpunkte des grünen (Ordinate) und roten Kanals (Abszisse).

(Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ )

### 5.7 Co-Transfektion von OS-9 und Neuroserpin in HEK-293-Zellen

Um die gleichzeitige Expression der Plasmidkonstrukte für Flag-markiertes, humanes OS-9 (OS-9<sup>Flag</sup>) und NS<sup>WT-eGFP</sup> bzw. NS<sup>G392E-eGFP</sup> zu untersuchen, wurden HEK-293-Zellen mit je 4  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA und zwei verschiedenen Volumen an Lipofectamin 2000 transfiziert und in einer Western-Blot-Analyse untersucht. Als negative Kontrollen wurden Transfektionen mit den beiden jeweiligen Leervektoren durchgeführt. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von intrazellulärem Aktin. In der Immundetektion mit einem anti-Flag-Antikörper zeigte sich nach Transfektion mit Flag-markiertem OS-9 ein Signal in der Höhe einer entsprechenden Molekülmasse von 79 kDa nach SDS-PAGE. Ein Signal in der Immundetektion mit einem Antikörper gegen das eGFP-markierte Neuroserpin zeigte sich nur nach zusätzlicher Co-Transfektion mit den entsprechenden Neuroserpin-Konstrukten (Abb. 17).

## Ergebnisse



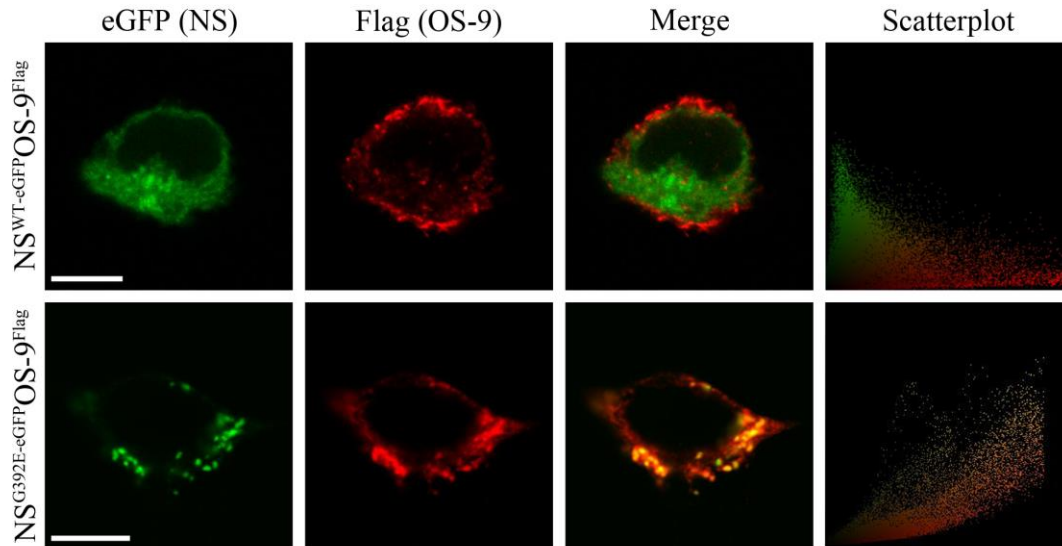
### Abbildung 17: Co-Transfektion von OS-9 und Neuroserpin in HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden transient mit je 4  $\mu$ g Plasmid-DNA für NS<sup>WT-eGFP</sup> bzw. NS<sup>G392E-eGFP</sup> und/oder Flag-markiertem OS-9 transfiziert. Die Transfektionen wurden mit 10  $\mu$ l oder 20  $\mu$ l Lipofectamin 2000 durchgeführt. 24 Stunden nach Transfektion wurde das Zelllysate durch eine Western-Blot-Analyse mittels Antikörpern gegen Flag-Tag auf den Gehalt an OS-9 (Flag (OS-9)) und mittels eGFP-Antikörpern auf den Gehalt an Neuroserpin (eGFP (NS)) untersucht. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von intrazellulärem Aktin (Aktin). Als negative Kontrolle diente die Transfektion mit den jeweiligen Leervektoren (p3xFLAG, pcDNA3.0).

### 5.8 Kolokalisation von ER-Lektin OS-9 mit Wildtyp-Neuroserpin oder Mutante

Um mehr über die räumliche Beziehung von Neuroserpin und OS-9 zu erfahren, wurde eine Kolokalisationsanalyse mittels Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. HEK-293-Zellen mit einer stabile Expression von NS<sup>WT-eGFP</sup> oder NS<sup>G392E-eGFP</sup> wurden mit Plasmid-DNA für Flag-markiertes OS-9 transfiziert, anschließend fixiert und mit einem Antikörper gegen Flag-Tag gefärbt (Abb. 18). Weiter wurden Färbungen von Zellen mit stabiler Expression von NS<sup>G392E-eGFP</sup> durchgeführt, bei denen zusätzlich zu OS-9 auch die ER-spezifische Proteinsequenz Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) mit einem Antikörper detektiert wurde (Abb. 19). NS<sup>WT-eGFP</sup> zeigt eine regelmäßige Verteilung innerhalb der Zelle, während NS<sup>G392E-eGFP</sup> Aggregate bildet (Abb. 18). Nach Färbung von KDEL zeigte sich eine Kolokalisation von Neuroserpin mit diesem ER-Marker (Abb. 19, grün und blau). Die Verteilung von OS-9 ist rot dargestellt (Abb. 18 und 19, rot). Die

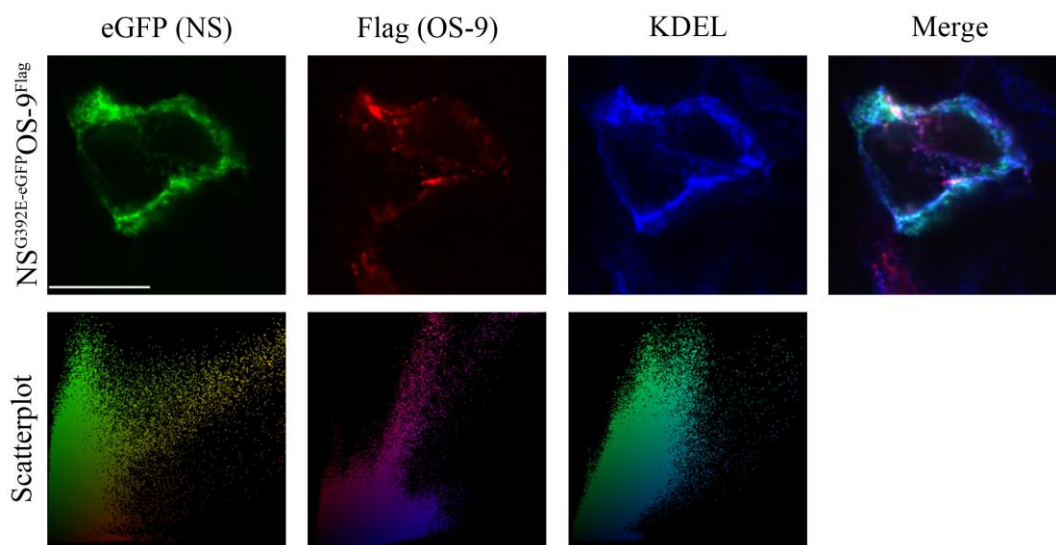
Überlagerung der Einzelbilder zeigt eine Kolokalisation von OS-9 mit NS<sup>G392E-eGFP</sup>, während keine relevante Überlagerung beider Bildsignale im Falle von NS<sup>WT-eGFP</sup> nachweisbar ist (Abb. 18 und 19, Merge).



**Abbildung 18: Mutiertes Neuroserpin zeigt Kolokalisation mit OS-9**

Zellen, die eine stabile Expression von NS<sup>WT-eGFP</sup> oder NS<sup>G392E-eGFP</sup> zeigen (grün), wurden mit Flag-markiertem OS-9 transfiziert, fixiert und mit Antikörpern gegen das Flag-Tag (rot) gefärbt. Die Überlagerung beider Bilder (Merge) zeigt die Kolokalisation beider Proteine. NS<sup>G392E-eGFP</sup> zeigt eine Kolokalisation mit OS-9 (gelb). Das Streudiagramm (Scatterplot) zeigt die Verteilung der Bildpunkte des grünen (Ordinate) und roten Kanals (Abszisse).

(Maßstabsbalken entspricht 10 µm)



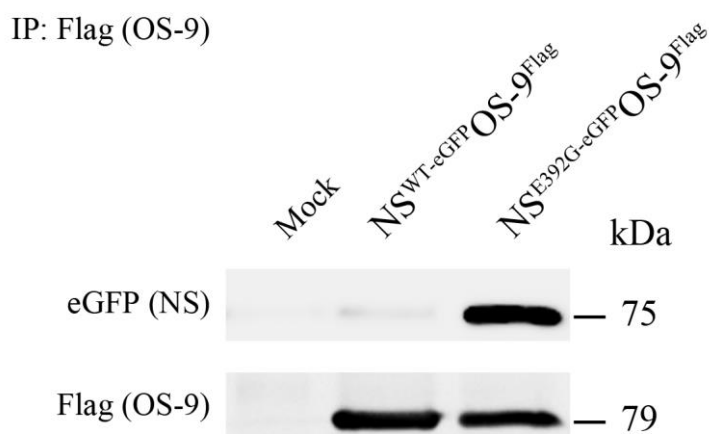
**Abbildung 19: Kolokalisationsanalyse von mutiertem Neuroserpin, OS-9 und ER-Marker-Protein KDL**

Zellen, die eine stabile Expression NS<sup>G392E-eGFP</sup> zeigen (grün), wurden mit Flag-markiertem OS-9 transfiziert, fixiert und mit Antikörpern gegen KDEL (blau) und das Flag-Tag (rot) gefärbt. Die Überlagerung beider Bilder (Merge) zeigt die Kolokalisation der Proteine. Die jeweiligen Streudiagramme (Scatterplots) zeigen die räumliche Verteilung der Bildpunkte der dargestellten Farbkanäle. (Maßstabsbalken entspricht 10 µm)

### 5.9 Mutiertes Neuroserpin bindet an OS-9

Um die Interaktion von OS-9 und Neuroserpin weiter zu untersuchen und um eine Bindung beider Proteine zu bestätigen, wurde eine Co-Immunpräzipitation (Co-IP) durchgeführt. Dafür wurden HEK-293-Zellen, die eine stabile Expression von NS<sup>WT-eGFP</sup> oder NS<sup>G392E-eGFP</sup> aufwiesen, zusätzlich transient mit Flag-markiertem OS-9 transfiziert und nach 24 Stunden Zelllysate hergestellt. Aus diesen wurde OS-9 mit Antikörpern gegen das Flag-Tag gewonnen und anschließend auf das Vorhandensein von Neuroserpin mittels Western-Blot-Analyse gegen eGFP untersucht. Im Fall der Co-Expression mit NS<sup>WT-eGFP</sup> zeigte sich nach der Isolierung von OS-9 eine geringe Interaktion (Abb. 20, oben, Spur 2). Nach Co-Expression mit NS<sup>G392E-eGFP</sup> zeigte sich eine starke Interaktion mit OS-9 (Abb. 20, oben, Spur 3). Um zu kontrollieren, ob eine erfolgreiche Präzipitation von OS-9 erfolgt ist, wurde die Membran mit einem Antikörper gegen Flag-Tag analysiert. Es zeigte sich dabei in beiden Fällen ein starkes

Signal für Flag-markiertes OS-9 (Abb. 20, unten, Spur 2 und 3). Als negative Kontrolle wurde nach Transfektion von HEK-293-Zellen mit Leervektor (p3xFLAG-CMV-9) eine Präzipitation nach gleichem Protokoll durchgeführt (Abb. 20, Mock).



#### Abbildung 20: Co-Immunpräzipitation von OS-9 und Neuroserpin

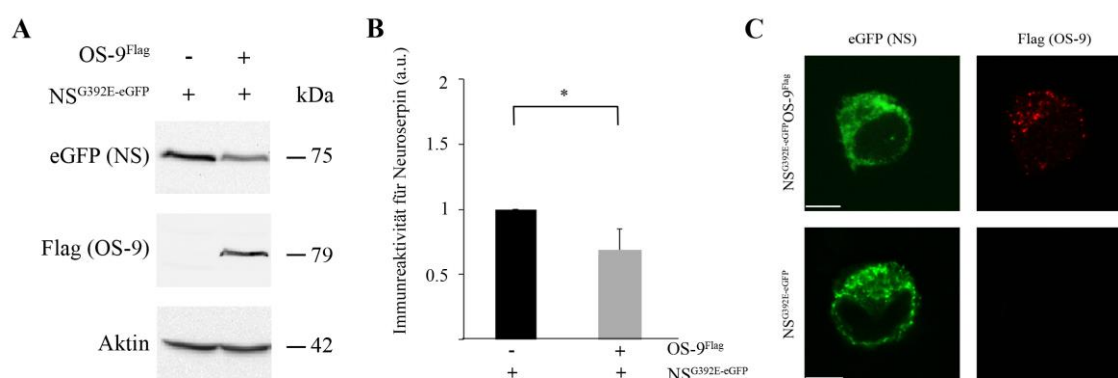
Zelllysate von HEK-293-Zellen mit stabiler Expression von NS<sup>WT-eGFP</sup> oder NS<sup>G392E-eGFP</sup> wurden mit Flag-markiertem OS-9 transfiziert. Im Anschluss erfolgte die Immunpräzipitation, indem OS-9 mit einem Antikörper gegen das Flag-Tag eluiert wurde. Das Eluat wurde auf den Gehalt an OS-9 (Flag (OS-9)) und Neuroserpin (eGFP (NS)) mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Im Fall der Co-Expression mit NS<sup>WT-eGFP</sup> zeigte sich nach der Isolierung von OS-9 eine geringe Interaktion (Abb. 20, oben, Spur 2). Nach Co-Expression mit NS<sup>G392E-eGFP</sup> zeigt sich eine starke Interaktion mit OS-9 (Abb. 20, oben, Spur 3).

#### 5.10 Überexpression von OS-9 senkt Akkumulation von intrazellulärem mutiertem Neuroserpin

Um zu untersuchen, ob eine Überexpression von OS-9 einen Einfluss auf die Akkumulation von intrazellulärem mutiertem Neuroserpin hat, wurden HEK-293-Zellen mit NS<sup>G392E-eGFP</sup> und Flag-markiertem OS-9 oder Leervektor co-transfiziert. Abschließend wurden die Zelllysate in einer Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen das eGFP- bzw. Flag-Tag auf ihren Gehalt an mutiertem Neuroserpin (mNS) und OS-9 untersucht (Abb. 21, NS und OS-9). Als Ladekontrolle diente der Nachweis von intrazellulärem Aktin (Aktin). Im Fall der Co-Transfektion von mutiertem Neuroserpin mit OS-9 zeigte sich eine signifikante Abnahme der Immunreaktivität von Neuroserpin in Relation zur Signalintensität von Aktin (Aktin) (Abb. 21, B,\*).



Die Färbung von mutiertem Neuroserpin veranschaulicht gefundene Unterschiede der Signalintensitäten (Abb. 21, C).



**Abbildung 21: Überexpression von OS-9 senkt Menge von intrazellulärem mutiertem Neuroserpin**

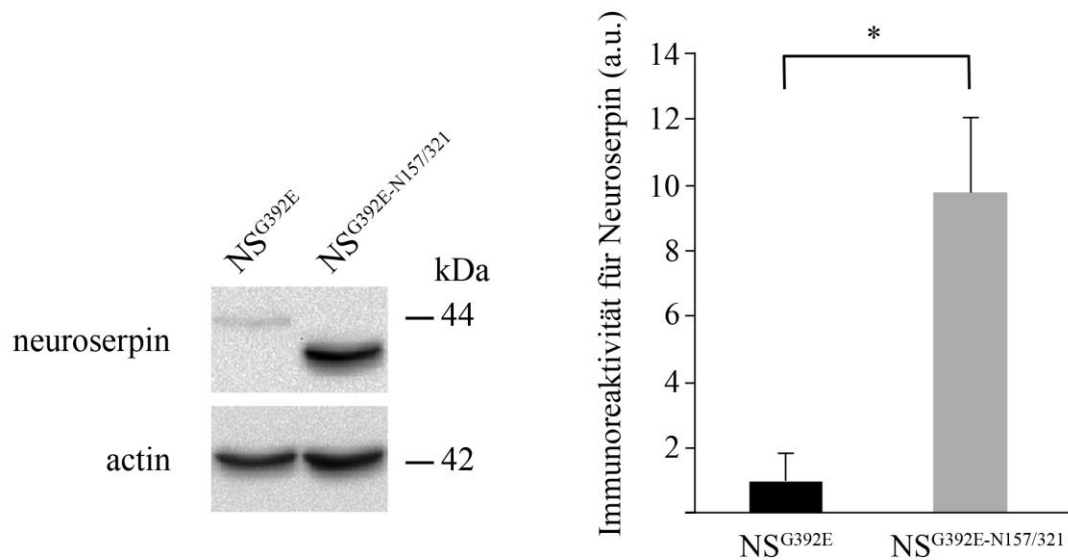
(A) HEK-293-Zellen wurden co-transfiziert mit NS<sup>G392E</sup>-eGFP und Flag-markiertem OS-9 oder Leervektor. Die Zellysate wurden mittels Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen die jeweiligen Tags auf ihren Gehalt an mutierten Neuroserpin (eGFP (NS)) und OS-9 (Flag (OS-9)) untersucht. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von intrazellulärem Aktin (Aktin).

(B) Das Diagramm zeigt die Quantifizierung von 3 unabhängigen Experimenten (\*: n=3, t-Test, p≤0,05). (C) Die Färbung von mutiertem Neuroserpin veranschaulicht gefundene Unterschiede der Signalintensitäten. (Maßstabsbalken entspricht 10 μm)

**5.11 Mutiertes Neuroserpin mit nichtfunktionalen N-Glykosylierungsstellen zeigt eine stärkere Tendenz zur intrazellulären Aggregation.**

HEK-293-Zellen mit einer stabilen Expression von NS<sup>G392E</sup> wurden mittels ortsgerechter Mutagenese an zwei N-Glykosylierungsstellen verändert, so dass keine N-glykosidische Verbindung mehr erfolgen konnte. Die Tendenz zur intrazellulären Akkumulation dieser neuen Mutante (NS<sup>G392E-N157/321</sup>) wurde verglichen mit unverändertem NS<sup>G392E</sup> (Abb. 22). 24 Stunden nach der Transfektion mit den jeweiligen Neuroserpin-Konstrukten wurden die Zellen geerntet und anschließend mittels einer Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Neuroserpin auf ihren Gehalt an mutiertem Neuroserpin untersucht (Abb. 22, NS<sup>G392E</sup> oder NS<sup>G392E-N157/321</sup>). Als Ladekontrolle diente der Nachweis von intrazellulärem Aktin (Aktin). Das Diagramm zeigt die Intensitätswerte für Neuroserpin in Relation zu Aktin für die FENIB-Mutante

(Abb. 22, NS<sup>G392E</sup>) und für die Variante mit geänderten N-Glykosylierungsstellen (Abb. 22, NS<sup>G392E-N157/321</sup>).



**Abbildung 22: Gesteigerte Tendenz der intrazellulären Aggregation von Neuroserpin mit G392E-Mutation und nichtfunktionalen N-Glykosylierungsstellen**

Die 293-Zelllysate wurden nach Transfektion mit NS<sup>G392E</sup> oder NS<sup>G392E</sup> mit veränderten N-Glykosylierungsstellen auf ihre Immunreaktivität gegenüber intrazellulärem Neuroserpin mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von intrazellulärem Aktin (Aktin). Das Diagramm rechts zeigt die densitometrische Quantifizierung von vier unabhängigen Experimenten (\*: n=4, t-Test, p≤0,05).

### 6 Diskussion

Neurodegenerative Erkrankungen und Demenzerkrankungen zeigen, bedingt durch den demografischen Wandel, eine deutliche Zunahme an Betroffenen. In der Bundesrepublik Deutschland ist bis 2050 mit einer Verdoppelung der Prävalenz zu rechnen (Ziegler et al. 2009). Bei vielen Demenzerkrankungen bilden sich Ablagerungen von fehlgefalteten Proteinen, welche intermolekulare Verbindungen eingehen und durch Aggregate das Gleichgewicht zwischen Proteinproduktion und Abbau (Proteostase) stören (Carrell et al. 1997; Lomas et al. 2002). Verschiedene neurodegenerative Erkrankungen zeigen dabei in einer frühen Phase intrazelluläre Proteinaggregationen, deren Zusammensetzung und Verteilung für die jeweilige Erkrankung charakteristisch sind. Warum unterschiedliche Subpopulationen von Neuronen bei den einzelnen Erkrankungen empfindlicher auf eine Störung der Proteostase reagieren, welche Stressoren jeweils vorherrschen und wie Neurone einer Proteinaggregation entgegenwirken, ist Gegenstand aktueller Forschung (Barker et al. 2012). FENIB ist eine autosomal-dominant vererbte Demenzerkrankung, bei der Mutationen im Gen für Neuroserpin, einem neuronalen Serinprotease-Inhibitor, zur Aggregation innerhalb des ERs und in der Folge zu Neurodegeneration und vorzeitiger Demenz führen. Die intrazellulären Aggregate treten bei FENIB bereits in der asymptomatischen Phase auf und zeigen einen antiproportionalen Zusammenhang ihrer Anzahl zu Beginn und Schwere der Symptomatik (Gooptu et al. 2009). Diese Abhängigkeit der Symptomatik vom Schweregrad der Störung der Proteostase und die bekannte kristallografische Struktur und Mechanismen der Polymerbildung von mutiertem Neuroserpin machen FENIB zu einer idealen Modellerkrankung für neurodegenerative Erkrankung (Carrell 2005; Ekeowa et al. 2010).

#### **FENIB – ein Modell für Konformationserkrankungen**

Die eindruckliche Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp bei FENIB konnte auch in Zell- und Tiermodellen gezeigt werden (Miranda et al. 2004; Galliciotti et al. 2007; Takasawa et al. 2008). Zunächst wurde ein COS-7-Zellmodell von FENIB entwickelt, um die Prozessierung von Neuroserpin-Wildtyp und S49P sowie S52R-Mutation zu untersuchen (Miranda et al. 2004). Diese Zellen zeigten nach transienter Transfektion eine Aggregation von mutiertem Neuroserpin innerhalb des ERs. Polymere der beiden

mutierten Formen wurden sowohl im Zelllysats als auch im Kulturmedium gefunden, wobei die eingeschränkte Sekretion bei der S52R-Variante im Vergleich zur weniger destabilisierenden S49P-Mutante weiter vermindert war (Miranda et al. 2004). In dieser Arbeit wurde ein HEK-293-Zellmodell der am stärksten polymerisierende FENIB-Mutation G392E benutzt. Die Western-Blot-Analyse für Neuroserpin von Zelllysats und Medium zeigt im Fall von Neuroserpin-Wildtyp eine Sekretion in das Kulturmedium, während bei der G392E-Variante keine Bande im Medium zu detektieren ist (Abb. 11, NS<sup>G392E</sup>, M). Dies spricht für eine vollständige Aggregation des mutierten Neuroserpins innerhalb der Zelle, ein Effekt, der bereits an einem COS-7-Zellmodell beschrieben wurde (Miranda et al. 2008). In der Western-Blot-Analyse zeigte sich weiter, dass die Bande für Neuroserpin-Wildtyp im Kulturmedium in einer Fraktion mit höherer Molekülmasse im Vergleich zur intrazellulären Form zu finden war (Abb. 11, NS<sup>WT</sup>, C und M). Diese Erhöhung der Molekülmasse von Neuroserpin während der Sekretion kann durch einen Transfer von komplexen Zuckerketten im Golgi-Apparat erklärt werden. Durch die relativ schnelle Sezernierung nach Verbindung mit den komplexen Oligosacchariden erscheint das Signal dieser Fraktion nicht in der Spur für Zelllysats, sondern nur im Kulturmedium.

Für die verwendeten C-terminal eGFP-markierten Neuroserpinkonstrukte zeigte sich im Vergleich zu nicht markiertem Neuroserpin ein äquivalentes Verhalten in der Western-Blot-Analyse (Vgl. Abb. 11 und 12). Jedoch ist die oben beschriebene Verschiebung der Molekülmasse bei der in das Kulturmedium sezernierten Wildtyp-Variante weniger deutlich (Abb. 12, NS<sup>WT-eGFP</sup>, M). Eine mögliche Erklärung liegt in der durch das eGFP-Tag erhöhten Molekülmasse für das Neuroserpin-Molekül, welches dadurch in einem SDS-Gel in einem Bereich geringerer räumlicher Auftrennung zu finden ist.

In der Untersuchung mit einem Konfokalmikroskop zeigte sich eine gleichförmige, intrazelluläre Verteilung von NS<sup>WT-eGFP</sup>, das eine Kolo-kalisation mit dem ER-Marker-Protein PDI zeigt (Abb. 13, NS<sup>WT-eGFP</sup>). Dieses Verteilungsmuster ist für ein sekretorisches Glykoprotein typisch und wurde in anderen Zellmodellen von FENIB beschrieben (Miranda et al. 2004). Im Falle der eGFP-markierten G392E-Mutante zeigten sich nach Transfektion intrazelluläre Inklusionen von Neuroserpin (Abb. 13, NS<sup>G392E-eGFP</sup>), wie sie bereits durch Versuche an verschiedenen Tier- und Zellmodellen von FENIB bekannt sind (Miranda et al. 2004; Galliciotti et al. 2007; Takasawa et al. 2008). Diese Aggregate von NS<sup>G392E-eGFP</sup> zeigten ebenfalls eine Kolo-kalisation mit dem

ER-Marker PDI; ein Hinweis auf ihre Lokalisation innerhalb des ERs (Abb. 13, Merge). Die Lokalisation der Aggregate innerhalb des ERs wurde ebenfalls in Maus- und Zellmodellen der S49P-Mutante gezeigt und ist im Einklang mit den mikroskopischen Untersuchungen von Gewebe betroffener Patienten (Davis et al. 1999; Miranda et al. 2004; Galliciotti et al. 2007). Somit zeigen Modellsysteme bei FENIB ein adäquates Abbild der humanen Erkrankung und beschreiben die Pathophysiologie verschiedener Konformationserkrankungen.

Die Untersuchung dieser Modelle kann Einblicke in die zellulären Signalwege liefern, die einer intrazellulären Proteinaggregation und drohendem Zelluntergang entgegenwirken (Roussel et al. 2011).

### **ER-Lektin OS-9 und der Abbau fehlgefalteter Proteine via ERAD**

Innerhalb des ERs existiert ein komplexes Qualitätskontrollsystem, um einer Aggregation von fehlgefalteten Proteinen entgegenzuwirken. Dabei unterstützen Chaperone und Lektine den Faltungsvorgang der naszenten Proteine und können diese im Falle einer persistierenden Fehlfaltung, in einem Vorgang der ER-assoziierte Degradation (ERAD) genannt wird, dem Abbau im Ubiquitin-Proteasom-System zuführen (Ellgaard et al. 2003; Caramelo et al. 2008). Eine Schlüsselrolle am Ende dieses Qualitätskontrollsystem hat das ER-Lektin OS-9, welches als Substratrezeptor für ERAD fungiert und terminal fehlgefaltete Proteine am Status der Oligosaccharidketten erkennt und dem HRD1-SEL1-Transportprotein zuführt (Lederkremer 2009). Nach Transfer in das Zytosol wird das fehlgefaltete Protein ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut. Um eine mögliche Interaktion von mutiertem Neuroserpin mit OS-9 zu untersuchen, wurde zunächst ein N-terminal Flag-markiertes OS-9 kloniert und dessen Expression nach Transfektion in HEK-293-Zellen untersucht. Nach Western-Blot-Analyse des Zelllysates zeigte sich ein mit der eingesetzten Plasmid-DNA-Menge ansteigendes Signal in der Immundetektion mit einem Anti-Flag-Antikörper (Abb. 15). In der Untersuchung der intrazellulären Verteilung mittels Konfokalmikroskop zeigte sich eine Kollokalisierung von OS-9 mit dem ER-Marker-Protein PDI (Abb. 16, Merge). Diese Lokalisation innerhalb des ERs wurde für das native, nicht Flag-markierte OS-9 in HeLa-Zellen beschrieben (Christianson et al. 2008).

### **Beteiligung von OS-9 am Abbau von mutiertem Neuroserpin via ERAD**

Der proteasomale Abbau von mutiertem Neuroserpin via ERAD wurde in Zellkulturversuchen mit PC-12 und COS-7-Zellen sowie in einem Mausmodell von FENIB gezeigt (Miranda et al. 2004; Kroeger et al. 2009; Schipanski 2011). Dabei zeigte sich nach pharmakologischer bzw. in den Mäusen induzierte Blockade des proteasomalen Abbaus eine Zunahme der Inklusionsdichte von mutiertem Neuroserpin. Es wird vermutet, dass durch ERAD besonders der lösliche, noch nicht polymerisierte Anteil des mutierten Neuroserpins abgebaut wird (Kroeger et al. 2009). Die Substraterkennung von mutiertem Neuroserpin könnte durch ER-Lektine wie OS-9 und XTP3-B innerhalb des ERs erfolgen. Neuere Untersuchungen haben eine Interaktion dieser Lektine mit einer Variante von  $\alpha 1$ -Antitrypsin-NHK (NHK) gezeigt, bei der ein vorzeitiges Stoppcodon zur Trunkierung und ER-Retention des Serpins führt (Siefers et al. 1988; Christianson et al. 2008). Voraussetzung für eine effiziente Erkennung der fehlgefalteten Proteine durch diese Lektine und damit für einen proteasomalen Abbau via ERAD sind vorhandene Oligosaccharide (Bernasconi et al. 2008; Hosokawa et al. 2009). Daher wurde durch Verdau mit EndoH oder PNGaseF der Glykosylierungsstatus von Zelllysaten nach Transfektion mit Neuroserpin-Wildtyp und G392E-Mutant untersucht. Beide Formen von Neuroserpin besitzen Glykosylierungen vom mannosereichen Typ, da nach dem Verdau durch EndoH eine Erhöhung der Mobilität nach Auftrennung durch SDS-Page nachweisbar ist (Abb. 14).

Weiter wurde untersucht, wie sich das Akkumulationsverhalten von Neuroserpin der Mutation G392E ändert, wenn die N-Glykosylierungsstellen durch ortsgerichtete Mutagenese unbrauchbar gemacht wurden. In der Konsequenz ist eine um den Faktor 9,75 gesteigerte Aggregation von NS innerhalb von HEK-293-Zellen festzustellen (Abb. 22, Diagramm).

Um eine Interaktion von mutiertem G392E-Neuroserpin mit dem ER-Lektin OS-9 zu untersuchen, wurde zunächst eine Co-Transfektion von OS-9 und Neuroserpin in HEK-293-Zellen durchgeführt (Abb. 17). Dabei zeigt sich in der Immundetektion ein Signal für beide Konstrukte (Abb. 17, OS-9 und NS). In der Kolokalisationsanalyse mit einem Konfokalmikroskop zeigte sich eine Überlagerung der Bildsignale im Falle von mutiertem Neuroserpin mit OS-9, jedoch nicht bei Co-Transfektion mit der Wildtyp-Form (Abb. 18, Merge). Dies spricht für eine räumliche Beziehung zwischen OS-9 und der mutierten Form von Neuroserpin, bei der es in mehreren Untersuchungen Anzeichen

auf eine Verzögerung des Faltungsprozesses gibt (Takehara et al. 2010; Belorgey et al. 2011). Die randbetonte Verteilung von OS-9 innerhalb der Zelle bei Co-Transfektion mit Neuroserpin-Wildtyp (Abb. 18, oben, Mitte) könnte durch eine teilweise Sekretion OS-9 bei Überexpression erklärt werden. Entgegen der Hefehomologe besitzen OS-9 und XTP3-B keine ER-Retentionssequenz und werden im Lumen des ERs am ehesten durch Interaktion mit Substrat oder Bindungspartnern zurückgehalten, deren Verfügbarkeit jedoch limitiert ist. (Christianson et al. 2008; Hosokawa et al. 2009). Um zu überprüfen, ob die Interaktion auch innerhalb des ER stattfindet, wurde eine weitere Kolokalisationsanalyse durchgeführt, bei der als dritte Komponente die ER-ständige Proteinsequenz KDEL immunhistochemisch angefärbt wurde (Abb. 19). Im Anschluss wurde untersucht, ob mutiertes Neuroserpin auch an OS-9 bindet. Hierfür wurde nach Co-Transfektion von OS-9 und Neuroserpin in HEK-293-Zellen eine Co-Immunpräzipitation (Co-IP) durchgeführt (Abb. 20). Dabei zeigte sich eine selektive Bindung von OS-9 an mutiertes Neuroserpin (Abb. 20, NS<sup>G392E-eGFP</sup>). Neuroserpin-Wildtyp zeigte auch sehr geringe Interaktion mit dem ER-Lektin (Abb. 20, NS<sup>WT-eGFP</sup>). Ein Effekt, der möglicherweise durch einen geringen Anteil an getrimmten Oligosaccharidketten bei der Überexpression des Serpin zu erklären ist (Mikami et al. 2010). Im Anschluss wurde der Einfluss einer Überexpression von OS-9 auf den Umsatz von mutiertem Neuroserpin via ERAD untersucht (Abb. 21). Dabei zeigte sich eine signifikante Senkung des intrazellulären Anteils von mutiertem Neuroserpin im Falle einer Co-Transfektion mit OS-9 im Vergleich zur Transfektion mit einem Leervektor (Abb. 21, Diagramm). Nach Veränderung der N-Glykosylierungsstellen von Neuroserpin der FENIB-Mutante (NS<sup>G392E-NM</sup>) kommt es zu einer deutlich gesteigerten intrazellulären Anreicherung dieser Neuroserpin-Variante. Möglicherweise ist durch die fehlenden Oligosaccharidketten keine Erkennung durch Lektine des ERAD-Systems möglich und führt in der Konsequenz durch verminderten Abbau im Proteasom zu einer enormen Steigerung der Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen innerhalb des ERs (Abb. 22, Diagramm).

Zusammenfassend wurde ein Zellmodell von FENIB auf die Beteiligung von ERAD untersucht. Dabei wurde der Schwerpunkt auf eine Beteiligung des ER-Lektins OS-9 am proteasomalen Abbau von mutiertem Neuroserpin gelegt. Es wurde gezeigt, dass in einem HEK-293-Zellmodell Neuroserpin mit Mutation G392E-Aggregate innerhalb des ERs bildet, während die Wildtyp-Form eine gleichmäßige Verteilung zeigt. Nach

Transfektion mit OS-9 in HEK-293-Zellen zeigte sich ebenfalls eine Verteilung innerhalb des ERs. In der Kolkalisationsanalyse wurde die räumliche Beziehung von mutiertem Neuroserpin mit OS-9 innerhalb des ERs untersucht. Ein weiterer Hinweis für die Interaktion des ER-Lektins OS-9 an mutiertes Neuroserpin in diesem Modell ist die selektive Präzipitation in der Co-IP. Funktionell konnte der Spiegel an intrazellulärem, mutiertem Neuroserpin durch eine Überexpression von OS-9 gesenkt werden.

Weitere Untersuchungen an intrazellulären Signalwegen, die einer Proteinaggregation entgegenwirken, können hoffentlich in Zukunft zu einem besseren Verständnis neurodegenerativer Erkrankungen führen und liefern möglicherweise Ansatzpunkte einer kausalen Therapie.



## 7 Appendix

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 14: Liste der verwendeten Abkürzungen**

<b>Verwendete Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
a.u.	Unskalierte Einheiten (engl.: arbitrary units)
APS	Ammoniumpersulfat
AT III	Antithrombin III
bp	Basenpaar
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECL	enhanced chemiluminiscence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endoglycosidase H (EndoH)	Roche, Mannheim
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziiertes Proteinabbau
ERQC	ER-Protein-Qualitätskontrolle-Kompartiment
FBS	Fetales Kälberserum (engl.: Fetal Bovine Serum)
FENIB	Familiäre Enzephalopathie mit Neuroserpin-Einschlüssen
G	Gravitationskraft
g	Gramm
GFP, eGFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HRP	Meerrettichperoxidase
kb	kilo base (= 1000 bp)
kDa	kilo Dalton (=1000 Da)
L	Liter
LDL	Low Density Lipoprotein
M	Mol
M*	Intermediärprodukt
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter

## Appendix

Verwendete Abkürzung	Bedeutung
mM	Millimol
NCBI	National Center for Biotechnology Information, USA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NS	Neuroserpin
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAS	Periodic acid-Schiff reaction
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pH-Wert
PI12	Proteaseinhibitor 12
PNGaseF	Peptid N-glycosidase F
RCL	Reaktive Schleife
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumlaurylsulfat
Serpin	Serin-Protease-Inhibitor
SS	Signalsequenz
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tPA	gewebespezifischer Plasminogenaktivator
U	Unit (Enzymaktivität)
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
UPR	unfolded protein response
V	Volt
WT	Wildtyp

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inhibitionsmechanismus der Serpine .....	10
Abbildung 2: Mögliche Reaktionen bei der Inhibierung von Proteasen durch Serpine..	11
Abbildung 3: Verteilung pathogener Mutationen bei verschiedenen Serpinopathien .....	13
Abbildung 4: Klassisches Modell der Polymerbildung bei Serpinopathien .....	14
Abbildung 5: Alternatives Modell der Polymerbildung bei Serpinopathien.....	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung von humanem Neuroserpin .....	16
Abbildung 7: Lokalisation pathogener Mutationen verschiedener FENIB-Varianten....	20
Abbildung 8: Übersicht der Eigenschaften verschiedener FENIB-Mutationen.....	21
Abbildung 9: Übersicht der verschiedenen Teilabschnitte bei ERAD .....	24
Abbildung 10: Substraterkennung bei ERAD und Aufgabe von OS-9.....	27
Abbildung 11: Mutiertes Neuroserpin wird nicht sezerniert .....	47

## Appendix

---

Abbildung 12: Mutiertes Neuroserpin mit eGFP-Tag wird nicht in das Zellmedium sezerniert .....	48
Abbildung 13: Neuroserpin zeigt Kollokalisierung mit dem ER-marker PDI .....	49
Abbildung 14: Mutiertes Neuroserpin besitzt Glykosylierung vom mannosereichen Typ .....	50
Abbildung 15: Expression von OS-9 in HEK-293-Zellen nach transienter Transfektion.....	51
Abbildung 16: OS-9 zeigt Kollokalisierung mit dem ER-marker PDI .....	52
Abbildung 17: Co-Transfektion von OS-9 und Neuroserpin in HEK-293-Zellen.....	53
Abbildung 18: Mutiertes Neuroserpin zeigt Kollokalisierung mit OS-9 .....	54
Abbildung 19: Kollokalisationsanalyse von Neuroserpin, OS-9 und ER-Markerprotein KDL .....	55
Abbildung 20: Co-Immunpräzipitation von OS-9 und Neuroserpin.....	56
Abbildung 21: Überexpression von OS-9 senkt Menge von intrazellulärem mutiertem Neuroserpin.....	57

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte und Software .....	28
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmittel für die DNA-Analytik .....	29
Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion.....	30
Tabelle 4: Verwendete Plasmide .....	30
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmittel für die Proteinanalytik .....	31
Tabelle 6: Verwendete primäre Antikörper für Immundetektion .....	32
Tabelle 7: Verwendete sekundäre Antikörper für die Immundetektion.....	32
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmittel für die Zellkultur .....	32
Tabelle 9: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmittel für die Fluoreszenzfärbung .....	33
Tabelle 10: Zusammensetzung eines Standard-Ansatzes zur Polymerase-Kettenreaktion .....	34
Tabelle 11: Reaktionsbedingungen für die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion .....	34

Tabelle 12: Reaktionsbedingungen für die Durchführung der ortsgerichteten Mutagenese .....	35
Tabelle 13: Reaktionsbedingungen für die Durchführung eines Restriktionsverdaus mit Endonukleasen .....	35
Tabelle 14: Liste der verwendeten Abkürzungen .....	65

## 8 Danksagung

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Professor Glatzel für die Möglichkeit an seinem Institut promovieren zu können. Mein Dank für ihr Engagement und die gemeinsame Zeit gilt den Mitarbeitern des Labors der Neuropathologie, im Besonderen Giovanna Galliciotti, Berta Puig, Angela Schipanski, Beata Szalay. Weiter möchte ich mich bei meinen Freunden und Eltern ganz herzlich für die ausdauernde Unterstützung bedanken.

## 9 Literaturverzeichnis

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;49:46852-46857.

Barker R, Kehoe PG, Love S. Activators and inhibitors of the plasminogen system in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 2012;4:865-876.

Belorgey D, Hagglof P, Karlsson-Li S, Lomas DA. Protein misfolding and the serpinopathies. *Prion* 2007;1:15-20.

Belorgey D, Irving JA, Ekeowa UI, Freeke J, Roussel BD, Miranda E, Perez J, Robinson CV, Marciniak SJ, Crowther DC, Michel CH, Lomas DA. Characterisation of serpin polymers in vitro and in vivo. *Methods* 2011;3:255-266.

Berger P, Kozlov SV, Cinelli P, Kruger SR, Vogt L, Sonderegger P. Neuronal depolarization enhances the transcription of the neuronal serine protease inhibitor neuroserpin. *Mol Cell Neurosci* 1999;6:455-467.

Bernales S, Papa FR, Walter P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;487-508.

Bernasconi R, Galli C, Calanca V, Nakajima T, Molinari M. Stringent requirement for HRD1, SEL1L, and OS-9/XTP3-B for disposal of ERAD-LS substrates. *J Cell Biol* 2010;2:223-235.

Bernasconi R, Pertel T, Luban J, Molinari M. A dual task for the Xbp1-responsive OS-9 variants in the mammalian endoplasmic reticulum: inhibiting secretion of misfolded protein conformers and enhancing their disposal. *J Biol Chem* 2008;24:16446-16454.

Briand C, Kozlov SV, Sonderegger P, Grutter MG. Crystal structure of neuroserpin: a neuronal serpin involved in a conformational disease. *FEBS Lett* 2001;1:18-22.

Caramelo JJ, Parodi AJ. Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles. *J Biol Chem* 2008;16:10221-10225.

Carrell RW. Cell toxicity and conformational disease. *Trends Cell Biol* 2005;11:574-580.

Carrell RW, Huntington JA. How serpins change their fold for better and for worse. *Biochem Soc Symp* 2003;70:163-178.

Carrell RW, Lomas DA. Conformational disease. *Lancet* 1997;9071:134-138.

Cheret J, Lebonvallet N, Misery L, Le Gall-Ianotto C. Expression of neuroserpin, a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the human skin. *Exp Dermatol* 2012;9:710-711.

Chevet E, Cameron PH, Pelletier MF, Thomas DY, Bergeron JJ. The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. *Curr Opin Struct Biol* 2001;1:120-124.

Christianson JC, Shaler TA, Tyler RE, Kopito RR. OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol* 2008;3:272-282.

Cinelli P, Madani R, Tsuzuki N, Vallet P, Arras M, Zhao CN, Osterwalder T, Rulicke T, Sonderegger P. Neuroserpin, a neuroprotective factor in focal ischemic stroke. *Mol Cell Neurosci* 2001;5:443-457.

Coutelier M, Andries S, Ghariani S, Dan B, Duyckaerts C, Van Rijckevorsel K, Raftopoulos C, Deconinck N, Sonderegger P, Scaravilli F, Vikkula M, Godfraind

C. Neuroserpin mutation causes electrical status epilepticus of slow-wave sleep. *Neurology* 2008;1:64-66.

Crowther DC. Familial conformational diseases and dementias. *Hum Mutat* 2002;1:1-14.

Davies MJ, Miranda E, Roussel BD, Kaufman RJ, Marciniak SJ, Lomas DA. Neuroserpin polymers activate NF-kappaB by a calcium signaling pathway that is independent of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 2009;27:18202-18209.

Davis RL, Holohan PD, Shrimpton AE, Tatum AH, Daucher J, Collins GH, Todd R, Bradshaw C, Kent P, Feiglin D, Rosenbaum A, Yerby MS, Shaw CM, Lacbawan F, Lawrence DA. Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies. *Am J Pathol* 1999;6:1901-1913.

Davis RL, Shrimpton AE, Carrell RW, Lomas DA, Gerhard L, Baumann B, Lawrence DA, Yepes M, Kim TS, Ghetti B, Piccardo P, Takao M, Lacbawan F, Muenke M, Sifers RN, Bradshaw CB, Kent PF, Collins GH, Larocca D, Holohan PD. Association between conformational mutations in neuroserpin and onset and severity of dementia. *Lancet* 2002;9325:2242-2247.

Davis RL, Shrimpton AE, Holohan PD, Bradshaw C, Feiglin D, Collins GH, Sonderegger P, Kinter J, Becker LM, Lacbawan 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;6751:376-379.

Doolittle RF. Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family. *Science* 1983;4622:417-419.

Ekeowa UI, Freeke J, Miranda E, Gooptu B, Bush MF, Perez J, Teckman J, Robinson CV, Lomas DA. Defining the mechanism of polymerization in the serpinopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;40:17146-17151.

Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;3:181-191.

Ellgaard L, Molinari M, Helenius A. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 1999;5446:1882-1888.

Elliott PR, Lomas DA, Carrell RW, Abrahams JP. Inhibitory conformation of the reactive loop of alpha 1-antitrypsin. *Nat Struct Biol* 1996;8:676-681.

Galliciotti G, Glatzel M, Kinter J, Kozlov SV, Cinelli P, Rulicke T, Sonderegger P. Accumulation of mutant neuroserpin precedes development of clinical symptoms in familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies. *Am J Pathol* 2007;4:1305-1313.

Galliciotti G, Sonderegger P. Neuroserpin. *Front Biosci* 2006;33-45.

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;5:e63118.

Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 1992;6355:33-45.

Gettins PG. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 2002;12:4751-4804.

Gooptu B, Lomas DA. Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies. *Annu Rev Biochem* 2009;147-176.



Hagen MC, Murrell JR, Delisle MB, Andermann E, Andermann F, Guiot MC, Ghetti B. Encephalopathy with Neuroserpin Inclusion Bodies Presenting as Progressive Myoclonus Epilepsy and Associated with a Novel Mutation in the Proteinase Inhibitor 12 Gene. *Brain Pathol* 2011;

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;52:33062-33067.

Hebert DN, Molinari M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev* 2007;4:1377-1408.

Helenius A. How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 1994;3:253-265.

Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 2001;5512:2364-2369.

Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 2004;1019-1049.

Hosokawa N. [OS-9 and XTP3-B: lectins that regulate endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD)]. *Seikagaku* 2011;1:26-31.

Hosokawa N, Kamiya Y, Kamiya D, Kato K, Nagata K. Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans. *J Biol Chem* 2009;25:17061-17068.

Hosokawa N, Wada I, Hasegawa K, Yorihuzi T, Tremblay LO, Herscovics A, Nagata K. A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* 2001;5:415-422.

Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res* 2000;12:1845-1864.

James EL, Bottomley SP. The mechanism of alpha 1-antitrypsin polymerization probed by fluorescence spectroscopy. *Arch Biochem Biophys* 1998;2:296-300.

Kamiya Y, Kamiya D, Yamamoto K, Nyfeler B, Hauri HP, Kato K. Molecular basis of sugar recognition by the human L-type lectins ERGIC-53, VIPL, and VIP36. *J Biol Chem* 2008;4:1857-1861.

Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 1999;10:1211-1233.

Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002;10:1389-1398.

Kimura Y, Nakazawa M, Yamada M. Cloning and characterization of three isoforms of OS-9 cDNA and expression of the OS-9 gene in various human tumor cell lines. *J Biochem* 1998;5:876-882.

Kroeger H, Miranda E, Macleod I, Perez J, Crowther DC, Marciniak SJ, Lomas DA. Endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) and autophagy cooperate to degrade polymerogenic mutant serpins. *J Biol Chem* 2009;34:22793-22802.

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;23:8984-8996.

Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol* 2006;5:216.

Lederkremer GZ. Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation. *Curr Opin Struct Biol* 2009;5:515-523.

Lederkremer GZ, Glickman MH. A window of opportunity: timing protein degradation by trimming of sugars and ubiquitins. *Trends Biochem Sci* 2005;6:297-303.

Lee TW, Montgomery JM, Birch NP. The serine protease inhibitor neuroserpin regulates the growth and maturation of hippocampal neurons through a non-inhibitory mechanism. *J Neurochem* 2012;4:561-574.

Loebermann H, Tokuoka R, Deisenhofer J, Huber R. Human alpha 1-proteinase inhibitor. Crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *J Mol Biol* 1984;3:531-557.

Lomas DA. Molecular mousetraps, alpha1-antitrypsin deficiency and the serpinopathies. *Clin Med* 2005;3:249-257.

Lomas DA, Carrell RW. Serpinopathies and the conformational dementias. *Nat Rev Genet* 2002;10:759-768.

Lomas DA, Evans DL, Finch JT, Carrell RW. The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 1992;379:605-607.

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;3:473-494.

Makarova A, Mikhailenko I, Bugge TH, List K, Lawrence DA, Strickland DK. 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* 2003;50:50250-50258.

Man HY, Ma XM. A role for neuroserpin in neuron morphological development. *J Neurochem* 2012;4:495-496.

Mikami K, Yamaguchi D, Tateno H, Hu D, Qin SY, Kawasaki N, Yamada M, Matsumoto N, Hirabayashi J, Ito Y, Yamamoto K. The sugar-binding ability of human OS-9 and its involvement in ER-associated degradation. *Glycobiology* 2010;3:310-321.

Miranda E, Macleod I, Davies MJ, Perez J, Romisch K, Crowther DC, Lomas DA. The intracellular accumulation of polymeric neuroserpin explains the severity of the dementia FENIB. *Hum Mol Genet* 2008;11:1527-1539.

Miranda E, Romisch K, Lomas DA. Mutants of neuroserpin that cause dementia accumulate as polymers within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2004;27:28283-28291.

Muller CM, Griesinger CB. Tissue plasminogen activator mediates reverse occlusion plasticity in visual cortex. *Nat Neurosci* 1998;1:47-53.

Noto R, Santangelo MG, Ricagno S, Mangione MR, Levantino M, Pezzullo M, Martorana V, Cupane A, Bolognesi M, Manno M. The tempered polymerization of human neuroserpin. *PLoS One* 2012;3:e32444.

Olson ST, Gettins PG. Regulation of proteases by protein inhibitors of the serpin superfamily. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2011;185-240.

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;4:2312-2321.

Osterwalder T, Contartese J, Stoeckli ET, Kuhn TB, Sonderegger P. Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *EMBO J* 1996;12:2944-2953.

Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D. Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 1993;6411:453-457.

Quan EM, Kamiya Y, Kamiya D, Denic V, Weibezahn J, Kato K, Weissman JS. Defining the glycan destruction signal for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Cell* 2008;6:870-877.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;7:519-529.

Roussel BD, Irving JA, Ekeowa UI, Belorgey D, Haq I, Ordonez A, Kruppa AJ, Duvoix A, Tamir Rashid S, Crowther DC, Marciniak SJ, Lomas DA. Unravelling the twists and turns of the serpinopathies. *FEBS J* 2011;

Santangelo MG, Noto R, Levantino M, Cupane A, Ricagno S, Pezzullo M, Bolognesi M, Mangione MR, Martorana V, Manno M. On the molecular structure of human neuroserpin polymers. *Proteins* 2012;1:8-13.

Schick C, Pemberton PA, Shi GP, Kamachi Y, Cataltepe S, Bartuski AJ, Gornstein ER, Bromme D, Chapman HA, Silverman GA. Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry* 1998;15:5258-5266.

Schipanski A. 2011. Mechanism of neuronal death in familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies (FENIB); Implications for mutant neuroserpin degradation – a study in mus musculus. Hamburg. Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg.

Schipanski A, Lange S, Segref A, Gutschmidt A, Lomas DA, Miranda E, Schweizer M, Hoppe T, Glatzel M. A novel interaction between aging and ER overload in a protein conformational dementia. *Genetics* 2013;3:865-876.

Schrimpf SP, Bleiker AJ, Brecevic L, Kozlov SV, Berger P, Osterwalder T, Krueger SR, Schinzel A, Sonderegger P. Human neuroserpin (PI12): cDNA cloning and chromosomal localization to 3q26. *Genomics* 1997;1:55-62.

Seeds NW, Basham ME, Ferguson JE. Absence of tissue plasminogen activator gene or activity impairs mouse cerebellar motor learning. *J Neurosci* 2003;19:7368-7375.

Siefers RN, Brashears-Macatee S, Kidd VJ, Muensch H, Woo SLC. A Frameshift Mutation Results in a Truncated Alpha-Antitrypsin That Is Retained within the Rough Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 1988;7330-7335.

Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remold-O'donnell E, Salvesen GS, Travis J, Whisstock JC. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 2001;36:33293-33296.

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;2:249-258.

Su YA, Hutter CM, Trent JM, Meltzer PS. Complete sequence analysis of a gene (OS-9) ubiquitously expressed in human tissues and amplified in sarcomas. *Mol Carcinog* 1996;4:270-275.

Takao M, Benson MD, Murrell JR, Yazaki M, Piccardo P, Unverzagt FW, Davis RL, Holohan PD, Lawrence DA, Richardson R, Farlow MR, Ghetti B. Neuroserpin mutation S52R causes neuroserpin accumulation in neurons and is associated with progressive myoclonus epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;12:1070-1086.

Takasawa A, Kato I, Takasawa K, Ishii Y, Yoshida T, Shehata MH, Kawaguchi H, Mohafez OM, Sasahara M, Hiraga K. Mutation-, aging-, and gene dosage-dependent accumulation of neuroserpin (G392E) in endoplasmic reticula and lysosomes of neurons in transgenic mice. *J Biol Chem* 2008;51:35606-35613.

Takehara S, Zhang J, Yang X, Takahashi N, Mikami B, Onda M. Refolding and polymerization pathways of neuroserpin. *J Mol Biol* 2010;5:751-762.

Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 1995;6547:340-344.

Vivien D, Buisson A. Serine protease inhibitors: novel therapeutic targets for stroke? *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;5:755-764.

Whisstock JC, Bottomley SP. Molecular gymnastics: serpin structure, folding and misfolding. *Curr Opin Struct Biol* 2006;6:761-768.

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;5:2576-2584.

Yamasaki M, Li W, Johnson DJ, Huntington JA. Crystal structure of a stable dimer reveals the molecular basis of serpin polymerization. *Nature* 2008;7217:1255-1258.

Yepes M, Lawrence DA. Neuroserpin: a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. *Thromb Haemost* 2004;3:457-464.

Yepes M, Lawrence DA. Tissue-type plasminogen activator and neuroserpin: a well-balanced act in the nervous system? *Trends Cardiovasc Med* 2004;5:173-180.

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;12:1571-1578.

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;2:569-576.

Ying Z, Wang H, Fan H, Wang G. The ER-associated degradation system regulates aggregation and degradation of mutant neuroserpin. *J Biol Chem* 2011;

Ziegler U, Doblhammer G. [Prevalence and incidence of dementia in Germany--a study based on data from the public sick funds in 2002]. *Gesundheitswesen* 2009;5:281-290.



## **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.

Felix Oberhauser