

# **INAUGURAL-DISSERTATION**

**Zur**  
**Erlangung der Doktorwürde**  
**der**  
**Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät**  
**der**  
**Ruprecht-Karls-Universität**  
**Heidelberg**

Vorgelegt von  
Diplom-Biologin Nina Lüdemann  
aus Eckernförde

Tag der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_\_

**NL6, ein neuer monoklonaler Antikörper zur Analyse der  
O-Glycosylierung von Neurofilament Protein M**

Gutachter: Prof. Dr. Roland Brandt  
PD Dr. Uwe Ernsberger

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Zytoskelett.....	2
1.2	Das neuronale Zytoskelett.....	8
1.3	Neurofilamente.....	9
1.4	Neurofilamente und neurodegenerative Erkrankungen.....	12
1.5	Zytoplasmatische Glycosylierung.....	13
1.6	O-GlcNAc und Erkrankungen.....	16
1.6.1	O-GlcNAc und neurodegenerative Erkrankungen.....	17
1.6.2	O-GlcNAc und Krebs.....	17
1.6.3	O-GlcNAc und Diabetes.....	18
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.1	Material und Geräte.....	21
2.1.1	Chemikalien.....	21
2.1.2	Tiere.....	21
2.1.3	Zellkultur.....	21
2.1.3.1	Eukaryontische Zell-Linien.....	21
2.1.3.2	Zellkulturmedien.....	22
2.1.3.3	Stammlösungen für Zellkultur.....	23
2.1.4	Puffer und Stammlösungen.....	23
2.1.4.1	Immunfluoreszenz-Färbung.....	23
2.1.4.2	Protein-Biochemie.....	24
2.1.4.3	Molekularbiologie.....	25
2.1.4.4	Restriktionsenzyme, DNA modifizierende Enzyme und Bakterienstämme .....	26
2.1.5	Antikörper und Immunchemikalien.....	27
2.1.6	Geräte und Materialien.....	28
2.1.6.1	Glaswaren.....	30
2.1.6.2	Plastikwaren.....	30
2.2	Methoden.....	30
2.2.1	Allgemeine Zellkultur.....	30
2.2.1.1	Lösen adhärenter Zellen mit Trypsin (Abtrypsinieren).....	31

2.2.1.2	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	31
2.2.1.3	Zellzahlbestimmung .....	31
2.2.1.4	Beschichtung von mikroskopischen Deckgläschen und Kulturschalen .....	31
2.2.1.5	Kultur von 3T3 Zellen .....	32
2.2.1.6	Kultur von humanen BE2 Zellen.....	32
2.2.1.7	Kultur von CHO Zellen .....	33
2.2.1.8	Kultur von HEK293 Zellen .....	33
2.2.1.9	Kultur von HeLa Zellen.....	33
2.2.1.10	Kultur von Neuro2A Zellen.....	34
2.2.1.11	Kultur von NT2N Zellen .....	35
2.2.1.12	Kultur von Ratten Pheochromocytoma-Zellen (PC12).....	36
2.2.1.13	Kultur von RAT1 Zellen .....	36
2.2.1.14	Kultur von SH-SY5Y Zellen .....	37
2.2.2	Spezielle Zellkultur .....	37
2.2.2.1	Transfektion mit FuGENE 6 .....	37
2.2.2.2	Präparation von Hippocampus-Schnitten .....	38
2.2.2.3	Kultur von Hippocampus-Schnitten .....	38
2.2.2.4	Mikroinjektion von NT2 Zellen in Hippocampus-Schnitte.....	39
2.2.3	Immunfluoreszenzmikroskopie .....	39
2.2.3.1	Fixierung von Zellen auf Deckgläschen.....	40
2.2.3.2	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen auf Deckgläschen.....	40
2.2.3.3	Fixierung von Hippocampus-Schnitten auf Filtereinsätzen .....	41
2.2.3.4	Immunfluoreszenzfärbung von Hippocampus-Schnitten auf Filtereinsätzen .....	41
2.2.4	Allgemeine Protein-Biochemische Methoden.....	41
2.2.4.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	41
2.2.4.2	Proteintransfer durch Elektrolot (Westernblot) .....	42
2.2.4.3	Proteintransfer durch Dotblot .....	43
2.2.4.4	Immundetektion.....	43
2.2.4.5	Strippen einer Blot-Membran.....	44
2.2.4.6	Proteinbestimmung nach Bradford.....	44
2.2.4.7	BCA Proteinbestimmung.....	45
2.2.5	Spezielle Protein-Biochemische Methoden.....	46
2.2.5.1	Präparation von Zell-Lysaten und Gewebe-Lysaten .....	46

2.2.5.2	Neurofilament-Anreicherung durch Tritonextraktion von Zellen.....	46
2.2.5.3	Neurofilament Aufreinigung aus Ratten-Rückenmark.....	47
2.2.5.4	Dephosphorylierung von Proteinen mit alkalischer Phosphatase .....	47
2.2.5.5	$\beta$ -Eliminierung von O-Glukanen auf einer PVDF-Membran.....	48
2.2.5.6	Partieller chymotryptischer Verdau von NF-Proteinen.....	48
2.2.5.7	ELISA.....	49
2.2.6	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	49
2.2.6.1	Transformation und Präparation von Plasmid-DNA.....	49
2.2.6.2	Analytischer und präparativer Restriktionsverdau .....	50
2.2.6.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	50
2.2.6.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	51
2.2.6.5	Ligation von DNA Fragmenten.....	51
2.2.7	Spezielle molekularbiologische Methoden.....	51
2.2.7.1	Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR).....	52
2.2.7.2	Klonierung von PCR-Produkten in TOPO-Vektoren.....	53
2.2.7.3	Gerichtete Mutation.....	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
3.1	Charakterisierung des NL6 Antikörper .....	55
3.1.1	Isotypbestimmung .....	55
3.1.2	Expression des NL6 Epitops in humanen Modellneuronen .....	56
3.1.3	NL6 Expression im humanen Kortex .....	61
3.1.4	Posttranslationale Modifikation des NL6 Epitops.....	64
3.1.5	Expression von humanem und murinem NF-M in unterschiedlichen Zelltypen .....	67
3.1.6	NL6 Immunreaktivität bei der Differenzierung von verschiedenen neuronalen Zelltypen .....	69
3.1.7	Einfluss modifizierender Agenzien auf die relative NL6 Immunreaktivität in Zellen .....	71
3.1.7.1	Effekt von PUGNAC - einem GlcNAcase-Inhibitor.....	71
3.1.7.2	Effekt von H7 – einem Breitbandkinase-Inhibitor .....	74
3.1.7.3	Effekt von Cyclosporin A – einem Phosphatase 2A Inhibitor .....	75
3.1.7.4	Effekt von Colchicin – einem Mikrotubuli-destabilisierendes Agens .....	76
3.1.8	Ultrastrukturelle Analyse der NL6 und M20 Immunreaktivität.....	77
3.2	Bestimmung des NL6 Epitops.....	79

3.2.1	Chymotryptischer Verdau von Neurofilamenten .....	79
3.2.2	Deletion bekannter Glycosylierungsstellen in der Schwanzdomäne.....	80
3.2.3	Deletion von Regionen mit vorhergesagten Glycosylierungsstellen.....	82
3.2.4	Epitopenalyse durch gerichtete Mutation .....	85
<i>1.1.1.1</i>	<i>3.2.5 Zusammenfassung der Epitopbestimmung und Sequenzanalyse</i>	<i>89</i>
3.3	Anwendungen des NL6 Antikörpers .....	92
3.3.1	NL6 Expression in ALS .....	92
3.3.2	Expression des NL6 Epitops bei Diabetes.....	94
3.3.3	NL6 als neuronaler Marker in Xenotransplantaten .....	96
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>100</b>
4.1	NL6 erkennt eine Glycosylierung in der KSP-Region von NF-M .....	101
4.2	Beeinflussung der Glycosylierung am NL6 Epitop.....	106
4.3	NL6 Expression in Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen.....	109
4.4	Ausblick.....	111
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Vektorkarten .....</b>	<b>116</b>
<b>8</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>121</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>138</b>

