1 Einleitung

Das Gehirn ist der Ort, der unser Verhalten steuert und der uns unsere geistige Individualität verleiht. Wir können mit ihm unter anderem Informationen unserer Umgebung verarbeiten, lernen, uns erinnern und Handlungen steuern. Dies wird durch ein präzises Netzwerk aus mehr als 100 Milliarden Nervenzellen bewerkstelligt. Die Neuronen sind dabei in signalübertragenden Bahnen und Gruppen organisiert, wobei die Kommunikation untereinander durch Synapsen erfolgt. Die Information wird dabei in Form von elektrischen Signalen weitergeleitet, die unabhängig von der Art des Reizes immer gleich sind. Der Inhalt der Information wird dabei über die Wahl der weiterleitenden Neuronen bestimmt.

Während der Embryogenese werden fast alle Neuronen geboren und migrieren an den Ort ihrer Bestimmung. Dort nehmen sie Kontakt mit anderen Neuronen auf, um Gruppen und Netzwerke zu bilden, die gemeinsam Informationen verarbeiten. Während unseres gesamten Lebens werden neuronale Verknüpfungen umorganisiert, verfeinert und neu gebildet.

Das zentrale Nervensystem besteht aber eigentlich zum kleinsten Teil aus Neuronen. Diese sind von 10 - 50 mal mehr Gliazellen umgeben, die vielseitige Funktionen ausüben, so dass sie nicht nur als Bindegewebe des Gehirns bezeichnet werden können. Zum Beispiel bilden Oligodendrozyten und Schwann Zellen das Myelin, das Axone umhüllt und so zur elektrischen Isolierung beiträgt und eine schnelle Reizleitung ermöglicht. Mikrogliazellen sind die Makrophagen des Gehirns, indem sie Zelltrümmer abgestorbener Zellen entfernen. Astrozyten regulieren Transmitter- und Kaliumionen-Konzentration im Extrazellularraum, induzieren die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke und dienen zum Teil während der Entwicklung als Leitbahnen für migrierende Neuronen.



Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Neurons.

Schon am Anfang des 20. Jahrhundert charakterisierte Ramón y Cajal einzelne Neuronen als die elementaren Einheiten des Nervensystems. Sie sind in vier morphologisch und funktional definierte Bereiche gegliedert: Zellkörper (Soma), Dendriten, Axon und präsynaptische Endigung (Abb.1.1). Das Soma enthält den Kern und ist Zentrum des Stoffwechsels. Am Zellkörper und an den baumartig verzweigten Dendriten werden in der Regel die chemischen Signale von anderen Nervenzellen empfangen, in elektrische umgewandelt und an den Axonhügel weitergeleitet. Hier werden die empfangenen Signale integriert und als Aktionspotential unverzerrt über das gesamte Axon bis zur Präsynapse geleitet. Dort wird das elektrische Signal wieder in ein chemisches umgewandelt, indem Transmitter sekretiert werden.

Das Neuron zeigt folglich durch die Einteilung in ein somatodendritisches und ein axonales Kompartiment einen charakteristischen, polaren Aufbau, der als Basis seine Funktion dient. Die strukturelle Polarität verlangt erstens, dass die Entwicklung von Fortsätzen exakt reguliert wird; d.h. nur einer der Fortsätzen entwickelt sich zum Axon und die anderen nehmen eine dendritische Morphologie an. Zweitens muss ein Mechanismus vorliegen, der es den Neuronen erlaubt sowohl zeitlich als auch örtlich definierte Verbindungen zu anderen Neuronen herzustellen. Als Drittes muss noch die Integrität des axonalen und dendritischen Kompartiments während der langen Lebenszeit eines Neurons sichergestellt werden. Die hauptsächliche intrazelluläre Determinante der neuronalen Morphologie stellt das Zytoskelett dar (für eine Übersicht: Brandt, 1998).

1.1 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett setzt sich aus einem komplexen Netzwerk von Proteinfilamenten zusammen. Dieses umfasst hauptsächlich drei Klassen: Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente, die sich in ihrem Aufbau und ihrer Funktion unterscheiden. Zudem gibt es eine Vielzahl von Proteinen, die mit den Proteinfilamenten assoziiert sind, sie miteinander und mit anderen Zellkomponenten verbinden und ihre Interaktionen und ihren Aufbau modulieren.

Die Mikrofilamente (F-Aktin) sind die kleinsten Filamente mit einem Durchmesser von 7 - 9 nm und haben eine doppelhelikale Struktur. Sie setzen sich aus dem monomeren, globulären, 42 kDa großen Protein Aktin (G-Aktin) zusammen. Aktin wurde bisher in allen eukaryontischen Zellen gefunden und seine Sequenz wurde während der Evolution stark konserviert. Das Aktinmolekül besteht aus zwei Domänen, die einen tiefen Spalt formen, der Nukleotide (ATP oder ADP) und divalente Ionen (*in vivo* wahrscheinlich Mg²⁺) bindet. Die Aktin Polymerisation wird begleitet von der Hydrolyse der gebundenen Nukleotide, obwohl diese nicht obligatorisch für den Zusammenbau der Monomere zum Polymer ist (Carlier et al., 1989). Mikrofilamente besitzen eine Polarität, die durch unterschiedliche Kinetik des Einbaus von Monomeren an den Enden entsteht. Es gibt somit ein schnell und langsam wachsendes Ende (für Übersichten: Kreis & Vale, 1999; Lodish et al., 1996).

Mikrofilamente bilden die Basis für Bewegungen in allen eukaryontischen Zellen. Im Zytoplasma liegen die Mikrofilamente in Form von linearen Bündeln, zweidimensionalen Netzwerken und dreidimensionalen Gels vor. Mikrofilamente kommen zwar in der gesamten Zelle vor, sind aber in peripheren Regionen nahe der Plasmamembran stark angereichert. Dort ist ein dreidimensionales Aktinnetzwerk über Aktin-bindende Proteine und durch direkte Bindung an integrale Membranproteine mit der Plasmamembran verankert. Dieser sogenannte Zellkortex gibt der äußeren Oberfläche der Zelle mechanische Stabilität und verleiht ihr auch die Fähigkeit zur Bewegung (z.B. Gleiten, Partikel Einschließen, Veränderung der äußeren Form) (für eine Übersicht: Bray, 1992).

Mikrotubuli sind hohle, zylindrische Polymere mit einem Durchmesser von 25 nm, die vor allem aus den heterodimeren Untereinheiten α - und β -Tubulin aufgebaut sind. Der *in vitro* Zusammenbau der Untereinheiten ist spontan, benötigt GTP, welches erst kurz nach dem Einbau in das Protofilament zu GDP hydrolysiert wird, und wird durch erhöhte Temperatur beschleunigt.

Wie Mikrofilamente sind auch Mikrotubuli polare Strukturen, wobei die beiden Enden unterschiedliche Einbauraten der Untereinheiten besitzen. Es wird zwischen einem schneller wachsenden Plus- und einem langsamer wachsenden Minusende unterschieden. In Zellen sind Mikrotubuli zumeist polar organisiert, d.h. sie weisen mit ihrem Plusende zur Außenmembran. Die Minusenden sind in der Zelle meistens mit einem Mikrotubuli-organisierendem Zentrum (MTOC) verbunden, von dem aus neue Mikrotubuli entstehen. Die bekanntesten MTOCs sind die Basalkörper an der Basis von Flagellen und die Zentrosomen, die während der Interphase an der Kernmembran verankert sind und während der Mitose zu den Spindelpolen werden (Kreis & Vale, 1999).

Zelluläre Mikrotubuli sind sehr dynamische Strukturen, denn selbst wenn der Aufbau eine scheinbare statische Phase erreicht hat, können einzelne Mikrotubuli sehr dynamisch bleiben. Diese Eigenschaft nennt man dynamische Instabilität (Mitchison & Kirschner, 1984). Folglich

können Mikrotubuli als wachsende und schrumpfende Populationen koexistieren, wobei beide Populationen statistisch in einander übergehen können.

In Eukaryonten haben Mikrotubuli vor allem zwei essentielle Funktionen. Erstens sind sie die primäre strukturelle Komponente der mitotischen Spindel, die für die Koordination der Verteilung der Chromosomen während der Mitose verantwortlich ist. Zweitens organisieren sie das Zytoplasma, indem sie vor allem "Schienen" für den Vesikeltransport bilden. Eine Vielzahl an Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs) unterstützen diese Funktionen der Mikrotubuli und stabilisieren deren Netzwerk. Zusammen mit Mikrofilamenten und Intermediärfilamenten bilden und erhalten Mikrotubuli die Architektur des Zytoplasmas, wodurch sie Zellform hauptsächlich bestimmen. Wenn man die Mikrotubuli durch Agenzien zerstört, kommt es zu starken Änderungen in der Zellform, zu einer Umverteilung von zytoplasmatischen Komponenten und zu einem Kollaps der Intermediärfilamente (für Übersichten: Kreis & Vale, 1999; Lodish et al., 1996).

In der Familie der Intermediärfilamente (IF) sind über 50 Proteine zusammengefasst, die mit sich selbst oder mit anderen IF-Untereinheiten Filamente mit einer Dicke von ca. 10 nm bilden können. Die unterschiedlichen Intermediärfilamente werden aufgrund von Sequenzhomologien und Expressionsmustern in fünf Klassen eingeordnet (Tab. 1.1).

Im Zytoplasma ziehen Intermediärfilamente von der Kernoberfläche bis zur Plasmamembran, und bilden ein dichtes Netzwerk. Im Nukleoplasma formen sie ein Geflecht, das vor allem die innere Membran der Kernhülle auskleidet.

IF-Proteine besitzen alle eine dreiteilige Sekundärstruktur mit einer charakteristischen α -helikalen Stabdomäne, die beiderseits von nicht-helikalen Domänen flankiert wird. Die Stabdomäne ist in der Familie der IFs stark konserviert und besteht aus ~310 Aminosäuren mit 38 - 40 hydrophoben, sieben Aminosäuren umfassenden Wiederholung (Ausnahme: Lamine, die sechs Wiederholungen länger sind), die notwendig für den Zusammenbau ist. Hingegen unterscheiden sich die Proteine stark in der Länge und Sequenz der Kopf- und Schwanzdomänen. Diese beiden Domänen scheinen im Filament auf der Oberfläche zu liegen und könnten somit für die gewebsspezifische Funktion von unterschiedlichen Intermediärfilamenten verantwortlich sein.

| Klasse | Proteinkomponenten | Verteilung | Filamentzusammensetzung |
|--------|--|---|---|
| I | Saure Keratine K9 - K20; Ha1 - Ha4 Basische Keratine | in den meisten epithelialen Zellen mit unterschiedlicher Expression während der Entwicklung und Differenzierung | Obligate Heteropolymere aus Klasse I + II im Verhältnis 1:1 |
| | K1 - K8; Hb1 - Hb4 Vimentin | Mesenchymale Zelltypen, transformierte Zelllinien, Tumore | |
| | Desmin | Glatter Muskel, Skelett- und Herzmuskel | Homopolymere, aber auch |
| III | GFAP Peripherin | PNS: DRG, sympathische Ganglia, craniale Nerven, ventrale Motoneuronen | Heteropolymere mit jedem Klasse III Protein und NF-L |
| | Neurofilamente | Neuronen | Obligate Heteropolymere |
| IV | α-Internexin | Neuronen (embryonal) | |
| 1 V | Nestin | transient in multipotenten, neuroektodermalen Zellen | Homopolymere |
| V | Lamine | Kernlamina in allen höheren Eukaryoten | Heteropolymere |

Tab. 1.1: Klasseneinteilung der Intermediärfilamente.

Es wird angenommen, dass die einzelnen IFs aus einer Serie von Protofilamenten gebildet werden. Das vorherrschende Model beschreibt, dass die 10 nm Filamente aus vier Protofibrillen, die im Querschnitt aus acht Proteinketten bestehen, aufgebaut sind. Jede Protofibrille baut sich wiederum aus zwei Protofilamenten mit je vier Proteinketten auf. Jedes einzelne Protofilament ist dabei aus zwei antiparallelen linearen Ketten von Proteindimeren, die parallel und hintereinander angeordnet sind, konstruiert (für Übersichten: Fuchs & Weber, 1994; Kreis & Vale, 1999).



Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von Intermediärfilamenten. Die Kästchen repräsentieren das Stabsegment eines Dimers, wobei der Pfeil die Orientierung der Polypeptidkette $(N \Rightarrow C)$ angibt. Die grauen Kästchen stehen für die mutmaßlichen Regionen, in denen sich die Stabdomänen zwischen Helix 2B des einen und der Helix 1A des anderen Dimers überlappen. Ein Protofilament besteht deshalb aus aneinandergelagerten, antiparallelen Tetrameren. Zwei Protofilamente setzen sich zu einer Protofibrille zusammen, von denen vier das 10 nm dicke Intermediärfilament bilden. (nach Fuchs & Weber, 1994)

Durch eine Vielzahl *in vivo* und *in vitro* Experimente wurde gezeigt, dass die Kopfdomäne für den Zusammenbau der Filamente von entscheidender Bedeutung ist, während der *C*-terminale Schwanz mehr an der allgemeinen Organisation des IF Netzwerks beteiligt ist (für eine Übersicht: Fuchs & Weber, 1994). Bei der Regulation sowohl des zytoplasmatischen als auch des nukleären IF Zusammenbaus spielt die Phosphorylierung eine entscheidende Rolle. Es wurde nachgewiesen, dass die *N*-terminale Domäne der IF Proteine ein Ziel für eine Reihe von Proteinkinasen (einschließlich Proteinkinase A, Proteinkinase C, CaM-abhängige Kinase II, p34^{edc2}-Kinase und Rho-Kinase) darstellt. Die *in vitro*-Phosphorylierung durch eine dieser Kinasen induziert den Abbau von Filamenten (Inagaki et al., 1989).

Die Struktur von IFs ist dynamischer als ursprünglich angenommen. Ein extremes Beispiel sind die Lamine, die während der Mitose vollständig mittels Hyperphosphorylierung abgebaut, gleichmäßig im Zytoplasma verteilt und nach der Teilung in den Tochterzellen wieder zusammengebaut werden (Peter et al., 1990). Ein kompletter Abbau des zytoplasmatischen IF Netzwerks während der Teilung ist häufig aber nicht die Regel. Das IF-Netzwerk wird vermutlich nur lokal begrenzt an der Teilungsfurche aufgelöst. Mittels

Phosphorylierungs-abhängiger Antikörper wurde gezeigt, dass die Regulation der Phosphorylierungs-gekoppelten IF-Dynamik zeitlich und örtlich kontrolliert abläuft (Tsujimura et al., 1994; Sekimata et al., 1996). Zudem gibt es einen konstanten Austausch von Untereinheiten zwischen einem löslichen Pool und den polymerisierten Filamenten, der über deren gesamte Länge ablaufen kann (Vikstrom et al., 1992).

Viele Erkrankungen, bei denen Intermediärfilamente eine Rolle spielen, sind durch extensive Bildung von IF-Aggregaten gekennzeichnet, wie z.B. die Mallory Körper in Hepatozyten von Alkoholikern (Denk et al., 1979). Basierend auf dem heutigen Wissen über die Regulation der IF-Dynamik könnte diese pathologische Situation aus der gestörten Regulation der Proteinkinasen und -phosphatasen resultieren. Dadurch würde es zu einem Ungleichgewicht von Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungs-gekoppeltem IF-Auf- und Abbau kommen.

Das Intermediärfilamentsystem ist jedoch keine isolierte Struktur in der Zelle. Es ist Teil des gesamten Zytoskeletts der Zelle. Die Interaktionen zwischen den IFs und anderen Strukturen wird zum Teil über die langen, seitlich abstehenden Schwanzdomänen (z.B. im Falle von Neurofilament M und H) oder aber durch eine Familie homologer multifunktionaler IF-assoziierter Proteine (IFAPs) vermittelt. Zu den Mitgliedern dieser Familie gehören Desmoplakin, Envoplakin, Plektin, BFAG1 ("bullous pemphigoid antigen 1") und IFAP300, die vor allem bei der Verankerung von Keratin an Desmosomen und Hemidesmosomen verantwortlich sind (Green & Jones, 1996; Schmidt et al., 1994). Seifert und Kollegen (1992) zeigten, dass es in Fibroblasten eine Verbindung zwischen Mikrofilamenten und dem IF Vimentin gibt, die wahrscheinlich durch IFAPs vermittelt wird. Eine Verbindung zwischen einzelnen IFs sowie IFs und Mikrotubuli wurde nachgewiesen und scheint über Plektin vermittelt zu werden (Svitkina et al., 1996). Zudem wurde eine neuronale Form des bpag1 Genprodukts, BPAG1n, gefunden, das vermutlich zur Bindung von Mikrofilamenten an Neurofilamenten in der Lage ist (Yang et al., 1996). Sowohl BPAG als auch Plektin verfügen über eine N-terminale Aktinbindedomäne und eine C-terminale IF-Bindungsdomäne (McLean et al., 1996; Brown et al., 1995).

Eine der offensichtlichsten Funktionen von Intermediärfilamenten ist die mechanische Stabilisierung von Zellen und Geweben. Zerstört man die Struktur von IFs in Zellen z.B. durch Mikroinjektion von inhibitorischen Peptiden in Fibroblasten, kommt es zum Zusammenbruch des IF-Zytoskelettsystems und zur Deformierung der Zellen. Dies beweist, dass die intakte IF-Struktur für die Aufrechterhaltung der Zellform und mechanische Integrität der Zelle notwendig ist (Goldman et al., 1996).

1.2 Das neuronale Zytoskelett

Das Zytoskelett von Neuronen setzt sich hauptsächlich aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Neurofilamenten zusammen, wobei die Neurofilamente erst im Laufe der Differenzierung exprimiert werden. Bei der Morphogenese von Neuronen interagiert das Aktinfilamentsystem, das unter der Plasmamembran angereichert ist, mit dem zytoplasmatischen Mikrotubuli-System, um Fortsätze zu bilden. Untersuchungen an embryonalen Neuronen aus dem Hippocampus der Ratte zeigten, dass Neuronen ihre charakteristische Morphologie durch eine stereotype Abfolge von Zwischenschritten entwickeln (Goslin & Banker, 1989, 1991). Im ersten Schritt bilden frisch ausplattierte Neuronen eine Vielzahl an morphologisch nicht unterscheidbaren kurzen Fortsätzen aus. In einem zweiten Schritt wächst einer der Fortsätze zu Dendriten, die sich verzweigen und distal verjüngen.

Dieser ganze Prozess wird entscheidend durch die Mikrotubuli und Mikrofilamente beeinflusst. Durch den gezielten Mikrotubuli-Aufbau und deren Stabilisierung durch MAPs werden neue Zellausläufer initiiert und vorhandene verlängert (Drubin et al., 1985, 1988). Außerdem muss lokal das kortikale Aktinnetzwerk umorganisiert werden, damit eine Ausstülpung der Fortsätze ermöglicht wird. Bei diesem Prozess handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel der beiden Zytoskelettsysteme und vieler assoziierter Proteine.

In adulten Neuronen sind die Mikrotubuli im Axon stark angereichert und ihre Orientierung unterscheidet sich von denen in den Dendriten. Während im Axon alle Mikrotubuli mit ihrem Plusende distal orientiert sind, weisen die Mikrotubuli der Dendriten gemischte Orientierungen auf (Bass et al., 1988). Nach der initialen Bildung der Fortsätze werden auch sukzessiv Neurofilamente in die Fortsätze transportiert, um ihnen vor allem mechanische Stabilität zu verleihen.

Die Familie der neuronalen Intermediärfilamente umfasst bei Säugern sechs Proteine: neben den drei Neurofilament (NF) Untereinheiten – NF-L (66 kDa) (Geisler et al., 1985), NF-M (95-100 kDa) (Levy et al., 1987; Napolitano et al., 1987; Myers et al., 1987) und NF-H (110-115 kDa) (Lees et al., 1988; Julien et al., 1988) – werden auch α -Internexin (~60 kDa) (Kaplan et al., 1990), Peripherin (~50 kDA) (Thompson & Ziff, 1989) und Nestin (~200 kDa) (Lendhal et al., 1990) neuronal exprimiert. Mit Ausnahme von Peripherin (Klasse III) gehören alle neuronalen Intermediärfilamente der Klasse IV an (Fuchs & Weber, 1994).

Die Neurofilament-Proteine kommen in allen Säuger-Neuronen vor, während α -Internexin und Peripherin nur in einer Subpopulation von terminal differenzierten Neuronen exprimiert wird. α -Internexin wurde zuerst aus dem optischen Nerv und dem Rückenmark von Ratten als IF-Bindeprotein isoliert (Pachter & Liem, 1985) und erst später als eigentliches IF identifiziert (Kaplan et al., 1990; Chien & Liem, 1994). Es wird in vielen ZNS und PNS Neuronen zum Teil parallel zu Neurofilamenten exprimiert. Dabei ist α -Internexin in den Neuronen mit kleinerem Axondurchmesser abundanter als NFs. In Neuronen mit größerem Axondurchmesser verhält es sich umgekehrt (Fliegner et al., 1994).

Die Expression von Peripherin ist auf Neuronen mit Neuralleisten-Herkunft begrenzt und solchen, deren Axone sich außerhalb der zentralen neuralen Achse erstrecken (Parysek & Goldman, 1988; Escurat et al., 1990). In peripheren sensorischen und autonomen Ganglia exprimieren die Neuronen mit größtem Axondurchmesser ausschließlich NFs und die Neuronen mit kleinstem nur Peripherin. Neurone mit mittleren Axondurchmesser exprimieren beide Proteine nebeneinander (Gorham et al., 1990; Troy et al., 1990; Goldstein et al., 1991).

Im Gegensatz zu den anderen neuronalen Intermediärfilamenten ist Nestin nur eine transient exprimierte Komponente von neuronalen Zellen, da es nur in multipotenten, neuroektodermalen Zellen vor der terminalen Differenzierung auftritt (Lendhal et al., 1990; Zimmermann et al., 1994). Diese Zellen können sich nicht nur in Neuronen, sondern auch in Oligodendrozyten und Astrozyten differenzieren. Nestin ist das größte bekannte Intermediärfilament-Protein mit sehr kurzer Kopfdomäne (11 Aminosäuren) und einer 1485 Aminosäuren umfassenden, stark sauren Schwanzdomäne.

1.3 Neurofilamente

Die drei Neurofilament-Proteine wurden aufgrund ihrer Häufigkeit in Säuger-Neuronen als erste Neuronen-spezifische Intermediärfilamente identifiziert (Hoffman & Lasek, 1975). Sie reichern sich vor allem in großen myelinisierten Neuronen an, wobei sie 5- bis 10-fach häufiger als Mikrotubuli vorkommen.

Neurofilamente sind obligate Heteropolymere, da NF-M und NF-H ohne NF-L nicht in der Lage sind, sich zu Filamenten zusammenzufügen (Geisler & Weber, 1981; Gardner et al., 1984; Balin & Lee, 1991; Balin et al., 1991). NF-L bildet zellfrei hingegen glatte 10 nm dicke Filamente (Hisanaga & Hirokawa, 1988, 1990; Hisanaga et al., 1990; Heins et al., 1993), die nicht die charakteristischen "Seitenarme" der zellulären Neurofilamente besitzen. Diese "Seitenarme" werden somit von NF-M bzw. NF-H gebildet, indem sie ihre langen Schwanzdomänen rechtwinkelig vom Filament-Rückgrat ausstrecken (Hirokawa et al., 1984). Dies ermöglicht die Quervernetzung von Filamenten und anderen Zellbestandteilen. Neurofilamente haben keine festgelegte prozentuale Zusammensetzung aus den drei Untereinheiten. So werden verschiedene Verhältnisse der Polypeptide zueinander in unterschiedlichen neuronalen Geweben und während der neuronalen Entwicklung gefunden (Pernas-Alonso et al., 1997). Man unterscheidet auch zwischen unreifen und reifen NFs, da bei der Entwicklung des ZNS erst NF-L und NF-M und zeitlich deutlich verzögert NF-H exprimiert werden. NF-L und NF-M mRNA kann bei der embryonalen Entwicklung des Mäusegehirns schon ab Embryonaltag 12-13 nachgewiesen werden, während NF-H kaum detektierbar ist und erst postnatal akkumuliert (Julien et al., 1986).

Der molekulare Aufbau des Triplett-Proteins entspricht dem anderer Intermediärfilamente (Abb. 1.3). Obwohl die Kopfdomänen der drei NFs keine auffälligen Aminosäurensequenz-Homologien aufweisen, sind sie reich an Serinen und Threoninen. Diese sind stark phosphoryliert (Sihag & Nixon, 1990, 1991) und *O*-glycosyliert (Dong et al., 1993), was vermutlich für die Regulation des Auf- und Abbaus der Filamente in der Zelle wichtig ist. Die zentrale Stabdomäne von NF-L mit einer Unterbrechung im Coil 1 ähnelt der von Klasse III IFs (Tab.1.1) (Geisler et al., 1985), während diese Domäne bei NF-M (Myers et al., 1987; Levy et al., 1987) und NF-H (Lees et al., 1988; Julien et al., 1988) eine durchgängige Helix bildet.

Am meisten aber unterscheiden sich die Untereinheiten in ihrer C-terminalen Schwanzdomäne. Diese Region ist bei NF-L sehr sauer, da sie viele Glutaminsäurereste (E-Segment; Shaw, 1991) enthält. Der Schwanz von NF-M ist länger und enthält auch einige E-Segmente und Segmente, die reich an Glutaminsäure- und Lysinresten sind. Die Schwanzdomäne von NF-H unterscheidet sich am stärksten von denen anderer IFs. Sie enthält 42 bis 51 Wiederholungen von Lysin-Serin-Prolin (KSP), wobei die Serinreste im Axon stark phosphoryliert sind (Julien & Mushynski, 1982, 1983; Carden et al., 1985; Lee et al., 1988; Elhanany et al., 1994). NF-M enthält auch einige KSP Motive, die in Axonen phosphoryliert sind (Xu et al., 1992). Ihre Anzahl und Position ist aber zwischen den Spezies nicht konserviert (Shaw, 1991). Phosphorylierungen im Schwanz von NF-M und NF-H die Interaktionen zwischen den beeinflussen drei Untereinheiten und anderen Zellkomponenten und wirken auf das axonale Wachstum und den axoplasmatischen Fluss (Nixon, 1998).



Abb. 1.3: Schematischer Aufbau der Neurofilamente mit Glycosylierung und Phosphorylierung. Dargestellt ist eine maßstabsgetreue Abbildung der NF-Proteine, wobei die Subdomänen als Kästen dargestellt sind (Farbzuordnung siehe Zeichnung). Bekannte Glycosylierungs- und Phosphorylierungstellen sind eingezeichnet. E: Glutaminsäure-reiches Segment; KSP: Lysin-Serin-Prolin Wiederholungen; KE: Lysin- und Glutaminsäure-reiches Segment.

Die Akkumulierung von Neurofilamenten beginnt während des Auswachsens von Neuriten und verstärkt sich während der Synapsenbildung und der Myelinisierung (Carden et al., 1987; Schlaepfer & Bruce, 1990). Diese zweite Wachstumsphase des Axons wird radiales Wachstum genannt, da der axonale Umfang um das bis zu 10fache zunehmen kann. Es wurde gezeigt, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen der NF-Anzahl und der Querschnittsfläche gibt (Hoffman et al., 1984). Dies deutet darauf hin, dass Neurofilamente die intrinsische Determinante des radialen Wachstums sind. Für die Funktion der Neuronen ist die Vergrößerung des axonalen Durchmessers wichtig, da dieser zusammen mit der Myelinisierung die Geschwindigkeit der Reizleitung bestimmt.

Es wird angenommen, dass Neurofilamente im Soma zusammengebaut werden, und dann mittels langsamem Transport durch das Axon bewegt werden (Hoffman & Lasek, 1975). Dabei existieren im Axon zwei unterschiedliche Pools von Neurofilamenten. Der eine wird langsam transportiert, während der andere mehr oder weniger stationär ist (Nixon & Logvinenko, 1986). Die Organisation der NFs im Axon unterscheidet sich von der im Perikaryon. Im Axon sind die NFs in regelmäßigen Abständen angeordnet, da sie durch die Brücken der langen NF-Schwanzdomänen parallel entlang des Axons organisiert werden. Im Gegensatz dazu herrscht im Perikaryon ein dreidimensionales Netzwerk vor.

1.4 Neurofilamente und neurodegenerative Erkrankungen

Abnorme Neurofilament-Ablagerungen sind pathologische Merkmale von vielen neurodegenerativen Erkrankungen wie amyotropher Lateralsklerose (ALS) (Brady, 1993), spinaler Muskelatrophie (SMA), Demenzen des Lewiskörpertyps, Alzheimer Erkrankung (Nixon, 1993) und Parkinsonscher Erkrankung (Pollanen, 1994). Auch bei der Untersuchung von verschiedenen Mauslinien mit spontanen oder induzierten neurologischen Veränderungen hat sich gezeigt, dass fehlerhafte Neurofilamente eine selektive Degeneration und den Tod von Motoneuronen hervorrufen können (Julien & Muhshynski, 1998).

Dabei sind Neurofilamente bei einigen vererbbaren Motoneuron-Erkrankungen wie ALS und SMA häufig von Krankheits-auslösenden Veränderungen betroffen (Julien, 1999). In verschiedenen sporadischen und einem familiären, autosomalen ALS Fall wurden Mutationen des NF-H Gens nachgewiesen. In neun Fällen kam es zu Codondeletionen und in einem zur Insertion von 84 Basenpaaren in die Schwanzdomäne von NF-H (Figlewicz et al., 1994; Al-Chalabi et al., 1999; Tomkins et al., 1998). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Variationen in der NF-H Schwanzdomäne als primäre Ursache für einen kleinen Prozentsatz (~1%) der ALS Fälle in Frage kommen.

In den meisten Fällen scheinen die Neurofilament-Aggregate allerdings erst sekundär zu entstehen und allmählich den axonalen Transport zu blockieren. Verschiedene Faktoren könnten dabei zu abnormen Ablagerungen von NFs führen: Fehlregulation der IF-Genexpression, Neurofilament-Mutationen, falsche Proteininteraktionen und posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Glycosylierung, Nitrierung oder Proteinvernetzung. Chou und Kollegen (1998) detektierten z.B. fortgeschrittene Glycosylierungs-Produkte in ALS assoziierten NF-Einschlüssen.

Auch Diabetes geht mit Neurodegeneration einher. Es handelt sich dabei meistens um symmetrische sensorische Neuropathien, wobei es zu einer Vielzahl von strukturellen Veränderungen der peripheren Neuronen kommt. Dies äußert sich in einer Degeneration von Axonen, paranodaler Demyelinisierung und Verlust von myelinisierten Fasern. Dies führt letztendlich zum Verlust von distalen Axonen (Thomas et al., 1992; Yagihashi, 1997). Bei Untersuchungen an diabetischen Ratten wurde derselbe Krankheitsverlauf beobachtet, wobei es zusätzlich zu einer Reduktion des Axondurchmessers kam. Da der Axondurchmesser vor

allem durch Neurofilamente bestimmt wird, wurden diese in mehreren Studien untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression von Neurofilamenten in sensorischen Neuronen (Mohiuddinet al., 1995) und der axonale Transport in Motoneuronen reduziert ist (Medori et al., 1988). Außerdem wurden abnorme Phosphorylierungen der NFs im Rückenmark und im Ischiasnerv nachgewiesen (Perkiner & McLean, 1991; Terada et al., 1998), die zu der distalen sensorischen Axopathie, die bei Diabetes auftritt, beitragen könnten.

1.5 Zytoplasmatische Glycosylierung

Lange Zeit wurde angenommen, dass Protein-Glycosylierung ausschließlich an extrazellulären und luminalen Polypeptiden erfolgt (Furukawa & Kobata, 1992). Mittlerweile ist allerdings bekannt, dass viele nukleäre und zytoplasmatische Proteine auch durch Zuckermoleküle modifiziert werden können. Dabei handelt es sich um einzelne β -N-acetylglucosamin Moleküle (O-GlcNAc), die an Hydroxylgruppen spezifischer Serinoder Threoninreste gebunden sind (Torres & Hart, 1984; Holt & Hart, 1986). Diese O-GlcNAc Modifikation kommt in nahezu allen Eukaryonten vor, wobei Tierparasiten und Viren, die Eukaryonten infizieren, eingeschlossen sind. Man vermutet, dass bis zu tausend Proteine im Nukleus und im Zytoplasma mit O-GlcNAc modifiziert sind (Hart, 1997; Haltiwanger et al., 1997) (Abb. 1.4).

Alle bisher bekannten *O*-GlcNAc-modifizierten Proteine sind auch Phosphoproteine. Dabei deuten drei Charakteristika darauf hin, dass *O*-Glycosylierung eine analoge Rolle zur Phosphorylierung bei der zellulären Regulation spielt: (1) Wie die Phosphorylierung ist *O*-Glycosylierung hoch dynamisch. Eine Veränderung der Glycosylierung erfolgt als schnelle Antwort auf zelluläre Signale oder zelluläre Zustände (Chou et al., 1992; Kearse & Hart, 1991; Roquemore et al., 1996). (2) *O*-GlcNAc wird an Stellen am Proteingerüst angebaut, die denen ähnlich sind, die durch Proteinkinasen modifiziert werden (Haltiwanger et al., 1992; Hart et al., 1996; Wells et al., 2001). (3) In einigen Fällen konnte sogar eine direkte Reziprozität von Phoshorylierung und *O*-Glycosylierung an derselben oder an benachbarten Aminosäuren gezeigt werden (Kelly et al., 1993; Chou et al., 1995). Die Beziehung zwischen Serin/Threonin *O*-GlcNAc Modifikation und *O*-Phosphorylierung scheint sehr komplex zu sein. Die spezifische Addition oder Entfernung von diesen zwei unterschiedlich regulierten posttranslationalen Modifikationen könnte eine sehr große Modulation der Proteinfunktion erlauben. Dadurch wäre es möglich die zellulären Aktivitäten sowohl mit hoher zeitlicher als auch räumlicher Genauigkeit zu koordinieren.



Abb. 1.4: Schematische Darstellung *O*-GlcNAc-modifizierter Proteine in Eukaryonten. Dargestellt ist ein Überblick über die Verteilung von *O*-GlcNAc modifizierten Proteinen in einer eukaryontischen Zelle und das Vorhandensein dieser Modifikation in Parasiten und Viren, die Eukaryonten infizieren. Praktisch alle großen zellulären Systeme sind repräsentiert, wobei eine Vielzahl von Proteinen noch nicht identifiziert sind. Dies deutet auf eine essentielle Rolle von *O*-GlcNAc in der Funktionalität der Zelle hin. (nach Comer & Hart, 2000)

Da nur wenige Proteine zur gleichen Zeit durch *O*-GlcNAc und *O*-Phosphat modifiziert sind, führte das zur Aufstellung der "Yin-Yang" Hypothese (Abb. 1.5), die besagt, das *O*-GlcNAc und *O*-Phosphat um dieselben Aminosäurereste oder Regionen auf den Proteinen kompetitieren (Ku & Omary, 1994). Dies wurde vor allem durch Studien unterstützt, in denen der Einsatz von Kinase/Phosphatase-Inhibitoren einen umgekehrten Effekt auf den Grad der Glycosylierung zeigte (Griffith and Schmitz, 1999; Lefebvre et al., 1999). Diese Daten führten zu einem Modell, in dem unterschiedlich modifizierte Formen eines Proteins existieren können.



Abb. A. 1.5: Schematische Darstellung der "Vin-Yang" Hypothese. Die "Yin-Yang" Hypothese geht davon aus, dass *O*-GlcNAc die Phosphorylierung verhindert und umgekehrt. Proteine können somit in drei verschiedenen Zuständen vorkommen: glycosyliert, phosphoryliert oder unmodifiziert, wobei der Übergang von einer Modifikation zur anderen schrittweise erfolgt. *O*-GlcNAcase - β -*N*-Acetylglucosaminidase; OGT - *O*-GlcNAc Transferase; OPO³⁻ - Phosphatgruppe; *O*-GlcNAc - β -*N*-Acetylglucosamin. (nach Zachara & Hart, 2002)

Mittlerweile konnte man die beiden Enzyme, die *O*-GlcNAc an Serin- bzw. Threoninreste anhängen und entfernen, identifizieren. β -*N*-Acetylglucosaminyltransferase (*O*-GlcNAc Transferase (OGT)) konnte aus der Rattenleber isoliert werden (Haltiwanger et al., 1992), und es wurde gezeigt, dass dieses Enzym sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus vorkommt. Die Sequenz der OGT zeigte, dass es sich nicht wie beim Prototyp der Glycosyltransferase um ein Typ 2 Membranprotein handelt (Kreppel et al., 1997). OGT (110 kDa) wird von einem einzelnen Gen ohne jede Verwandtschaft zu anderen kodiert, und seine Sequenz ist von *C. elegans* bis zum Menschen (80% Homologie) sehr stark konserviert.

Durch Mutationsexperimente konnte gezeigt werden, dass eine funktionale OGT essentiell für das Überleben von embryonalen Stammzellen und Mäusen ist (Shafi et al., 2000). Demnach sind *O*-GlcNAc Modifikationen für die zelluläre Physiologie von Eukaryonten notwendig, weshalb auch unterschiedliche Mechanismen zur Regulation der OGT Aktivität bestehen.

OGT ist in zwei funktionale Domänen, einer *C*-terminalen katalytischen und einer *N*-terminalen - 9-12 Tetratricopeptid Wiederholungen (TPRs)-enthaltenden Domäne, aufgeteilt. Die TPR Domäne, die allgemein in Protein-Protein-Interaktionen involviert ist, ist für die Trimerisierung und Stabilität der OGT wichtig (Kreppel & Hart, 1999). Außerdem ist sie für die enzymatische Aktivität gegenüber Proteinsubstraten notwendig, wobei die Substratselektivität zusätzlich durch eine Vielzahl von assoziierten Proteinen bestimmt wird. Eine weitere Regulation erfolgt über die Konzentration von UDP-GlcNAc, da das Protein mehrere K_m Werte für UDP-GlcNAc und somit unterschiedliche Glycosylierungs-Effizienzen für verschiedene Substrate besitzt. Zudem wird die OGT selbst mit *O*-GlcNAc modifiziert und an Tyrosinresten phosphoryliert (Kreppel et al., 1997). Obwohl mittlerweile viele Glycosylierungsstellen bekannt sind, konnte bis jetzt kein eindeutiges Motiv für die Glycosylierung identifiziert werden. Dong und Kollegen (1996) haben aus den bekannten Daten herausgefiltert, dass meistens ein Prolin, Valin und/oder Glutamin *N*-terminal von der Glycosylierungsstelle zu finden ist (PVQX₀₋₄(S/T)).

O-GlcNAcase (β-N-acetylglucosaminidase) oder Hexosaminidase C wurde aus der Rattenmilz isoliert (Dong & Hart, 1994) und kürzlich kloniert (Gao et al., 2001). Gao und Kollegen entdeckten außerdem ein 130 kDa großes Protein im Rindergehirn, das zuerst als mutmaßliche Hyaluronidase identifiziert wurde (Heckel et al., 1998). Allerdings wurde anhand kinetischer Daten gezeigt, dass das Enzym *O*-GlcNAc als Substrat bevorzugt.

O-GlcNAcase wird in allen Geweben exprimiert und ist vor allem im Zytoplasma zu finden (Gao et al., 2001). Es existieren zwei Splicevarianten, ein vollständiges Protein (p130) und ein kürzeres Protein (p75) mit einem anderen *C*-terminalen Schwanz. Die kürzere p75 Variante scheint vor allem im Nukleus angereichert zu sein, wobei sie aber keine aktive *O*-GlcNAcase darstellt (Wells et al., 2002). Die Ergebnisse von Wells und Kollegen zeigten, dass p130 phosphoryliert wird und Teil eines großen Proteinkomplexes ist. Dies deutet auf eine regulierte Aktivität von p130 hin.

1.6 *O*-GlcNAc und Erkrankungen

Da *O*-GlcNAc sehr verbreitet im Körper vorkommt und es vermutlich viele zelluläre Prozesse reguliert, könnten fehlerhafte Glycosylierungen zu Erkrankungen führen. Insgesamt gibt es drei große Gebiete auf denen zur Zeit erforscht wird, inwiefern *O*-GlcNAc eine Rolle bei der Entstehung und Entwicklung einer Krankheit spielt.

1.6.1 O-GlcNAc und neurodegenerative Erkrankungen

O-GlcNAc ist sehr abundant im Gehirn und ist besonders als Modifikation von Komponenten des Zytoskeletts wie Neurofilamenten, Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs), Proteinen für den Clathrin-Zusammenbau und dem " β -Amyloid precursor protein" (APP - Amyloid-Vorläufer-Protein) zu finden (Dong et al., 1996; Arnold et al., 1996; Yao & Coleman, 1998; Griffith et al., 1995). Veränderungen der *O*-GlcNAc Modifizierung bei einigen dieser Proteine könnten zum Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen beitragen. Z.B. ist das OGT Gen auf dem X Chromosom lokalisiert und teilt denselben Locus wie das Gen, welches für X-gekoppelte Parkinsondystonie verantwortlich ist (Shafi et al., 2000). Das Mikrotubuliassoziierte Protein Tau, das den Hauptbestandteil von Alzheimer Fibrillen in Gehirnen von Alzheimer Patienten darstellt, ist im normalen Gehirn mehrfach glycosyliert (Arnold et al., 1996). Während der fortschreitenden Alzheimer Erkrankung (AD) wird assoziiertes Tau jedoch hyperphosphoryliert (Alonso et al, 1996). Außerdem ist auch APP, dem das neurotoxische Spaltprodukt β -Amyloid-Peptid entstammt und das bei der AD von Bedeutung ist, durch *O*-GlcNAc modifiziert (Griffith et al., 1995).

Comer und Hart (2000) haben aufgrund dieser Daten die Hypothese aufgestellt, dass die Ursache einiger neurodegenerativer Erkrankungen im reduzierten Glucose-Metabolismus von alternden Neuronen bestehen könnte. Dies führt zu einer allmählichen Reduktion von *O*-GlcNAc Modifikationen auf Schlüsselproteinen des Zytosols und des Nukleus. Dieses fortscheitende Versagen der Addition von *O*-GlcNAc könnte nach der "Yin-Yang" Hypothese dazu führen, dass viele Proteine abnorm phosphoryliert werden, wobei sich vermutlich der Effekt bei den abundant vorhandenen Zytoskelettproteinen als erstes zeigen wird.

1.6.2 O-GlcNAc und Krebs

Bei Krebs kommt es zu unkontrollierten Zellteilungen. Sie werden dadurch ausgelöst, dass Proteine, die normalerweise Kontrollfunktionen in der Zelle ausüben, z.B. durch Mutationen ausgeschaltet sind oder falsch funktionieren. Diese Proteine werden deshalb als Onkogene bezeichnet, da sie die Tumorbildung begünstigen.

O-GlcNAc Modifikationen sind auf vielen regulatorischen Proteinen der Transkription zu finden. Mutationen bei diesen Proteinen tragen zu einem onkogenen Phänotyp bei. Dabei könnte der pathogene Mechanismus in der Unterbrechung der *O*-GlcNAc-vermittelten Regulation der Proteine liegen. Zum Beispiel ist c-Myc, ein Onkogen, an der Transaktivierungsdomäne am Threonin-58 glycosyliert (Chou et al., 1995b). Dies ist auch ein

Mutations-,,Hotspot", der zu einem hohem Prozentsatz bei Patienten mit Burkitts Lymphom identifiziert wird. Diese Glycosylierungsstelle ist gleichzeitig eine wichtige Phophorylierungsstelle, die die c-Myc Transkriptionsaktivität reguliert (Chou et al., 1995a). Weitere Onkogene, die nachweislich glycosyliert werden, sind SV40 Large T Antigen (Medina et al., 1998) und p53 (Shaw et al., 1996).

Da einige der Glycosylierungsstellen auch phosphoryliert werden, lässt sich mit Mutationsstudien nicht entscheiden, welche der Modifikationen, *O*-Phosphat oder *O*-GlcNAc, für die essentielle Funktion des Proteins verantwortlich ist. *O*-GlcNAc Modifikationen erhöhen die Komplexität der Proteinregulation, und zeigen, dass die regulatorischen Mechanismen der Zelle noch präziser als nur durch Phosphorylierung abgestimmt werden können. Eine Störung einer dieser posttranslationalen Modifikationen könnte die Kontrollmechanismen beeinflussen, und so einen transformierten Phänotyp hervorrufen.

1.6.3 O-GlcNAc und Diabetes

Diabetes mellitus Typ 1/Typ 2 ist eine chronische endokrine Störung, die durch relativen oder absoluten Insulinmangel gekennzeichnet ist. Dadurch werden die Zellen nur unzureichend mit Glucose versorgt, wodurch es zu einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels kommt. Typ 1 Diabetes ist meist angeboren oder entwickelt sich in den ersten Lebensjahren. Meist können hier die β -Zellen der Bauchspeicheldrüse kein Insulin produzieren. Typ 2 Diabetes entwickelt sich im Erwachsenenalter und ist durch eine verminderte Insulinwirkung gekennzeichnet.

In letzter Zeit hat sich herausgestellt, dass es eine Verbindung zwischen falscher Regulation von *O*-GlcNAc Glycosylierung und Diabetes gibt. Mehreren Studien zeigten, dass die Umsetzung von Glucose in Glucosamin, die im Hexosamin-Weg von Glutamin-Fructose-6-phosphat Aminotransferase (GFAT) katalysiert wird, essentiell für die Entwicklung der Insulinresistenz (Typ 2 Diabetes mellitus) ist (Marshall & Rumberger, 2000). Versuchstiere oder Zellkultursysteme, die mit erhöhten Mengen an Glucose oder Glucosamin behandelt werden, entwickeln unweigerlich eine Insulin-Resistenz (Robinson et al., 1993 a, b).

Dabei ist nicht klar, ob die erhöhte Menge an Glucosamin direkt zu einer Fehlregulation der *O*-GlcNAc-Glycosylierung oder später zu Diabetes führt. Sicher ist, dass die OGT, welche die *O*-GlcNAc Modifikation von Proteinen katalysiert, den "Spender"-Zucker UDP-GlcNAc (Endprodukt des Hexosamin-Wegs) verwendet. Die Konzentration von UDP-GlcNAc in der Zelle ist dabei abhängig vom extrazellulären Glucosespiegel (Rosetti et al., 1995; McClain & Crook, 1996). Es wurde gezeigt, dass ein erhöhter Einstrom von UDP-GlcNAc über den Hexosamin-Weg *in vivo* die Menge an *O*-GlcNAc Modifikationen auf Proteinen des Skelettmuskels (Yki-Jarvinen et al., 1993) und der pankreatischen Betazellen (Liu et al., 2000) erhöht. Im Falle des Skelettmuskels ist die reduzierte Insulinrezeptorsubstrat (IRS)-1 und -2-Signalkaskade mit deren erhöhten Glycosylierung und verringerten Phosphorylierung assoziiert (Patti et al., 1999). Diese Hyper-O-GlcNAc-Glycosylierung von Proteinen könnte also das Gleichgewicht zwischen O-GlcNAc und O-Phosphat in der Insulin-Signalkaskade verändern, und somit die Insulin-induzierte Phosphorylierung von Proteinen, die den Glucose-Haushalt regulieren, verhindern. Allerdings sind bis jetzt die spezifischen molekularen Ziele der Hyperglycämie, welche die Insulinresistenz vermitteln, nicht bekannt.

Es wird aber angenommen, dass *O*-GlcNAc eine Rolle als "Ernährungs-Sensor" spielt. Wenn man die Beziehungen zwischen umgebendem Glucosespiegel, intrazellulärer UDP-GlcNAc Konzentration und erhöhter Glycosylierung betrachtet, scheint diese Modifikation die Informationen über extrazelluläre Glucose Konzentrationen auf Transkriptionsfaktoren oder andere Komponenten des intrazellulären Signalwegs zu übertragen. Somit könnte der Status der *O*-GlcNAc-Glycosylierung den Ernährungszustand der Zelle reflektieren, wodurch entsprechend auf externe Signal reagiert werden kann. Diese Effekte könnten durch eine Anzahl von Glycosylierungs-abhängigen Mechanismen vermittelt werden.

Allerdings konnte bei Diabetes durch den erhöhten Glucosespiegel auch eine andere Form von Zuckereinbau in Proteine beobachtet werden. Dabei handelt es sich um eine nicht enzymatische Glycierung, bei der Glucose an Lysinreste angehängt wird (Cohen, 1986). Auch diese pathologische Modifikation könnte zu einem Absterben der Neuronen beitragen.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Proteine des Zytoskeletts stellen die Hauptdeterminante der neuronalen Morphologie dar. Zudem sind einige dieser Proteine an der Degeneration von Neuronen beteiligt. Um neue "Werkzeuge" für die Analyse zytoskeletaler Proteine und ihrer Interaktionen zu erhalten, wurden in Vorarbeiten zu dieser Studie ein Reihe monoklonaler Antikörper hergestellt. Dazu wurden Mäuse mit Zytoskelettkomponenten, die aus kultivierten humanen Modellneuronen (NT2N-Zellen) und Neuroblastomazellen (BE2 Zellen) isoliert wurden, immunisiert. Die erhaltenen Hybridomazellen produzierten eine Vielzahl interessanter Antikörper.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte NL6 - einer dieser monoklonalen Antikörper, der das Neurofilament Protein M erkennt - weiter charakterisiert werden. Dabei sollten zunächst die allgemeinen Eigenschaften dieses Antikörpers bzw. seines Antigens in verschiedenen Spezies und im Vergleich zu Kontrollantikörpern bestimmt werden. Weiter sollte durch gezielte Deletionen und Mutationen im NF-M-Protein das genaue Epitop des NL6 Antikörpers identifiziert werden und mögliche Anwendungsgebiete des Antikörpers bestimmt werden. Dafür wurden Kollaborationen mit unterschiedlichen Labors begonnen.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) und Riedel-de Haen AG (Seelze) bezogen. Produkte für die Zellkultur stammten von der Firma Invitrogen Life Technologies GmbH Deutschland.

Reinstwasser (ddH₂O) wurde mit dem Milli-Q Plus Ultra-Pure Wasser System der Firma MILLIPORE (Eschborn) hergestellt (elektrischer Widerstand 18.2 Megaohm).

2.1.2 Tiere

Zur Herstellung der Schnittkulturen wurden NMRI Mäuse (P0-P8) präpariert. Zur Gewinnung von Neurofilamenten aus Ratten-Rückenmark wurden adulte Wistar Ratten verwendet. Alle Tiere stammten aus dem zentralen Tierstall der Universität Heidelberg.

2.1.3 Zellkultur

2.1.3.1 Eukaryontische Zell-Linien

| Human: | NT2 | Gabe von Dr. Koo (Boston) |
|-----------|------------|----------------------------------|
| | SK-N-BE(2) | Gabe von Dr. Andreadis (Boston) |
| | SH-SY5Y | ATCC (USA) |
| | HeLa | Gabe von Prof. Dr. Walter (Bonn) |
| | HEK 293 | ATCC (USA) |
| Ratten: | PC12 | Gabe von Dr. Wagner (Boston) |
| | RAT1 | ATCC (USA) |
| Maus: | Neuro2A | Gabe von Dr. Mandelkow (Hamburg) |
| | 3T3 | ATCC (USA) |
| Hamster : | СНО | ATCC (USA) |

2.1.3.2 Zellkulturmedien

Fötales Kälberserum (FCS), Pferdeserum (HS) und mit Eisen angereichertes Kälberserum (CS) wurden bei 56°C für 1 h "hitzeinaktiviert".

| 3T3-Medium | DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium) mit |
|------------------------|--|
| | 10% (v/v) FCS, 2% (v/v) 0,2 M Glutamin, 1% (v/v) 5000 |
| | U/ml Penicillin / 5000 µg/ml Streptomycin |
| BE2-Medium | OPTI-MEM1 mit 5% (v/v) CS (mit Eisen angereichert), |
| | 1% (v/v) 0,2 M Glutamin, 1% (v/v) 5000 U/ml Penicillin |
| | / 5000 µg/ml Streptomycin |
| CHO-Medium | MEM Alpha Medium mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) |
| | 0,2 M Glutamin, 2% (v/v) 5000 U/ml Penicillin / 5000 |
| | µg/ml Streptomycin |
| DMEM-Serum | DMEM mit 10% (v/v) FCS, 5% (v/v) HS, 1% (v/v) |
| | 0,2 M Glutamin, 1% 5000 U/ml Penicillin / 5000 µg/ml |
| | Streptomycin |
| HEK 293-Medium | DMEM mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) 0,2 M Glutamin, |
| | 1% (v/v) 5000 U/ml Penicillin / 5000 µg/ml |
| | Streptomycin |
| HeLa-Medium | MEM Earles Medium mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) |
| | 0,2 M Glutamin, 1% (v/v) 5000 U/ml Penicillin / 5000 |
| | µg/ml Streptomycin |
| Maus-Medium (Schnitte) | 25% (v/v) 2 x MEM, 25% (v/v) BME (Basal Medium |
| | mit Eagle Salzen), 25% (v/v) HS, 1% (v/v) 0,2 M |
| | Glutamin, 0,65% (w/v) Glucose, ad H ₂ O; pH 7,2 |
| N2A-Medium | MEM (Minimum Essential Medium) mit Earle's Salze |
| | mit nicht essentiellen Aminosäuren, 1% (v/v) 0,2 M |
| | Glutamin |
| NB/B27 Medium | Neurobasal Medium mit 2% B27 Supplement, 25 μM |
| | β -Mercapto-Ethanol, 0,5 mM Glutamin, 25 μ M |
| | Glutamat, 1% (v/v) 5000 U/ml Penicillin / 5000 µg/ml |
| | Streptomycin |
| Präparationsmedium | MEM mit 1% (v/v) Glutamin; pH 7,35 |

| RAT1-Medium | DMEM mit 5% (v/v) FCS, 1% (v/v) 0,2 M Glutamin, | | | | | | | | | |
|----------------|---|--------|------|-------|---------|--------|--------|-------|------|-------|
| | 1% | (v/v |) 5 | 5000 | U/ml | Penie | cillin | / | 5000 | µg/ml |
| | Strep | tomy | /cin | | | | | | | |
| SH-SY5Y-Medium | DME | EM 1 | mit | 10% | (v/v) | FCS, | 1% | (v/v) | 5000 | U/ml |
| | Penic | cillin | / 50 | 00 µg | /ml Str | reptom | ycin | | | |

2.1.3.3 Stammlösungen für Zellkultur

| Zell-Gefrierlösung | 10% DMSO in FCS | | | | |
|---------------------|--|--|--|--|--|
| Kollagenlösung | 50 µg/ml Kollagen einer Präparation aus Ratten- | | | | |
| | schwänzen in 0,02 N Essigsäure, steril filtriert | | | | |
| NGF-Stock | 100 μ g/ml murines NGF (7S) in H ₂ O | | | | |
| PBS | Dulbecco's, steril filtriert | | | | |
| Poly-L-Lysin-Lösung | 100 mg/ml Poly-L-Lysin in PBS | | | | |
| Retinolsäure-Lösung | 10 mM Retinolsäure in DMSO | | | | |
| Trypan-Blau | 0,4%ige Lösung | | | | |
| Zytostatika-Lösung | 10 μM 5-Fluoro-2'-deoxyuridin, 10 μM Uridin, 1 μM | | | | |
| | Cytosin-β-D-arabinosid in ddH ₂ O | | | | |

2.1.4 Puffer und Stammlösungen

2.1.4.1 Immunfluoreszenz-Färbung

| Anti-Ausbleich-Medium | 0,1% (w/v) p-Phenylendiamin in 90% (v/v) Glyzerin, | | |
|-------------------------|---|--|--|
| | 10% (v/v) PBS, gepuffert auf pH 9,0 mit 0,5 M | | |
| | K-Karbonat/Bikarbonat | | |
| DAPI-Stammlösung | 1 mg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) in DMSO | | |
| Triton/PBS | 0,2% (v/v) Triton X-100 in PBS | | |
| Gewebe-Block-Lösung | 5% (v/v) FCS, 1% (w/v) BSA, 0,1% (v/v) Triton, 0,02% | | |
| | (v/v) Natriumazid in PBS | | |
| Glyzin-Lösung | 0,1 M Glyzin, 0,02% (v/v) Natriumazid in PBS | | |
| Natriumborhydrid-Lösung | 10 mg/ml Natriumborhydrid in PBS (vor Gebrauch frisch | | |
| | angesetzt) | | |

| NP40-Fixierungs-Lösung | 80 mM PIPES/KOH, pH 6,8, 5 mM EGTA, 1 mM |
|---------------------------|--|
| | MgCl ₂ , 4% (w/v) Paraformaldehyd; (vor Gebrauch 0,5% |
| | (v/v) Nonidet P-40 (NP40) zugegeben) |
| Standardfixierungs-Lösung | PBS wurde auf 70°C erhitzt, 4% (w/v) Paraformaldehyd |
| | zugegeben, mit tropfenweise 1 M NaOH geklärt und |
| | nach dem Lösen wurde wieder auf pH 7,0 eingestellt. |
| | Nach dem Abkühlen wurden 4% Saccharose zugegeben. |
| 1 x PBS | Fertigtabletten: 8 g Natriumchlorid, 0,2 g Kalium- |
| | hydrogenphosphat, 1,15 g Natriumphosphat, ad 1 l mit |
| | ddH ₂ O, pH 7,4 |
| PBS/BSA/Tween-Lösung | 1% (w/v) BSA, 0,1% (v/v) Tween 20 (Polyoxyethylen- |
| | sorbitan Monolaurat), 0,02% (v/v) Natriumazid in PBS |

2.1.4.2 Protein-Biochemie

| Acrylamid/Bis-Stammlösung | 30 g Acrylamid, 0,8 g Bisacrylamid, ad 100 ml mit |
|---------------------------|---|
| | ddH ₂ O, filtriert |
| APS | 10% (w/v) Ammoniumpersulfat in ddH ₂ O |
| Assembly-Puffer | 50 mM MES pH 6,8, 0,5 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, 8 M |
| | Glyzerol |
| BCA-Reagenz (Pierce) | 50 Teile BCA Reagenz A plus 1 Teil BCA Reagenz B |
| | (vor Gebrauch frisch angesetzt) |
| BioRad-Testreagenz | Protein-Assay-Farbkonzentrat (BioRad) 1:5 in ddH_2O |
| | (vor Gebrauch frisch angesetzt) |
| Blockierungspuffer | 5% (w/v) Magermilchpulver (Reformhaus) in TBS- |
| | Tween |
| Disassembly-Puffer | 50 mM MES pH 6,8, 0,5 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, |
| | 1 mM PMSF (frisch) |
| Dotblotpuffer | 30% (v/v) Methanol, 0,5% (w/v) DOC in 1xTBS |
| Elektrophorese-Laufpuffer | 1,2 g Tris-Base, 5,76 g Glyzin, 0,4 g SDS, ad 400 ml mit |
| | ddH ₂ O |
| ELISA-Bindungspuffer | 15 mM NA ₂ CO ₃ , 35 mM NaHCO ₃ ; pH 9,6 |
| ELISA-Blockpuffer | PBS, 1% (w/v) BSA, 0,05% (v/v) Tween 20 |
| ELISA-Waschpuffer | PBS, 0,5% (w/v) BSA, 0,05% (v/v) Tween 20 |
| Entwickler | ECL-Kit (Amersham Buchler GmbH) |
| | |

| 4 x Lower-Tris: | 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,4% (w/v) SDS |
|------------------------------|---|
| 10 x Protease-Inhibitoren | 10 mM EGTA, |
| | 10 mM PMSF, |
| | 100 μg/ml Leupeptin, |
| | 100 μg/ml Pepstatin, |
| 10 x Phosphatase-Inhibitoren | 10 mM Natrium-Pyrophosphat, |
| | 10 mM Sodium-ortho-vanadat, |
| | 200 mM Natriumfluorid |
| Phosphatasepuffer | 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM ZnSO ₄ , 100 mM NaCl |
| | mit Protease-Inhibitoren |
| 5 x Probenpuffer | 300 mM Tris/HCl, pH 6,8, 10% (w/v) SDS, 50% (v/v) |
| | Glyzerin, 6,25% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,005% (w/v) |
| | Bromphenolblau |
| RIPA-Puffer | 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, |
| | 1% NP40, 0,5% DOC, 0,1% SDS in ddH2O mit |
| | Protease- und Phosphatase-Inhibitoren |
| Strip-Lösung | 0,2% SDS, 20 mM TCEP in ddH_2O (vor Gebrauch frisch |
| | angesetzt) |
| 10 x TBS | 90 g/l (w/v) NaCl, 100 mM Tris, pH 7,4 |
| TBS-Tween | 0,05% (v/v) Polyoxyethylensorbitan Monolaurat |
| | (Tween-20) in 1 x TBS |
| Transferpuffer | 0,2M Glyzin, 250 mM Tris/Base, 20% (v/v) Methanol |
| Triton-Extraktionspuffer | 10 mM PIPES, 50 mM KCl, 10 mM EGTA, 3 mM |
| | MgCl ₂ , 1% Triton X-100, Protease- und Phosphatase- |
| | Inhibitoren |
| 4 x Upper-Tris: | 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,4% (w/v) SDS |
| Verdau-Puffer | 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM CaCl mit Protease- |
| | Inhibitoren ohne PMSF |

2.1.4.3 Molekularbiologie

| Ampicillin-Stammlösung | 100 mg/ml in H ₂ O, steril filtriert, Lagerung bei -20°C |
|------------------------|---|
| DNA Größenmarker | GeneRuler TM 1kb DNA Ladder Plus |
| dNTP-Stocklösung | 10 mM dNTP-Mix (MBI-Fermentas) |
| DTT-Stammlösung | 1 M Dithiothreitol (DTT) in H ₂ O, Lagerung bei -20°C |

| EB-Puffer | 10 mM Tris-Cl, pH 8,5 |
|----------------------------|--|
| Ethidiumbromid-Stammlösung | 25 mg/ml in H ₂ O |
| Kanamycin-Stammlösung | 10 mg/ml in H ₂ O, steril, Lagerung bei -20°C |
| LB-Agar (pro Liter) | LB-Medium, 15 g Bacto-Agar, autoklaviert |
| LB-Medium (pro Liter) | 10 g Bacto-Tryptone (Difco), 5 g Hefe-Extrakt (Gibco), |
| | 10 g NaCl, auf pH 7,5 eingestellt, autoklaviert |
| PCR | Expand High Fidelity PCR System |
| PCR-Reaktionsgefäße | 200 µl, dünnwandig (Biozym) |
| PCR-Wachs | Chill-out 14 TM Liquid Wax (MJ Research Inc.) |
| Probenpuffer 6x | 60%~(v/v) Glyzerin, 0,5% (v/v) Bromphenolblau, 0,5% |
| | (v/v) Xylencyanol |
| TBE 5x | 0,45 M Tris, 0,45 M Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0 |

2.1.4.4 Restriktionsenzyme, DNA modifizierdende Enzyme und Bakterienstämme

Alle Restriktionsenzyme, modifizierende Enzyme und DNA-Größenmarker wurden bei MBI-Fermentas bestellt (im Ausnahmefall auch bei New England Biolabs). Es wurden die mitgelieferten enzymspezifischen Puffer verwendet.

| Verwendete Klone | Resistenz |
|--|------------|
| pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen) | Ampicillin |
| pEGFP-C3 (Clontech) | Kanamycin |
| pRSET A mit Maus NF-M (Albrecht Clement) | Ampicillin |

| Verwendete Bakterienstämme | Genotyp |
|------------------------------|---|
| DH5a (Invitrogen) | $F^- \Phi 80 lac Z \Delta M15 \Delta (lac ZYA-arg F) U169 deo R rec A1$ |
| | endA1 $hsdR17(r_k,m_k^+)$ phoA $supE44$ thi-1 gyrA96 |
| | relA1 λ- |
| TOP10 (Invitrogen) | F^- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 |
| | $\Delta lacX74$ deoR recA1 araD139 $\Delta (ara-leu)7697$ galU |
| | galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG |
| GM2163 (New England Biolabs) | F ⁻ ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 |
| | galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 rpsL136(Str ^R) |
| | dam13::Tn9(Cam ^R) xylA5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2 |

| Primärantikörper | Spezies | Arbe | eitskonzentration |
|----------------------|--|--------|-------------------|
| | (Hersteller) | ECL | Immunfluoreszenz |
| NL6 (NF-M) | Maus (Eigenproduktion) | 1:2000 | 1:200 |
| M20 (NF-M) | Maus (Gabe von Dr. Riederer (Lausanne) | 1:2000 | 1:200 |
| SMI32 (NF-H) | Maus (Sternberger Monoclonals Incorporated) | - | 1:1000 |
| JP39 (Nestin) | Maus (Eigenproduktion) | - | 1:5 |
| αΜΑΡ2 | Maus (Chemicon) | - | 1:200 |
| αVimentin | Maus (Sigma) | - | 1:200 |
| αAktin | Maus (Oncogene Research) | 1:2500 | - |
| DM1A (Alpha-Tubulin) | Maus (Sigma) | 1:5000 | - |
| αO-GlcNac (CTD110.6) | Maus (Gabe von Covance) | 1:1000 | - |
| αGFP (polyclonal) | Kaninchen (Molecular Probes) | - | 1:300 |

2.1.5 Antikörper und Immunchemikalien

Tab. A.1: Verwendete Primärantikörper

| Sekundärantikörper | Spezies | Arbe | eitskonzentration |
|--------------------|----------------------------------|----------|-------------------|
| gekoppelt an: | (Hersteller) | ECL | Immunfluoreszenz |
| Cy TM 3 | EselaMaus (Dianova) | - | 1:250 |
| ALEXA 488 | ZiegeαMaus (Molecular Probes) | - | 1:200 - 1:500 |
| ALEXA 543 | ZiegeαMaus (Molecular Probes) | - | 1:200 - 1:500 |
| FITC | ZiegeαKaninchen (Dianova) | - | 1:200 |
| DAPI | Kernfarbstoff (Sigma) | - | 1:200-1:1000 |
| HRP | EselαMaus (Dianova) | 1:20 000 | - |
| HRP (a IgM) | EselaMausaIgM (Sigma) | 1:20 000 | _ |

Tab. A.2: Verwendete Sekundärantikörper

2.1.6 Geräte und Materialien

| Analyse- und Feinwaagen: | - 3716 (Sartorius) |
|----------------------------------|---|
| | - handy H110 (Sartorius) |
| Autoradiographie- und Chemolun | nineszenz-Film Entwicklungsgerät: |
| | M35 X-OMAT Processor (Kodak) |
| Bakterien-Drehrad: | Rollodrum TM TC-Y (New Brunswick Scientific) |
| Bakterien-Schüttler: | INFORS AG, Schweiz |
| Chemolumineszenz-Filme: | Hyperfilm ECL (Amersham Buchler GmbH) |
| Digitalkamers für Agarosegele: | CS-1 (Cybertech. Berlin) |
| Dotblot-Gerät: | ENZO Diagnostic Inc. |
| Elektroblot-Tank: | EMBL, Heidelberg |
| ELISA Reader: | Emax Microplate Reader |
| Filtereinsätze (Gewebekultur): | Millicell CM (Millipore) |
| Filterpapier: | Whatman 3MM |
| Fotokopierfolie: | Schwan/Stabilo |
| Fotografie: | - Kamera: F801/Objektiv: 60mm (Nikon) |
| | - Filme: T _{MAX} p3200 (Kodak) |
| | - Fotografisches Papier: ILFOSPEED (ILFORD) |
| | - Foto-Entwicklungsmaschine: 2150 RC (ILFORD) |
| Heizblock: | Thermostat 5320 (Eppendorf) |
| Horizontalschüttler: | Typ 3016 (Gesellschaft für Labortechnik) |
| Immobilon-P PVDF Transfermen | <u>ıbran:</u> |
| | (MILLIPORE), 1.45 µm Porengröße |
| Inkubator: | Heraeus Function line, Heracell (Heraeus) |
| <u>Kryostat:</u> | Jung Frigocut 2800N (Leica) |
| <u>Küvetten:</u> | Plastibrand 1,5 ml halbmikro Einmal-Küvetten (Neolab) |
| Kulturflaschen: | 75 cm ² Flaschen (Nunclon TM Δ) |
| Kulturschalen: | 96-Wellplatte, 4-Wellplatte, 4-cm, 6-cm, 10-cm und |
| | 15-cm Schalen (Nunclon TM Δ) |
| Luft-Verdrängungspipetten mit ac | ljustierbaren Volumina: |
| | 0,1-2 µl (Gilson); 0,5-10 µl, 5-40 µl, 40-200 µl, 200- |
| | 1000 µl (Finnpipette Techpette Digital, Labsystems) |
| Magnetrührer: | KMO 2 electronic (Janke & Kunkel) |
| McIllwain Chopper: | Tissue Chopper (H. Saur) |

| Mikroinjektionseinheit: | Nanoject (Drummond, USA) |
|------------------------------|---|
| Mikromanipulator: | Manueller Mikromanipulator (Fine Science Tools) |
| Mikroreaktionsgefäße: | 1,5 ml (Sarstedt); 2 ml, 0,5 ml (Eppendorf) |
| Mikroskope: | - Fluoreszenzmikroskop Axiophot (Zeiss) |
| | - Leica TCS SP2 (konfokal) |
| | - EM10 (Zeiss) |
| Mikroskopische Deckgläschen: | 12 mm, rund (LAB Euroline, Brenzinger) |
| Netzgerät (Agarosegele): | Electrophoresis power supply ST 305 (Gibco BRL Life |
| | Technologies GmbH, Karlsruhe) |
| Netzgerät (Westernblot): | BioRad Powerpack 1000 oder 3000 (BioRad) |
| Objektträger: | ca. 76 x 26 mm (Menzel-Gläser) |
| Parafilm: | PARAFILM "M" Laboratory Film (American National |
| | Can) |
| <u>pH-Meter:</u> | Mikroprozessor-pH-Meter 761 (Knick) |
| Photometer: | Ultraspec 3000 (Pharmacia Biotech) |
| Probenröhrchen: | konisch, aus Polypropylen mit Schraubverschluß: 15 ml, |
| | 50 ml (Sarstedt) |
| Plastikzellschaber: | (Nunclon TM Δ) |
| Quantifizierungssoftware: | NIH Image 1.61 ppc |
| Sterilfilter: | - sterile Steritop GS Filtersysteme (0,22 µm, 500 ml) |
| | (MILLIPORE) |
| | - sterile Steriflip (0,22 μm, 50 ml) (MILLIPORE) |
| Thermocycler für PCR: | Robocycler® Gradient 96 (Stratagene) |
| Thermo-Wasserbad: | Grant |
| Ultraschallbad: | Sonorex Super RK 102 H (Bandelin) |
| Wippe: | EMBL, Heidelberg |
| Zentrifugen und Rotoren: | -Tischzentrifuge/Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Haereus |
| | Instrument) |
| | - Table-Top Optima TL Ultrazentrifuge; Rotoren: TLA- |
| | 100,2 und TL-55 (Beckmann) |
| | - Megafuge 1,0 R (Heraeus Instrument) |
| | - Optima L70-K Ultrazentrifuge; Rotor: SW 60 Ti, Ti 70 |
| | -Zentrifugenröhrchen: Polykarbonat-Röhrchen (Beck- |
| | mann), Glasröhrchen (Corex) |

Zubehör für SDS-PAGE:

Plexiglas-Elektrophorese-Kammern (Anfertigung des Theoretikums der Universität Heidelberg), Glasplatten, Kunststoff-Abstandhalter und -Kämme (Sigma)

2.1.6.1 Glaswaren

Allgemeine Glaswaren wurden von Schott Schleiffer AG (Feldbach, Schweiz) bezogen. Mikroskopische Deckgläschen und Objektträger wurden von LAB Euroline (Brenzinger bzw, Partner GdbR, Walldorf) gekauft.

2.1.6.2 Plastikwaren

Allgemeine Plastikwaren wurden von Sarstedt (Nümbrecht) und Eppendorff (Hamburg) bezogen. Die Plastikwaren für die Zellkultur stammten von Nunc (Wiesbaden). Sterilfilter wurden von Millipore (Eschborn) und spezielle Zentrifugenröhrchen wurden von Beckman (München) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkultur

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter einer biologischen Sicherheitssterilwerkbank (SG-400E, The Baker Company) durchgeführt. Verwendete Glasgeräte wurden vor dem Gebrauch autoklaviert und alle verwendeten Lösungen wurden durch Filtration sterilisiert. Die Inkubatoren (C0₂-Auto-Zero, Heraeus) wurden auf 37°C und 10% CO₂ für 3T3, BE2, CHO, HEK293, NT2, PC12 und Rat1 Zellen bzw. auf 5% für HeLa, Neuro2A, SH-SY5Y Zellen und Hippocampus-Schnittkulturen eingestellt.

Kulturmedien und PBS wurden unmittelbar vor dem Gebrauch im 37°C-Wasserbad erwärmt.

2.2.1.1 Lösen adhärenter Zellen mit Trypsin (Abtrypsinieren)

Protokoll:

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen 1 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 0.5 ml (10-cm Schalen) oder 1 ml Trypsin/EDTA (15-cm Schalen) auf die Zellen gegeben, um sie von der Platte zu lösen. Sobald sich die Zellen gelöst hatten, wurden 4.5 ml bzw. 9 ml Medium zugegeben. Die Zellen wurden dann ausgezählt oder 1:5 bis 1:10 (je nach Generationszeit der Zellen) verdünnt auf neue Platten ausplattiert.

2.2.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Protokoll:

Die gefrorenen Zellen wurden nach dem schnellen Auftauen bei 37°C in eine 10-cm Schale mit 10 ml Medium überführt und kultiviert.

Die von einer konfluenten 15-cm Schale abtrypsinierten Zellen wurden 5 min bei 200 x g abzentrifugiert, in 5 ml Zell-Gefrier-Lösung aufgenommen, auf fünf 1 ml Kryoröhrchen (Nunc) verteilt und in einem Kryo-Einfriergefäß (Nunc) bei -80°C langsam eingefroren. Nach einem Tag konnten sie dann in den flüssigen Stickstoff überführt werden.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Protokoll:

Abtrypsinierte Zellen wurden 5 min bei 200 x g pelletiert. Nach dem Resuspendieren der Zellen in 500 µl Medium wurden 15 µl der Zellen mit 15 µl Trypan-Blau versetzt und die ungefärbten (lebenden) Zellen in einer geeichten Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.2.1.4 Beschichtung von mikroskopischen Deckgläschen und Kulturschalen

Mikroskopische Deckgläschen und Kulturschalen wurden zur besseren Haftung der Zellen mit Poly-L-Lysin und/oder Kollagen beschichtet.

a) Poly-L-Lysin Beschichtung

Protokoll:

Die Deckgläschen wurden mit einer Pinzette 3 x durch eine Flamme geführt und in einer Kulturschale einige Minuten mit 100% EtOH inkubiert. Anschließend wurden sie mit PBS

gewaschen und mindestens 5 h mit Poly-L-Lysin (PLL) bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Deckgläschen 2 x 1 h mit PBS gewaschen.

b) Kollagen Beschichtung

Protokoll:

Die sterile Kollagen-Lösung wurde auf die mit PLL-beschichteten Deckgläschen oder unbehandelten Zellkulturschalen gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C wurden die Deckgläschen und die Schalen 2 x mit PBS gewaschen und mit PBS bis zum Gebrauch aufbewahrt.

2.2.1.5 Kultur von 3T3 Zellen

3T3 Zellen sind Maus Fibroblasten, die 1962 durch Dissoziation von "Schweizer Albino" Embryonen isoliert wurden (Todaro et al., 1965). Sie wachsen adhärent als Monolayer, zeigen Kontaktinhibition und haben eine niedrige Verdopplungszeit. Sie eignen sich daher gut für Transfektionsversuche.

Protokoll:

Die Zellen wurden in 10-cm Schalen mit 7 ml 3T3-Medium kultiviert. Alle 3 - 4 Tage wurde das Medium erneuert und bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen abtrypsiniert und 1:10 auf neuen Schalen ausplattiert.

2.2.1.6 Kultur von humanen BE2 Zellen

SK-N-BE(2) (BE2) ist eine humane Neuroblastoma Zelllinie, die aus dem Knochenmark eines Jungen isoliert wurde (Biedler & Spengler, 1976 a,b; Biedler et al., 1978). Die Zellen bilden nach Differenzierung mit Retinolsäure einen neuronalen Phänotyp aus, der durch die Ausbildung langer Dendriten-ähnlicher Neuriten charakterisiert ist. BE2 Zellen entwickeln jedoch keine Polarität und proliferieren weiter.

Protokoll:

BE2 Zellen wurden in 10-cm Schalen mit 7 ml BE2-Medium kultiviert. Alle 3 - 4 Tage wurde das Medium erneuert und bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen abtrypsiniert und 1:10 auf neue Schalen aufgeteilt.

Zur Differenzierung der BE2 Zellen wurden die Zellen nach dem Umsetzen auf eine neue Platte mit Retinolsäure (Endkonzentration: 10 μ M) in BE2-Medium kultiviert. Das Medium mit Retinolsäure wurde alle 3 - 4 Tage gewechselt. Die Differenzierung erfolgte über maximal zwei Wochen.

2.2.1.7 Kultur von CHO Zellen

Diese epithelialen Zellen wurden 1957 aus den Ovarien eines adulten Chinesischen Hamster isoliert (Puck et al., 1958). CHO Zellen eignen sich auch besonders gut zur Transfektion, da sie ein extrem kurze Generationszeit haben.

Protokoll:

CHO Zellen wurden in 10-cm Schalen mit 7 ml CHO-Medium kultiviert. Alle 3 - 4 Tage wurde das Medium erneuert und bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen abtrypsiniert und 1:20 auf neue Schalen aufgeteilt.

2.2.1.8 Kultur von HEK293 Zellen

Die HEK293 Zellen sind aus humanen embryonalen Nierenzellen durch Transformation mit Adenovirus Typ 5 hervorgegangen (Graham et al., 1977). Sie wachsen Fibroblasten-artig als Monolayer und exprimieren neben Cytokeratinen und Vimentin auch Neurofilamente.

Protokoll:

Die HEK293 Zellen wurden in 10-cm Schalen mit 7 ml HEK-Medium kultiviert. Alle 3 - 4 Tage wurde das Medium erneuert und bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen abtrypsiniert und 1:10 auf neue Schalen aufgeteilt.

2.2.1.9 Kultur von HeLa Zellen

HeLa Zellen sind epithelial-wachsende Zellen eines humanen Cervixkarzinoms (Scherer et al., 1953). Sie sind somit nicht neuronalen Ursprungs und exprimieren vor allem Cytokeratine. Sie wurden hier als nicht neurale Kontrollzellen verwendet.

Protokoll:

Die HeLa Zellen wurden in 10-cm Schalen mit 7 ml HeLa-Medium kultiviert. Alle 3 - 4 Tage wurde das Medium erneuert und bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und 1:5 auf neue Schalen verteilt.

2.2.1.10 Kultur von Neuro2A Zellen

Diese neuronalen Zellen wurden aus einem spontanen Neuroblastom einer Albino Maus isoliert (Olmsted et al., 1970). 30% der Neuro2A Zellen wachsen adherent wie neuronale Zellen, die restlichen Zellen haften lose an den adherenten Zellen.

Protokoll:

Die Neuro2A Zellen wurden in 10-cm Schalen mit 7 ml Neuro2A-Medium kultiviert. Alle 3 - 4 Tage wurde das Medium erneuert. Zum Passgieren wurden die Zellen abtrypsiniert und 1:3 auf neue Schalen aufgeteilt

2.2.1.11 Kultur von NT2N Zellen

NT2N Zellen sind postmitotische, terminal differenzierte, polare Neuronen, die durch Retinolsäure-Behandlung aus NT2/D1 Zellen hervorgehen. Die NT2/D1 (NT2) Zelllinie wurde aus einem humanen embryonalen Teratokarzinom isoliert. In ihrem Phänotyp entsprechen diese Zellen zentralnervösen Vorläuferzellen (Pleasure & Lee, 1993).

Neben den NT2N Zellen sind in der Kultur nach der Behandlung mit Retinolsäure (RA) und Zytostatika noch flache Zellen enthalten. Sie stellen ein postmitotisches Zwischenstadium dar, deren Charakter unklar ist. Es wird bei der Präparation versucht, die Neuronen selektiv anzureichern.

Protokoll:

NT2 Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen mit 8 ml Serum-DMEM kultiviert, bei Erreichen der Konfluenz abtrypsiniert (2 x die Woche) und 1:5 in Serum-DMEM wieder auf 10-cm Schalen ausplattiert.

Zur Differenzierung wurden die Zellen in einer Dichte von 2 x 10^6 Zellen/75 cm² Kulturflasche mit 10 ml Serum-DMEM ausplattiert. Nach einem Tag wurde Retinolsäure (RA) in einer Endkonzentration von 10 μ M zugegeben. Das RA-enthaltende Medium wurde 2 x pro Woche gewechselt.

Fünf Wochen nach der ersten RA Zugabe wurden die Zellen zum ersten Mal replattiert:

Hierzu wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen, 1 ml Trypsin/EDTA zugegeben und bei 37° C inkubiert bis sich alle Zellen gelöst hatten. Nach Zugabe von 9 ml Serum-DMEM wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellen wurden dann zusammen mit weiteren 8 ml Serum-DMEM auf eine Kollagen-beschichtete 15-cm Kulturschale ausplattiert.

Nach drei Tagen wurden die Zellen zum zweiten Mal replattiert:

10 ml des Nährmedium wurde abgesaugt und mit den verbliebenen 8 ml Serum-DMEM wurden die Neuronen (NT2N) selektiv von der Oberfläche der Kulturschale gespült und auf eine Kollagen-beschichtete 10-cm Kulturschale übertragen. Außerdem wurden 80 μl Zytosstatikalösung zugegeben. Das Medium wurde 2 x die Woche durch frisches Medium mit Zytosstatika ersetzt.

Nach mindestens zwei Wochen wurden die Zellen zum dritten Mal replattiert:

Das Nährmedium wurde abgesaugt und die Zellen nach 1 x Waschen mit PBS mit 0,5 ml Trypsin/EDTA bei 37° C inkubiert bis sich alle Zellen gelöst hatten. Anschließend wurden 4,5 ml Serum-DMEM zugegeben und die Zellsuspension einige Male auf- und abpipettiert, um die Zellen zu vereinzeln. Danach wurden die Zellen auf eine 10-cm Kulturschale übertragen. Nach 0,5 - 1 h Inkubation wurde der Überstand, der nicht abgesetzte Zellen (vor allem Neuronen) enthielt, abgenommen und in einer Dichte von 2000 Zellen/cm² auf Kollagen-beschichtete Deckgläschen ausplattiert.

2.2.1.12 Kultur von Ratten Pheochromocytoma-Zellen (PC12)

Die Pheochromocytoma-Zelllinie (PC12) ist eine aus dem Nebennieremark der Ratte isolierte Zelllinie neuralen Ursprungs (Greene & Tischler, 1976). Sie können Katacholamine synthetisieren und in Gegenwart des Nervenwachstumsfaktors NGF zeigen diese Zellen einige Eigenschaften sympathischer Neuronen wie z.B. das Auswachsen langer Neuriten und das Aussetzung der Proliferation.

Protokoll:

PC12 Zellen wurden in 10-cm Kulturschalen mit 7 ml Serum-DMEM kultiviert. Das Medium wurde 2 x die Woche gewechselt. Sobald die Zellen bis zur Konfluenz hochgewachsen waren, wurden sie auf eine neue Kulturschale passagiert:

Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen einmal gewaschen und 5 ml frisches Serum-DMEM zugegeben. Die auf der Kulturschale haftenden Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren des Mediums abgelöst und 1:5 auf neue Schalen aufgeteilt.

Zur Differenzierung wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² ausplattiert und am folgenden Tag mit NB/B27 gewaschen und in NB/B27 mit 100 ng/ml NGF für 2 - 3 Tage inkubiert.

2.2.1.13 Kultur von RAT1 Zellen

Die Rat1 Zellen (F2408) sind eine Ratten Fibroblasten Zelllinie, die in ihrem Phänotyp den Maus 3T3 Zellen entsprechen (Topp, 1981). Sie proliferieren schnell und lassen sich gut transfizieren.

Protokoll:

RAT1 Zellen wurden in 10-cm Schalen mit 7 ml Rat1-Medium kultiviert. Alle 3 - 4 Tage wurde das Medium erneuert und bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen abtrypsiniert und 1:10 auf neue Schalen ausplattiert.

2.2.1.14 Kultur von SH-SY5Y Zellen

Bei den SH-SY5Y Zellen handelt es sich um eine weitere humane Neuroblastoma Zelllinie, die als Sublinie aus der Neuroepitheloma Zelllinie Sk-N-SH her vorgegangen ist. Sie wurde ursprünglich 1970 bei einer Knochenmarkbiopsie eines vierjährigen Mädchens isoliert (Biedler et al., 1973). Sie exprimieren als neuronalen Marker Neurofilamente aber kein GFAP.

Protokoll:

Die Zellen wurden in 10-cm Schalen mit 7 ml SH-SY5Y-Medium kultiviert. Alle 3 - 4 Tage wurde das Medium erneuert, da die Zellen nicht konfluent wurden, wurde bei ca. 80% Konfluenz abtrypsiniert und 1:5 auf neue Schalen aufgeteilt. Zur Differenzierung wurden die SH-SY5Y Zellen für 2 - 4 Tage mit 10 µM RA behandelt.
2.2.2 Spezielle Zellkultur

2.2.2.1 Transfektion mit FuGENE 6

Zur Expression von exogenen Proteinen in Zellen wird deren cDNA in Vektorplasmide kloniert, die einen eukaryontischen Promotor besitzen, so dass sie in den Zellen abgelesen werden können. Die DNA wird dann zusammen mit einem Transfektionsreagenz auf die Zellen gegeben, das die Aufnahme in die Zelle bewirkt. Bei dem Transfektionsreagenz FuGENE 6 handelt es sich um eine nicht-liposomale Formulierung für die Transfektion von eukaryontischen Zellen. FuGENE 6 zeichnet sich durch eine hohe Effizienz und niedrige Zytotoxizität aus.

Protokoll:

Die Zellen wurden am Vortag in einer Dichte von 5 x 10^4 Zellen pro Well (4-Well) auf Kollagen-beschichtete Deckgläschen ausplattiert. Für die Transfektion wurden zwei Röhrchen vorbereitet. Im ersten Röhrchen wurden 2 µg DNA (Qiagen-Qualität) mit DMEM auf 10 µl gebracht. Im zweiten wurden 4 µl FuGENE 6 mit 50 µl DMEM durch Pipettieren gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurde das FuGENE 6 Gemisch tropfenweise mit der DNA vermengt und für 15 bis 20 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit frischem Medium versetzt und pro Well wurden 32 µl FuGENE 6 /DNA Gemisch zupipettiert. Die Analyse der Zelle erfolgte nach zwei Tagen.

2.2.2.2 Präparation von Hippocampus-Schnitten

Die Hippocampus Schnittkultur wurde mit Hilfe der "Interface-Methode" von Stoppini und Kollegen (1991) durchgeführt. Dabei liegen die Schnitte auf einem speziellen Filter, der von unten mit Nährmedium in Kontakt steht. Die Schnitte befinden sich sozusagen an der Grenze zwischen Luft und Medium, was für das Überleben von Gewebekulturen unerlässlich ist. Mit dieser Methode können die Schnitte über mehrere Monate in Kultur gehalten werden, und sie flachen sich nur geringfügig ab.

Protokoll:

Es wurden 1 ml Mausmedium in eine 6-Well Platte pipettiert und mit Filtereinsätzen (Millipore) versehen. Diese Platten wurden während der Präparation der Schnitte auf Eis aufbewahrt.

Die P0 - P8 NMRI Mäuse wurden dekapitiert, dann wurde die Kopfdecke mit Scheren geöffnet und entfernt. Mit einem speziellen breiten Spatel wurden die oberen zwei Drittel des Gehirns entfernt und in eine vorbereitete Schale mit Präparationsmedium überführt. Dann wurde das Cerebellum entfernt und die beiden Hälften des Gehirns getrennt. Die Hippocampi wurden freigelegt und mit einer Rasierklinge entlang einer Ader herausgeschnitten. Die isolierten Hippocampi wurden mit Hilfe eines McIlwain Choppers in 400 µm dicke Scheiben geschnitten, vereinzelt und in eine frische Schale mit Präparationsmedium überführt. Intakte Schnitte wurden auf die Filter (bis zu 8 Schnitte pro Filter) transferiert. Nach der gesamten Präparation wurden die Platten in einen 5% CO₂ Inkubator gestellt.

2.2.2.3 Kultur von Hippocampus-Schnitten

Protokoll:

Das Nährmedium der Schnitte auf den Filtern wurde alle 2 - 3 Tage gewechselt. Bei jedem Wechsel musste erst der pH Wert des Maus-Mediums auf 7.2 eingestellt werden. Dann wurde das Medium unter dem Filter gewechselt, wobei darauf geachtet wurde, dass kein Medium auf die Filter gelangt. Die Schnitte konnten für Wochen und Monate in Kultur gehalten werden.

2.2.2.4 Mikroinjektion von NT2 Zellen in Hippocampus-Schnitte

Für die Xenotransplantat-Versuche wurden NT2 Zellen zur Differenzierung in Maus Hippocampus-Schnitte injiziert. Durch die starke Aggregation und die Faktoren des umgebenden Gewebes konnten sich die NT2 Zellen teilweise in Neuronen differenzieren.

Protokoll:

Am Vortag wurden Hippocampus-Schnitte von P8 Mäusen präpariert. NT2 Zellen wurden kurz vor der Mikroinjektion mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und mit 200 x g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Nach einem Waschschritt in PBS wurden die Zellen ausgezählt, in einer Endkonzentration von 5000 Zellen/µl in PBS aufgenommen und bis zur Mikroinjektion auf Eis aufbewahrt (maximal 1 h). Zur Mikroinjektion wurden Glaskapillaren vorbereitet, deren vordere Öffnung einen Durchmesser von ca. 15 - 20 µm hatten. Diese Kapillaren wurden von hinten mit Mineralöl gefüllt und in den manuellen Mikromanipulator eingespannt. Dann wurden die NT2 Zellen durch die vordere Öffnung in die Kapillare gefüllt. Mit den Glaskapillaren wurde an 3 - 5 Stellen in die vorbereiteten Hippocampi gestochen und jeweils

9.2 nl Zelllösung wurden injiziert. Nach der Mikroinjektion wurden die Schnitte weiter bei 5% CO₂ im Inkubator kultiviert.

2.2.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist eine sensitive Methode zum Nachweis und zur Lokalisierung subzellulärer Bestandteile. Damit ist es möglich die Verteilung von einzelnen Proteinen und Zellstrukturen, z.B. dem Zytoskelett, innerhalb einer Zelle sichtbar zu machen. Im ersten Färbeschritt wurden die gewünschten Proteine (Antigene) spezifisch durch einen nicht markierten mono- oder polyklonalen Primärantikörper erkannt. Im zweiten Schritt wird ein Sekundärantikörper gegen Antikörper der Spezies, aus dem der Primärantikörper stammte, eingesetzt. An diesen Sekundärantikörper ist ein Fluorochrom wie z.B. Fluoreszein Isothiocynat (FITC) oder Rhodamin gekoppelt, damit das Präparat mit geeigneter Filterkombination am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden kann. Durch die Verwendung von zwei Antikörpern in Folge kommt es zu einer Vervielfachung des Signals, da die polyklonalen Sekundärantikörper an mehrere Epitope auf den Primärantikörpern binden können.

2.2.3.1 Fixierung von Zellen auf Deckgläschen

Bei der Standardfixierung werden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, so dass alle zellulären Proteine in ihrer Position erhalten bleiben. Bei der NP-40 Fixierung werden die Zellen gleichzeitig fixiert und extrahiert. Während hier die zytosolischen Proteine extrahiert werden, bleiben zytoskeletäre und Zytoskelett-assoziierte Proteine weitgehend erhalten. Durch diese Methode kann eine Bindung von Proteinen an das Zytoskelett dargestellt werden.

a) Standardfixierung

Protokoll:

Die Deckgläschen mit den Zellen wurden aus der Kulturschale entnommen, auf Parafilm gelegt, 1 x mit PBS gewaschen und mit 50 μ l Standardfixierungs-Lösung für 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und 20 min bei RT mit Glyzin-Lösung inkubiert. Nach 1 x Waschen mit PBS wurde eine Inkubation von 5 min mit Triton/PBS bei RT durchgeführt. Schließlich wurden die Deckgläschen 5 x 2 min mit PBS/BSA/Tween blockiert und zur Färbung verwendet.

b) NP40-(Paraformaldehyd)-Fixierung (für Glutaraldehyd-sensitive Antikörper)

Protokoll:

Die Deckgläschen wurden aus der Kulturschale entnommen, auf Parafilm gelegt, einmal mit PBS gewaschen und mit 50 μ l NP40-Fixierungs-Lösung überschichtet. Nach einer Inkubation von 20 min bei RT wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und 20 min bei RT mit Glyzin-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen 5 x 2 min mit PBS/BSA/Tween gewaschen und für die Immunfärbung verwendet.

2.2.3.2 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen auf Deckgläschen

Protokoll:

Die Zellen wurden nach der Fixierung 1 h mit 50 µl Primärantikörper in PBS/BSA/Tween inkubiert. Bei Doppelimmunfluoreszenzfärbungen (DIF) wurde danach 5 x 2 min mit PBS/BSA/Tween gewaschen und der Färbevorgang mit dem zweiten Primärantikörper wiederholt. Nach 5 x 2 min Waschen mit PBS/BSA/Tween wurden die Zellen 30 min mit 50 µl Sekundärantikörper oder einer Kombination zweier Sekundärantikörper (DIF) in PBS/BSA/Tween inkubiert. Um die Zellkerne der Zellen sichtbar zu machen, wurde DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) zusammen mit dem Sekundärantikörper auf das Deckgläschen aufgetragen.

Anschließend wurden die Deckgläschen erneut mit PBS/BSA/Tween gewaschen und auf Objektträger übertragen. Dazu wurde ein Tropfen Anti-Ausbleich-Mediums auf den Objektträger aufgetragen, das Deckgläschen umgekehrt auf den Tropfen gelegt und mit Nagellack versiegelt.

2.2.3.3 Fixierung von Hippocampus-Schnitten auf Filtereinsätzen

Protokoll:

Die Filtereinsätze wurden 1 x mit PBS gewaschen und mit 1,5 ml Standardfixierungs-Lösung für 2 h bei RT oder o/n bei 4°C fixiert. Dann wurde 2 x 10 min bei RT mit PBS gewaschen und 4 x 15 min mit 0,5% Tween 20 in PBS solubilisiert. Nach 3 x 10 min Waschen mit PBS wurde 3 x 15 min mit 50 mM NH₄Cl gequencht, 3 x 10 min mit PBS gewaschen und o/n bei 4°C in Gewebe-Blockpuffer geblockt. Alle Schritte wurden auf einer Wippe durchgeführt.

2.2.3.4 Immunfluoreszenzfärbung von Hippocampus-Schnitten auf Filtereinsätzen

Protokoll:

Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in Blockpuffer (1.5 ml) über Nacht bei 4°C. Nach 4 x 30 min Waschen mit PBS wurde der Sekundärantikörper auch o/n bei 4°C inkubiert. Nach 4 x 30 min Waschen mit PBS wurde der Filtereinsatz trocken gesaugt und der Filter mit den Schnitten mittels eines Skalpells ausgeschnitten und mit Einbettmedium unter einem Deckgläschen eingebettet und mit Nagellack versiegelt. Als Abstandhalter wurden seitlich des Filters zwei runde Deckgläschen eingebettet.

Falls mehrere verschiedene Antikörper für Schnitte auf einem Filter verwendet werden sollten, wurden die einzelnen Schnitte vor der Antikörperinkubation mit einem Skalpell aus dem Filter geschnitten und in 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert. Die Antikörperinkubation wurde dann mit 200 – 500 μ l Lösung durchgeführt.

2.2.4 Allgemeine Protein-Biochemische Methoden

2.2.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine entsprechend ihrer Größe in einer Gelmatrix durch Anlegen eines elektrisches Feldes getrennt. Die Gelmatrix entsteht durch Polymerisation der Monomere Acrylamid und Bisacrylamid unter der Verwendung der Katalysatoren APS und TEMED. Das bei der SDS-PAGE verwendete ionische Detergenz SDS bindet an die Proteine und verleiht ihnen einen Überschuß an negativer Ladung. Im elektrischen Feld wandern die Proteine deshalb entsprechend ihrer Größe durch die Gelmatrix zur Anode. Proteine mit kleinem Molekulargewicht wandern schneller zur Anode als größere Proteine, die von der Matrix stärker zurückgehalten werden (Lämmli, 1970). Zur Größenbestimmung der aufzutrennenden Proteine wird bei der SDS-PAGE zum Vergleich ein Größenmarker mit auf das Gel aufgetragen.

Protokoll:

Die Minigele wurden nach dem Pipetier-Schema mit der jeweiligen Prozentzahl angesetzt:

| | Trenngel | | | Sammelgel |
|---------------------------|----------|--------|---------|-----------|
| | 5% | 7.5% | 10% | 3.5% |
| Acrylamid/Bis-Stammlösung | 500 µl | 750 µl | 1 ml | 117 µl |
| 4 x Lower Tris | 750 µl | 750 µl | 750 µl | - |
| 4 x Upper Tris | - | - | - | 250 µl |
| ddH ₂ O | 1.75 ml | 1.5 ml | 1.25 ml | 627 µl |
| APS-Stammlösung | 20 µl | 20 µl | 20 µl | 5 µl |
| TEMED | 3.5 µl | 3.5 µl | 3.5 µl | 1 μl |

Die zu analysierenden Proben wurden mit $\frac{1}{4}$ Volumen 5 x Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C gekocht, in der Tischzentrifuge zentrifugiert und auf das entsprechende Gel aufgetragen. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden 5 µl Größenmarker Benchmark (Invitrogen) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte innerhalb des Sammelgels bei einer Spannung von 120 V und nach dem Übergang in das Trenngel bei 180 V.

2.2.4.2 Proteintransfer durch Elektroblot (Westernblot)

Beim Westernblot werden Proteine mittels angelegter Spannung aus dem Gel auf polymere Schichten wie Nitrocellulose- oder Polyvinyliden-Difluorid (PVDF) Membranen transferiert. Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinbanden werden dabei auf der Membran immobilisiert. Die hier verwendete PVDF-Membran ist eine hydrophobe Mikroporen-Membran mit einer hohen Protein-Bindungskapazität und hoher mechanischer Stabilität.

Protokoll:

Der Westernblot wurde immer direkt im Anschluß an die SDS-PAGE (Abschnitt 2.4.1) durchgeführt. Die Schwammtücher der Blotkammer und die Whatman-3MM Filterpapiere wurden mit Transfer-Puffer befeuchtet. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol aktiviert und anschließend kurz in Transfer-Puffer getaucht.

Die einzelnen Lagen des Blots wurden im Blotting-Rahmen luftblasenfrei folgendermaßen aufeinander geschichtet: Schwammtuch, Filterpapier, Gel, PVDF-Membran, Filterpapier und Schwammtuch. Der Blotting-Rahmen wurden in die Kammer so eingebaut, dass das Gel in Richtung Kathode und die Membran in Richtung Anode orientiert waren. Der Transfer wurde bei einer Stromstärke von konstant 100 mA über Nacht durchgeführt.

2.2.4.3 Proteintransfer durch Dotblot

Beim Dotblot werden die Proteine direkt auf eine Membran aufgetragen, ohne dass vorher eine Auftrennung im Gel durchgeführt wurde. Diese Methode wird eingesetzt, wenn Gesamtproteinfraktionen untersucht werden, bei denen es nicht auf die Größe der Proteine ankommt, oder wenn der Antikörper mehrere Banden erkennt, die zusammen ausgewertet werden sollen.

Protokoll:

Es wurden 3MM Papier und Nitrocellulose in der geeigneten Größe für die Dotblot-Kammer zugeschnitten. Das Papier wurde mit TBS Puffer und die Nitrocellulose mit H₂O befeuchtet und mit der Nitrocellulose nach oben blasenfrei in die Dotblot-Kammer eingebaut. Alle 25 Löcher wurden dann mit 500 µl Dotblotpuffer/H₂O (2:1) befüllt und durch Anlegen eines leichten Unterdrucks entleert. Dann wurden die zu untersuchenden Proben in einem Verhältnis 2:1 (Dotblotpuffer/H₂O) mit Dotblopuffer und H₂O in mindestens 500 µl verdünnt und in die Löcher gefüllt. Die leeren Löcher wurden ebenfalls mit 2:1 (Dotblotpuffer/H₂O) gefüllt. Nach der Leerung der Löcher wurde das Vakuum noch für weitere 5 min aufrechterhalten, um die Proteine fest an die Membran zu binden. Die Nitrocellulose wurde aus der Kammer entfernt, getrocknet und es konnte dann nach Befeuchtung mit H₂O eine Immundetektion durchgeführt werden.

2.2.4.4 Immundetektion

Die Immundetektion wird mittels ECL ("enhanced"; verstärkte Chemolumineszenz), einer nicht radioaktiven, sensitiven Methode zum Nachweis geringer Proteinmengen auf einer Membran, durchgeführt. Bei der Chemolumineszenz werden Substanzen durch eine chemische Reaktion angeregt. Beim anschließenden Übergang in den Grundzustand kommt es zu einer Lichtemission, die von einem sensitiven Autoradiographiefilm aufgenommen wird. Hierfür wird die an Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) genutzt. Eine durch HRP und Wasserstoffperoxid katalysierte Oxidation von Luminol, einem zyklischen Diacylhydrazid, führt unter alkalischen Bedingungen zu einer Lichtemission bei 428 nm. Die Reaktion wird bei der verstärkten Chemolumineszenz durch Phenol um ein ca. 1000-faches verstärkt.

Protokoll:

Die PVDF-Membran bzw. Nitrocellulose wurde nach dem Transfer in TBS-Tween gespült und für 2 h bei RT mit Blockierungspuffer auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde kurz mit TBS-Tween gewaschen und die Membran 1.5 h mit dem Primärantikörper in TBS-Tween auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran 3 x 10 min mit TBS-Tween gewaschen. Die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper würde für 45 min auf dem Schüttler durchgeführt. Dann wurde die Membran wieder 3 x 10 min mit TBS-Tween gewaschen.

Nach dem letzen Waschschritt wurde die Membran 1 min mit ECL-Entwickler inkubiert (ca. 0.125 ml/cm²) und zwischen zwei Fotokopierfolien in eine Autoradiographie-Kassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde die Autoradiographie-Filme für unterschiedliche Expositionszeiten aufgelegt und anschließend entwickelt. Bei der direkten Detektion des ECL Signals durch ein digitales Kamerasystem wurde überschüssiges ECL Reagenz abgenommen und die Lumineszenz direkt aufgenommen.

2.2.4.5 Strippen einer Blot-Membran

Um mehrere verschiedene Antikörper auf einer Membran zu testen, kann die Membran nach einer ECL Reaktion gestrippt werden. Dabei werden die an die Proteine gebundenen Antikörper mit TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin-hydrochlorid) und SDS wieder von der Membran gelöst.

Protokoll:

Die PVDF-Membran wird mit MeOH aktiviert und die Nitrocellulose Membran wird mit ddH₂O befeuchtet, 3 x 10 min mit ddH₂O gewaschen und mit der Stripp-Lösung für 1 h bei 37°C auf der Wippe inkubiert. Danach wurde die Membran 3 x 10 min mit ddH₂O gewaschen und erneut eine Immundetektion (s.o.) durchgeführt.

2.2.4.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Beim Bio-Rad-Protein-Test wird die Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung von 465 nm auf 595 nm detektiert, die bei der Bindung des Reagenz an Proteine erfolgt. Die Absorptionswerte werden anschließend auf die Messwerte eines Proteinstandards (hier: BSA) bezogen. Mit Bradford wurden nur Detergenzfreie Proteinlösungen gemessen.

Protokoll:

Pro Küvette wurden 1 ml Testreagenz pipettiert und jeweils genau 20 μ l ddH₂O, Proteinstandards (BSA in ddH₂O: 200 μ g/ml, 400 μ g/ml, 600 μ g/ml, 800 μ g/ml, 1000 μ g/ml) und die zu bestimmenden Proben (in geeigneter Verdünnung) unter Vortexen zugegeben und weitere 5 s gevortext. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte am Spektrophotometer bei 595 nm. Durch Erstellen einer Eichkurve anhand der OD₅₉₅-Werte der Proteinstandards konnte der Proteingehalt der Probe ermittelt werden.

2.2.4.7 BCA Proteinbestimmung

Da die Proteinbestimmung nach Bradford relativ anfällig für viele Detergenzien und Lösungsmittel ist, wurde bei der Proteinbestimmung von RIPA-Lysaten der BCA Assay verwendet. Der Test beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der die Proteine in alkalischer Umgebung Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduzieren, das mit der BCA Reagenz (Bicinchonic Acid) einen lilafarbigen Komplex bildet. Der so gebildet Komplex weist bei Licht einer Wellenlänge von 562 nm eine messbare Absorption auf. Die Absorption ist in einem Bereich von 20 µg/ml bis 2000 µg/ml linear.

Protokoll:

Es wurde das Mikrotiterplatten-Protokoll aus der Packungsbeilage von Pierce verwendet. Dazu wurden 10 μ l der Standards und der Probe (zum Teil Verdünnungen) als Triplett ausplattiert und 200 μ l BCA Reagenz dazupipettiert. Die Platte wurde mit Parafilm verschlossen, gevortext und 30 min bei 37°C inkubiert. Im ELISA Reader wurde die Absorption bei 570 nm gemessen.

2.2.5 Spezielle Protein-Biochemische Methoden

2.2.5.1 Präparation von Zell-Lysaten und Gewebe-Lysaten

Um eine Gesamtproteinfraktion von Zellen zu erhalten, können diese lysiert werden. Dabei werden die Membranen der Zellen durch Hochsalz und verschiedene Detergenzien solubilisiert und Proteinkomplexe zum Teil zerstört, so dass die Proteine der Zelle frei werden. Bei der anschließenden Zentrifugation werden alle unlösliche Stoffe, wie z.B. die DNA abzentrifugiert. Die Zell-Lysate können direkt aufs Gel aufgetragen werden, oder für weiterführende Versuche, z.B. für Immunpräzipitationen, verwendet werden.

Protokoll:

Die Zellen einer konfluenten 15 cm Schalen wurden einmal mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und in 9 ml Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in ein 50 ml Reaktionsröhrchen transferiert und für 5 min bei 300 x g und 4°C abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen 1 x mit PBS (4°C) gewaschen und in 500 μ l RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren aufgenommen, und 30 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde das Zell-Lysat 10 min bei 10000 x g zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zellen kleinerer Platten wurden mit entsprechend weniger RIPA-Puffer lysiert.

Um Gewebe effizient zu lysieren, wurde das Gewebe erst in flüssigen Stickstoff tiefgefroren und dann mit Hilfe eines Kryostaten in 10 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese Schnitte wurden bei -20°C in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und dann mit 100 - 200 µl RIPA-Puffer analog zu dissoziierten Zellen lysiert.

2.2.5.2 Neurofilament-Anreicherung durch Tritonextration von Zellen

Neurofilamenten gehören zu den stabilsten Strukturen von Neuronen. Sie sind resistent gegenüber Triton, und Temperaturen von 4°C können ihnen, im Gegensatz zu Tritonresitenten Mikrotubuli, nichts anhaben. Dies wird bei der Neurofilament-Anreicherung ausgenutzt, um möglichst viele Proteine in Lösung zu bekommen. Die Neurofilamente sind dann in der Pellet-Fraktion angereichert.

Protokoll:

Die Zellen einer 15 cm Schale wurden 1 x mit PBS gewaschen, dann in 5 ml PBS mit einem Zellschaber abgeschabt und 5 min bei 1200 rpm, 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in

1 ml Extraktionspuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Je 250 μ l wurden dann auf ein vorbereitetes 0.85 M Sucrosekissen (800 μ l) pipettiert und bei 27000 x g für 1h bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurde in 50 – 100 μ l PBS (oder falls es das Experiment erforderte, in einem anderen Puffer) aufgenommen und resuspendiert.

2.2.5.3 Neurofilament Aufreinigung aus Ratten-Rückenmark

Rückenmarkgewebe ist sehr reich an Neurofilamenten, da hier viele Axone eng gebündelt verlaufen. Um die Neurofilamente gezielt aufzureinigen, können sie, zum Teil in mehreren Schritten durch Scherkräfte, Harnstoff oder hohe Salzkonzentration zerstört und dann wieder mit Hilfe von Glyzerol oder physiologischen Salzkonzentrationen zum Filament-Aufbau gebracht werden.

Protokoll:

Rückenmark mehrerer adulter Ratten wurde mit gleicher Menge (v/w) Disassembly-Puffer versetzt und auf Eis mittels eines elektrischen Homogenisators (mit Scheidwerkzeug) vollständig homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 min bei 72000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit Disassembly-Puffer aufgefüllt und ein zweites Mal unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und mit dem gleichen Volumen an Assembly-Puffer versetzt. Nach einer Inkubation von 15 min bei 4°C wurde bei 75000 x g und 4°C für 45 min zentrifugiert. Das erhaltene durchsichtige Pellet wurde in 100 μ l aufgenommen und 1:10 für die EM Färbung verwendet.

2.2.5.4 Dephosphorylierung von Proteinen mit alkalischer Phosphatase

Bei der Dephosphorylierung werden die an Proteine gebundenen Phosphatreste spezifisch mit der alkalischen Phosphatase entfernt. Die alkalische Phosphatase stammt aus der intestinalen Schleimhaut von Kälber. Die Proteine dürfen nicht in einem Phosphatpuffer vorliegen, da die Phosphationen die alkalische Phosphatase inhibieren würden.

Protokoll:

Es wurden 10 µg Protein mit Phosphatasepuffer auf 10 µl gebracht und mit 0,2 µl alkalischer Phosphatase (2000 u/ml; Sigma) versetzt. Die Ansätze wurden dann für unterschiedliche Zeiträume bis zu 4 h bei 37°C inkubiert und danach wurden die Reaktionen durch Zugabe von 2,5 µl 5xProben-Puffer und durch Schockfrieren abgestoppt. Die Proben wurden dann mittels Immunblot analysiert.

2.2.5.5 β-Eliminierung von O-Glukanen auf einer PVDF-Membran

Bei der β -Eliminierung werden durch eine leicht basische Behandlung spezifisch β -O-glycosyidische Bindungen von Glycoproteinen gelöst, die auf einer PVDF-Membran immobilisiert sind (Duk et al., 1997).

Protokoll:

Proteine wurden als Duplikat über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membranen wurden dann mit Ponceau Rot gefärbt und in einzelne Spuren zerschnitten. Nach reichlich Waschen mit H₂O (3 x 10 min) wurde die eine Hälfte getrocknet und bei 4°C aufbewahrt. Der andere Hälfte wurde 16 h mit 55 mM NaOH bei 40°C inkubiert, dann 3 x 10 min gewaschen und zusammen mit der anderen Hälfte immundetektiert.

2.2.5.6 Partieller chymotryptischer Verdau von NF-Proteinen

Beim partiellen Verdau von NF-Proteine wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Schwanzdomänen von NF-M und NF-H vom Filamentrückgrat abstehen. Dadurch liegen sie exponiert und werden durch das Enzym als erstes vom Restfilament (vornehmlich Stab- und Kopfdomänen) geschnitten. Durch eine Zentrifugation können dann die löslichen Schwänze von dem unlöslichen Filamentrückgrat getrennt werden (Julien & Mushynski, 1983).

Protokoll:

Die zu verdauenden NF-Proteine (Triton-Extraktion) wurden in Verdau-Puffer aufgenommen. In 18 µl wurden 10 µg Protein mit Chymotrypsin in einem Verhältnis 1:200 versetzt und für unterschiedliche Zeiträume (bis zu 15 min) bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 mM PMSF gestoppt. Nach der Inkubation wurden die Proben für 20 min bei 4°C und 12800 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden in der gleichen Menge Verdau-Puffer mit PMSF aufgenommen und beide Fraktionen wurden mittels eines Immunblots analysiert.

2.2.5.7 ELISA

Es wurde in dieser Arbeit ein Festphasen-Assay durchgeführt, bei dem die Proteine eines Zell-Lysats direkt an die Oberfläche einer 96 Wellplatte gebunden wurden. Mit spezifischen Antikörpern wurden dann einzelne Proteine gebunden und mittels TMB Farbreaktion sichtbar gemacht. Dabei konnte mit Hilfe einer Eichgerade deren Menge bestimmt werden.

Protokoll:

Die zu untersuchenden Zell-Lysate wurden im Bindungspuffer verdünnt (ca. 100 ng/Well), 100 μ l pro Well in dreifacher Ausführung ausplattiert und O/N bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Platten 3 x mit 200 μ l PBS gewaschen, 1 h mit Blockpuffer abgesättigt und nach weiteren 3 x Waschen mit Waschpuffer für 2 h bei RT mit Primärantikörper in Waschpuffer (100 μ l/Well) inkubiert. Nach 3 x Waschen mit Waschpuffer wurde 1 h mit Sekundärantikörper inkubiert und 3 x mit Waschpuffer ohne BSA gewaschen. Für die Detektion wurden die Wells mit 100 μ l TMB-Lösung inkubiert und nach ca. 20 min wurde die Reaktion mit 100 μ l 2 M H₂SO₄ abgestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen.

2.2.6 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 Transformation und Präparation von Plasmid-DNA

Protokoll:

Für die Transformation wurden 100 μ l kompetente Bakterien (*E.coli*: DH5 α , TOP 10 (Invitrogen) oder Dam⁻/Dcm⁻ GM2163 (New England Biolabs)) aufgetaut, und mit 1 mM DTT und ca. 100 ng einer zirkulären Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 s bei 42°C wurden 900 μ l LB- Medium zugegeben und der Ansatz für 45 min bei 37°C im Drehrad inkubiert. Danach wurden die Bakterien 1 min bei 13000 rpm in der Tischzetriguge pelletiert und der Überstand wurde bis auf ca. 100 μ l abgesaugt. Die Bakterien wurden resuspendiert, auf LB-Agar-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin oder 40 μ g/ml Kanamycin (je nach verwendetem Konstrukt) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Klone wurden einzelnd gepickt und in flüssiges LB-Medium überführt.

Zur Kontrolle der Plasmide nach einer Ligation wurden jeweils 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin oder 40 µg/ml Kanamycin angeimpft und über Nacht bei 37°C im Drehrad inkubiert. 3 ml dieser Übernachtkultur wurden dann in der Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min abzentrifugiert und die Präparation erfolgte mittels des QIAprep® Spin Miniprep Kit von QIAGEN. Die DNA wurde dann mit einem analytischen Restriktionsverdau überprüft.

Zur Herstellung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 200 ml LB-Medium mit Antibiotikum mit Bakterien eines Klons angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien 30 min bei 5000 x g abzentrifugiert und die Plasmid-DNA wurde mittels des QIAGEN® Plasmid Maxi Kit von QIAGEN oder des CONCERTTM High Purity Plasmid Maxiprep System von GIBCO BRL® nach Angaben des Herstellers isoliert. Nach Aufnahme der DNA in EB Puffer wurde die Konzentration bestimmt. Dies wurde mit einer photospektrometrischen Messung bei 260/280 nm durchgeführt. Dazu wurde 1 µl DNA in 99 µl H2O verdünnt und die OD260 und OD280 gemessen. Die gemessene OD bei 260 nm wurde mit 10 multipliziert und ergab die Konzentration der DNA in μ g/µl. Der Quotient von OD260/OD280 ist ein Maß für die Reinheit der DNA. Er sollte zwischen 1,6 und 1,8 liegen.

2.2.6.2 Analytischer und präparativer Restriktionsverdau

Zur Umklonierung und zur Überprüfung einer Klonierung wurde ein Restriktionsenzymverdau durchgeführt.

Protokoll:

Hierzu werden 0,5-2 μ g Plasmid-DNA (analytischer Verdau) oder 2-10 μ g Plasmid-DNA (präparativer Verdau) mit 0,1 Volumen 10 x Verdaupuffer (enzymspezifisch), 4-15 U Restriktionsenzym und H₂O auf ein Endvolumen von 10 bis 50 μ l gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde über Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.6.3 Agarose-Gelelektrophorese

Hierbei werden DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Laufstrecke der DNA-Fragmente ist dabei umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Die Visualisierung der DNA erfolgt durch Zugabe von Ethidiumbromid im Gel. Ethidiumbromid interkaliert in der DNA und lässt sich mit UV-Licht anregen.

Protokoll:

Agarose (Endvolumen 0,8% (w/v)) wurde in 1xTBE aufgekocht, nach leichtem Abkühlen mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 3 μ g/ml) versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Nach Erkalten des Gels wurden die Proben mit 6x Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung der Gelfragmente erfolgte bei 120 mV mit Laufpuffer (1xTBE). Die Detektion und Dokumentation des DNA-Bandenmusters erfolgte mittels eines UV-Transilluminators und einer Video-Dokumentations-Einheit.

2.2.6.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von spezifischen DNA-Fragementen wurde die DNA mittels eines Agarosegels aufgetrennt, die gewünschte Bande unter dem UV-Licht mit einem Skapell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß transferiert. Das Fragment wurde dann mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit von QIAGEN nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die aufgereinigten DNA-Fragmente konnten direkt für die Ligation verwendet werden.

2.2.6.5 Ligation von DNA Fragmenten

Durch Ligation kann ein DNA Fragment in einen linearisierten Vektor eingefügt werden. Die Enden müssen dabei kompatibel sein. Es gibt zwei verschiedene Typen von Enden: "sticky ends" mit überhängendem Einzelstrang und "blunt end" mit glatten Enden.

Protokoll:

Die zu ligierenden Fragmente wurden aufgereinigt. Ca. 100 ng Vektor wurden mit der 3-5fachen molaren Menge an Insert versetzt, mit H₂O auf 8,5 μ l aufgefüllt und 5 min bei 65°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde der Ansatz mit 1 μ l Ligasepuffer und 0.5 μ l Ligase versetzt. Bei einer "blunt end" Ligation wurden 1 μ l 25% (w/v) PEG 4000 hinzugegeben. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 17°C inkubiert. Zeitgleich wurde ein Kontrollansatz ohne Ligase durchgeführt. In der Regel wurden 5 μ l Ligationsansatz direkt für die Transformation eingesetzt

2.2.7 Spezielle molekularbiologische Methoden

2.2.7.1 Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Technik zur Amplifikation von spezifischen DNA Fragmenten. Dabei wird zunächst die doppelsträngige DNA geschmolzen, an die dann zwei Oligonukleotid-Primer (sense und antisense Primer) in gegenläufiger Richtung an die komplementären DNA-Einzelstränge (Annealing) gebunden werden. Die Hitze-stabile Taq-DNA-Polymerase verlängert anschließend die Primer durch anheften der zur DNA komplementären Nukleotide an die freien 3'-OH-Enden. Die DNA wird somit in jedem Zyklus originalgetreu kopiert und die Menge der DNA-Fragmente nimmt exponentiell zu. Durch entsprechendes Design der Primer können auch neue Sequenzen an den kopierten DNA-Abschnitten angefügt werden.

| Verwendete Primer für die S | ynthese von humaner und muriner NF-M cDNA: |
|-----------------------------|--|
| NFM-Nterm | 5`-AAGATGAGCTACACGTTGGACTCGC-3` |
| NFM-Cterm | 5`-GGTCACTCTGGGTGACTTCCTTTAC-3` |

Protokoll:

<u>Für ein 25 µl Ansatz wurden angesetzt:</u>

| 2,5 µl | 10 x PCR Puffer (Roche) |
|-----------|--|
| je 175 | dATP, dGTP, dCTP und dTTP |
| je 1 µM | beider Primer |
| ca. 10 ng | Plasmid DNA (oder ca. 500 ng genomische DNA) |
| 1 µl | Taq Polymerase oder Expand High Fidelty PCR System (Roche) |

Der PCR Ansatz wurde mit 15 µl PCR-Wachs überschichtet, um Verdunstung zu vermeiden. Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

| 1 Zyklus | Denaturierung der DNA: | 2 min | 94°C |
|--------------|------------------------|-------|----------|
| 25-32 Zyklen | Denaturierung der DNA: | 40 s | 94°C |
| | Annealing: | 1 min | 53°-62°C |
| | Extension: | 90 s | 72°C |
| 1 Zyklus | Extension: | 7 min | 72°C |

Die PCR-Ansätze wurden für kurze Zeit bei 4°C oder länger bei -20°C aufbewahrt. Zur Kontrolle wurden 10 µl auf einen Agarosegel aufgetrennt.

2.2.7.2 Klonierung von PCR-Produkten in TOPO-Vektoren

Die TOPO®-Klonierung wurde mit dem CT-GFP Fusion TOPO®TA Expression Kit (Invitrogen) durchgeführt, um an das gewünschte Protein *C*-terminal GFP zu fusionieren. Bei dieser Methode liegt der Vektor linearisiert und kovalent mit Topoisomerase I verknüpft vor. Zudem besitzt der Vektor an beiden Enden überhängendes 3'Thymidin, das komplementär zu den bei der PCR-Reaktion von der Taq-Polymerase angehängtem überhängenden Adenosin ist. Dadurch wird gewährleistet, dass die PCR-Produkte effizient mit dem Vektor ligieren können. Die 5'-OH Gruppe des PCR-Produktes kann nun die Bindung zwischen Vektor und Topoisomerase angreifen, wodurch eine neue Phosphodiester-Bindung zwischen PCR-Produkt und Vektor gebildet und die Topoisomerase freigesetzt wird (Shuman, 1994).

Protokoll:

4 μ l frisches PCR-Produkt, 1 μ l Salzlösung und 1 μ l TOPO®-Vektor wurden nach Angaben des Herstellers vorsichtig gemischt, 5 – 10 min bei RT inkubiert und dann auf Eis gestellt. Von der Klonierungsreaktion wurden anschließend 2 μ l für die Transformation verwendet.

2.2.7.3 Gerichtete Mutation

Mit einer gerichteten Mutation können einzelne oder auch mehrere Basenpaare in einer DNA-Sequenz ausgetauscht werden. Dadurch können neue Restriktionsenzymstellen eingebaut werden, oder es wird erreicht, dass Aminosäuren in dem Protein verändert werden. Hier wurde das QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene verwendet. Dabei wird zunächst mittels einer PCR Reaktion mit Primern eine veränderte Base in die Sequenz eingeführt und das Plasmid amplifiziert. Danach erfolgt ein Restriktionsenzymverdau mit DpnI, einem Enzym, das nur methylierte DNA schneiden kann. Vorraussetzung dafür ist, dass die eingesetzte parentale DNA methyliert ist, während die durch die PCR-Reaktion synthetisierten Plasmide unmethyliert sind. Durch den Verdau bleiben nur die unmethylierten mutierten Plasmide intakt, die dann in spezielle kompetente Bakterien transformiert werden, welche die Plasmide wieder zusammenfügt. Dadurch kann man innerhalb von zwei Tagen gezielt mutierte Plasmide erhalten. Verwendete Primer (mutierte Basen sind fett und unterstrichen):

T747A forw:

5`-GGAAGCTGTGGCAGAGGTGGTC<u>G</u>CCATCACCAAATCGGTAAAGG-3`

T747A rev:

5'-CCTTTACCGATTTGGTGATGGCACCACCTCTGCCACAGCCTTCC-3`

Eco32I1(1813/1814) forw:

5'-GCTGGTGGCAGAT<u>AT</u>CAAGGTGGAAAAGCC-3`

```
Eco32I1(1813/1814) rev:
```

5'- GGCTTTTCCACCTTG<u>AT</u>ATCTGCCACCAGC-3`

Eco32I1(2369/2370) forw:

5`-GGAGGAAGGGAGTGATA<u>TC</u>GGTGCCAAGGGATCCAGG-3`

```
Eco32I1(2369/2370) forw:
```

5'-CCTGGATCCCTTGGCACC<u>GA</u>TATCACTCCCTTCCTCC-3`

Protokoll:

Die gerichtete Mutation wurde mit den beigefügten Stocklösungen nach dem Protokoll des Herstellers mit kleinen Veränderungen bei der PCR Reaktion durchgeführt.

Für ein 50 µl Ansatz wurden angesetzt:

| 5 µl | 10 x Reaktions-Puffer |
|-----------|-----------------------|
| 50 ng | TOPO-hNFM-GFP DNA |
| je 125 ng | beider Primer |
| 2 µl | dNTP Mix |
| | |

mit ddH2O auf 50 µl auffüllen und dann 1,5 µl PfuTurbo DNA Polymerase zufügen.

| Einstellungen des PCR-Cycl | ers mit geheizt | em Deckel: |
|----------------------------|-----------------|------------|
| 1 Zyklus | 30 s | 95°C |
| 18 Zyklen | 30 s | 95°C |
| | 1 min | 55°C |
| | 20 min | 68°C |

Nach dem DpnI Verdau wurden 4 µl für die Transformation verwendet. Alle folgenden Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des NL6 Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Antikörper NL6 untersucht und sein Epitop identifiziert werden. Dieser monoklonale Antikörper wurde bei der Charakterisierung von Hybridomazellen isoliert, die im Zuge eines Antikörperscreens gegen Zytoskelettproteine humaner neuronaler Zellen hergestellt worden waren und Antikörper gegen unterschiedliche Proteine dieser Fraktion produzierten. Bekannt war, dass der Antikörper das humane Neurofilament-Protein M erkennt, dass es sich um einen IgG Antikörper handelt und dass der Antikörper Glutaraldehyd-sensitiv ist, d.h. nach einer Fixierung mit Glutaraldehyd sein Epitop nicht mehr binden kann (Lüdemann, 1999).

3.1.1 Isotypbestimmung

Als erstes wurde der IgG Subtyp des Antikörpers mittels des "Isostrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit" (Roche) bestimmt, um im Weiteren die Versuchsbedingungen daran anpassen zu können. Es gibt insgesamt vier verschiedene IgG Subtypen in der Maus (IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3), die z.B. unterschiedliche Affinitäten zu Protein A haben.



Abb. 3.1: Isotypbestimmung des NL6 Antikörpers. Ergebnis des "Isostrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Test" (Roche) des NL6 Antikörpers mit immobilisierten blauen Kügelchen bei IgG2a und κ (leichte Kette).

Der Test ergab, dass es sich bei NL6 um einen IgG2a Antikörper mit einer κ -Kette handelt (Abb.3.1). Dies stellte sich als Vorteil heraus, da die meisten der kommerziellen Antikörper vom Subtyp G1 sind. Im Allgemeinem sind in BALB/c Mäusen, die für die Immunisierung verwendet wurden, die meisten IgG Antikörper vom Subtyp 1 (ca. 56%) (Natsuume-Sakai et al., 1976). Bei 95% der Maus Antikörper wird die leichte κ -Kette gefunden.

Da NL6 ein IgG2a Antikörper ist, konnten Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit anderen monoklonalen IgG1 Maus Antikörpern durchgeführt werden, indem Isotyp-spezifische Sekundärantikörper verwendet wurden. Der NL6 Antikörper ließ sich zudem sehr gut über Protein-A-Sepharose aufreinigen, da IgG2a eine hohe Affinität zu Protein A besitzt.

3.1.2 Expression des NL6 Epitops in humanen Modellneuronen

Neurofilamente werden nur in ausdifferenzierten Neuronen exprimiert, und werden zudem posttranslational stark modifiziert. Ihre Expression startet während der neuronalen Morphogenese und erreicht ihren Höhepunkt erst, wenn die Neuronen zu ihren Zielzellen Kontakt aufgenommen haben. Viele monoklonale Antikörper, die Neurofilament-Proteine erkennen, sind abhängig von spezifischen Modifikationen.

Mit Hilfe der humanen neuronalen Zelllinie NT2, die sich *in vitro* durch Behandlung mit Retinsäure (RA) zu postmitotischen Neuronen (NT2N) differenziert, kann die Entwicklung von humanen Neuronen im Kultursystem untersucht werden. Es wurden daher zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Differenzierung Zell-Lysate hergestellt und mittels eines Immunblots analysiert. Dazu wurde die Expression des NL6 Antigens (NF-M) während der Reifung der Neuronen bestimmt und das NL6 Signal mit dem eines Kontroll-Antikörpers (M20) verglichen, der NF-M unabhängig von posttranslationalen Modifikationen erkennt.

Die Analyse zeigte, dass sich NF-M erstmalig zwischen der zweiten und dritte Woche während der Differenzierung der NT2 Zellen mit RA immunbiochemisch nachweisen lässt (Abb. 3.2). Dabei sind keine auffälligen Unterschiede im relativen Verhältnis der Signale von NL6 und M20 zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass beide Antikörper NF-M gleichermaßen erkennen. Als Referenzprotein zum Nachweis vergleichbarer Proteinmengen wurde in diesem Fall das konstitutiv exprimierte Aktin verwendet.



Abb. 3.2: Immunblot-Analyse der NF-M Expression während der Differenzierung von NT2 Zellen. NT2 bzw. NT2N Zellen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten während der fünfwöchigen Differenzierung durch Retinsäure (RA) lysiert und je 10 μ g (NF-M) bzw. 1 μ g (Aktin) Protein wurden über eine 7.5% ige (NF-M) bzw. 10% ige (Aktin) SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde der 7.5% ige Immunblot nacheinander mit NL6 und M20 (nach vorherigen Strippen) und der 10% ige Immunblot mit α -Aktin analysiert.

Das langsame Ansteigen der NF-M Expression könnte zwei Gründe haben. Einerseits könnte das zunehmende Signal bedeuten, dass in allen Zellen die NF-M Expression langsam zunimmt. Andererseits könnten auch einzelne Zellen sehr stark NF-M exprimieren während andere es nur schwach oder gar nicht exprimieren, da nicht geklärt ist, ob sich im NT2/NT2N-Kultursystem alle Zellen gleichmäßig und zeitgleich differenzieren.

Um dies zu klären, wurden NT2/NT2N Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Differenzierung durch RA auf Deckgläschen ausplattiert und mit NL6 und gegen αNestin immungefärbt (Abb. 3.3).

Die Aufnahmen in Abbildung 3.3 zeigen, dass nach 20 Tagen nicht alle der Zellen NF-M (NL6) exprimieren, wobei das Expressionsniveau der exprimierenden Zellen sehr hoch war. In den Zellen waren die NL6 Signale in bestimmten Bereichen stark angereichert. Siehe Abbildungen 1

Abb. 3.3: Immunfluoreszenzfärbung von NT2-NT2N Zellen während der RA Differenzierung. NT2 Zellen wurden 20 Tage mit RA behandelt, auf Kollagen-beschichtete Deckgläschen ausplattiert, drei Tage später standardfixiert und mit NL6 und αNestin (JP39) doppelgefärbt. Maßstabsbalken entspricht 20 μm.

Auswertungen mehrerer Gesichtsfelder ergaben, dass nach 20 Tagen fast 90 % der Zellen eine NF-M Expression zeigten (Abb. 3.4). Die Expression war erstmals nach acht Tagen detektierbar, wobei sie bis zum Tag 25 stetig zunahm. Insgesamt differenzierten sich etwa 85 bis 95% der NT2 Zellen soweit, dass sie NF-M exprimierten.



Abb. 3.4: Anzahl der NL6 positiven NT2-NT2N Zellen während der RA Differenzierung. NT2 Zellen wurden an unterschiedlichen Zeitpunkten während der RA Behandlung auf Kollagen-beschichtete Deckgläschen ausplattiert, drei Tage später standardfixiert und mit NL6 und DAPI gefärbt. Zur Quantifizierung wurden fünf unabhängige Gesichtfelder im Mikroskop ausgezählt und der Anteil der NL6 positiven Zellen bestimmt. Mittelwert und Standardfehler sind gezeigt.

In differenzierten Neuronen werden Neurofilamente in den unterschiedlichen Kompartimenten verschieden stark modifiziert. NFs im Soma und in den Dendriten sind unphosphoryliert oder sehr wenig phosphoryliert, während die NFs in den Axonen sehr viele Phosphate tragen. Deshalb können z.B. Phosphorylierungs-abhängige NF-Antikörper spezifisch unterschiedliche Bereiche im Neuron anfärben.

Um zu überprüfen, ob der Antikörper NL6 in den Neuronen eine gleichmäßige Verteilung zeigt, wurden NT2N Zellen mit NL6 und monoklonalen Antikörpern gegen NF-M (M20) bzw. unphosphoryliertes NF-H (SMI32) doppelgefärbt und mittels konventioneller Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert.

Siehe Abbildungen 1

Abb. 3.5: Immunfluoreszenzaufnahmen von NT2N Zellen. NT2N Zellen wurden nach siebenwöchiger Differenzierung auf Kollagen-beschichtete Deckgläschen ausplattiert und vier Tage später standardfixiert. Die Zellen wurden mit NL6 und M20 bzw. SMI32 doppelgefärbt und mit einem konventionellen Immunfluoreszenzmikroskop analysiert. Die Photos wurden mit einer AxioCam MRC Kamera von Zeiss aufgenommen. Maßstabsbalken entspricht 20 μm.

NL6 zeigte ein filamentöse Verteilung im gesamten Neuron, die stellenweise stark konzentriert war. Die stärkste Anreicherung war im Zellsoma zu erkennen, wobei aber auch alle Fortsätze von NL6 gefärbt wurden. NL6 zeigte dieselbe Verteilung wie der NF-M Antikörper M20 (Abb. 3.5, oben), der Gesamt-NF-M in den Zellen detektiert. Der SMI32 Antikörper hingegen erkennt NF-H nur, wenn das Epitop nicht phosphoryliert ist. Deshalb färbt er vor allem neuronales Soma, die Dendriten und nur Axone mit großen Durchmesser, da die meisten Neurofilamente im Axon phosphoryliert sind, so dass das Epitop maskiert ist. Diese spezifische Verteilung der phosphorylierten Epitope auf den NFs herrschte auch in NT2N Zellen vor, da SMI32 hauptsächlich das Soma und proximale Anteile der Fortsätze

färbte. Die Unterschiede in der Verteilung von NL6 und SMI32 sind deutlich in der Abbildung 3.5 (unten) zu erkennen. NL6 färbt den langen Fortsatz eines Neurons (Pfeil), dessen Soma sich rechts außerhalb des Blickfeldes befindet. Dieser Zellausläufer wird von SMI32 nur schwach und nur im proximalen Bereich detektiert, woraus geschlossen werden kann, dass es sich um ein Axon handelt.

Siehe Abbildungen 1

Abb. 3.6: Immunfluoreszenzaufnahmen von NT2N Zellen. NT2N Zellen wurden nach siebenwöchiger Differenzierung auf Kollagen-beschichtete Deckgläschen ausplattiert und vier Tage später fixiert. Die Zellen wurden mit NL6 und αMAP2b doppelgefärbt und mit dem konventionellen Immunfluoreszenzmikroskop analysiert. Die Photos wurden mit einer AxioCam MRC Kamera von Zeiss aufgenommen. Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Des Weiteren wurde mit einem Kompartiment-spezifischen αMAP2b Antikörper doppelgefärbt. MAP2b ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, dass in adulten Neuronen im somatodendritischen Kompartiment angereichert ist. In der Abbildung 3.6 ist zu erkennen, dass MAP2b im gesamten Soma und den Dendriten aber nur im proximalen Teil des Axons (Pfeil) detektiert wird, während NL6 auch im distalen Axon vorhanden ist. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das NL6 Antigen in NT2N Zellen in allen Zellausläufern relativ gleichmäßig verteilt ist. Eine Kompartiment-spezifische Lokalisation, die darauf schließen lassen würde, dass der NL6 Antikörper nur eine spezifisch verteilte Subpopulation von NF-M detektiert, ist nicht zu erkennen.

3.1.3 NL6 Expression im humanen Kortex

Da es sich bei NT2 Zellen um eine immortalisierte Zelllinie handelt, sollte geklärt werden, ob das NL6 Antigen auch *in situ* ubiquitär im ganzen Neuronen vorkommt. Dazu wurden in einer Kollaboration mit Dr. Volkmar Hans (Universität Bonn) humanes Temporallappengewebe aus Biopsien von Epilepsiepatienten mit den Antikörpern NL6 und 2F11 analysiert. Der 2F11 Antikörper erkennt phosphoryliertes NF-H und, weniger effizient, NF-L, das im Axon von Neuronen lokalisiert ist. Die Proben wurden nach einem standardisierten Protokoll zur Färbung von Paraffinschnitten mit dem automatischen TechMate 500 (DAKO) gefärbt. Dabei wurde Diaminobenzidin als Peroxidase-Substrat verwendet. Die Schnitte wurden zudem mit Hematoxylin, das an DNA bindet, gegengefärbt.

Es zeigte sich, dass beide Antikörper die Axone in der subkortikalen weißen Substanz stark anfärbten (Abb. 3.7). Zudem exprimierten sowohl radiale und horizontale als auch colaterale Fasern in den infragranulären Schichten (IV bis VI) des Kortex beide Antigene. Die gefärbten Regionen der beiden Antikörper waren identisch, wobei die Färbung mit NL6 vergleichsweise schwächer war. Das NL6 Antigen wurde exklusiv in Axonen gefunden, während 2F11 gelegentlich auch perinukleäre Soma (Abb. 3.7; Pfeil) färbte.

Im Gehirngewebe zeigte NL6 im Gegensatz zur Verteilung in dissoziierten Zellen keine ubiquitäre Verteilung, sondern das Signal wird ausschließlich axonal detektiert. Die Verteilung glich der des 2F11 Antikörper, der spezifisch NF-H im Axon erkennt. Dies deutet darauf hin, dass der NL6 Antikörper ein modifiziertes Epitop erkennt, da Neurofilamente im gesamten Neuron exprimiert werden.

Um die Ergebnisse der Immunhistologie zu bestätigen, wurden aus dem Biopsiematerial von fünf Patienten Lysate hergestellt und im Immunblot analysiert. Hierbei wurde die graue und weiße Substanz getrennt lysiert, um somatodendritisches (graue Substanz) und axonales Kompartiment (weiße Substanz) der Neuronen getrennt zu analysieren. Um einen Eindruck über das Verhältnis von NL6 Antigen zu Gesamt-NF-M zu erhalten, wurde nacheinander mit NL6 und M20 (nach Strippen) immundetektiert.



Abb. 3.7: Immunhistologische Schnitte durch den Temporallappen eines humanen Gehirns. Humanes Temporallappengewebe wurde mit 4% Formalin immersionsfixiert und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte (Dicke 4 μm) wurden deparaffiniert, die endogenen Peroxidase wurden blockiert und mit Antikörper NL6 bzw. 2F11 inkubiert. Die Detektion erfolgte durch die ABC Methode mit Diaminobenzidin als Peroxidase-Substrat. Die Schnitte wurden außerdem mit Hematoxylin gegengefärbt. Alle Reaktionen wurden mit einer automatischen Immunfärbemaschine (TechMate 500, DAKO) nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Der Pfeil weist auf ein gefärbtes perinukleäres Soma. Der Maßstab in der oberen Reihe entspricht 1 mm, in der unteren Reihe 100 μm.

Abbildung 3.8 (A) zeigt einen Immunblot der Gehirn-Lysate, der mit NL6 und M20 inkubiert wurden. Es ist bei beiden Antikörpern ein deutlicher Unterschied in der Bandenintensität zwischen grauer und weißer Substanz zu erkennen. Der NL6 Antikörper detektierte bei allen untersuchten Biopsieproben immer insgesamt drei Banden (Abb. 3.8 A), während M20 nur die oberste Bande erkennt.



Abb. 3.8: Verteilung von NL6 Antigen zu Gesamt-NF-M in humanen Cortex. Temporallappengewebe von fünf Patienten wurde in weiße und graue Substanz getrennt, am Kryostat geschnitten und dann mit RIPA-Puffer lysiert. Es wurden jeweils 30 μ g der Lysatfraktionen mittels einer 7.5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den Antikörpern NL6 und M20 (nach Strippen) nacheinander immundetektiert (A – Immunblot eines Patienten). Die erhaltenen ECL Filme wurden mittels eines Durchlichtscanners digitalisiert und alle Banden quantifiziert. Mittelwert und Standardfehler sind gezeigt (B - ***: Student T-Test; paarweise; "2-tailed"; p<0.001; n = 5).

Die Quantifizierung der Immunblots (Abb. 3.8 B), deutete daraufhin, dass die axonale Anreicherung des NL6 Antigen auch mittels immunbiochemischer Methoden nachweisbar ist. Das Signal von M20 ist ungefähr zweimal stärker in der weißen gegenüber der grauen Substanz angereichert, während das NL6 Antigen gut viermal stärker in der weißen Substanz angereichert ist. Dieser Unterschied zwischen dem NL6 Antigen und Gesamt-NF-M ist hochsignifikant. Das bedeutet, dass das NL6 Antigen nicht wie Gesamt-NF-M verteilt ist, sondern vor allem im Axon angereichert ist. Dies bestätigt das Ergebnis der Immunfärbung und verstärkt die Hypothese, dass NL6 ein modifiziertes Epitop erkennt.



Abb. 3.9: Altersabhängige Expression von NL6 im Vergleich zu Gesamt-NF-M. Das gesamte NL6 Signal der fünf Patienten aus Abbildung 3.8 wurde ins Verhältnis zu dem M20 Signal gesetzt. Die erhaltenen Werte wurden nach dem Alter der Patienten sortiert (m: männlich; w: weiblich).

Betrachtet man das gesamte NL6 Signal (weiße + graue Substanz) im Verhältnis zu Gesamt-NF-M wird deutlich, dass der NL6 positive Anteil mit dem Alter der Patienten von ca. 1,5 beim siebenjährigen Patienten bis auf 2,6 bei der 38 Jahre alten Patientin steigt (Abb. 3.9). Es könnte folglich sein, dass die von NL6 erkannte Modifizierung am NF-M Protein mit dem Alter zunimmt. Allerdings gibt es auch einen auffälligen Unterschied zwischen den beiden 38 Jahre alten Patienten, und bei der Sechzigjährigen liegt das Verhältnis nur bei 1,8. Somit zeigen diese Ergebnisse nur einen möglichen Trend an, denn für eine gesicherte Aussage einer Alter-abhängigen Expression des NL6 Antigens werden mehr Daten benötigt.

3.1.4 Posttranslationale Modifikation des NL6 Epitops

NL6 zeigt im Humangehirn eine Kompartiment-spezifische Verteilung, die auch ein NF-H Antikörper aufweist, der ein phosphoryliertes Epitop erkennt. Da Neurofilamente im gesamten Neuron verteilt vorkommen, kann daraus geschlossen werden, dass NL6 ein modifiziertes Epitop erkennt, das vor allem im Axon verändert wird. Um eine mögliche Phosphorylierungs-Abhängigkeit des NL6 Antikörpers zu untersuchen, wurden Tritonextrahierte Neurofilament-Proteine aus BE2-Zellen, mit alkalischer Phosphatase versetzt. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde dann nach verschiedenen Inkubationzeiten gestoppt, und die Fraktionen wurden im Immunblot mit NL6 analysiert. Bei den BE2 Zellen handelt es sich um humane Neuroblastomzellen, die das NL6 Antigen stark exprimieren. Da sie leichter als NT2N Zellen zu kultivieren und schneller zu differenzieren sind, wurden diese Zellen für alle weiteren biochemischen Experimente verwendet.



Abb. 3.10: Immunblot-Analyse der Dephosphorylierung von NF-Proteinen aus BE2-Zellen. Durch Triton-Extraktion aus BE2-Zellen angereicherte NF-Proteine (10 μg) wurden mit alkalischer Phospatase für 5, 10, 20, 40, 80, 240 min inkubiert, dann über eine 7.5%ige SDS-Page aufgetrennt, geblottet und mit NL6 immundetektiert.

In Abbildung 3.10 ist erkennbar, dass durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase das Signal von NL6 nicht beeinflusst wird. Zwar verschwindet mit der Zeit die obere Bande des Dupletts, das anfangs und in der Kontrolle detektiert wird. Dies ist aber auf die veränderte Beweglichkeit von NF-M nach zunehmender Dephosphorylierung zurückzuführen. Die Intensität der Bande nach 240 min Phosphatase-Behandlung entspricht der Gesamt-Intensität der beiden Banden bei 0 min. Somit scheint das von NL6 erkannte Epitop nicht Phosphorylierungs-abhängig zu sein. Dieses Ergebnis wurde im Rahmen einer Kollaboration durch Untersuchungen von Dr. A. Clement (Scripps Research Institute, San Diego) an dephosphorylierungs-abhängigen Antikörpern bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Modifikation, die anNeurofilamenten gefunden wurde, ist die zytoplasmatische Glycosylierung, bei der einzelne *N*-Acetylglucosamin Monosaccharide an Serin- und Threoninreste gehängt werden. Diese Zucker sind β -O-glycosidisch an Proteine gebunden, und können somit spezifisch durch eine leicht basische Behandlung entfernt werden (β -Eliminierung). Diese Behandlung entfernt zwar auch Phosphate, da aber eine Phosphorylierungsabhängigkeit ausgeschlossen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass

eine Reduktion des Signals nach der Behandlung auf die Entfernung eines Zuckers im Epitop beruht.

Für die β -Eliminierung wurden die Triton-extrahierten NF-Proteine aus BE2-Zellen gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Von den geblotteten Proteinen wurde dann über Nacht mit 55 mM NaOH die β -glycosidischen Zucker entfernt. Behandelte sowie unbehandelte Membranen wurden dann im Immunblot mit NL6, M20 und einem Kontrollantikörper (α GlcNAc (CTD110.6)), der *N*-Acetylglucosamin unabhängig vom Proteinrückgrat erkennt (Comer et al., 2001), analysiert.



Abb. 3.11: Immunblot-Analyse der β -Eliminierung von O-GlcNAc von Proteinen aus Triton-extrahierte BE2-Zellen. Proteine aus Triton-extrahierten BE2-Zellen (10 µg - NL6, M20; 1µg - α -GlcNAc, Protein) wurden über eine 7.5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde geteilt und ein Teil wurde über Nacht bei 40°C mit 55 mM NaOH inkubiert, während der andere unbehandelt gelagert wurde. Nach der Behandlung wurde eine Immundetektion mit den Antikörpern (A) NL6, M20 und (B) α -GlcNAc durchgeführt. Der α -GlcNAc Blot wurde zur allgemeinen Proteindetektion nachträglich mit Ponceau Rot gefärbt.

Der M20 Antikörper erkennt NF-M unabhängig von der Behandlung der Membranen (Abb. 3.11). Dies bedeutet, dass das Protein durch die basische Behandlung nicht zerstört oder abgewaschen wird. NL6 detektiert hingegen nach der β -Eliminierung das Protein nicht mehr. Daraus lässt sich schließen, dass das Epitop des NL6 Antikörper Glycosylierungs-abhängig ist. Als Positivkontrolle für die Effektivität der Eliminierung wurden diese Membranen auch mit einem generellen α -GlcNAc Antikörper detektiert. Dieser detektierte nach der β -Eliminierung keine Banden mehr. Die Entfernung von *O*-GlcNAc war folglich effektiv.

3.1.5 Expression von humanem und murinem NF-M in unterschiedlichen Zelltypen

Nachdem nun geklärt war, dass das Epitop des NL6 Antikörpers Glycosylierungs-abhängig ist, stellte sich die Frage, inwiefern diese Stelle universell glycosyliert werden kann oder ob sie nur in Neuronen modifiziert wird. Deshalb wurden folgende Einzelfragen mit Hilfe von Transfektionsexperimenten adressiert:

- Sind alle Zellen (neuronal/nicht neuronal) prinzipiell in der Lage das Epitop so zu gylcosylieren, dass es NL6-reaktiv wird?
- Können auch Zellen anderer Spezies (Maus, Ratte, Hamster) dieses humane NF-M Epitop glycosylieren?
- Erkennt der NL6 Antikörper auch murines NF-M oder gibt es Unterschiede zur Detektion von humanem NF-M?

Es wurden vier verschiedene humane Zelllinien mit GFP-gekoppeltem humanen bzw. murinen NF-M transfiziert und immunfluoreszenzmikroskopisch mit NL6 und M20 analysiert. Als neuronale Zelllinien dienten NT2 und SH-SY5Y Zellen. Als nicht neuronale Kontrollzellen wurden HeLa und HEK 293 Zellen eingesetzt, wobei sich bei den HEK 293 Zellen herausstellte, dass ein Teil der Zellen endogenes NF-M exprimiert. Dies ist auch in der Literatur dokumentiert (Shaw et al., 2001).

Wie in Abbildung 3.12 dargestellt, werden die exogenen NF-M Untereinheiten in NT2 Zellen in Filamente eingebaut. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um das Vimentin-Filamentsystem, in das NF-M eingebaut werden kann (Monteiro & Cleveland, 1989). NL6 detektiert das humane aber nicht das murine NF-M-Fusionprotein, während M20 beide exogenen NF-M-Fusionsproteine erkennt. Somit ist klar, dass beide Proteine exprimiert werden, dass aber NL6 spezifisch nur das humane NF-M erkennt.

Auch in den anderen humanen Zelllinien konnte der NL6 Antikörper nur das humane NF-M erkennen. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen neuronalen bzw. nicht-neuronalen Zellen. Dies deutet daraufhin, dass diese spezifische Glycosylierung nicht Neuronen-spezifisch ist.

Siehe Abbildungen 2

Abb. 3.12: Immunfärbung von hNF-M und mNF-M transfizierten NT2 Zellen. Die Zellen wurden mit TOPO-hNFM-GFP oder TOPO-mNFM-GFP DNA transfiziert, nach 48 h standardfixiert und mit α GFP und NL6 bzw. M20 immungefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

In weiteren Experimenten wurden Ratten (PC12, RAT1), Maus (Neuro2A, 3T3) und Hamster (CHO) Zelllinien mit den humanen und murinen NF-M Konstrukten transfiziert, wobei bei Ratte und Maus sowohl neurale (PC12, Neuro2A) als auch nicht-neurale Zellen (RAT1, 3T3) eingesetzt wurden.

| | NL6 Reaktivität | | | |
|---------|-----------------|------------|---------|--------|
| Zelltyp | TOPO-hNF-M | TOPO-mNF-M | Spezies | neural |
| NT2 | + | - | | ja |
| SHSY5Y | + | - | | ja |
| HELA | + | - | Mensch | nein |
| HEK 293 | + | - | | ? |
| PC12 | + | - | | ja |
| RAT1 | + | - | Ratte | nein |
| Neuro2A | + | - | | ja |
| 3T3 | + | - | Maus | nein |
| СНО | + | - | Hamster | nein |

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Immunfluoreszenzergebnisse nach Transfektionen mit humanem und murinem NF-M

Für alle Zelllinien ergab sich unabhängig von der Spezies und sowohl für neurale als auch für nicht-neurale Herkunft, dass NL6 das transfizierte humane NF-M aber nicht das murine NF-M detektieren konnte (Tab. 3.1).

In der Tabelle 3.1 sind alle Ergebnisse der Transfektionsversuche zusammengefasst. Sie belegen, dass die Glycosylierung des NL6 Epitops in allen Spezies und unabhängig vom Charakter der Zellen stattfindet, es sich also um keine Neuronen-spezifische Modifikation handelt. Allerdings erkennt NL6 nur das humane NF-M, nicht aber das Maus NF-M, obwohl die Aminosäuresequenz von humanem und murinem NF-M zu 83.5 % identisch sind. Dafür sind drei Erklärungen möglich: Erstens könnte dieser Serin- oder Threoninrest im murinen NF-M gar nicht existieren, zweitens könnte diese Stelle in murinen NF-M nicht glycosyliert werden oder drittens könnte die Glycosylierung zwar stattfinden, aber die restlichen Aminosäuren, die das NL6 Epitop ausmachen, könnten verschieden sein.

3.1.6 NL6 Immunreaktivtät bei der Differenzierung von verschiedenen neuralen Zelltypen

NL6 Immunreaktivität nimmt während der Differenzierung von NT2 Zellen stark zu, wobei auch die Gesamt-NF-M Expression entsprechend zunimmt. Durch Vergleich verschiedener neuraler Zelllinien sollte geklärt werden, inwieweit sich die relative NL6 Immunreaktivität während der Differenzierung verändert. Dazu wurden Zell-Lysate von BE2 (-/+ zwei Wochen RA), Neuro2A (-/+ zwei Tage RA unter serumfreien Bedingungen), PC12 (-/+ vier Tage NGF – serumfrei) und SHSY5Y Zellen (-/+ vier Tage RA) über eine SDS-Page aufgetrennt und im Immunblot mit NL6 und M20 detektiert. Als Kontrolle für vergleichbare Proteinmengen wurde mit einem αAktin Antikörper immundetektiert.

NL6 und M20 erkennen beide das humane NF-M in BE2 und SH-SY5Y Zellen (Abb. 3.13). Bei den BE2 Zellen nimmt die Expression von NF-M durch die Differenzierung nicht stark zu. Auch ist kein nennenswerter Unterschied in der Zunahme der Expression von Gesamt-NF-M und der von NL6 detektierten Subpopulation zu detektieren. In SH-SY5Y Zellen kommt es durch die Behandlung mit RA zu einen sehr starken Anstieg der gesamten NF-M Expression, wobei hier der Anteil des NL6 positiven NF-Ms stärker zuzunehmen scheint. Bei der Differenzierung von SH-SY5Y Zellen kommt es also möglicherweise zu einer vermehrten Glycosylierung des NL6 Epitops.



Abb. 3.13: Immunblot-Analyse der NL6 und M20 Expression in verschiedenen Zellen vor und nach der Differenzierung. BE2 Zellen wurden zwei Wochen mit RA, N2A Zellen 24 h mit RA unter Serumentzug, PC12 Zellen drei Tage mit NGF unter serumfreien Bedingungen und SHSY5Y Zellen vier Tage mit RA differenziert. Die Zellen wurden jeweils lysiert und 20 μg (NF-M) bzw. 1 μg (Aktin) Protein wurde über eine 7.5 %ige (NF-M) bzw. 10 %ige (Aktin) SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit NL6, M20 (nacheinander, nach Strippen) oder Aktin immundetektiert. Die Pfeile weisen auf die unterschiedlichen Molekulargewichte von Human- (160kDa) und Ratten-NF-M (145 kDa).

NL6 kann das Maus und Ratten NF-M der Neuro2A bzw. PC12 Zellen nicht binden, während M20 zu mindestens Ratten NF-M detektiert. Da M20 Affinität zu murinem NF-M besitzt, deutet dies daraufhin, dass nur wenige Neurofilamente exprimiert werden, die unter diesen Bedingungen im Immunblot nicht nachweisbar sind. Das endogene NF-M von PC12 Zellen nimmt nach Differenzierung mit NGF leicht zu. NL6 erkennt das NF-M der PC12 Zellen nicht, obwohl der Antikörper zu mindestens eine schwache Affinität zu Ratten NF-M aus Rückenmarkshomogenaten zeigt (Dr. A. Clement: Daten nicht gezeigt). Möglicherweise wird endogenes NF-M in PC12 Zellen nicht glycosyliert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass NL6 eine starke Affinität zu humanem NF-M zeigt, wobei die Modifikation des NL6 Epitops sich möglicherweise bei der Differenzierung realtiv zur Gesamt-NF-M Population verändert. Endogenes Ratten-NF-M wird in PC12 Zellen durch den NL6 Antikörper nicht erkannt.

3.1.7 Einfluss modifizierender Agenzien auf die relative NL6 Immunreaktivität in Zellen

Die Glycosylierung von NF-M wird über verschiedene Enzyme geregelt. Die *O*-GlcNAc Transferase (OGT) katalysiert die Bindung von *O*-GlcNAc an Serin- oder Threoninreste, während die GlcNAcase diese Bindung wieder löst. Beide Enzyme stehen in einem Gleichgewicht, so dass immer eine konstante Menge an Zucker im Molekül eingebaut ist. Veränderungen im Gleichgewicht können durch Signaltransduktions-Mechanismen entstehen, die eine Modifikation der Enzyme hervorgerufen kann. Daraufhin wird entsprechend mehr oder weniger *O*-GlcNAc in Proteine eingebaut. *In vitro* können diese Situationen durch Inhibitoren bzw. Aktivatoren der Enzyme oder durch mehr systemisch wirkende Agenzien simuliert werden.

Es sollte untersucht werden, inwieweit die von NL6 detektierte Glycosylierung durch unterschiedliche modifizierdende Agenzien beeinflussbar ist, und wie sich die Immunreaktivität von NL6 im Vergleich zur Gesamt-NF-M Menge (M20) verhält. Dazu wurden BE2 Zellen zwei Stunden mit unterschiedlichen Konzentration der zu untersuchenden Agenzien inkubiert, und die Zell-Lysate wurden mit NL6 und M20 analysiert.

3.1.7.1 Effekt von PUGNAC - einem GlcNAcase-Inhibitor

Um die Glycosylierungsenzyme direkt zu beeinflussen existiert nur eine Substanz, welche die GlcNAcase inhibiert. Es handelt sich dabei um *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-gluco-pyranosylidene)amino-*N*-phenylcarbamate (PUGNAC), ein Derivat von *N*-Acetylglucosamin, das sich in die GlcNAc-Bindestelle des Enzyms setzt und sie so blockiert. Es wurde gezeigt, das PUGNAC spezifisch die zytoplasmatische GlcNAcase beeinträchtigt (Haltiwanger et al., 1998).

Untersucht wurde der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen (10, 20, 50, 100 μ M) und Inkubationszeiten (20 μ M über 10, 30, 60 und 120 min) von PUGNAC. Die Analyse der Zell-Lysate erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Immunblot. Dabei wurde das ECL Signal über ein digitales Kamerasystem aufgenommen und quantifiziert.



Abb. 3.14: Behandlung von BE2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen PUGNAC. BE2 Zellen wurden 2 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an PUGNAC, einem GlcNAcase-Inhibitor, behandelt, und danach lysiert. 15 μ g Protein der Zell-Lysate wurde mittels einer 7.5% igen SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Mit NL6 und M20 (nach Strippen) wurde nacheinander immundetektiert und die durch ECL entstandene Lumineszenz wurde mittels Versadoc 3000 von Biorad digitalisiert und die Signale mit NIH-Image quantifiziert. Mittelwert und Standardfehler sind gezeigt (Students T-Test; paarweise; "1-tailed"; * p<0.05; n = 9).

Es wurde das Verhältnis von NL6 zu Gesamt-NF-M (M20 Signal) bestimmt. Mit zunehmender Konzentration war eine relative Zunahme des NL6 Signals um bis zu 50% im Vergleich zu unbehandelten BE2 Zellen zu erkennen (Abb. 3.14). Mit zunehmender PUGNAC Konzentration nahm auch das relative NL6 Signal zu, wobei bei 20 μ M PUGNAC die Glycosylierung maximal erschien.

Um die Zeitabhängigkeit der Inhibition mit PUGNAC zu untersuchen, wurden 20 μ M PUGNAC eingesetzt (Abb. 3.15). Nach etwa 30 min war ein Maximum erreicht, wobei in diesem Versuch eine etwas niedrigere maximale Zunahme (26% statt 45%) als im vorherigen Versuch erreicht wurde. Die Daten deuten daraufhin, dass durch die Inhibition der GlcNAcase die Glycosylierung des NL6 Epitops um 25 bis 50% gesteigert werden kann.


Abb. 3.15: Behandlung von BE2 Zellen mit 20 μM PUGNAC für unterschiedliche Zeiten. BE2 Zellen wurden 10, 30, 60 und 120 min mit 20 μM PUGNAC, einem GlcNAcase-Inhibitor, behandelt und danach lysiert. 15 μg Protein der Zell-Lysate wurde mittels einer 7.5%igen SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Mit NL6 und M20 (nach Strippen) wurde nacheinander immundetektiert und die durch ECL entstandene Lumineszenz wurde mittels dem LAS 1000 von Fujifilm (Raytest) digital detektiert und die Banden mit NIH-Image quantifiziert. Mittelwert und Standardfehler sind gezeigt.

Um Informationen über die Wirkung von PUGNAC auf die Glycosylierung aller Proteine in der Zelle zu erhalten, wurden die Zell-Lysate (20 μ M PUGNAC: 10, 30 ,60 und 120 min) mittels eines Dotblots auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und nach Strippen nacheinander mit α GlcNAc Antikörper und einem Glycosylierungs-unabhängigen Referenzantikörper immundetektiert (Abb. 3.16 A).

Die Glycosylierung der Gesamtproteine war nach etwa 30 min maximal und betrug etwa 30% (Abb. 3.16). Die Glycosylierung des NL6 Epitops verhält sich damit entsprechend zur Gesamtglycosylierung der Zellproteine.



Abb. 3.16: α GlcNAc Signal nach 20 μ M PUGNAC-Behandlung von BE2 Zellen für unterschiedliche Zeiträume. BE2 Zellen wurden 10, 30, 60 und 120 min mit 20 μ M PUGNAC, einem GlcNAcase-Inhibitor, behandelt, daraufhin lysiert und 15 μ g Protein der Zell-Lysate wurden mittels eines Dotblots auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Mit α GlcNAc und α Aktin wurde nacheinander immundetektiert, und auf ECL-Film exponiert (A). Die Filme wurde gescannt und die Dots mit NIH-Image quantifiziert (B), wobei das α GlcNAc-Signal mit dem Aktin-Signal als Referenz verrechnet wurde. Mittelwert und Standardfehler sind gezeigt (Students T-Test; paarweise; "1-tailed"; * p<0.05; **p<0.01; n = 3).

Die Ergebnisse der Versuche mit PUGNAC zeigen, dass das NL6 Epitop sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig durch PUGNAC ähnlich wie das Gesamtprotein beeinflusst wird. Dies bestätigt auch, dass der NL6 Antikörper ein Glycosylierungs-sensitives Epitop erkennt.

3.1.7.2 Effekt von H7 – einem Breitbandkinase-Inhibitor

Da bekannt ist, das einige Glycosylierungsstellen auch phosphoryliert werden können, sollte untersucht werden inwieweit dies auch für das NL6 Epitop zutrifft. Da die Phosphorylierung reziprok zur Glycosylierung stattfindet, sollte durch einen Kinaseinhibitor die Glycosylierung ansteigen und durch einen Phosphataseinhibitor sollte sie sinken. BE2 Zellen wurden 2 h mit 10, 50, 100 bzw. 200 μ M H7, einem Breitbandkinase-Inhibitor, der eine Reihe von "second Messenger"-abhängigen Kinasen inhibiert, inkubiert und danach lysiert. 200 μ M H7 wirkte bereits toxisch, da die Zellen sich abrundeten und teilweise ablösten. Die Lysate wurden mittels eines ELISA-Tests analysiert und das Verhältnis von NL6 zu M20 wurde bestimmt.



Abb. 3.17: Behandlung von BE2 Zellen mit H7. BE2 Zellen wurden 2 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an H7, einem Breitband-Kinaseinhibitor, behandelt und danach lysiert. Die Zell-Lysate wurden mittels eines ELISA-Tests mit NL6 und M20 immundetektiert und quantifiziert. Mittelwert und Standardfehler sind gezeigt (Students T-Test; paarweise; "2-tailed"; * p<0.05;** p<0.01; n = 9).

Durch die Behandlung mit H7 kommt es zu einer signifikanten, Konzentrations-abhängigen Reduktion des NL6 Signal gegenüber Gesamt-NF-M (Abb. 3.17). Dies steht im Gegensatz zu der Annahme, dass ein Kinaseinhibitor die Glycosylierung erhöhen müsste, wenn das Epitop reziprok glycosyliert und phophoryliert würde. Dies könnte daraufhin deuten, dass das NL6 Epitop nicht phosphoryliert wird. Zu mindestens kann ausgeschlossen werden, dass das Epitop durch "second Messenger"-abhängigen Kinasen phosphoryliert wird. Veränderungen des NL6 Signals ließen sich dann dadurch erklären, dass H7 systemisch auf die Zelle wirkt, und somit Faktoren beeinflusst, welche die Glycosylierungsenzyme beeinflussen.

3.1.7.3 Effekt von Cyclosporin A – einem Phosphatase 2A Inhibitor

In weiteren Experimenten wurden BE2 Zellen mit Cyclosporin A, einem Phosphatase 2A Inhibitor inkubiert. Es wurden Konzentrationen von 5, 50, 200 und 500 nM Cyclosporin A eingesetzt. Auch hier zeigten die Zellen, die mit der höchsten Konzentration an Cyclosporin A behandelt wurden, Anzeichen von Toxizität. Die Zell-Lysate wurden wiederum mittels eines ELISA-Tests ausgewertet und das Verhältnis von NL6 zu Gesamt-NF-M wurde bestimmt.



Abb. 3.18: Behandlung von BE2 Zellen mit Cyclosporin A. BE2 Zellen wurden 2 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cyclosporin A, einem Phosphatase 2A Inhibitor, behandelt und dann lysiert. Die Zell-Lysate wurden mittels eines ELISA-Tests mit NL6 und M20 immundetektiert und quantifiziert. Mittelwert und Standardfehler sind gezeigt (Students T-Test; paarweise; "2-tailed"; * $p \le 0.05$;** p < 0.01; n = 9).

Auch die Behandlung mit Cyclosporin A führte zu einer signifikanten Reduktion des NL6 Signals bezogen auf die M20 Immunreaktivität (Abb. 3.18). Allerdings war keine deutliche Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen, sondern bereits bei 5 nM Cyclosporin A kam es zu einer Reduktion um etwa 25 % verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen. Damit zeigt der NL6 Antikörper eine direkte Reziprozität zur Phosphorylierung, die durch die Phosphatase 2 A geregelt wird.

3.1.7.4 Effekt von Colchicin – einem Mikrotubuli-destabilisierendes Agens

Wenn Mikrotubuli destabilisiert werden, kommt es auch zu einem Abbau von Intermediärfilamenten. Dies ist vor allem während der Zellteilung notwendig, da die IF-Proteine zum Einen verteilt werden müssen und zum Anderen aufgrund ihrer Rigidität eine gleichmäßige Teilung behindern würden. Durch die Behandlung der Zellen mit dem Mikrotubuli-destabilisierdenden Colchicin sollte überprüft werden, ob der Zusammenbruch von Mikrotubuli Einfluß auf die Glycosylierung des NL6 Epitops hat. Daher wurden BE2 Zellen für 2 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (1, 10, 50 mM) Colchicin behandelt, und die Zell-Lysate mittels eines ELISA-Tests analysiert.



Abb. 3.19: Behandlung von BE2 Zellen mit Colchicin. BE2 Zellen wurden 2 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Colchicin, einem Mikrotubuli-destabilisierenden Agens, behandelt und lysiert. Die Zell-Lysate wurden mittels eines ELISA-Tests mit NL6 und M20 immundetektiert und quantifiziert. Mittelwert und Standardfehler sind gezeigt (Students T-Test; paarweise; "2-tailed"; * p<0.05; n = 9).

Die Quantifizierung ergab eine konzentrationsabhängige Reduktion des relativen NL6 Signals um bis zu 32% im Vergleich zu einer Kontrolle (Abb. 3.19). Bei höheren Colchicin Konzentrationen war der Unterschied signifikant. Daraus lässt sich schließen, dass die Glycosylierung des NL6 Epitops durch einen möglichen Abbau der Neurofilamente ausgelöst durch eine Mikrotubulidestabilisierung verringert wird. Dies könnte daraufhin deuten, dass die Glycosylierung vor allem im Filament stattfindet und während des Abbaus reduziert wird.

3.1.8 Ultrastrukturelle Analyse der NL6 und M20 Immmunreaktivität

Es sollte untersucht werden, ob der Antikörper NL6 auch ultrastrukturell einzelne Neurofilamente erkennt, die aus den drei Untereinheiten rekonstituiert wurden und ob bestimmte Domänen bevorzugt gefärbt werden. Dies sollte mittels der Immun-Elektronenmikroskopie (IEM) untersucht werden.

Aus Vorversuchen war bekannt, dass NL6 auch Ratten NF-M erkennt. Deshalb wurde aus dem Rückenmark von Ratten ein Homogenat hergestellt, das reich an Neurofilamenten ist. Die Anreicherung der Neurofilamente wurde durch einen aufeinanderfolgenden Disassembly/Assembly-Schritt durch Scherkräfte im Gewebe-Zerkleinerer bei der Homogensisierung bzw. 4 M Glyzerol zum Zusammenbau der Untereinheiten erreicht. Die erhaltenen Neurofilamente wurde von Andrea Hellwig auf Kupfergrids aufgebracht,

standardfixiert und mit NL6 und M20 immungefärbt (Abb. 3.20 A,B). Um die Neurofilamente sichtbar zu machen, wurde im Anschluss an die Färbung eine Negativkontrastierung vorgenommen.

Siehe Abbildungen 2

Abb. 3.20: Elektronenmikroskopische Analyse der NL6 bzw. M20 Bindung an Ratten Neurofilamente. (A/B) Aus Rückenmark von mehreren Ratten wurde durch Homogenierung und Disassembly/Assembly Neurofilamente angereichert. Die Neurofilamente wurden auf hydrophile Pioloform-beschichtete Kupfergrids (400 Mesh) aufgebracht und standardfixiert. (C) NT2N Zellen wurden auf Formavar- und Kollagen-beschichtete Nickelgrids (100 Mesh) auf Deckgläschen ausplattiert und NP40-Extraktions-fixiert.

Es wurde mit den Antikörpern NL6 (1:200) und M20 (1:200) immundetektiert. Als Brücken-Antikörper wurde die IgG Fraktion eines Kaninchen α Maus Antikörpers (1:150; ICN) verwendet und mittels Protein A Gold (\emptyset 15 nm) markiert. Nachträglich wurde mit 2% Glutaraldeyd fixiert und mit 1% Uranylacetat negativ kontrastiert. Der Maßstabsbalken entspricht 500 nm.

Die Immunfärbung ergab, dass NL6 einzelne rekonstituierte Neurofilamente detektieren kann. Die Glycosylierung des NL6 Epitops scheint somit nicht den Zusammenbau der Filamente zu hemmen. Sowohl NL6 als auch M20 banden relativ gleichmäßig am gesamten NF (Abb. 3.20 A/B). Zum Teil kam es bei beiden Antikörpern stellenweise zu Akkumulationen. Dies könnte daran liegen, dass NF-M Untereinheiten teilweise gehäuft auftreten und ihre Verteilung im Filament nicht gleichmäßig ist.

Da die Neurofilamente rekonstituiert wurden, konnte mit diesen Experimenten keine Aussage darüber getroffen werden, ob in Neuronen bestimmte Regionen, wie z.B. die Enden der Filamente, glycosyliert vorliegen. Deshalb wurden in einem zweiten Ansatz NT2N Zellen auf Nickelgrids ausplattiert, mittels eines kombinierten NP40-Extraktionsfixierungsprotokolls fixiert und mit NL6 immungefärbt.

Aufgrund der Dicke der Zellen ist der Kontrast der Probe relativ hoch, aber es lässt sich deutlich erkennen, dass NL6 auch an den zellulären Filamenten gleichmäßig verteilt ist (Abb. 3.20 C). Infolgedessen scheint keine auffällige Regionalisierung der Glycosylierung des NL6 Epitops bezogen auf einzelne Filamente in der Zelle vorzuliegen.

3.2 Bestimmung des NL6 Epitops

Zur genaueren Charakterisierung des NL6 Antikörpers sollte auch die Lokalisation des NL6 Epitops auf NF-M bestimmt werden. Im ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass der NL6 Antikörper ein glycosyliertes Epitop erkennt. Durch Immunblot-Analyse von Menschen-, Ratten-, Maus- und Rinderrückenmark wurde zudem im Rahmen einer Kollaboration von Dr. A. Clement (Scripps Research Institute, San Diego) gezeigt, dass die Affinität von NL6 zu humanem NF-M um ein Vielfaches stärker ist als zu Ratten-NF-M und dass NF-M aus Maus und Rind mit dem NL6 Antiköper nicht reagiert (Daten nicht gezeigt).

3.2.1 Chymotryptischer Verdau von Neurofilamenten

Um erste Hinweise auf die Lage des Epitops zu bekommen, wurden intakte Neurofilamente nach einer Neurofilament-Extraktion aus BE2-Zellen über eine kurzen Zeitraum (2 bis 15 min) mit Chymotrypsin verdaut. In Neurofilamenten stehen die Schwanzdomänen von NF-M und NF-H rechtwinklig vom Neurofilamentrückgrat ab, das aus den Kopf- und Stabdomänen der Untereinheiten gebildet wird. Deshalb schneidet Chymotrypsin erst die gesamte Schwanzdomäne von NF-M und NF-H ab, bevor diese weiterverdaut werden. Wenn die Proben nach dem Verdau abzentrifugiert werden, können somit die löslichen Schwanzdomänen von den Resten des Neurofilamentrückgrats getrennt werden. Pellets und Überstände wurden dann mittels eines Immunblots mit NL6 analysiert.



Abb. 3.21: Immunblot-Analyse von chymotryptisch verdauten Neurofilamenten. Intakte Neurofilamente aus Triton-extrahierten BE2-Zellen (20 μ g) wurden für 2, 8 und 15 min bei 37°C mit Chymotrypsin (Enzym:Protein = 1:200) verdaut und danach abzentrifugiert. Die Pellets wurden im gleichen Volumen wie die Überstände aufgenommen, durch eine 10% ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit NL6 immundetektiert. Banden, die im Pellet auf der Höhe von ca. 58 kDa laufen (*), entstehen durch unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers. Positionen des intakten NF-M Proteins und der Spaltprodukte sind durch Pfeilköpfe gekennzeichnet.

Unbehandelte Neurofilamente (ca. 160 kDa) werden von NL6 vollständig im Pellet nachgewiesen, aber bereits nach 2 min Chymotrypsin-Behandlung kann NL6 in dieser Fraktion kein NF-M mehr detektieren (Abb. 3.21). Zu diesem Zeitpunkt erscheint im Überstand eine Doppelbande mit einem Molekulargewicht von 100-110 kDa, wobei es sich aufgrund der Größe um die gesamte Schwanzdomäne handeln muss. Nach 8 min kann keine Bande mehr von NL6 detektiert werden, da das Protein weiter abgebaut wurde. Bei einem vollständigen Abbau von NF-M mit Chymotrypsin entstehen Fragmente mit einer maximalen Größe von ca. 17 kDa, die durch eine SDS-PAGE mit einem 10 %igen Trenngel nicht mehr aufgetrennt wurden. Aus diesem Experiment kann geschlossen werden, dass das Epitop des NL6 Antikörpers in der Schwanzdomäne lokalisiert ist.

3.2.2 Deletion bekannter Glycosylierungsstellen in der Schwanzdomäne

Wie in der Abbildung 3.22 dargestellt, gibt es in der Schwanzdomäne von NF-M nur eine bekannte Glycosylierungsstelle. Dabei handelt es sich um Threonin 430, das in der Nähe der Stabdomäne lokalisiert ist (Dong et al., 1993).



Abb. 3.22: Schematische Darstellung von humanem NF-M mit bekannten Glycosylierungsstellen.

Um herauszufinden, ob der NL6 Antikörper diese Glycosylierungsstelle (T430) erkennt, wurde eine Deletionsmutante hergestellt. Dabei wurde mit dem Enzym Eco0109 I, das die NF-M cDNA an den Positionen 1154 und 1412 schneidet, ein 261 bp großes Fragment aus dem TOPO-hNFM-GFP Konstrukt deletiert. Dadurch fehlt dem NF-M-Protein ein Stück mit einer Länge von 87 Aminosäuren (Abb. 3.23), das einen Teil der Stab- und ein Stück der Schwanzregion mit der Glycosylierungsstelle T430 enthält.



Abb. 3.23: Schematische Darstellung der hNFM(Δ 385-472) Deletionsmutante

Die TOPO-hNFM(Δ385-472)-GFP DNA wurde in NT2 Zellen transfiziert und mit NL6 und M20 immungefärbt. Die Expression des *C*-terminalen GFPs sicherte dabei, dass das Konstrukt vollständig exprimiert wurde. Die NT2-Zellen zeigten ein relativ gleichmäßige punktartige Färbung (Abb. 3.24), wobei es sich wahrscheinlich um Proteinaggregate handelt. In keiner der transfizierten Zellen konnte ein filamentöses Expressionsmuster, wie das der vollständigen NF-M Konstrukte, beobachtet werden, da ein Teil der zum Zusammenbau

essentiellen Stabregion fehlte. Diese punktartige Verteilung konnte sowohl mit dem Antikörper NL6 als auch mit M20 (nicht gezeigt) detektiert werden.

Siehe Abbildungen 2

Abb. 3.24: Immunfärbung von NT2 Zellen, die mit hNFM(Δ 385-472) transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit TOPO-hNFM(Δ 385-472)-GFP DNA transfiziert, nach 48 h standardfixiert und mit α GFP und NL6 immungefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m.

Dies deutet darauf hin, dass die Glycosylierungsstelle T430 nicht innerhalb des NL6 Epitops liegt. Somit muss es sich bei der von NL6 erkannten Glycosylierungstelle um eine bisher nicht identifizierte Glycosylierungsstelle handeln.

3.2.3 Deletion von Regionen mit vorhergesagten Glycosylierungsstellen

Bisher ist keine Konsensussequenz der OGT bekannt, mit der eine genaue Vorhersage möglicher Glycosylierungsstellen getroffen werden kann. Es gibt allerdings einige Gemeinsamkeiten der bekannten Glycosylierungsstellen, die Gupta und Kollegen (Manuskript Bearbeitung) in einem Programm zusammengefasst haben. dass putative in Glycosylierungsstellen auf Proteinen identifizieren kann. Dabei werden auch Phosphorylierungsstellen mit einbezogen, um prospektive "Yin-Yang"-Stellen zu erkennen. Unter der Adresse <http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang.html> kann jede Proteinsequenz nach möglichen Glycosylierungs- oder "Yin-Yang"-Stellen durchsucht werden.

Für humanes NF-M ergab die Analyse in der Kopfdomäne zusätzlich zu den drei bekannten Stellen noch weitere elf Aminosäurereste, die glycosyliert sein könnten. In der Schwanzdomäne wurden weitere fünf Aminosäuren als potentielle Glycosylierungsstellen identifiziert (Abb. 3.25).



Abb. 3.25: Schematische Darstellung von humanen NF-M mit bekannten und vorhergesagten Glycosylierungsstellen. Die nicht im Epitop befindliche Glycosylierungsstelle in der Schwanzregion wurde durchgestrichen.

Durch weitere Deletionsmutanten sollte geklärt werden, ob eine dieser Stellen im Epitop von NL6 liegen könnte. Um diese Deletionsmutanten herzustellen, wurden *N*-terminale Anteile der NF-M cDNA in den eGFP C3 Vektor (Clontech) kloniert, der das GFP *N*-terminal an das zu untersuchende Protein fusioniert. Dadurch war es nicht mehr notwenig, die Deletionen im Leseraster vom GFP zu belassen, wodurch mehr Restriktionsstellen verwendet werden konnten. Als Konsequenz stellte eine GFP Expression nach der Transfektion in Zellen allerdings auch nicht mehr sicher, dass das Protein vollständig exprimiert wurde.



Abb. 3.26: Schematische Darstellung der hNFM(Δ892) Deletionsmutante. Die nicht im Epitop befindliche Glycosylierungsstelle in der Schwanzregion wurde durchgestrichen.

Mit der ersten Deletion wurde eine Region mit den beiden *C*-terminalen Glycosylierungsstellen Threonin 912 und Serin 914 entfernt. Hierfür wurde die NF-M cDNA

mit dem Enzym BCU I an der Position 2676 (von 2751 bp) geschnitten und in den eGFP C3 Vektor kloniert. Dadurch fehlten die letzten 24 Aminosäuren von NF-M (Abb. 3.26).

Die Transfektion von NT2 Zellen mit der eGFP-C3-hNFM(Δ 892) DNA und darauffolgende Immunfärbung mit NL6 und M20 ergab, dass NL6 weiterhin dieses verkürzte NF-M-Protein detektierte (Abb. 3.27). Das Epitop liegt somit weiter *N*-terminal. Allerdings konnte der Antikörper M20 diese Deletionsmutante nicht mehr binden. Daraus folgt, dass das Epitop des M20 Antikörpers sich innerhalb der letzten 30 Aminosäuren des NF-M Proteins befindet. Dadurch war der M20 Antikörper nicht mehr als Kontrolle für weitere *C*-terminale Deletionen brauchbar. Es wurde deshalb eine filamentöse Verteilung des GFPs als Nachweis der Expression der NF-M-Fusionsproteine angenommen.

Siehe Abbildungen 3

Abb. 3.27: Immunfärbung von NT2 Zellen, die mit hNFM($\Delta 892$) transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit eGFP-C3-hNFM($\Delta 892$) DNA transfiziert, nach 48 h mit PFA fixiert und mit α GFP und NL6 bzw. M20 doppelgefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

Um die Region der restlichen drei vorhergesagten Glycosylierungsstellen bei Serin 669 und 684 sowie Threonin 747 zu deletieren, wurde die NF-M cDNA mit BamH I geschnitten. Dieses Enzym schneidet NF-M an Positionen 1654 und 2380. Das 1654 bp große *N*-terminale Fragment wurde dann in den eGFP C3 Vektor kloniert. Dadurch entstand eine *C*-terminale Deletion von 363 Aminosäuren (Abb. 3.28).



Abb. 3.28: Schematische Darstellung der hNFM(Δ553) Deletionsmutante. Die nicht im Epitop befindlichen Glycosylierungsstellen in der Schwanzregion wurden durchgestrichen.

In der Abbildung 3.29 ist zu erkennen, dass NL6 nach der Transfektion in NT2 Zellen mit dieser Deletionsmutante nicht reagierte. Das NL6 Epitop befindet sich folglich zwischen den Aminosäuren 553 und 891.

Siehe Abbildungen 3

Abb. 3.29: Immunfärbung von NT2 Zellen, die mit hNFM(Δ 553) transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit eGFP-C3-hNFM(Δ 553) DNA transfiziert, nach 48 h standardfixiert und mit α GFP und NL6 immungefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

3.2.4 Epitopanalyse durch gerichtete Mutation

In dem Bereich zwischen den Aminosäuren 551 und 891 liegen drei vorhergesagte Glycosylierungsstellen. Im Weiteren sollte analysiert werden, ob eine dieser Glycosylierungsstellen im Epitop des NL6 Antikörpers liegt. Dies sollte mittels gerichteter Mutation der vorhergesagten Glycosylierungsstellen durchgeführt werden. Eine gerichtete Mutation wird im ersten Schritt immer durch eine PCR Reaktion mit Primern, welche die passenden Mutationen enthalten, gestartet. Die beiden Serinreste 669 und 684 gehören zur KSP (Lysin-Serin-Prolin) Domäne, die sich durch sechs Wiederholungen der Aminosäuren KG**KSP**V(P/S)**KSP**VEE auszeichnet. Da in der KSP Region die Primer aber an mindestens sechs Stellen mit gleicher Affinität binden würden, war diese Methode ungeeignet, um diese Serinreste zu mutieren.

Im Gegensatz dazu konnte für Threonin 747 eine gerichtete Mutation mit Hilfe des QuikChange Site-Directed Mutagenese Kit (Stratagene) durchgeführt werden. Es wurde die an Position 2248 in der NF-M cDNA ein Adenosin gegen ein Guanosin ausgetauscht, wodurch der Threoninrest gegen ein Alanin ersetzt wurde, das nicht glycosyliert werden kann (Abb. 3.30).



Abb. 3.30: Schematische Darstellung der hNFM(T747A) Mutante. Die nicht im Epitop befindlichen Glycosylierungsstellen in der Schwanzregion wurden durchgestrichen.

Die eGFP-C3-hNFM(T747A) DNA wurde in NT2 Zellen transfiziert. NL6 erkannte immer noch dieses mutierte NF-M (Abb. 3.31). Damit kann Threonin 747 als Bestandteil des Epitops ausgeschlossen werden.

Siehe Abbildungen 3

Abb. 3.31: Immunfärbung von NT2 Zellen, die mit hNFM(T747A) transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit TOPO-hNFM(T747A)-GFP DNA transfiziert, nach 48 h standardfixiert und mit α GFP und NL6 immungefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Durch gerichtete Mutationen der putativen Glycosylierungsstellen konnte nur eine der drei vorhergesagten Positionen ausgeschlossen werden. Das Epitop des NL6 Antikörpers scheint folglich in der KSP Region zu liegen. Innerhalb dieser Region gibt es, neben S669 und S684 noch weitere 25 Serin- und 14 Threoninreste in der durch Deletionen eingegrenzten Region von 340 Aminosäuren (551-891). Da die Konsensusequenz für die OGT nicht genau bekannt ist, besteht die Möglichkeit, dass auch eine dieser Aminosäuren glycosyliert sein könnte.

Um den Bereich, in dem das Epitop von NL6 liegt, weiter einzugrenzen, wurden mit gerichteten Mutation gezielt Enzymschnittstellen in die NF-M cDNA eingefügt, wodurch weitere Deletionsmutanten hergestellt werden konnten.



Abb. 3.32: Schematische Darstellung der hNFM($\Delta 604$) Mutante. Die nicht im Epitop befindlichen Glycosylierungsstellen in der Schwanzregion wurden durchgestrichen.

Es wurde zuerst kurz vor der KSP Region durch einen Austausch von Guanosin und Cytidin gegen Adenosin und Thymidin (1813/1814) in dem eGFP-C3-hNFM(Δ 892) Konstrukt eine Eco32 I Schnittstelle hergestellt. Mit Eco32 I und Bcl I (schneidet im Vektor direkt hinter der NF-M cDNA) konnte dann ein Fragment mit einer Größe von ca. 870 bp deletiert werden, wodurch die letzten 311 Aminosäuren entfernt wurden (Abb. 3.32).

Die Transfektion der eGFP-C3-hNFM($\Delta 604$) DNA in NT2 Zellen ergab, dass NL6 dieses Konstrukt nicht erkannte (Abb. 3.33). Das Epitop liegt somit, wie erwartet, *C*-terminal von der Aminosäure 603.

Siehe Abbildungen 3

Abb. 3.33: Immunfärbung von NT2 Zellen, die mit hNFM($\Delta 604$) transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit eGFP-C3-hNFM($\Delta 604$) DNA transfiziert, nach 48 h standardfixiert und mit α GFP und NL6 immungefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

In einem weiteren Schritt wurde durch gerichtete Mutation der hNFM($\Delta 892$) DNA an den Positionen 2369/2370 die Adenosine durch Thymidin und Guanosin ersetzt. Dadurch entstand eine weitere Eco32 I Schnittstelle, die zusammen mit Bcl I eine Deletion des *C*-Terminus von NF-M nach der Aminosäure 789 ermöglichte (Abb. 3.34).



Abb. 3.34: Schematische Darstellung der hNFM(Δ 789) Mutante. Die nicht im Epitop befindlichen Glycosylierungsstellen in der Schwanzregion wurden durchgestrichen.

Wie die Aufnahmen in Abbildung 3.35 zeigen, wird die hNFM(Δ 789) Mutante nach der Transfektion in NT2 Zellen durch den NL6 Antikörper erkannt. Das Epitop befindet sich damit *N*-terminal von der Aminosäure 789.

Siehe Abbildungen 4

Abb. 3.35: Immunfärbung von NT2 Zellen, die mit hNFM(Δ 789) transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit eGFP-C3-hNFM(Δ 789) DNA transfiziert, nach 48 h standardfixiert und mit α GFP und NL6 immungefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Durch die Analyse der beiden letzten Deletionsmutanten lässt sich schließen, dass sich das Epitop des NL6 Antikörpers zwischen den Aminosäuren 604 und 788 befindet. In diesem Bereich liegt die KSP Region, die zwei vorhergesagte Glycosylierungsstellen enthält. Zudem gibt es in diesem Bereich noch weitere 16 Serin- und 2 Threoninreste, die theoretisch Bestandteil des Epitops sein könnten, falls sie glycosyliert werden.

3.2.5 Zusammenfassung der Epitopbestimmung und Sequenzanalyse

Aufgrund des Designs und der Reaktivität der Deletionsmutanten wurde demonstriert, dass der NL6 Antikörper an eine bisher unbekannte Glycosylierungsstelle im Neurofilament M Protein bindet. Dabei könnte es sich um zwei Serinreste in der KSP Region handeln, die durch den Vergleich der Sequenz mit bekannten Glycosylierungsstellen vorausgesagt wurden. Mit Hilfe von Deletionsmutanten wurde das Epitop zwischen den Aminosäuren 604 und 788 eingegrenzt.

Da NL6 neben humanem NF-M zwar Ratten NF-M aber kein Maus NF-M detektiert, wurden die Sequenzen der drei Proteine miteinander verglichen, um Gemeinsamkeiten zwischen Mensch und Ratte sowie Unterschiede zur Maus zu identifizieren. Die Analyse ergab, dass außerhalb der KSP Region (AS 690 - 788) fünf Serin- und Threoninreste sowohl in Mensch als auch in Ratte und Maus vorkommen.

724735749/751760782788Mensch PKDVPEKKKAESPVKEEAVAEV VTITKSVKVHLEKETKEEGKPL QQEKEKEKAGGEGGSEEEGSD
RattePKDVPDKKKAESPVKEKAVEEM ITITKSVKVSLEKDTKEE - KPQQQEKVKEKAEEEGGSEEEVGD
MausPKDVADKKKAESPVKEKAVEEV ITISKSVKVSLEKDTKEE - KPQPQEKVKEKAEEEGGSEEEGSD

Abb. 3.36: Sequenzvergleich möglicher NF-M Glycosylierungsstellen außerhalb der KSP Region zwischen Mensch, Ratte und Maus. Dargestellt ist die NF-M Sequenz außerhalb der KSP Region (AS 724 - 788) von Mensch, Ratte und Maus, die durch Deletionsmutanten eingegrenzt wurde. Alle Unterschiede von Ratte und Maus zu humanen NF-M wurden rot hervorgehoben. Die Serin- und Threoninreste, die prinzipiell einen Zucker tragen könnten, wurden grün markiert. Die Zahlen entsprechen den Aminosäuren im humanen NF-M.

Zwar existiert zur Zeit keine gesicherte Konsensussequenz für die *O*-GlcNAc-Transferase (OGT), aber aus den bekannten Glycosylierungsstellen wurde ein mögliches Konsensusmotiv entworfen. Demzufolge befinden sich Prolin, Valin und, seltener, Glutamin mit einem maximalen Abstand von vier Aminosäuren vor dem Serin- oder Threoninrest. Vor den fünf Serin- und Threoninresten, die *C*-terminal an die KSP Region angrenzen, befinden sich lediglich einzelne Aminosäuren des Motivs (Abb. 3.36). Es kann daher angenommen werden, dass diese Aminosäuren nicht glycosyliert werden. Zudem existieren vor den Serin- und Threoninresten von Ratte und Maus nur gemeinsame Unterschiede zum Mensch, so dass die unterschiedliche Affinität nicht erklärbar wäre. Es ist also eher unwahrscheinlich, dass das NL6 Epitop zwischen den Aminosäuren 690 und 788 liegt.

Im Gegensatz dazu enthält die KSP Region des humanen NF-Ms zwei der vorhergesagten Glycosylierungsstellen, nämlich Serin 669 und Serin 684. Humanes NF-M besitzt sechs Wiederholungen der KSP Sequenz, die jeweils zwei KSPs enthalten, während Ratten und Maus NF-M nur eine Wiederholung mit zwei KSPs besitzen. In dieser Region wurden bei einer Analyse des Ratten und Maus NF-M mit dem "Yin Yang Server" keine Glycosylierungsstellen identifiziert.

Die Wiederholungen der humanen KSP Region gleichen sich bis auf wenige Aminosäuren (Abb 3.37). Bei fünf der sechs Wiederholungen liegen vor der zweiten KSP Sequenz die Aminosäuren Prolin-Valin-Prolin-Lysin (PVPK), die bis auf den fehlenden Glutaminrest dem Glycosylierungs-Motiv der OGT entsprechen. Die KSP Region vom NF-M der Ratte ist mit denen von humanen NF-M identisch, während bei der murinen Sequenz das Valin gegen ein Methionin ausgetauscht ist.

| Mensch | 611 KAKSPV PKSPV EE 623 624 KGKSPV PKSPV EE 636 637 KGKSPV PKSPV EE 649 650 KGKSPV PKSPV EE 662 663 KGKSPV SKSPV EE 675 676 KAKSPV PKSPV EE 688 |
|---------------|--|
| Ratte Maus | 600 KAKSPV PKSPV EE 612 602 KAKSPM PKSPV EE 614 |

Abb. 3.37: Sequenzvergleich möglicher NF-M Glycosylierungsstellen in der KSP Region zwischen Mensch, Ratte und Maus. Dargestellt ist die NF-M Sequenz der KSP Region von Mensch (AS 611 - 688), Ratte (AS 600 - 612) und Maus (AS 602 - 614). Die Unterschiede wurden rot hervorgehoben und die Serinreste, die eine vorhergesagte Glycosylierung tragen, wurden grün markiert.

Dies deutet daraufhin, dass das NL6 Epitop wahrscheinlich die Aminosäuren Valin, Prolin, Lysin und Serin umfasst, wobei dieser Serinrest glycosyliert sein muss. Durch den Austausch von Valin gegen Methionin könnte der Antikörper murines NF-M nicht mehr binden entweder weil die Gegenwart von Valin essentiell ist oder weil aufgrund des Methioninrests eine Glycosylierung des Serinrests nicht mehr stattfindet. Dies könnte auch erklären, warum NL6 eine wesentlich höhere Affinität zu humanem NF-M im Vergleich zum NF-M der Ratte besitzt. Beim humanen NF-M sind fünf der sechs Wiederholungen völlig identisch, d.h. der NL6 Antikörper könnte somit bis zu fünf Epitope gleichzeitig besetzen, wenn diese glycosyliert wären. Im Gegensatz dazu hat das NF-M der Ratte nur ein mögliches Epitop, das zudem glycosyliert sein müsste.

Vergleiche der NF-M Sequenz von Rind, Huhn und Kaninchen ergaben, dass nur beim Kaninchen das entsprechende Epitop existiert. Es handelt sich dabei, wie bei den anderen Nagern, um eine einzelne KSP Wiederholung von 13 Aminosäuren, die identisch mit der humanen NF-M Sequenz ist. Somit sollte NL6 auch NF-M aus Kaninchen aber nicht NF-M aus Huhn und Rind detektieren. Tatsächlich erkennt NL6 das NF-M aus Rind nicht. Für die anderen Spezies wurde die Untersuchung bisher nicht durchgeführt.

3.3 Anwendungen des NL6 Antikörpers

Die Charakterisierung des NL6 Antikörpers ergab, dass dieser Antikörper eine neue Glycosylierungsstelle auf NF-M erkennt, die sehr wahrscheinlich in der KSP-Region liegt. Bisher konnte dieser *O*-Glycosylierung keine Funktion zugeordnet werden. Es ist jedoch bekannt, dass sich Neurofilamente während unterschiedlicher degenerativer Erkrankungen verändern, und dass diese Veränderungen teilweise Ursache der Degeneration sein können. Dabei ist vor allem eine veränderte Modifizierung der Neurofilamente auffällig. Deshalb stellte sich die Frage, ob und inwieweit die Glycosylierung des NL6 Epitops während einer Erkrankung beeinflusst wird. Im Rahmen verschiedener Kollaborationen sollte dies an Tiermodellen der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) und Diabetes untersucht werden.

Da der NL6 Antikörper zudem eine sehr hohe Affinität zu humanem NF-M hat, aber an NF-M aus Maus und Rind gar nicht bindet, sollte weiterhin untersucht werden, ob der Einsatz von NL6 als humaner neuronaler Marker in Xenotransplantaten möglich ist.

3.3.1 NL6 Expression in ALS

Bei ALS handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung, die durch die Degeneration von Motoneuronen gekennzeichnet ist. Diese führt zu progressiven, motorischen Fehlfunktionen, die Lähmungen und letztendlich den Tod verursachen. Ein auffälliges Merkmal der degenerierenden Neuronen ist die Aggregation von Neurofilamenten, wodurch z.B. der essentielle axonale Transport unterbunden wird. Die Neurofilamente in den Aggregaten sind zumeist hyperphosphoryliert. Da die Glycosylierung zum Teil reziprok zur Phosphorylierung erfolgt, könnte dies bedeuten, dass die Glycosylierung der NFs bei ALS reduziert ist.

Um diese Hypothese für die Glycosylierung des NL6 Epitops zu untersuchen, wurde der Antikörper in einer Kolaboration mit Dr. A. Clement (Scripps Research Institute, San Diego) in einem ALS Rattenmodell untersucht. Diese transgenen Ratten überexprimieren Cu^{2+}/Zn^{2+} Superoxid-Dismutase 1 (SOD 1), die eine familiär-vererbte genetische Mutation (SOD^{G93A}) trägt. Dadurch entwickeln diese Ratten eine ALS-ähnliche Erkrankung der Motoneuronen, die im dritten Monat nach der Geburt beginnt, und nach weiteren elf Tagen zum Tod führt (Howland et al., 2002)



Abb. 3.38: relative NL6 Immunreaktivität bei kranken und gesunden Ratten verschiedener Altersstufen. Das Rückenmark der Ratten wurde in einem Glashomogenisator homogenisiert, nach Zugabe von Detergenzien mit Ultraschall behandelt und nach 10 min Kochen bei 14000 x g abzentrifugiert. Vom Überstand, der mit NFs angereichert war, wurden 20 μ g Protein über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit NL6 und α Tubulin Antikörper immundetektiert. Die Antiköpersignale wurden mittels Jod¹²⁵-Protein A im Phosphoimmager detektiert und mit Programm Mac-Bas analysiert. Die erhaltenen NL6 Werte wurden relativ zum Tubulin-Signal berechnet und jeweils auf Kontrolltiere gleichen Alters bezogen. Es handelt sich jeweils um einzelne Tiere.

Es wurden jeweils trangene und gesunde Ratten vor (1 Monat), zu Beginn (3.25 Monate) und im Endstadium der Erkrankung (4 Monate) verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Ratten mit mutierter SOD1 im Vergleich zu Wildtyptieren immer ein niedrigeres relatives NL6 Signal aufwiesen (Abb. 3.38). Dabei nahm die relative NL6 Reaktivität im Laufe der Erkrankung immer weiter ab, so dass Tiere im Endstadium im Vergleich mit gesunden Kontrolltieren nur noch 55 % der relativen NL6 Immunreaktivität zeigten. Dies deutet darauf hin, dass die Glycosylierung im NL6 Epitop während des Krankheitsverlaufs beeinflusst wird.



Abb. 3.39: Relative NL6 Immunreaktivität bei gesunden Ratten unterschiedlichen Alters. Das Rückenmark der Ratten wurde in einem Glashomogenisator homogenisiert, nach Zugabe von Detergenzien mit Ultraschall behandelt und nach 10 min Kochen bei 14000 g abzentrifugiert. Vom Überstand, der mit NFs angereichert war, wurden 20 μg Protein über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit NL6 und αTubulin Antikörper immundetektiert. Die Detektion wurde mittels Jod¹²⁵-ProteinA im Phosphoimmager mit dem Programm Mac-Bas analysiert. Die erhaltenen NL6 Werte wurden jeweils auf das Tubulinsignal bezogen. Es handelt sich jeweils um einzelne Tiere.

Vergleicht man die relative Immunreaktivität (bezogen auf Tubulin) von NL6 in gesunden Ratten unterschiedlichen Alters, so fällt auf, dass mit dem Alter der Tiere die relative NL6 Immunreaktivität zunimmt (Abb. 3.39). Dies könnte zum Einen daran liegen, dass mit zunehmenden Alters insgesamt mehr NF-M exprimiert wird. Zum Anderen könnte aber auch die Zunahme der Glycosylierung im NL6 Epitop die Ursache sein. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu entscheiden, sollten die Proben auch mit einem Antikörper gegen Gesamt-NF-M (z.B. M20) analysiert werden, was im Rahmen dieser Arbeit aber nicht mehr durchgeführt werden konnte.

Die Ergebnisse aus den beiden Abbildungen 3.38 und 3.39 zeigen, dass die relative Expression des NL6 Epitops in alternden ALS-transgenen Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren zwar immer geringer wird, sich die relative Immunreaktivität von NL6 in den gesunden Ratten aber erhöht. Dies einbezogen heißt, dass die Immunreaktivität in den transgenen Tieren während ihres Lebens relativ unverändert bleibt. Ob dies an einer veränderten Expression von NF-M in gesunden Tieren liegt, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

3.3.2 Expression des NL6 Epitops bei Diabetes

Diabetes führt beim Menschen zu Neuropathien. Dabei handelt es sich häufig um symmetrische, sensorische Polyneuropathien, bei denen es zu unterschiedlichen strukturellen Veränderungen und zur Degeneration von peripheren Nerven kommt. Es wurde von Fernyhough und Kollegen gezeigt, dass bei Ratten diabetische Neuropathien mit einer abnormen Phosphorylierung der Neurofilamente einhergehen (1999). Die Phosphorylierung wird dabei um das Zwei- bis Dreifache erhöht.

Das Epitop von NL6 liegt in einer Region die stark phosphoryliert wird. Zudem detektiert NL6 eine Glycosylierung, die durch einen gestörten Glucosehaushalt beeinflusst sein könnte. Um die Frage zu klären, ob die Glycosylierung am NL6 Epitop im diabetischen Krankheitsverlauf verändert ist, wurde der Antikörper in einer Kollaboration mit Dr. P. Fernyhough (Universität Manchester, UK) im Diabetes-Tiermodell untersucht.

Bei männlichen Wistar Ratten wurde durch eine einzelne intraperitoneale Injektion von Streptozocin (STZ; 55mg/kg), einem *N*-Aceylglucosamin-Derivat das die Beta-Zellen des Pankreas irreversibel schädigt, für 8 Wochen bzw. 14 Wochen (NT-3 Studie) eine experimentelle Diabetes ausgelöst. Diese Ratten hatten eine Blutzuckerspiegel von > 27 mmol/l, während Kontrollratten einen Wert von 10-11 mmol/l aufwiesen. Die diabetischen Ratten wurden zum Teil mit humanem rekombinanten Neurotrophin-3 (hrNT-3) behandelt, wodurch die durch Diabetes-ausgelöste Reduktion der Leitungsgeschwindigkeit in sensorischen Neuronen aufgehoben wurde. Ischiasnerv-Homogenate der unbehandelten oder NT-3-behandelten diabetischen Ratten und der Kontrollratten wurden mittels eines quantitativen Immunblots analysiert. Zudem wurden auch Homogenate von dorsalen Hinterwurzelganglien (DRG) analysiert. Letztere zeigten aber insgesamt nur eine sehr niedrige NL6 Expression, so dass eine Auswertung nicht möglich war (Daten nicht gezeigt).



Abb. 3.40: Quantitative Immunblotanalyse der NL6 Immunreaktivität im diabetischen Tiermodell. Der Ischiasnerv von STZ-induzierten, diabetischen Ratten, die teilweise mit hrNT3 behandelt wurden, und von Kontrolltieren wurde präpariert und mittels eines Polytrons homogenisiert. 10 μ g des erhaltenen Proteins wurde über eine 10% ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit NL6 immundetektiert. Die erhaltenen Banden wurden mittels NIH-Image quantifiziert (Kontrolle: n = 7; NT3-behandelt/diabetisch: n = 8).

Die Analyse der Ischiaspräparationen unterschiedlichen Tiere ergab eine vergleichbare relative Immunreaktivität von NL6 in allen Tieren (Abb. 3.40). Es gab keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und diabetischen Ratten (mit NT3 oder ohne NT3).

Dies deutet auf eine gleichbleibende Glycosylierung des NL6 Epitops im Ischiasnerv während der Diabetes Erkrankung hin. Diese Glycosylierung scheint somit nicht direkt vom extrazellulären Glucosespiegel abzuhängen. Auch scheint diese Glycosylierung nach diesen Daten keinen direkten Einfluß auf die Neuropathie zu haben.

3.3.3 NL6 als neuronaler Marker in Xenotransplantaten

Die Charakterisierung des NL6 Antikörpers ergab, dass NL6 eine hohe Affinität zu humanem NF-M aber keine Kreuzreaktivität zu murinem NF-M zeigt. Der NL6 Antikörper sollte deshalb auf seine Tauglichkeit hin untersucht werden, als Marker für differenzierte humane Neuronen in Fremdgewebe zu dienen. Als Modell sollte die NL6 Expression bei der Differenzierung humaner NT2 Zellen in murinem Gehirngewebe beobachtet werden.

Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass NT2N Zellen in Gehirn oder Rückenmark von immunkompetenten oder immundefizienten Nagern erfolgreich transplantiert werden können (Andrews, 1984; Miyazono et al., 1996; Kleppner et al., 1995; Trojanoawski et al., 1997). Häufig lassen sich bei diesen Xenotransplanat-Experimenten die injizierten Zellen aber nur schwer identifizieren. Sie müssen meist mit Farbstoffen markiert werden, die Auswirkungen auf den Versuchsverlauf haben können. Mit der selektiven Reaktivität von NL6 hätte man zu mindestens für die Transplantation von humane Neuronen in Mausgehirn ein Werkzeug zur Verfügung, die humanen Neuronen im späteren Versuchsverlauf zu identifizieren.

Für die Untersuchungen wurden hippocampale Schnittkulturen von Mäusen (P8) verwendet, die einen Tag nach der Präparation an drei Positionen mit jeweils ca. 50 NT2 Zellen mikroinjiziert wurden. Die Cokulturen wurden dann über verschiedene Zeiträume bis zu 30 Tage in Kultur gehalten, fixiert und mit NL6 und weiteren Antikörpern immungefärbt. Nach 8 - 10 Tagen waren die ersten NL6 positiven NT2N Zellen zu sehen, die zwar Fortsätze entwickelten aber keine eindeutige neuronale Morphologie besaßen. Viele NL6 positiven NT2N Zellen mit neuronaler Morphologie waren nach 20 Tagen zu beobachten.

Siehe Abbildungen 4

Abb. 3.41: Immunfärbung von Schnittkulturen aus dem Hippocampus der Maus mit mikroinjizierten NT2/NT2N Zellen. Hippocampale Schnittkulturen von P8 Mäusen wurde präpariert und am nächsten Tag an drei Stellen mit je ca. 50 NT2 Zellen in 9,2 nl PBS mikroinjiziert. Nach 20 Tagen wurden die Schnitte fixiert und mit NL6 und αMAP2b immungefärbt. Die Immunfärbung wurde an einem konfokalen Laserscan-Mikroskop ausgewertet. Bei der oberen Reihe wurden insgesamt 50 Einzelbilder (optische Schnitte; insgesamt ca. 30 μm Dicke) kollabiert, während die untere Reihe Overlays von Einzelbildern in unterschiedlichen Ebenen des Stapels darstellen. Der Maßstabsbalken entspricht 40 μm.

Die NT2 Zellen bilden im Maus Hippocampus tumorartige Strukturen, bei denen es nur am Rand zu Interaktionen zwischen den humanen Zellen und dem Maus Gewebe kam. Eine ähnliche Tumorbildung wurde auch von Miyazono und Kollegen (1995) nach Injektion von undifferenzierten NT2 Zellen in immundefiziente Mäuse beobachtet. In Abbildung 3.41 ist deutlich zu erkennen, dass der NL6 Antikörper nur Zellen dieses "NT2/NT2N Tumors" färbt, während, wie erwartet die murinen Neuronen des Hippocampus ungefärbt blieben. Diese wurden mit dem MAP2b Antikörper gegengefärbt. Deutlich ist hier innerhalb der murinen Neuronen (MAP2b-positiv) ein Hohlraum zu sehen, der keine MAP2b-positiven Zellen enthält. Hier liegen die injizierten NT2/NT2N Zellen, die zu diesem Zeitpunkt noch kein MAP2b exprimieren.

Durch die Analyse mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskpos konnte gezeigt werden, dass die durch NL6 angefärbten NT2N Zellen tatsächlich tief im Gewebe lagen und von allen Seiten von murinen Neuronen umgeben waren. Dies wird deutlich durch die Bilder in der unteren Reihe der Abbildung 3.41, in der einzelne optische Schnitte durch das Gewebe gezeigt werden. Es war aber auch ersichtlich, dass sich die Zellen der beiden Spezies gegenseitig nicht vermischten. Auch die Zellfortsätze verblieben meist innerhalb des jeweiligen Bereiches.

Um eine Eindruck zu bekommen, wie viele NT2 Zellen sich wirklich differenziert haben und NL6 exprimieren, wurden die Kokulturen mit NL6 und αNestin bzw. αVimentin Antikörpern doppelgefärbt. Diese Intermediärfilament-Proteine sind vor allem in neuronalen Vorläuferzellen wie den undifferenzierten NT2 Zellen, zu finden. Es zeigte sich, dass nur wenige der NT2 Zellen innerhalb der 20 Tage anfingen, NL6 zu exprimieren (Abb. 3.42). Die NL6-positiven Zellen hatten teilweise bereits einen neuronale Morphologie, wobei meist allerdings nur ein Fortsatz detektiert wurde. Alle anderen Zellen exprimierten Nestin und Vimentin, wobei diese Filamente nicht gleichmäßig in den Zellen verteilt, sondern eher in einzelnen Regionen konzentriert waren.

Siehe Abbildungen 4

Abb. 3.42: Immunfärbung von Schnittkulturen aus dem Hippocampus der Maus mit mikroinjizierten NT2/NT2N Zellen. Hippocampale Schnittkulturen von P8 Mäusen wurde präpariert und die Schnitte wurden am nächsten Tag an drei Stellen mit jeweils ca. 50 NT2 Zellen in 9,2 nl PBS mikroinjiziert. Nach 20 Tagen wurden die Schnitte fixiert und mit NL6 und α Nestin und α Vimentin Antikörpern immungefärbt. Die Immunfärbung wurde an einem konfokalen Laserscan-Mikroskop ausgewertet. Dabei handelt es sich hier kollabierte Projektionen mehrerer Einzelbilder (optische Schnitte; ca. 20 µm). Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Die Ergebnisse zeigen, dass NL6 gut als humaner neuronaler Marker nach Transplantations-Experimenten in Mausgewebe verwendet werden kann, da er keinerlei Kreuzreaktivität zu murinem NF-M zeigt. Dies könnte den Nachweis von humanen Neuronen in Xenotransplantat-Experimenten erleichtern. Vorteilhaft könnte hier auch sein, dass NL6 eine zytoskeletäre Struktur färbt, die bis in die Spitzen der Zellausläufer reicht, so dass die Neuronen mit allen ihren Verzweigungen visualisiert werden können. Wie zuvor gezeigt färbt NL6 auch Ratten-NF-M, wäre für Xenotransplantat-Experimente von humanen Neuronen in Rattengehirn also nicht verwendbar. Bei anderen Spezies müsste die Reaktivität noch getestet werden.

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte der Antikörper NL6 charakterisiert werden, der bei der Produktion von monoklonalen Antikörpern gegen Komponenten des humanen neuronalen Zytoskeletts hergestellt worden war. Dabei war anfangs nur bekannt, dass der IgG Antikörper das Neurofilament Protein M erkennt und Glutaraldehyd-sensitiv ist.

Im Mittelpunkt der Analyse stand die Aufklärung des Isotyps, der Speziesspezifität und des erkannten Epitops. Beim Letzteren war es besonders von Interesse zu untersuchen, ob der Antikörper Neurofilament M unabhängig von posttranslationalen Modifikationen erkennt. Es existiert bereits eine Anzahl von Neurofilament Antikörpern, die spezifische Phosphorylierungsstadien detektieren (Lee et al., 1987; Sternberger & Sternberger, 1983). Mit diesen Antikörpern wurde nachgewiesen, dass schwach bzw. unphosphorylierte Neurofilamente vor allem im Soma und in den Dendriten zu finden sind, und dass stark phosphorylierte Neurofilamente auf das Axon begrenzt sind (Lee et al., 1987; Bennett & DiLullo, 1985). Es wurde zudem festgestellt, dass Neuronen in vivo unterschiedlich modifizierte Neurofilamente besitzen können. Dadurch können diese Neuronen durch Modifikations-abhängige Antikörper unterschieden werden (Campbell & Morrison, 1989; Riederer et al., 1996; Hornung & Riederer, 1999).

Der Antikörper NL6 wurde in unterschiedlichen Zelllinien und Geweben getestet, um die Expression und die Verteilung des NL6 Antigens zu untersuchen. Nachdem sich herausstelle, dass der NL6 eine *O*-GlcNAc-Modifikation des Neurofilaments M detektierte, wurden Zellen mit Agenzien manipuliert, um somit mögliche Rückschlüsse auf die Funktion des Epitops zu erlangen.

Als Letztes sollte noch untersucht werden, inwiefern der Antikörper z.B. bei der Diagnose oder Aufklärung von Erkrankungen eine Rolle spielen könnte. Da bekannt ist, dass Neurofilamente bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen Veränderungen unterliegen, sollte in mehreren Kollaborationen die Expression des NL6 Antigens in Tiermodellen der Erkrankungen überprüft werden. Zudem wurde die Tauglichkeit des Antikörpers als spezifischer humaner neuronaler Marker im Xenotransplantat-Experiment untersucht.

Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in der Tabelle 4.1. kurz zusammengefasst.

| NL6 | | | | |
|-------------------------------|---|---|--|--|
| | Isotyp | IgG2a | | |
| Eigenschaften | Epitop | O-GlcNAc in der KSP Region | | |
| 0 | Speziesspezifität | Mensch (+++) - Ratte (+) Maus (-) - Rind (-) | | |
| | humane Modellneuronen (NT2N) | gleichmäßig - entspricht Gesamt-NF-M | | |
| | humaner Cortex | axonal - entspricht phosphoryliertem NF-H | | |
| Expression und Verteilung | Zelllinien (endogen) | NL6 Epitop teilweise unabhängig von der NF-M Expression reguliert (Ausnahme Ratte: negativ) | | |
| | in unterschiedlichen Zelllinien (exogen) | alle untersuchten Zellen und Spezies konnten exogenes hNF-M glycosylieren | | |
| | Einzelfilament | gleichmäßige Verteilung über das Filament | | |
| Einfluss von | GlcNAcase-Inhibitor | Konzentrations- und Zeit-abhängige Zunahme | | |
| Agenzien | Kinase-Inhibitor | Konzentrations-abhängige Reduktion | | |
| auf die | Phosphatase-Inhibitor | Reduktion | | |
| Glycosylierung des Epitops | Mikrotubuli-Destab. | Konzentrations-abhängige Reduktion | | |
| | ALS | im Tiermodell - Reduktion | | |
| Anwendungen | Diabetes | im Tiermodell - kein Effekt | | |
| | Xenotransplantate | Spezifischer humaner neuronaler Marker im Maushintergrund | | |

Tab. 4.1: Übersicht über die Eigenschaften des NL6 Antikörpers und Epitops.

4.1 NL6 erkennt eine Glycosylierung in der KSP-Region von NF-M

In den meisten der untersuchten Zelllinien zeigte NL6 im Immunblot eine ähnliche Verteilung wie Gesamt-NF-M. Eine Ausnahme bildeten SH-SY5Y Zellen, bei denen das NL6 Signal nach Differenzierung stärker als das Gesamt-NF-M Signal anstieg. In humanen Modellneuronen (NT2N Zellen) war die Verteilung des NL6 Signals identisch mit der NF-M Verteilung. Im Unterschied dazu war das NL6 Signals im humanen Kortex Kompartiment-spezifisch verteilt und im Axon angereichert. Da die Verteilung im Kortex der eines

Phosphorylierungs-abhängigen Antikörpers entsprach, wurde zuerst bestimmt, ob der NL6 Antikörper Phosphorylierungs-sensitiv ist. Nachdem dies ausgeschlossen wurde, ergab ein β -Eliminierungsexperiment, dass es sich bei dieser posttranslationalen Modifikation um eine Glycosylierung handelt, bei der ein β -N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) an die Hydroxylgruppe eines Serin- oder Threoninrests gebunden ist.

Diese Modifikation lässt sich auf einer Vielzahl von zytosolischen und nukleären Proteinen nachweisen und zählt neben der Phosphorylierung zu einer der häufigsten posttranslationalen Modifikation in der Zelle (Haltiwanger et al., 1997; Hart et al., 1996; Hart, 1997). Dabei handelt es sich um eine sehr dynamische Modifizierung (Chou et al., 1992; Kearse & Hart, 1991; Roquemore et al., 1996), die bisher nur auf phosphorylierten Proteinen gefunden wurde, und zudem teilweise eine Reziprozität zur Phosphorylierung aufweist (Hart et al., 1994; Hart, 1997).

Der NL6 Antikörper erkennt spezifisch diese Glycosylierung von NF-M. Bisher sind nur wenige Antikörper bekannt, die sowohl spezifisch für eine *O*-Glycosylierung als auch für das glycosylierte Protein sind. Kamemura und Kollegen haben einen monoklonalen Antikörper hergestellt, der *O*-GlcNAc am Threoninrest 58 im c-Myc Protein detektiert. Durch weitere Antikörper, die diesen Bereich unmodifiziert oder mit einer Phosphorylierung binden, wurden Studien über das Zusammenspiel zwischen Glycosylierung und Phosphorylierung an diesem Epitop durchgeführt (Kamemura et al., 2002).

Antikörper, die *O*-GlcNAc unabhängig von einem spezifischen Protein erkennen, sind verbreiteter und werden vielfach zur *O*-GlcNAc-Detektion eingesetzt. Beschrieben sind zwei Antikörper (RL-2 und HGAC-85) die *O*-GlcNAc jedoch nicht sehr spezifisch erkennen. RL-2 wurde gegen Glycoproteine des nukleären Porenkomplexes hergestellt, erkennt aber nur *O*-GlcNAc auf einer begrenzten Anzahl von *O*-GlcNAc Proteinen, da er zusätzlich zum Zucker noch Proteindeterminanten benötigt (Holt et al., 1987; Snow et al., 1987). HGAC-85, der ursprünglich gegen bakterielle Kohlenhydrate (Streptokokken) generiert wurde, erkennt neben β -*O*-GlcNAc, das an Serin- oder Threoninreste gebunden ist, noch andere Kohlenhydrat Epitope (Turner et al., 1990). Diese Antikörper sind somit weder spezifisch für ein Protein noch kann mit ihnen die Glycosylierung in Zellen allgemein untersucht werden.

Kürzlich stellten Comer und Kollegen aber einen monoklonalen Antikörper (CTD110.6) her, der sehr spezifisch *O*-GlcNAc in β -*O*-glycosidischer Bindung an Serin- oder Threoninresten erkennt. Dabei zeigte dieser Antikörper keine Kreuzreaktivität gegenüber ähnlichen Zuckern oder gegen Proteinanteile (Comer et al., 2001). Dadurch entstand ein neues nützliches Werkzeug, um glycosylierte Proteine des Zyto- und Nukleoplasmas zu untersuchen. Wir verwendeten diesen Antikörper als Positivkontrolle, um den Status der allgemeinen Glycosylierung in der Zelle zu überprüfen.

Mit dem NL6 Antikörper ist es zum ersten Mal gelungen einen NF-M spezifischen, Glycosylierungs-abhängigen Antikörper zu generieren. Mit diesem Antikörper kann nun die Rregulation und mögliche Funktion dieser spezifischen Glycosylierung von Neurofilament M untersucht werden. Dong und Kollegen haben bisher vier unterschiedliche Glycosylierungsstellen von NF-M identifiziert (Dong et al., 1993, 1996). Beim Menschen handelt es sich dabei um Threonin 17, Serin 32 und Threonin 46, die sich in der Kopfdomäne des Proteins befinden. Zudem wird Threonin 430 glycosyliert, das kurz hinter der Stabdomäne in der C-terminalen Schwanzdomäne zu finden ist. Zum Teil liegen diese Glycosylierungsstellen in Regionen, die für die Bildung eines korrekten Filamentnetzwerks notwendig sind. Dies wurde durch gezielte Deletionen in der Kopf- und Schwanzregion gezeigt (Gill et al., 1990; Wong & Cleveland, 1990). O-Glycosylierungen in diesen Regionen könnten somit eine Rolle bei der Regulation des Filamentaufbaus spielen.

Dies wird auch durch die Beobachtung bestätigt, dass die hNF-M($\Delta 385$ -472) Deletionsmutante nach der Transfektion in NT2 Zellen nicht mehr in Filamente integrierte, sondern punktförmige Aggregate bildete. Dieser Deletionsmutante fehlte allerdings neben der Glycosylierungsstelle auch ein Bereich der benachbarten Stabdomäne. Normalerweise werden Neurofilament-Untereinheiten nach Transfektion in Zellen ohne endogene Neurofilamente in das zelluläre Vimentin-Netzwerk eingebaut (Monteiro & Cleveland, 1989; Chin & Liem 1989). Dies war auch bei allen anderen untersuchten Deletionsmutanten der Fall, die sowohl eine intakte Stabregion als auch eine mindestens 100 Aminosäure-große Schwanzregion besaßen. Das GFP oder NL6 Signal zeigte immer eine filamentöse Verteilung des NF-M-Fusionsprotein.

Die Kopf- und Schwanzdomänen von NF-M sind ebenfalls phosphoryliert (Julien & Mushynski, 1983; Carden et al., 1985; Sihag & Nixon, 1989, 1990, 1991). Von den Phosphorylierungsstellen in der Kopfdomäne wird angenommen, dass sie für den Zusammenbau der Filamente wichtig sind (Gill et al., 1990; Wong & Cleveland, 1990; Chin et al., 1991). Da die Glycosylierungsstellen im Kopf zwar in unmittelbarer Nähe der Phosphorylierungsstellen liegen, aber nicht mit diesen identisch sind (Dong et al., 1996), wäre es möglich, dass die O-GlcNAc Modifikation den zeitlichen Ablauf oder die Ausdehnung des Filamentaufbaus regulieren. Es existiert sehr wahrscheinlich ein ausgewogenes

Zusammenspiel dieser beiden Modifikationen, um die Filamentbildung präzise zu koordinieren. Durch das Vorhandensein zweier Regulationsmechanismen kann eine wesentlich feinere Abstimmung von Prozessen erreicht werden, als dies mit nur einem System möglich wäre.

Durch die Analyse der unterschiedlichen Deletionsmutanten wurde ausgeschlossen, dass der NL6 Antikörper eine der bekannten Glycosylierungsstellen erkennt. Der NL6 Antikörper erkannte also eine neue Glycosylierungsstelle auf NF-M. Nach meinen Daten liegt diese mit hoher Wahrscheinlichkeit in der sogenannten KSP Region zwischen den Aminosäuren 620 und 690. Da es sich in dieser Region um sechs Wiederholungen von 13 Aminosäuren handelt, die bis auf wenige Ausnahmen identisch sind, könnte dies bedeuten, dass NL6 nicht nur ein einzelnes Epitop, sondern 5 - 6 Epitope erkennt. Dies würde auch die starke Affinität zu humanen NF-M im Vergleich zum NF-M der Ratte erklären, da dort nur eine dieser Wiederholungen zu finden ist.

Bisher wurde nur für die KSP Region von NF-H eine *O*-Glycosylierung nachgewiesen (Dong et al., 1996). Dabei konnten allerdings keine spezifischen, glycosylierten Serinreste identifiziert werden. Meine Daten weisen daraufhin, dass auch die KSP Region von NF-M glycosyliert wird. Da die KSP Regionen von NF-M und NF-H bis auf die eigentliche KSP-Sequenz nicht identisch sind, scheint somit das Motiv der OGT relativ variabel zu sein.

Die KSP Wiederholungsdomänen von NF-M und NF-H sind dafür bekannt, dass sie stark phosphoryliert werden (Julien & Mushynski 1982, 1983; Carden et al., 1985). Diese Region wird deshalb auch als "Multiphosphorylation Repeat" (MPR: Multiphosphorylierungs Wiederholung) bezeichnet (Lee et al., 1988 a,b). Vor allem in den internodalen Regionen von myelinisierten Axonen sind die KSP Wiederholungen der Neurofilamente fast vollständig phosphoryliert (Hsieh et al., 1994). Dabei können bei humanem NF-M alle 12 KSPs der sechs wiederholten Sequenzen phosphoryliert werden (Xu et al., 1989). Zelluläres NF-M enthält 10 bis 15 phosphorylierte Serinreste (Julien & Mushynski, 1983; Carden et al., 1985), die hauptsächlich in der KSP Region zu finden sind (Myers et al., 1987). Somit erscheint eine gleichzeitige hohe Glycosylierung dieser Region erstaunlich.

Dong und Kollegen (1996) postulierten deshalb, dass die Glycosylierung der KSP Region direkt nach der Synthese stattfinden könnte, noch bevor die Untereinheiten in Filamente eingebaut und in das distalen Axon transportiert werden. Dort würden dann die Zucker durch die O-GlcNAcase entfernt und durch Phosphatgruppen ersetzt. Die Funktion der Phosphorylierung der KSP Domäne induziert vermutlich eine Ausstreckung der Schwanzdomänen. Dadurch wird die Fähigkeit der Neurofilamente, mit anderen NFs oder Mikrotubuli zu assoziieren gefördert (Eyer & Leterrier, 1988; Hisanaga & Hirokawa, 1990). Außerdem wird der Durchmesser und die Erregungsgeschwindigkeit des Axons durch die Phosphorylierung von NF-M und NF-H reguliert (De Waegh et al., 1992; Mata et al., 1992; Sakaguchi et al., 1993). Durch die starke Ladung, die bei der Phosphorylierung entsteht, könnte es somit durch sich abstoßende Kräfte zu größeren Abständen zwischen den Filamenten kommen, die das Querschnittswachstum des Axons hervorrufen (Lee et al., 1988a; Nakagawa et al., 1995; Cole et al., 1994).

Die KSP Wiederholungen der Untereinheiten im Zellkörper, in den Dendriten und den Ranvier'schen Schnüringen sind hingegen unphosphoryliert (De Waegh et al., 1992; Cole et al., 1994; Hsieh et al., 1994). Infolgedessen könnten sie aufgrund der "Yin-Yang Hypothese" glycosyliert sein. Wäre dies für das NL6 Epitop der Fall, so müsste das NL6 Signal vor allem dort gefunden werden. Die Immunfärbung von humanem Temporallappengewebe mit NL6 Antikörper hat allerdings ergeben, dass das NL6 Signal ausschließlich im Axon zu finden ist. Dies würde bedeuten, dass zumindest ein Teil der NF-M Untereinheiten im Axon nicht phosphoryliert wäre, sondern eine Glycosylierung trägt. Dabei könnten einzelne Untereinheiten entweder ieweils nur eine der Modifikationen tragen oder Mischmodifikationen an einer Untereinheit vorkommen. Allerdings sind nur wenige Proteine bekannt, die gleichzeitig sowohl mit O-GlcNAc als auch mit O-Phosphat modifiziert sind (Ku & Omary, 1994).

Die Hypothese von Dong und Kollegen, dass die KSP Sequenzen direkt nach der Synthese der NF Untereinheiten glycosyliert werden, kann durch die Ergebnisse der humanen Kortexfärbung nicht bestätigt werden, da dann das NL6 Signal im gesamten Neuron verteilt vorkommen müsste. Dies ist nur für die kultivierten NT2N Zellen zutreffend, in denen das NL6 Antigen keinerlei Kompartiment-spezifische Verteilung zeigt. Auch konnte im EM gezeigt werden, dass die NL6 Epitope relativ gleichmäßig über die gesamten Neurofilamente verteilt vorkommen. Es kommt somit auch auf der Filamentebene zu keiner spezifischen Anreicherung.

NF-M wird in den NT2N Zellen im Gegensatz zu NF-M in kortikalen Neuronen in allen Kompartimenten glycosyliert. Die Transfektion von humanen NF-M in unterschiedliche Zelltypen (neural oder nicht-neural) und unterschiedlichen Spezies (Mensch, Ratte, Maus, Hamster) ergab, dass alle Zellen in der Lage waren, NF-M in der KSP Region zu glycosylieren. Das bedeutet erstens, dass die OGT aller getesteten Spezies humanes NF-M

glycosyliert, dass also die OGT während der Evolution konserviert wurde (Kreppel et al., 1997). Zweitens kann NF-M offensichtlich nicht nur in Neuronen mit *O*-GlcNAc modifiziert werden. d.h. zur Glycosylierung sind keine Neuronen-spezifischen Faktoren notwendig. Vielleicht könnte die axonale Anreicherung von NL6 in kortikalen Neuronen nicht durch aktivierende Signale im Axon gefördert, sondern umgekehrt durch inhibierende Signale im Soma und in den Dendriten blockiert werden. Die OGT wird selbst durch O-GlcNAc und durch Tyrosin-Phosphorylierung modifiziert (Kreppel et al., 1997; Kreppel & Hart, 1999), und coexistiert in einem Komplex mit anderen Proteinen wie z. B. einer unbekannten Serin/Threonin Phosphatase (Wells et al., 2002). Somit wird die Glycosylierung und Phosphorylierung wahrscheinlich synchron geregelt. Inwiefern dies auch für die Glycosylierung des NL6 Epitops zutrifft, muss weiter analysiert werden.

4.2 Beeinflussung der Glycosylierung am NL6 Epitop

Da es sich bei der zytoplasmatischen Glycosylierung um eine sehr dynamische Modifizierung von Proteinen handelt, wurde untersucht inwiefern sich die Glycosylierung des NL6 Epitops durch unterschiedliche Agenzien beeinflussen lässt. Die Glycosylierung konnte nur mit PUGNAC, einem GlcNAcase-Inhibitor (Haltiwanger et al., 1998), verändert werden, da bisher keine weiteren spezifischen Inhibitoren oder Aktivatoren der zellulären OGT bzw. GlcNAcase bekannt sind.

Nach Behandlung von BE2 Zellen mit PUGNAC wurde eine Erhöhung des NL6 Signal im Vergleich zu Gesamt-NF-M um maximal 50% erreicht. Dies deutet daraufhin, dass in den BE2 Zellen unter den Kulturbedingungen nicht alle Glycosylierungsstellen des NL6 Epitops besetzt sind. Die Glycosylierung erfolgt also nur in einer Subpopulation der Neurofilament M Proteine, wobei biochemisch hier nicht unterschieden werden kann, ob es sich um verschiedene Neurofilamente handelt oder ob unterschiedlich modifizierte Untereinheiten in einem Neurofilament nebeneinander existieren.

Neben der spezifischen Glycosylierung am NL6 Epitop hat auch die zytoplasmatische Glycosylierung aller zellulärer Proteine in den BE2 Zellen zugenommen, so weit dies durch die Verwendung des αGlcNAc Antikörpers (CTD110.6) zu beurteilen war (Comer et al., 2001). Die Zunahme der Glycosylierung aller Proteine lag dabei in allen Bereichen über der des NF-M Proteins. BE2 Zellen haben somit ein mittleres Glycosylierungsniveau, das sie in die Lage versetzt, auf entsprechende Stimuli mit einer Veränderung der Glycosylierung zu

reagieren. Von Haltiwanger und Kollegen wurde gezeigt, dass der Glycosylierungsstatus unterschiedlicher Zelllinien sehr verschieden sein kann (1998).

Der Einfluss von Phosphorylierungen auf die Expression des NL6 Epitop wurde ebenfalls untersucht, da einige bekannte Glycosylierungsstellen eine Reziprozität zur Phosphorylierng aufweisen (Kelly et al., 1993; Cheng et al., 2000; Chou et al., 1995a,b). Die Behandlung der BE2 Zellen mit H7, einem Breitbandkinase-Inhibitor, der vor allem "second Messenger" abhängige Kinasen inhibiert, resultierte in einer Konzentrations-abhängigen Reduktion des NL6 Signals. Dies steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu einer erwarteten Zunahme des NL6 Signals aufgrund der Kinase-Inhibition. Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei der beobachteten Reduktion um sekundäre Effekte.

Proteinkinase A (cAMP-abhängige Kinase) und Proteinkinase C, die durch H7 inhibiert werden, phosphorylieren vor allem Serin- und Threoninreste in der Kopfdomäne der Neurofilamente, wodurch wahrscheinlich der Filament-Aufbau bzw. -Abbau reguliert wird (Sihag and Nixon, 1989, 1990; Gonda et al., 1990; Dosemeci and Pant, 1992). Durch die Inhibition dieser Kinase kann es folglich zu einer Änderung des Filamentnetzwerkes kommen, so dass die Glycosylierung in der KSP Region beeinflusst wird.

Die KSP Region der Neurofilamente wird hingegen durch "Prolin-gerichtete", "second Messenger" unabhängige Kinasen phosphoryliert (Wible et al., 1989; Roder & Ingram, 1991). Die Phosphorylierung der KSP Region von NF-M wird vor allem durch die,,Prolingerichteten" Mitogen-aktivierten Kinasen Erk1 und Erk2 ("extracellular Signal-regulated" Kinase) bewerkstelligt (Veeranna et al., 1998; Li et al, 1999a). Um eine direkte Reziprozität zwischen Phosphorylierung und Glycosylierung in dieser Region zu zeigen, müsste mit spezifischen Inhibitoren bzw. Aktivatoren der Erk Kinasen gearbeitet werden. Es wurde z.B. gezeigt, dass der Einstrom von Calcium in PC12 Zellen, ausgelöst durch Inkubation mit Calciumionophoren, eine Phosphorylierung in dieser Region bewirkt, d.h. die Mitogenaktivierte Kinasen-Kaskade wurde aktiviert (Li et al., 1999b).

Die Proteinphosphatase 2A (PP2A) dephosphoryliert KSP Stellen auf Neurofilamenten (Veeranna et al., 1995). Ein spezifischer Inhibitor dieser Phosphatase ist Cyclosporin A. Die Behandlung von BE2 Zellen mit Cyclosporin A führte zu einer Reduktion des NL6 Signal um bis zu 25% im Vergleich zu Gesamt-NF-M. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass eine erhöhte Phosphorylierung eine Verringerung der Glycosylierung zufolge hat und legt nahe, dass die Glycosylierung am NL6 Epitop reziprok zur Phosphorylierung stattfindet. Da das NL6 Signal allerdings nicht vollständig zurückgeht, muss immer noch ein Teil der

Neurofilamente glycosyliert sein. Die OGT scheint somit eine hohe Aktivität in dieser NF-M Domäne zu haben.

Eine Behandlung von BE2 Zellen mit dem Mikrotubuli-destabilisierenden Agens Colchicin führte auch zu einer Konzentrations-abhängigen Reduktion des NL6 Signals. Dies könnte durch eine indirekte Beeinflussung der Glycosylierung bzw. Phosphorylierung des NL6 Epitops verursacht werden, was durch die Tatsache, dass Neurofflamente und Mikrotubuli vor allem im Axon stark kreuzvernetzt sind (Hirokawa, 1982), möglich ist. Wie dieser Neurofflament/Mikrotubuli Kontakt allerdings aussieht, ist bisher noch umstritten. Als mögliche Verbindungskomponenten werden Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) und die C-terminalen Schwanzdomänen von NF-M und NF-H angenommen. Beide Proteine weisen eine ausgestreckte Domäne auf, die von den Mikrotubuli bzw. dem Neurofflament Rückgrat absteht (Kim et al., 1979; Hirokawa et al., 1988; Hisanaga & Hirokawa, 1988; Willard & Simon, 1981). Eine Reihe von biochemischen Daten deuten auf eine Interaktion von MAPs und NFs hin (Runge et al., 1981; Letterrier et al., 1982, 1984; Aamodt & Williams, 1984; Heimann et al., 1985; Miyata et al., 1986; Flynn & Purich, 1987). Es wurde auch gezeigt, dass NF-H den Zusammenbau von Mikrotubuli fördert und sogar Netzwerke mit Mikrotubuli bildet (Minami & Sakai, 1983,1986; Minami et al., 1984).

Wenn solche Verbindungen zwischen den beiden Zytoskelett-Systemen bestehen, könnte dies bedeuten, dass die Neurofilamente in den BE2 Zellen infolge des Mikrotubuli-Zusammenbruchs abgebaut werden. Eine Verbindung der Mikrotubuli-Polymerisation mit anderen Intermediärfilamenten wurde in Zellen beobachtet, die sich z.B. auf die Teilung vorbereiten oder durch äußere Einflüsse eine Umorganisation des Zytoskeletts vollziehen (Franke et al., 1982). Dabei spielt die Phosphorylierung der Kopfdomäne eine entscheidende Rolle (Geisler & Weber, 1988; Geisler et al., 1989; Inagaki et al., 1988).

Falls es wirklich einen Abbau der Neurofilamente als Folge der Zerstörung der Mikrotubuli mit Colchicin gibt, könnte dies auf einen Zusammenhang zwischen der Glycosylierung der KSPs und dem NF-Aufbau bzw. -Abbau hindeuten. Dies würde implizieren, dass NF-M Untereinheiten vor allem im Filamentzustand glycosyliert sind. Dies steht im Gegensatz zu der Annahme, dass Neurofilamente vor allem im Axon in der KSP Region vollständig phosphoryliert sind. Diese Diskrepanz sollte durch andere Antikörper, welche die KSP Region im unmodifizierten oder im phosporylierten Zustand binden, weiter untersucht werden.
4.3 NL6 Expression in Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen

Neurofilament-Aggregate Merkmal vieler neurodegenerativer Abnorme sind ein Erkrankungen wie z. B. der amyotrophen Lateralsklerose (ALS), der infantilen spinalen Muskelatrophie oder der Parkinsonschen Erkrankung. Auch im Zuge der Diabetes kommt es zu Neuropathien, die durch abnorme Modifikationen der Neurofilamente gekennzeichnet sind. Die Analyse von verschiedenen Mauslinien mit spontanen oder induzierten Mutationen zeigen, dass abnorme Veränderungen von Neurofilamenten eine selektive Degeneration und den Tod von Motoneuronen hervorrufen können (Julien & Mushynski, 1998). Diese verheerenden Effekte der Akkumulation von NFs zeigen somit eine hohe zelluläre Selektivität. Die progressive Aggregation der Neurofilamente verlangsamten und stoppten letztendlich den axonalen Transport, wodurch die Aufrechterhaltung der Zellfunktion im distalen Axon nicht mehr gewährleistet wird und das Neuron abstirbt. Allerdings ist bisher umstritten, ob es sich bei diesen Veränderungen um die primäre Ursache oder um sekundäre Effekte der Degeneration handelt.

Der Antikörper NL6 wurden in einem ALS Rattenmodell getestet (Howland et al., 2002), um zu untersuchen, ob sich die Glycosylierung in der KSP Region während der ALS Erkrankung verändert. Es zeigte sich, dass die relative NL6 Expression in den kranken Tieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren zu jedem Zeitpunkt niedriger war. Die relative Expression von NL6 blieb in den kranken Tieren über den Zeitraum relativ gleich während sie in den gesunden Tieren mit dem Alter der Ratten zunahm. Dadurch vergrößerte sich der Abstand in der relativen NL6 Signalintensität zwischen den gesunden und kranken Tieren im Laufe der Erkrankung. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Glycosylierung der KSP Region bei den kranken Tieren reduziert ist. Dies könnte wiederum bedeuten, dass die KSP Region vermehrt phosphoryliert ist.

Eine erhöhte Phosphorylierung der KSP Region bewirkt *in vitro* eine Streckung einzelner Neurofilamente und die Bildung paralleler Bündel (Letterrier et al., 1996), wodurch *in vivo* der Abstand zwischen den Neurofilamenten erhöht wird (Hsieh et al., 1994; Nixon et al., 1994). Außerdem wird die Bildung der Kreuzvernetzungen von Neurofilamenten untereinander und zwischen Neurofilamenten und Zellbestandteilen durch Ausstreckung der Schwanzdomänen gefördert (Hirokawa et al., 1984; Gotow & Tanaka, 1994; Gotow et al., 1994). Eine extensive Phosphorylierung von NF-M und NF-H verlangsamt zudem den Transport von Neurofilamenten (Watson et al., 1989; Archer et al., 1994), und bei vollständiger Phosphorylierung kommt der Transport auch für längere Zeiträume vollständig zum Erliegen (Lewis & Nixon, 1988). Dies könnte bedeuten, dass in den untersuchten Ratten eine erhöhte Phosphorylierung vorliegt, die den Transport der Neurofilamente einschränkt. Eine pathologische Hyperphosphorylierung könnte somit bewirken, dass diese Neurofilamente nicht mehr transportiert werden, und es somit zur Aggregation kommt.

Auch Studien über diabetische Ratten zeigten, dass es zu einer abnormen Phosphorylierung von Neurofilamenten im Rückenmark und im Ischiasnerv kommt (Pekiner & McLean, 1991; Terada et al., 1998), und dass der axonale Transport von Neurofilamenten reduziert ist (Merodi et al., 1988). Untersuchungen von Ischiasnerven diabetischer und gesunder Ratten ergaben aber eine ähnliche NL6 Expression. Die Glycosylierung in der KSP Region von NF-M scheint somit nicht beeinflusst zu sein. Dies könnte wiederum bedeuten, das es zu keiner erhöhten Phosphorylierung der KSP Region kommt. Fernyhough und Kollegen (1999), zeigten aber, dass es in demselben Rattenmodell in den dorsalen Hinterwurzelganglien (DRG) zur erhöhten Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von c-jun N-terminaler Kinase (JNK) und (ERK) 1 und 2 kommt. Da die Kinasen ERK1/2 aber für die Phosphorylierung von NF-M in der KSP Region verantwortlich sind, könnte dies eine Reduktion des NL6 Signals zur Folge haben. Aufgrund der geringen Immunreaktivität von NL6 mit DRGs, würde diese Phosphorylierung wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Glycosylierung der KSP Region haben. Im Ischiasnerv wiederum könnte auch die Phosphorylierung der NF-M KSP Region einem anderen Mechanismus unterliegen.

4.4 Ausblick

Der in dieser Arbeit charakterisierte monoklonale Antikörper NL6 erkennt ein glycosyliertes Epitop in der KSP Region von humanem NF-M und stellt ein nützliches Werkzeug dar, um die Funktion der NF-M Glycosylierung im gesunden und kranken Organismus zu studieren.

Die direkte Reziprozität zur Phosphorylierung in dieser Region und die Abundanz der NL6 Expression im Axon steht im Widerspruch zur bisher angenommene Regulation und dem Ausmaß der Phosphorylierung der KSP Region. Es ist deshalb von Interesse mit Hilfe von anderen NF-M Antikörpern, welche die KSP Region phosphoryliert oder nicht modifiziert binden, vergleichende Studien durchzuführen. Dies sollte sowohl auf immunzytochemischer als auch auf proteinbiochemischer Ebene erfolgen. Dadurch könnten Hinweise auf die Funktion der Glycosylierung bzw. Phosphorylierung der KSPs gewonnen werden.

Dies könnte auch weitere Hinweise auf die Rolle der NF-M Glycosylierung bei ALS oder anderen Erkrankungen geben. Gegenwärtig wird die NL6 Expression in weiteren Kollaborationen, z.B. mit Prof. Ohm (Berlin) zur Analyse von Veränderungen bei der Alzheimerschen Erkrankung, untersucht.

In weiteren Experimenten stellte sich heraus, dass der NL6 Antikörper als Marker für humane Neuronen, vor allem in Xenotransplanaten, verwendbar ist. Damit lassen sich humane Neuronen, z.B. die häufig verwendeten und gut charakterisierten NT2N Zellen im Mausgewebe auch lange nach der Transplantation identifizieren.

5 Zusammenfassung

Das Zytoskelett ist eine der Hauptdeterminanten der neuronalen Morphologie und Veränderungen der Zytoskelettkomponenten treten in vielen neurodegenerativen Erkrankungen auf.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der neue monoklonale Antikörper NL6, der das Neuronen-spezifische Neurofilament M (NF-M) detektiert, näher charakterisiert und in Tiermodellen, die mit pathologischen Neurofilament Veränderungen einhergehen, untersucht.

Es wurde gezeigt, dass der NL6 Antikörper spezifisch ein O-glycosyliertes Epitop in NF-M erkennt. Mit Hilfe verschiedener Deletionsmutanten wurde die Lokalisation des Epitops auf die KSP Region von NF-M eingeengt. Der Antikörper erkannte neben humanen NF-M auch NF-M aus der Ratte aber nicht aus Maus und Rind. In kultivierten Modellneuronen (NT2N Zellen) war die O-Gylcosylierung von NF-M ist ubiquitär detektierbar, während sie im humanen Kortex auf axonales NF-M beschränkt ist. Mit verschiedenen Transfektionsmodellen wurde gezeigt, dass die Glycosylierung des NL6 Epitops sowohl in neuronalen als auch nicht nicht-neuronalen Zellen unterschiedlicher Spezies erfolgt. Das Glycosylierungsmotiv des NL6 Epitops ist demnach universal, und es sind keine Neuronenspezifischen Faktoren zur Glycosylierung erforderlich. Die Behandlung von NL6exprimierenden BE2 Zellen, einer humanen Neuroblastom Zelllinie, mit unterschiedlichen Glycosylierungs- und Phosphorylierungs-beeinflussenden Agenzien zeigte, dass NF-M in diesen Zellen nicht vollständig glycosyliert ist und dass die Glycosylierung durch die des Kinase/Phosphatase-Gleichgewichts verändert wird. Beeinflussung Auch eine Destabilisierung der Mikrotubuli führte zu einer Reduktion des NL6 Signals.

Die Analyse der *O*-Glycosylierung von NF-M mit dem NL6 Antikörper in Tiermodellen von ALS und Diabetes ergab, dass das NL6 Epitop nur bei ALS, nicht aber bei Diabetes, verändert war. Die an einer ALS-ähnlichen Erkrankung leidenden Tiere zeigen eine deutlich reduzierte Glycosylierung der KSP Region, die auf eine Hyperphosphorylierung dieser Region hindeuten könnte.

Zudem wurde in Xenotransplantatstudien gezeigt, dass der NL6 Antikörper zur Detektion von humanen Neuronen in murinem Gewebe eingesetzt werden kann.

6 Abkürzungen

| α | anti |
|--------------------|---|
| А | Ampere |
| Abb. | Abbildungen |
| AD | Alzheimer Erkrankung |
| ADP | Adenosin Diphosphat |
| ALS | amytrophe Lateralskelrose |
| APP | Amyloid-Vorläufer-Protein |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosin 5'-Triphosphat |
| BCA | Bicinchonic Acid |
| BFAG | "Bullous pemphigoid antigen" |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| c | centi |
| ca. | circa |
| CS | Kälberserum |
| d.h. | das heißt |
| DAPI | 4,6-Diamidino-2-phenylindol |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| DIF | Doppelimmunfluoreszenz |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DOC | Desoxycholat |
| DRG | Hinterwurzelganglien (Dorsal-Root-Glanglion) |
| E | Glutaminsäure |
| ECL | verstärkte Chemilumineszenz |
| EDTA | Ethylendiaminotetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglykol-bis-[β-aminoethylether]- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> ', <i>N</i> '-Tetraessigsäure |
| ELISA | Enzym-linked Immunosorbent Assay |

| EM | Elektronen-Mikroskopie |
|---------|---|
| Erk1/2 | "extra-cellular Signal regulated Kinase" |
| EtOH | Ethanol |
| F-Aktin | Mikrofilamente |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| FITC | Fluoreszein Isothiocyanat |
| g | Gramm |
| G-Aktin | globuläres Aktin |
| GDP | Guanosin Diphosphat |
| GFAP | Glial Fibrillary Acidic Protein |
| GFAT | Glutamin-Fructose-6-phosphat Aminotransferase |
| GTP | Guanosin 5'-Triphosphat |
| h | Stunde |
| Н | Wasserstoff |
| HGPRT | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase |
| hrNT-3 | humanes rekombinantes Neurotrophin-3 |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase |
| HS | Pferdeserum |
| IEM | Immun-Elektronenmikroskopie |
| IF | Intermediärfilament |
| IFAP | Intermediärfilament-assoziiertes Protein |
| Ig | Immunglobulin |
| IgG | Immunglobulin Subtyp G |
| K | Lysin |
| k | Kilo |
| kDa | Kilo-Dalton |
| КОН | Kalilauge |
| 1 | Liter |
| lös. | löslich |
| μ | mikro |
| m | Meter |
| m | milli |
| Μ | molar |
| MAP | Mikrotubuli-assoziiertes Protein |

| MEM | Minimal Essential Medium |
|--|---|
| MeOH | Methanol |
| min | Minuten |
| mRNA | Messenger-Ribonukleinsäure |
| MTOC | Mikrotubuli-organisierendes Zentrum |
| n | nano |
| n | Gesamtmenge (Statistik) |
| NaOH | Natronlauge |
| NF | Neurofilament |
| NF-H | Neurofilament Protein H (schwer) |
| NF-L | Neurofilament Protein L (leicht) |
| NF-M | Neurofilament Protein M (mittel) |
| NGF | Nerven-Wachstums-Faktor |
| nm | Nanometer |
| NP40 | Nonidet P-40 |
| OD | Optische Dichte |
| O-GlcNAc | β -N-Acetylglucosamin |
| O-GlcNAcase | β -N-acetylglucosaminidase |
| OGT | β -N-Acetylglucosamin-Transferase |
| Р | Prolin |
| n | Wahrscheinlichkeit |
| P | |
| P P8 | Postnataltag 8 |
| P P8 PAGE | Postnataltag 8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| P P8 PAGE PNS | Postnataltag 8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese Peripheres Nervensystem |
| P P8 PAGE PNS PP2A | Postnataltag 8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese Peripheres Nervensystem Proteinphosphatase 2A |
| P P8 PAGE PNS PP2A PUGNAC | Postnataltag 8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese Peripheres Nervensystem Proteinphosphatase 2A <i>O</i> -(2-acetamido-2-deoxy-D-gluco-pyranosylidene)amino- <i>N</i> - |
| P P8 PAGE PNS PP2A PUGNAC | Postnataltag 8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese Peripheres Nervensystem Proteinphosphatase 2A <i>O</i> -(2-acetamido-2-deoxy-D-gluco-pyranosylidene)amino- <i>N</i> - phenylcarbamate |
| P P8 PAGE PNS PP2A PUGNAC PVDF | Postnataltag 8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese Peripheres Nervensystem Proteinphosphatase 2A <i>O</i> -(2-acetamido-2-deoxy-D-gluco-pyranosylidene)amino- <i>N</i> - phenylcarbamate Polyvinyliden-Difluorid |
| P P8 PAGE PNS PP2A PUGNAC PVDF RA | Postnataltag 8Polyacrylamid-GelelektrophoresePeripheres NervensystemProteinphosphatase 2AO-(2-acetamido-2-deoxy-D-gluco-pyranosylidene)amino-N-phenylcarbamatePolyvinyliden-DifluoridRetinsäure |
| P P8 PAGE PNS PP2A PUGNAC PVDF RA RT | Postnataltag 8Polyacrylamid-GelelektrophoresePeripheres NervensystemProteinphosphatase 2AO-(2-acetamido-2-deoxy-D-gluco-pyranosylidene)amino-N-phenylcarbamatePolyvinyliden-DifluoridRetinsäureRaumtemperatur |
| P P8 PAGE PNS PP2A PUGNAC PVDF RA RT S | Postnataltag 8Polyacrylamid-GelelektrophoresePeripheres NervensystemProteinphosphatase 2AO-(2-acetamido-2-deoxy-D-gluco-pyranosylidene)amino-N-phenylcarbamatePolyvinyliden-DifluoridRetinsäureRaumtemperaturSerin |
| P P8 PAGE PNS PP2A PUGNAC PVDF RA RT S SMA | Postnataltag 8Polyacrylamid-GelelektrophoresePeripheres NervensystemProteinphosphatase 2AO-(2-acetamido-2-deoxy-D-gluco-pyranosylidene)amino-N-phenylcarbamatePolyvinyliden-DifluoridRetinsäureRaumtemperaturSerinspinale Muskeldystrophie |
| P P8 PAGE PNS PP2A PUGNAC PVDF RA RT S SMA SV40 | Postnataltag 8Polyacrylamid-GelelektrophoresePeripheres NervensystemProteinphosphatase 2AO-(2-acetamido-2-deoxy-D-gluco-pyranosylidene)amino-N-phenylcarbamatePolyvinyliden-DifluoridRetinsäureRaumtemperaturSerinspinale MuskeldystrophieSimian Virus 40 |

| TNX-100 | TritonX 100 |
|---------|---|
| UDP | Uridin Diphosphat |
| x g | Gravitationskonstante (Erdbeschleunigung) |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

7 Vektorkarten







Deletion 2368-2751bp in NF-M





8 Literatur

Aamodt E.J. and Williams R.C. Jr. (1984) Microtubule-associated proteins connect microtubules and neurofilaments in vitro. *Biochemistry* 23: 6023-6031

Al-Chalabi A., Andersen P.M., Nilsson P. Chioza B., Andersson J.L. et al. (1999) Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 8: 157-164

Alonso A.D., Grundke-Iqbal I. and Iqbal K. (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat. Med.* 2: 783-787

Archer D.R., Watson D.F. and Griffin J. W. (1994) Phosphorylation-dependent immunoreactivity of neurofilaments and the rate of slow axonal transport in the central and peripheral axons of the rat dorsal root ganglion. J. Neurochem. 62: 1119-1125

Arnold C.S., Johnson G.V.W., Cole R.N., Dong D.L.Y., Lee M. and Hart G.W. (1996) The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked Nacetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 271: 28741-28744

Baas P.W., Deitch J.S., Black M.M. and Banker G.A. (1988) Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85:** 8335-8339

Balin B.J. and Lee V.M. (1991a) Individual neurofilament subunits reassembled *in vitro* exhibit unique biochemical, morphological und immunological properties. *Brain Res.* 556: 196-208

Balin B.J., Clark E.A., Trojanowski J.Q. and Lee V.M. (1991b) Neurofilament reassembly *in vitro*: biochemical, morphological and immuno-electron microscopic studies employing monoclonal antibodies to defined epitopes. *Brain Res.* **556:** 181-195

Bennett G.S. and DiLullo C. (1985) Slow posttranslational modification of a neurofilament protein. *J. Cell Biol.* 100: 1799-1804

Biedler J.L., Helson L. and Spengler B.A. (1973) Morphology and growth, tumorigenicity and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* **33:** 2643-2652

Biedler J.L., Roffler-Tarlov S., Schachner M. and Freedman L.S. (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* **38**: 3751-3757

Biedler J.L. and Spengler B.A. (1976a) A novel chromosome abnormality in human neuroblastoma antifolate-restitant Chinese hamster cell lives in culture. *J. Natl. Cancer Inst.* **57:** 683-695

Biedler J.L. and Spengler B.A. (1976b) Metaphase chromosome anomaly: association with drug resistance and cell-specific products. *Science* **191:** 185-187

Brandt R. (1998) Cytoskeletal mechanisms of axon outgrowth and pathfinding. *Cell Tissue Res.* 292: 181-189

Brady S.T. (1993) Motor neurons and neurofilaments in sickness and in health. Cell 73: 1-3

Bray D. (1992) Cell movements. Garland Publishing, Inc, New York and London

Brown A., Bernier G., Mathieu M., Rossant J. and Kothary R. (1995) The mouse dystonia musculorum gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. *Nature Genet.* 10: 301-306

Campbell M.J. and Morrison J.H. (1989) Monoclonal antibody to neurofilament protein (SMI-32) labels a subpopulation of pyramidal neurons in the human and monkey neocortex. *J. Comp. Neur.* **282:** 191-205

Carden M.J., Schlaepfer W.W. and Lee V.M. (1985) The structure, biochemical properties, and immunogenicity of neurofilament peripheral regions are determined by phosphorylation state. *J. Biol. Chem.* 260: 9805-9817

Carden M.J., Trojanowski J.Q., Schlaepfer W.W. and Lee V.M. (1987) Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J. Neurosci.* **7:** 3489-3504

Carlier M.-F. (1989) Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. *Int. Rev. Cytol.* 115: 139-170

Cheng X., Cole R.N., Zaia J. and Hart G.W. (2000) Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry* **39**: 11609-11620

Chien C.L. and Liem R.K.H. (1994) Characterization of the mouse gene encoding the neuronal intermediate filament protein alpha-internexin. *Gene* 149: 289-292

Chin S.S. and Liem R.K. (1989) Expression of rat neurofilament proteins NF-L and NF-M in transfected non-neuronal cells. *Eur. J. Cell Biol.* 50: 475-490

Chin S.S. and Liem R.K. (1990) Transfected rat high-molecular-weight neurofilament (NF-H) coassembles with vimentin in a predominantly nonphosphorylated form. *J. Neurosci.* 10: 3714-3726

Chin S.S.M., Macoice P. and Liem R.K.H. (1991) Effects of truncated neurofilament proteins on the endogenous intermediate filaments in transfected fibroblasts. *J. Cell Sci.* 99: 335-350

Chou C.-F., Smith A.J. and Omary M.B. (1992) Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *J. Biol. Chem.* 267: 3901-3906

Chou S.M., Wang H.S., Taniguchi A. and Bucala R. (1998) Advanced glycation endproducts in neurofilament conglomeration of motoneurons in familial and sporadic amytrophic lateral sclerosis. *Mol. Med.* 4: 324-332

Chou T.-Y., Dang C.V. and Hart G.W. (1995a) Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4417-4421

Chou T.-Y., Hart G.W. and Dang C.V. (1995b) c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J. Biol. Chem.* 270: 18961-18965

Cohen M.P. (1986) Diabetes and protein glycosylation: Measurement and biologic relevance. *Springer, New York*

Cole J.S., Messing A., Trojanowski J.Q. and Lee V.M.-Y. (1994) Modulation of axon diameter and neurofilaments by hypomyelinating Schwann cells in transgenic mice. *J. Neurosci.* 14: 6956-6966

Comer F.I. and Hart G.W. (2000) *O*-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between *O*-GlcNAc and *O*-phospate. *J. Biol. Chem.* **275:** 29179-29182

Comer F.I., Vosseller K., Wells L., Accavitti M.A. and Hart G.W. (2001) Characterization of a mouse monoclonal antibody specific for O-linked *N*-actylglucosymine. *Anal. Biochem.* 293: 169-177

Dahlstrand J., Zimmerman L.B., McKay R.D. and Lendahl U. (1992) Characterization of the human nestin gene reveals close evolutionary relationship to neurofilaments. *J. Cell Sci.* **103:** 589-597

Deng H.X., Hentati A., Tainer J.A., Iqbal Z., Cayabyab A. et al. (1993) Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261: 1047-1051

Denk H., Franke W.W., Eckerstorfer R., Schmid E. and Kerjaschki D. (1979) Formation and involution of Mallory bodies ("alcoholic hyalin") in murine and human liver revealed by immunofluorescence microscopy with antibodies to prekeratin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76:** 4112-4116

De Waegh S.M., Lee V.M.-Y. and Brady S.T. (1992) Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* **68:** 415-463

Dong D.L.-Y. and Hart G.W. (1994) Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J. Biol. Chem.* **269**: 19321-19330

Dong D.L., Xu Z.S., Chevrier M.R., Cotter R.J. Cleveland D.W. and Hart G.W. (1993) Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. *J. Biol. Chem.* **268:** 16679-16687

Dong D.L.Y., Xu Z.S., Hart G.W. and Cleveland D.W. (1996) Cytoplasmic *O*-GlcNAc modification of the head domain and the KSP repeat motif of the neurofilament protein neurofilament-H. *J. Biol. Chem.* **271:** 20845-20852

Dosemeci A. and Pant H.C. (1992) Association of cyclic-AMP-dependent protein kinase with neurofilaments. *Biochem J.* **282:** 477-481

Drubin D.G., Feinstein S.C., Shooter E.M. and Kirschner M.W. (1985) Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J. Cell Biol.* **101:** 1799-1807

Drubin D.G., Kobayashi S., Kellogg D. and Kirschner M.W. (1988) Regulation of microtubule protein levels during cellular morphogenesis in nerve growth factor-treated PC12 cells. *J. Cell Biol.* **106:** 1583-1591

Duk M., Ugorski M. and Lisowska (1997) beta-Elimination of O-glycans from glycoproteins transferred to immobilon P membranes: method and some applications. *Anal. Biochem.* **253**: 98-102

Elhanany E., Jaffe H., Link W.T., Sheeley D.M., Gainer H. and Pant H.C. (1994) Identification of endogenously phosphorylated KSP sites in the high-molecular-weight rat neurofilament protein. *J. Neurochem.* 63: 2324-2335

Escurat M., Djabali K., Gumpel M., Gros F. and Portier M.M. (1990) Differential expression of two neuronal intermediate-filament proteins, peripherin and the low-molecular-mass neurofilament protein (NF-L), during the development of the rat. *J. Neurosci.* **10:** 764-784

Eyer J. and Leterrier J.-F. (1988) Influence of the phosphorylation state of neurofilament protein on the interaction between purified filaments *in vitro*. *Biochem. J.* **252:** 655-660

Fernyhough P., Gallagher A., Averill S.A., Priestley J.V., Hounsom L., Patel J. and Tomlinson D.R. (1999) Aberrant neurofilament phosphorylation in sensory neurons of rats with diabetic neuropathy. *Diabetes* 48: 81-89

Figlewicz D.A., Krizus A., Martinoli M.G., Meininger V., Dib M., Rouleau G.A. and Julien J.P. (1994) Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amytrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **3**: 1757-1761

Fliegner K.H., Kaplan M.P., Wood T.L., Pintar J.E. and Liem R.K. (1994) Expression of the gene for the neuronal intermediate filament protein alpha-internexin coincides with the onset of neuronal differentiation in the developing rat nervous system. *J. Comp. Neurol.* **342**: 161-173

Flynn G. and Purich D.L. (1987) GTP regeneration influences interactions of microtubules, neurofilaments, and microtubule-associated proteins in vitro. J. Biol. Chem. 262: 15443-15447

Franke W.W., Schmid E., Grund C. and Geiger B. (1982) Intermediate filament proteins in nonfilamentous structures: transient disintegration and inclusion of subunit proteins in granular aggregates. *Cell* 30: 103-113

Fuchs E. and Weber K. (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 345-382

Furukawa K. and Kobata A. (1992) Protein glycosylation. Curr. Opin. Biotechnol. 3: 554-559

Gao Y., Wells L., Comer F.I., Parker G.J. and Hart G.W. (2001) Dynamic Oglycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. J. Biol. Chem. 276: 9838-9845

Gardner E.E., Dahl D. and Bignami A. (1984) Formation of 10-nanometer filaments from the 150K-dalton neurofilament protein *in vitro*. J. Neurosci. Res. 11: 145-155

Geisler N., Plessmann U. and Weber K. (1985) The complete amino acid sequence of major mammalian neurofilament protein (NF-L). *FEBS Lett.* 182: 475-478

Geisler N. and Weber K. (1981) Self-assembly *in vitro* of the 68,000 molecular weight component of the mammalian neurofilament triplet proteins into intermediate-sized filaments. *J. Mol. Biol.* 151: 565-571

Geisler N. and Weber K. (1988) Phosphorylation of desmin in vitro inhibits formation of intermediate filaments; identification of three kinase A sites in the aminoterminal head domain. *EMBO J.* 7: 15-20

Geisler N., Hatzfeld M. and Weber K. (1989) Phosphorylation in vitro of vimentin by protein kinases A and C is restricted to the head domain. Identification of the phosphoserine sites and their influence on filament formation. *Eur. J. Biochem.* 183: 441-447

Gill S.R., Wong P.C., Monteiro M.J. and Cleveland D.W. (1990) Assembly properties of dominant and recessive mutations in the small mouse neurofilament (NF-L) subunit. *J. Cell Biol.* 111: 2005-2019

Goldman R.D., Khuon S., Chou Y-H, Opal P. and Steinert P. (1996) The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J. Cell Biol.* 134: 971-983

Goldstein M.E., House S.B. and Gainer H. (1991) NF-L and peripherin immunoreactivities define distinct classes of rat sensory ganglion cells. *J. Neurosci. Res.* 30: 92-104

Gonda Y., Nishizawa K., Ando S., Kitamura S., Minoura Y., Nishi Y. and Inagaki M. (1990) Involvement of protein kinase C in the regulation of assembly-disassembly of neurofilaments *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167: 1316-1325

Gorham J.D., Baker H., Kegler D. and Ziff E.B. (1990) The expression of the neuronal intermediate filament protein peripherin in the rat embryo. *Dev. Brain Res.* 57: 235-248

Goslin K. and Banker G. (1989) Experimental observation on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. J. Cell Biol. 108: 1507-1516

Goslin K. and Banker G. (1991) Rat hippocampal neurons in low-density culture. In: Banker G., Goslin K. (Eds) Culturing nerve cells. MIT Press Cambridge, Mass., 251-281

Gotow T. and Tanaka J. (1994) Phosphorylation of neurofilament H subunit as related to arrangement of neurofilaments. *J. Neurosci. Res.* 37: 691-713

Gotow T., Tanaka T., Nakamura Y. and Takeda M. (1994) Dephosphorylation of the largest neurofilament subunit protein influences the structure of crossbridges in reassembled neurofilaments. *J. Cell Sci.* 107: 1949-1957

Graham F.L., Smiley J., Russell W.C. and Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36: 59-74

Green K.J. and Jones J.C.R. (1996) Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J.* 10: 871-881

Greene L.A. and Tischler A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2424-2428

Griffith L.S., Mathes M. and Schmitz B. (1995) Beta-amyloid precursor protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine. J. Neurosci. Res. 41: 270-278

Griffith L.S. and Schmitz B. (1999) O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to pertubations of phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 262: 824-831

Gupta R., Hansen J. and Brunak S. (manuscript in preparation) Identifying intracellular O-β-GlcNAc "yin-yang" switches in the available human proteome.

Haltiwanger R.S., Blomberg M.A. and Hart G.W. (1992a) Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* 267: 9005-9013

Haltiwanger R.S., Kelly W.G., Roquemore E.P., Blomberg M.A., Dong D.L.-Y. et al. (1992b) Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins is ubiquitous and dynamic. *Biochem. Soc. Trans.* 20: 264-269

Haltiwanger R.S., Busby S., Grove K., Li S., Mason D. et al. (1997) O-glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: regulation analogous to phosphorylation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231: 237-242

Haltiwanger R.S., Grove K. and Philipsberg G.A. (1998) Modulation of O-linked Nacetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N- acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-Dglucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. J. Biol. Chem. 273: 3611-3617

Hart G.W. (1997) Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. Annu. Rev. Biochem. 66: 315-335

Hart G.W., Kreppel L.K., Comer F.I., Arnold C.S., Snow D.M. et al. (1996) *O*-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with *O*-phosphorylation and putative roles in protein multimerization. *Glycobiology* **6**: 711-716

Heckel D., Comtesse N., Brass N., Blin N., Zang K.D. and Meese E. (1998) Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum. Mol. Genet.* 7: 1859-1872

Heimann R., Shelanski M.L. and Liem R.K.H. (1985) Microtubule-associated proteins bind specifically to the 70-kDa neurofilament protein. *J. Biol. Chem.* 260: 12160-12166

Heins S., Wong P.C., Muller S., Goldie K., Cleveland D.W. and Aebi U. (1993) The rod domain of NF-L determines neurofilament architecture whereas the end domains specify filament assembly and network formation. *J. Cell Biol.* 123: 1517-1533

Hirokawa N. (1982) Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep- etching method. *J. Cell Biol.* **99:** 705-714

Hirokawa N., Glicksman M.A. and Willard M.B. (1984) Organization of mammalian neurofilament polypetides within the neuronal cytoskeleton. J. Cell Biol. 98: 1523-1536

Hirokawa N., Hisanaga S. and Shiomura (1988) MAP2 is a component of crossbridges between microtubules and neurofilaments in the neuronal cytoskeleton: quick-freeze, deepetch immunoelectron microscopy and reconstitution studies. *J. Neurosci.* 8: 2769-2777

Hisanaga S. and Hirokawa N. (1988) Structure of the peripheral domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing. *J. Mol. Biol.* 202: 297-305

Hisanaga S. and Hirokawa N. (1989) The effects of dephosphorylation on the structure of the projections of neurofilament. J. Neurosci. 9: 959-966

Hisanaga S. and Hirokawa N. (1990) Molecular architecture of the neurofilament. II. Reassembly process of neurofilament L protein *in vitro*. J. Mol. Biol. 211: 871-882

Hisanaga S., Ikai A. and Hirokawa N. (1990) Molecular architecture of the neurofilament. I. Subunit arrangement of neurofilament L protein in the intermediate-sized filament. J. Mol. Biol. 211: 857-869

Hoffman P.N. and Lasek R.J. (1975) The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J. Cell Biol.* **66:** 351-366

Hoffman P.N., Griffin J.W. and Price D.L. (1984) Control of axonal caliber by neurofilament transport. J. Cell Biol. 99: 705-714

Hoffman P.N., Cleveland D.W., Griffin J.W., Landes P.W., Cowan N.J. and Price D.L. (1987) Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3472-3476

Holt G.D. and Hart G.W. (1986) The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. J. Biol. Chem. 261: 8049-8057

Holt G.D., Snow C.M., Senior A., Haltiwanger R.S., Gerace L. and Hart G.W. (1987) Nuclear pore complex glycosproteins contain cytoplasmically disposed O-linked *N*acetylglucosamine. *J. Cell Biol.* 104: 1157-1164

Hornung J.-P. and Riederer B.M. (1999) Medium-sized neurofilament protein related to maturation of a subset of cortical neurons. *J. Comp. Neur.* 414: 348-360

Howland D.S., Liu J., She Y., Goad B., Mragakis N.J. et al. (2002) Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amytrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1604-1609

Hsieh S.-T., Kidd G.J., Crawford T.O., Xu Z., Lin W.-M. et al. (1994) Regional modulation of neurofilament organization by myelination in normal axons. *J. Neurosci.* 14: 6392-6401

Inagaki M., Gonda Y., Matsuyama M., Nishizawa K., Nishi Y. and Sato C. (1988) Intermediate filament reconstitution in vitro. The role of phosphorylation on the assemblydisassembly of desmin. J. Biol. Chem. 263: 5970-5978

Inagaki M., Nishi Y., Nishizawa K., Matsuyama M. and Sato C. (1989) Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments *in vitro*. *Nature* **328**: 649-652

Julien J.P. (1999) Neurofilaments function in health and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 554-560

Julien J.P., Cote F., Beaudet L., Sidky M., Flavell D. et al. (1988) Sequence and structure of the mouse gene coding for the largest neurofilament subunit. *Gene* 68: 307-314

Julien J.P., Grosveld F., Yazdanbaksh K., Flavell D., Meijer D. and Mushynski W. (1987) The structure of a human neurofilament gene (NF-L): a unique exon-intron organization in the intermediate filament gene family. *Biochim. Biophys. Acta* 909: 10-20

Julien J.P., Meyer D., Flavell D., Hurst J. and Grosveld F. (1986) Cloning and developmental expression of the murine neurofilament gene family. *Brain Res.* 387: 243-250

Julien J.P. and Mushynski W.E. (1982) Multiple phosphorylation sites in mammalian neurofilament polypeptides. J. Biol. Chem. 257: 10467-10470

Julien J.P. and Mushynski W.E. (1983) The distribution of phosphorylation sites among identified proteolytic fragments of mammalian neurofilaments. *J. Biol. Chem.* 258: 4019-4025

Julien J.P. and Mushynski W.E. (1998) Neurofilaments in health and disease. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 61: 1-23

Kamemura K., Hayes B.K., Comer F.I. and Hart G.W. (2002) Dynamic interplay between *O*-glycosylation and *O*-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c.Myc in Lymphomas, is regulated by mitogens. *J. Biol. Chem.* 277: 19229-19235

Kaplan M.P., Chin S.S., Fliegner K.H. and Liem R.K. (1990) Alpha-internexin, a novel neuronal intermediate filament protein, precedes the low molecular weight neurofilament protein (NF-L) in the developing rat brain. *J. Neurosci.* 10: 2735-2748

Kearse K. P. and Hart G.W. (1991) Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1701-1705

Kelly W.G., Dahmus M.E. and Hart G.W. (1993) RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. J. Biol. Chem. 268: 10416-10424

Kim H., Binder L.I. and Rosenbaum J.L. (1979) The periodic association of MAP2 with brain microtubules in vitro. *J. Cell Biol.* 80: 266-276

Kleppner S.R., Robinson K.A., Trojanowski J.Q. and Lee V.M. (1995) Transplanted human neurons derived from a teratocarcinoma cell line (NTera-2) mature, integrate, and survive for over 1 year in the nude mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **357:** 618-632

Kreis T. and Vale R. (Editor) (1999) Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins. Sambrooks & Tooze Publication, Oxford University Press

Kreppel L.K., Blomberg M.A. and Hart G.W. (1997) Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* **272:** 9308-9315

Kreppel L.K. and Hart G.W. (1999) Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* 274: 32015-32022

Ku N.-O. and Omary M.B. (1994) Expression, glycosylation, and phosphorylation of human keratins 8 and 18 in insect cells. *Exp. Cell Res.* 211: 24-35

Lämmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lee V.M.-Y., Carden M.J., Schlaepfer W.W. and Trojanowski J.Q. (1987) Monoclonal antibodies distinguish several differentially phosphorylated states of the two largest rat neurofilament subunits (NF-H and NF-M) and demonstrate their existence in the normal nervous system of adult rats. *J. Neurosci.* 7: 3474-3488

Lee V.M.-Y., Otvos L., Carden M.J., Hollosi M., Dietzschold B. and Lazzarini (1988a) Identifikation of the major multi-phosphorylation site in mammalian neurofilaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1998-2002

Lee V.M.-Y., Otvos L., Schmidt M.L. and Trojanowski J.Q. (1988b) Alzheimer disease tangles share immunologoical similarities with multi-phosphorylation repeats in the two large neurofilament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7384-7388

Lees J.F., Shneidman P.S., Skuntz S.F., Carden M.J. and Lazzarini R.A. (1988) The structure and organisation of the human heavy neurofilament subunit (NF-H) and the gene encoding it. *EMBO J.* 7: 1947-1955

Lefebvre T., Alonso C., Mahboub S., Dupire M.J., Zanetta J.P. et al. (1999) ... Biochim. Biophys. Acta 1472: 71-81

Lendahl U., Zimmerman L. and Mc Kay R. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate protein. *Cell* 60: 585-595

Leterrier J.-F., Liem R.K.H. and Shelanski M.L. (1982) Interactions between neurofilaments and microtubule-associated proteins: a possible mechanism for intraorganellar bridging. *Cell Biol.* **95**: 982-986

Leterrier J.-F., Wong J., Liem R.K.H. and Shelanski M.L. (1984) Promotion of microtubule assembly by neurofilament-associated microtubule-associated proteins. *J. Neurochem.* **43**: 1385-1391

Leterrier J.-F., Kas J., Hartwig J., Vegners R. and Janmey P.A. (1996) Mechanical effects of neurofilament cross-bridges. Modulation by phosphorylation, lipids, and interactions with F-actin. *J. Biol. Chem.* 271: 15687-15694

Levy E., Liem R.K., D'Eustachio P. and Cowan N.J. (1987) Structure and evolutionary origin of the gene encoding mouse NF-M, the middle-molecular-mass neurofilament protein. *Eur. J. Biochem.* 166: 71-77

Lewis S.E. and Nixon R.A. (1988) Multiple phosphorylated variants of the high molecular mass subunit of neurofilaments in axons of retinal cell neurons: characterization and evidence for their differential association with stationary and moving neurofilaments. *J. Cell Biol.* 107: 2689-2701

Li B.S., Veeranna, Gu J., Grant P. and Pant H.C. (1999a) Activation of mitogen-activated protein kinases (Erk1 and Erk2) cascade results in phosphorylation of NF-M tail domains in transfected NIH 3T3 cells. *Eur. J. Biochem.* 262: 211-217

Li B.S., Veeranna, Gu J., Grant P. and Pant H.C. (1999b) Calcium influx and membrane depolarization induce phosphorylation of neurofilament (NF-M) KSP repeats in PC12 cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **70:** 84-91

Liu K., Paterson A.J., Chin E. and Kudlow J.E. (2000) Glucose stimulates protein modification by o-linked GlcNAc in pancreatic cells: linkage of o-linked GlcNAc to beta-cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2820-2825

Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P. and Darnell J. (1996) Molecular Cellbiology *Walter de Gruyter* Berlin, New York

Lüdemann N. (1999) Präparation und Charakterisierung neuer monoklonaler Antikörper gegen Komponenten des neuronalen Zytoskeletts. *Diplomarbeit, Heidelberg*

Mata M., Kupina N. and Fink D.J. (1992) Phosphorylation-dependent neurofilament epitopes are reduced at the node of Ranvier. J. Neurocytol. 21: 199-210

McClain D.A. and Crook E.D. (1996) Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes* 45: 1003-1009

McLean W.H.I., Pulkkinen L., Smith F.J.D., Rugg E.L., Labe E.B. et al. (1996) Loss of plectin causes epidermolysis bullosa with muscular dystrophy: cDNA cloning and genomic organization. *Genes Dev.* 10: 1724-1725

Medina L., Grove K. and Haltiwanger R.S. (1998) SV40 large T antigen is modified with O-linked N-acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation. *Glycobiolgy* **8:** 383-391

Medori R., Jenich H., Autilio-Gambetti L. and Gambetti P. (1988) Experimental diabetic neuropathy: similar changes of slow axonal transport and axonal size in different animal models. *J. Neurosci.* 8: 1814-1821

Minami Y. and Sakai H. (1983) Network formation by neurofilament-induced polymerization of tubulin: 200K subunit of neurofilament triplet promotes nucleation of tubulin polymerization and enhances microtubule assembly. J. Biochem. (Tokyo) 94: 2023-2033

Minami Y. and Sakai H. (1986) Effects of microtubule-associated proteins on network formation by neurofilament-induced polymerization of tubulin. *FEBS Lett.* 195: 68-72

Minami Y., Endo S. and Sakai H. (1984) Participation of 200K or 150K subunit of neurofilament in construction of the filament core with 70K subunit and promotion of tubulin polymerization by incorporated 200K subunit. J. Biochem. (Tokyo) 96: 1481-1490

Mitchison T. and Kirschner M. (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237-242

Miyata Y., Hoshi M., Nishida E., Minami Y. and Sakai H. (1986) Binding of microtubuleassociated protein 2 and tau to the intermediate filament reassembled from neurofilament 70kDa subunit protein. Its regulation by calmodulin. *J. Biol. Chem.* 261:13026-13030

Miyazono M., Lee V.M. and Trojanowski J.Q. (1995) Proliferation, cell death, and neuronal differentiation in transplanted human embryonal carcinoma (NTera2) cells depend on the graft site in nude and severe combined immunodeficient mice. *Lab. Invest.*. **73**: 273-283

Miyazono M., Nowell P.C., Finan J.L., Lee V.M. and Trojanowski J.Q. (1996) Long-term integration and neuronal differentiation of human embryonal carcinoma cells (NTera-2) transplanted into the caudoputamen of nude mice. *J. Comp. Neurol.* **376:** 603-613

Mohiuddin L., Fernyhough P. and Tomlinson D.R. (1995) Reduced levels of mRNA encoding endoskeletal and growth-associated proteins in sensory ganglia in experimental diabetes mellitus. *Diabetes* 44: 25-30

Monteiro M.J. and Cleveland D.W. (1989) Expression NF-L and NF-M in fibroblasts reveals coassembly of neurofilament and vimentin subunits. *J. Cell Biol.* 108: 579-593

Myers M.W., Lazzarini R.A., Lee V.M., Schlaepfer W.W. and Neslon D.L. (1987) The human mid-size neurofilament subunit: a repeated protein sequence and the relationship of its gene to the intermediate gene family. *EMBO J.* 6: 1617-1626

Nakagawa T., Chen J., Zhang Z., Kanai Y. and Hirokawa N. (1995) Two distinct functions of the carboxyl-terminal tail domain of NF-M upon neurofilament assembly: crossbridge formation and longitudinal elongation of filaments. *J. Cell Biol.* **129:** 411-429

Napolitano E.W., Chin S.S. Colman D.R. and Liem R.K. (1987) Complete amino acid sequence and the in vitro expression of rat NF-M, the middle molecular weight neurofilament protein. *J. Neurosci.* 7: 2590-2599

Natsuume-Sakei S., Motonishi K. And Migita S. (1977) Quantitive estimations of five classes of immunoglobulin in inbred mouse strains. *Immunology* 32: 861-866

Nixon R.A. (1993) The regulation of neurofilament protein dynamics by phosphorylation: clues to neurofibrillary pathology. *Brain Pathol.* **3:** 29-38

Nixon R.A., Paskevich P.A., Sihag R.K. and Thayer C.Y. (1994) Phosphorylation on carboxyl terminus domains of neurofilament proteins in retinal ganglion cell neurons in vivo: influences on regional neurofilament accumulation, interneurofilament spacing, and axon caliber. *J. Cell Biol.* 126: 1031-1046

Nixon R.A. (1998) Dynamic behavior and organization of cytoskeletal proteins in neurons: reconciling old and new findings. *Bioassays* 20: 798-807

Nixon R.A. and Logvinenko K.B. (1986) Multiple fates of newly synthesized neurofilament proteins: evidence for stationary neurofilament network distributed nonuniformly along axons of retinal ganglion cell neurons. *J. Cell Biol.* **102:** 647-659

Olmsted J.B., Carlson K., Klebe R., Ruddle F. and Rosenbaum J. (1970) Isolation of microtuble protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65: 129-136

Pachter J.S. and Liem R.K. (1985) Alpha-Internexin, a 66 kD intermediate filament-binding protein from mammalian central nervous tissue. *J. Cell Biol.* **101:** 1316-1322

Parysek L.M. and Goldman R.D. (1988) Distribution of a novel 57 kDa intermediate filament (IF) protein in the nervous system. *J. Neurosci.* **8:** 555-563

Patti M.E., Virkamaki A., Landaker E.J. Kahn C.R. and Yki-Jarvinen H. (1999) Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes* **48**: 1562-1571

Pekiner C and McLean W.G. (1991) Neurofilament protein phosphorylation in spinal cord of experimentally diabetic rats. J. Neurochem. 56: 1362-1367

Pernas-Alonso R., Perrone-Capano C. and di Porzio U. (1997) Neurofilaments in cytoskeletal function and motoneurone disease. *Curr. Topics Neurochem.* **1:** 157-166

Peter M., Nakagawa J., Doree M., Labbe J.-C. and Nigg E.A. (1990) Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* 60: 791-801

Riederer B.M., Porchet R. and Muragg R.A. (1996) Differential expression and modification of neurofilament triplet proteins during cat cerebellar development. *J. Comp. Neur.* **364:** 704-717

Pleasure S.J. and Lee V.M.-Y. (1993) Ntera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *J. Neurosci. Res.* **35**: 585-602

Pollanen M.S., Bergeron C. and Weyer L. (1994) Characterization of a shared epitope in cortical Lewy body fibrils and Alzheimer paired helical filaments. *Acta Neuropathol.* 88: 1-6

Puck T.T., Cieciura S.J. and Robinson A. (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* **108**: 945

Robinson L.J., Razzack Z.F., Lawrence J.C. Jr. and James D.E. (1993) Mitogen-activated protein kinase activation is not sufficient for stimulation of glucose transport or glycogen synthase in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **268:** 26422-26427

Robinson K.A., Sens D.A. and Buse M.G. (1993) Pre-exposure to glucosamine induces insulin resistance of glucose transport and glycogen synthesis in isolated rat skeletal muscles. Study of mechanisms in muscle and in rat-1 fibroblasts overexpressing the human insulin receptor. *Diabetes* **42:** 1333-1346

Roder H.M. and Ingram V.M. (1991) Two novel kinases phosphorylate tau and the KSP site of heavy neurofilament subunits in high stoichiometric ratios. *J. Neurosci.* **11:** 3325-3343

Roquemore E.P., Chevrier M.R., Cotter R.J. and Hart G.W. (1996) Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Biochemistry* 35: 3578-3586

Rosen D.R., Siddique T., Patterson D., Figlewicz D.A., Sapp P. et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 362 : 59-62

Rossetti I., Hawkins M., Chen W., Gindi J. and Barzilai N. (1995) In vivo glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycemic but not hyperglycemic conscious rats. *J. Clin. Invest.* 96: 132-140

Runge M.S., Laue T.M., Yphantis S.A., Lifsics M.R., Saito A. et al. (1981) ATP-induced formation of an associated complex between microtubules and neurofilaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1431-1435

Sakaguchi T. Okada M., Kitamura T. and Kawasaki K. (1993) Reduced diameter and conduction velocity in myelinated fibers in the sciatic nerve of a neurofilament-deficient quail. *Neurosci. Lett.* 153: 65-68

Scherer W.F., Syverton J.T. and Gey G.O. (1953) Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* 97: 695-709

Schlaepfer W.W. and Bruce J. (1990) Simultaneous up-regulation of neurofilament proteins during the postnatal development of the rat nervous system. *J. Neurosci.* 25: 39-49

Schmidt A., Heid H.W., Schafer S., Nuber U.A., Zimbelmann R. and Franke W.W. (1994) Desmosomes and cytoskeletal architecture in epithelial differentiation: cell type-specific plaque components and intermediate filament anchorage. *Eur. J. Cell Biol.* 65: 229-245

Seifert G.J., Lawson D. and Wiche G. (1992) Immunolocalization of the intermediate filament-associated protein plectin at focal contacts and actin stress fibers. *Eur. J. Cell Biol.* 59: 138-147

Sekimata M., Tsujimura K., Tanaka J., Takeuchi Y., Inagaki N. and Inagaki M. (1996) Detection of protein kinase activity specifically activated at metaphase-anaphase transition. *J. Cell Biol.* 132: 635-641

Shafi R., Iyer S.P., Ellies L.G., O'Donnell N., Marek K.W. et al. (2000) The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5735-5739

Shaw G. (1991) Neurofilament proteins. In *The Neuronal Cytoskeleton*, ed. R.Burgoyne, pp. 185-214. New York: Wiley-Liss

Shaw G., Morse S., Ararat M., Kalra S. and Graham F.L. (2001) The mysterious origin of the HEK 293 cell line; an unexpected relationship to neuronal stem cells. *Society of Neuroscience Meeting 2001*, Poster abstract

Shaw P., Freeman J., Bovey R. and Iggo R. (1996) Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* 12: 921-930

Shuman S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 269: 32678-32684.

Sihag R.K. and Nixon R.A. (1989) *In vivo* phosphorylation of distinct domains of the 70-kilodalton neurofilament subunit involved different protein kinases. *J. Biol. Chem.* **264:** 457-464

Sihag R.K. and Nixon R.A. (1990) Phosphorylation of the amino-terminal head domain of the middle molecular mass 145-kDa subunit of neurofilaments. Evidence for regulation by second messenger-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 265: 4166-4171

Sihag R.K. and Nixon R.A. (1991) Identification of Ser-55 as a major protein kinase A phosphorylation site on the 70 k-Da subunit of neurofilaments. Early turnover during axonal transport. *J. Biol. Chem.* 266: 18861-18867

Snow C.M., Senior A. and Gerace L. (1987) Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycosproteins. *J. Cell Biol.* 104: 1143-1156

Sternberger L.A. and Sternberger N.H. (1983) Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6126-6130

Stoppini L., Buchs P.A. and Muller D. (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* 37: 173-182

Svitkina T.M., Verkhovsky A.B. and Borisy G.G. (1996) Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 135: 991-1007

Terada M., Yasuda H. and Kikkawa R. (1998) Delayed Wallerian degeneration and increased neurofilament phosphorylation in sciatic nerves of rats with streptozocin-induced diabetes. *J. Neurol. Sci.* 155: 23-30

Thomas P.K., Tomlinson D.R., Dyck P.J., Thomas P.K., Griffin J.W. et al. (1992) Peripheral neuropathy. 3rd ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1219-1250

Thompson M.A. and Ziff E.B. (1989) Structure of the gene encoding peripherin, an NGF-regulated neuronal-specific type III intermediate filament protein. *Neuron* **2:** 1043-1053

Todaro G.J., Habel K. and Green H. (1965) Antigenic and cultural properties off cells doubly transformed by polyoma virus and SV40. *Virology* 27: 179-185

Tomkins J., Usher P., Slade J.Y., Ince P.G., Curtis A., Bushby K. and Shaw P.J. (1998) Novel insertion in the KSP region of the neurofilament heavy gene in amytrophic lateral sclerosis (ALS). *Neuroreport* 9: 3967-3970

Topp WC (1981) Normal rat cell lines deficient in nuclear thymidine kinase. *Virology* **113:** 408-411

Torres C. and Hart G.W. (1984) Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **259:** 3308-3317

Trojanowski J.Q., Kleppner S.R., Hartley R.S., Miyazono M., Fraser N.W., Kesari S. and Lee V.M. (1997) Transfectable and transplantable postmitotic human neurons: a potential "platform" for gene therapy of nervous system diseases. *Exp. Neurol.* 114: 92-97

Troy C.M., Brown K., Greene L.A. and Shelanski M.L. (1990) Ontogeny of the neuronal intermediate filament protein, peripherin, in the mouse embryo. *Neuroscience* **36**: 217-237

Tsujimura K., Ogawara M., Takeuchi Y. Imajoh-Ohmi S., Ha M.-H. and Inagaki M. (1994) Visualization and function of vimentin phosphorylation by cdc2 kinase during mitosis. *J. Cell. Biol.* 269: 31097-31106

Turner J.R., Tartakoff A.M. and Greenspan N.S. (1990) Cytologic assessment of nuclear and cytoplasmic O-linked *N*-acetylglucosamine distribution by using anti-strptococcal monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5608-5612

Veeranna, Shetty K.T., Link W.T., Jaffe H., Wang J. and Pant H.C. (1995) Neuronal cyclin-dependent kinase-5 phosphorylation sites in neurofilament protein (NF-H) are dephosphorylated by protein phosphatase 2A. J. Neurochem. 64: 2681-2690

Veeranna, Amin N.D., Ahn N.G., Jaffe H., Winters C.A., Grant P. and Pant H.C. (1998) Mitogen-activated protein kinase (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M. *J. Neurosci.* 18: 4008-4021

Vikstrom K.L., Lim S.-S., Goldman R. and Borisy G. (1992) Steady state dynamics of intermediate filament networks. J. Cell Biol. 118: 121-129

Watson D.F., Griffin J.W., Fittro K.P. and Hoffman P.N. (1989) Phosphorylationdependent immunoreactivity of neurofilaments increases during axonal maturation and beta,beta'-iminodipropionitrile intoxication. J. Neurochem. 53: 1818-1829

Wells L., Vosseller K. and Hart G.W. (2001) Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 291: 2376-2378

Wells L, Gao Y, Mahoney JA, Vosseller K, Chen C, Rosen A and Hart GW. (2002) Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, *O*-GlcNAcase. *J. Biol. Chem.* 277: 1755-1761

Wible B.A., Smith K.E. and Angelides K.J. (1989) Resolution and purification of a neurofilament-specific kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 720-724

Willard M. and Simon C. (1981) Antibody decoration of neurofilaments. J. Cell Biol. 89: 198-205

Wong P.C. and Cleveland D.W. (1990) Characterization of dominant and recessive assembly-defective mutations in mouse neurofilament NF-M. J. Cell Biol. 111: 1987-2003

Xu Z.S., Liu W.S. and Willard M.B. (1992) Identification of six phosphorylation sites in the COOH-terminal tail region of the rat neurofilament protein M. J. Biol. Chem. 267: 4467-4471

Yagihashi S. (1997) Nerve structural defects in diabetic neuropathy: do animals exhibit similar changes? *Neurosci. Res. Commun.* 21: 25-32

Yamasaki H., Bennett G.S., Itakura C. and Mizutani M. (1992) Defective expression of neurofilament protein subunits in hereditary hypotrophic axonopathy of quail. *Lab. Invest.* 66: 734-743

Yang Y., Dowing J., Yu Q.C., Kouklis P., Cleveland D.W. and Fuchs E. (1996) An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell* 86: 655-665

Yao P.J. and Coleman P.D. (1998) Reduction of O-linked N-acetylglucosamine-modified assembly protein-3 in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **18:** 2399-2411

Yki-Jarvinen H., Virkamaki A., Daniels M.C., McClain D. and Gottschalk W.K. (1993) Insulin and glucosamine infusions increase O-linked N-acetyl- glucosamine in skeletal muscle proteins in vivo. *Metabolism* 47: 449-455

Zachara N.E. and Hart G.W. (2002) The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation. *Chem. Rev.* 102: 431-438

Zimmerman L., Parr B., Lendahl U., Cunningham M., McKay R. et al. (1994) Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12: 11-24

9 Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Roland Brandt bedanken. Nicht alleine, weil er mir die Bearbeitungen dieses interessanten Themas überlassen hat, sondern vor allem weil er immer Zeit hatte, um Daten und Problemstellungen durchzusprechen. Schließlich hatte mich seine offene, faire und humorvolle Betreuung dazu veranlasst "auch noch" meine Doktorarbeit in seinem Labor in Heidelberg anzufertigen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Uwe Ernsberger, der sich kurzfristig ohne Zögern bereit erklärte, das Zweitgutachten zu übernehmen, und bei Prof. Dr. Wink und Dr. Anne Régnier-Vigouroux für die Teilnahme an meiner mündlichen Prüfung.

Bei Andrea Hellwig, Dr. Albi Clement, Dr. Volkmar Hans und Dr. Paul Fernyhough möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Erst durch ihre Arbeit konnte ich meine Ergebnisse vervollständigen.

Des Weiteren gilt mein Dank den jetztigen und ehemaligen Mitgliedern der Gruppe Brandt in Heidelberg und Osnabrück für ihre stetige Diskussion- und Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre, die so manchen Fehlschlag erträglich machte. Auch alle anderen im Institut für Neurobiologie in Heidelberg haben durch ihre offenen Ohren für wissenschaftlich und nicht-wissenschaftliche Gespräche dazu beigetragen, dass ich mich "wie zu Hause" gefühlt habe.

Ein besonderes Dankeschön geht dabei an Julia, Zsofia und vor allem an Judith für die kritische Durchsicht meiner Doktorarbeit.