

INAUGURAL-DISSERTATION

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

Vorgelegt von
Diplom-Biologin Nina Lüdemann
aus Eckernförde

Tag der mündlichen Prüfung: _____

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

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

Inhalt

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

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

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

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

