

**Reduzierte Sialylierung von Fetuin-A sowie Konzentrationen von Fetuin-A
in Serum und Liquor cerebrospinalis sind assoziiert mit
neuroinflammatorischen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Frederik Ricken

aus

Goch

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Wilhelm Jahnen-Dechent
Universitätsprofessor Dr. med. Martin Georg Häusler

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2023

***Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online
verfügbar.***

Teile der Dissertation wurden in der Publikation (**Ricken F**, Can AD, Gräber S, Häusler M, Jahnen-Dechent W.: Post-translational modifications glycosylation and phosphorylation of the major hepatic plasma protein fetuin-A are associated with CNS inflammation in children. PLoS One. 2022 Oct 7;17(10):e0268592. doi: 10.1371/journal.pone.0268592. PMID: 36206263; PMCID: PMC9544022) veröffentlicht.

Inhalt

Inhalt	iii
Abkürzungsverzeichnis	vi
1 Einleitung	1
1.1 α 2-Heremans-Schmid-Glykoprotein (Fetuin-A, AHSG).....	1
1.1.1 Synthese und Struktur von Fetuin-A.....	1
1.1.2 Funktionen von Fetuin-A	4
1.1.3 Fetuin-B.....	6
1.2 Glykosylierung und Glykoproteine	7
1.2.1 N-Glykosylierung	7
1.2.2 O-Glykosylierung.....	8
1.2.3 Funktionen von Glykanen und Rolle in Krankheiten.....	8
1.2.4 Sialinsäuren	9
1.3 Proteine im CSF und Nutzen als Biomarker	10
1.3.1 Blut-Liquor-Schrankenstörung, intrathekale Immunglobulin- Synthese und Reiber-Schema	10
1.3.2 Biomarker für entzündliche neurologische Erkrankungen	12
2 Zielsetzung	13
3 Material und Methoden	14
3.1 Serum und CSF-Proben	14
3.2 Untersuchungen zur Glykosylierung von Fetuin-A.....	18
3.2.1 Verdau von Serum- und CSF-Proben mit Glykosidasen	18
3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	21
3.2.3 Western Blot und Immunodetektion	22
3.2.4 Statistische Auswertung der Glykosylierungsuntersuchungen	25
3.3 Konzentrationsmessung von Fetuin-A	26
3.3.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	26
3.3.2 Nephelometrie	28

3.3.3	Statistische Auswertung der Konzentrationsmessungen.....	29
4	Ergebnisse.....	30
4.1	Etablierung einer Methode zur Untersuchung der Glykosylierung von Fetuin-A.....	30
4.1.1	Glykosidasen-Verdau ist im 10 %-Polyacrylamid-Gel sichtbar.....	30
4.1.2	Sialidase-Au ist für den Verdau von O-Glykanen mit O-Glykosidase, β -Galaktosidase und Glukosaminidase notwendig	31
4.1.3	Alleiniger Verdau mit Sialidase-Au erhöht im Vergleich zum Verdau mit O-Glykosidase, β -Galaktosidase, Glukosaminidase und Sialidase-Au die Bandenschärfe.....	33
4.1.4	Proteolytische Aktivität ist kein Störfaktor für Methodik	34
4.1.5	Phosphorylierung ist kein Störfaktor für Methodik	35
4.1.6	Albumin wird nicht als stabilisierender Faktor für Verdau im CSF benötigt.....	38
4.1.7	Verdau von fluoreszierendem bovinen Fetuin-A in Serum und CSF zeigt keine Unterschiede zum humanen Fetuin-A	39
4.2	Glykosylierung von Fetuin-A.....	41
4.2.1	Asialofetuin-A tritt bei inflammatorischen neurologischen Erkrankungen vermehrt auf	41
4.2.2	Fetuin-A besitzt zwei N-Glykosylierungsstellen.....	43
4.3	Fetuin-A-Konzentrationen in Serum und CSF.....	45
4.3.1	Vergleich Nephelometrie und ELISA	45
4.3.2	Fetuin-A-Konzentration im Serum ist bei inflammatorischer neurologischer Erkrankung und erhöhter CRP-Konzentration erniedrigt ...	47
4.3.3	Fetuin-A-Konzentration im CSF ist bei Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung erhöht und bei erhöhter CRP-Konzentration erniedrigt	49
4.4	Untersuchung der Fetuin-A / Gesamtprotein-Quotienten in Serum und CSF und des Fetuin-A im CSF/Fetuin-A im Serum-Quotienten.....	51

4.4.1 Fetuin-A im Serum/Serum-Gesamtprotein-Quotient (FetA i.S./Prot. i.S.) ist bei Vorliegen intrathekalen IgG-Synthese und bei Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung erniedrigt	51
4.4.2 Fetuin-A im CSF/CSF-Gesamtprotein-Quotient (FetA i.CSF/Prot. i.CSF) steigt mit zunehmendem Alter	52
4.4.3 Fetuin-A im CSF/Fetuin-A im Serum-Quotient (Q_{Fet}) steigt mit dem Alter, dem Albumin-Quotienten (Q_{Alb}) und bei Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung an und sinkt bei erhöhter CRP-Konzentration ab.....	54
5 Diskussion	57
5.1 Differentielle Glykosylierung von Fetuin-A bei Inflammation	57
5.2 Fetuin-A-Konzentrationen in Serum und CSF bei neurologischen inflammatorischen Erkrankungen und Herkunft von Fetuin-A im ZNS	59
5.3 Ausblick	66
6 Zusammenfassung	67
7 Literatur.....	69
8 Anhang	77
8.1 Abbildungsverzeichnis	77
8.2 Tabellenverzeichnis	79
8.3 Weitere Abbildungen und Tabellen	80
8.4 Geräte und Gebrauchsmaterialien.....	84
Publikationen	viii
Danksagung.....	ix
Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung	x
Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung.....	xi
Lebenslauf	xii

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
AHSG	α 2-Heremans-Schmid-Glykoprotein, humanes Fetuin-A
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i> , Knochenmorphogenetisches Protein
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium ²⁺ -Ionen
CPM	<i>calciprotein monomer</i> , Calcium-Protein-Monomer
CPP	<i>calciprotein particle</i> , Calcium-Protein-Partikel
CRP	C-reaktives Protein
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i> , Hirnflüssigkeit, Liquor cerebrospinalis
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dol	Dolichol
DTT	Dithiothreitol
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FGF-23	<i>fibroblast growth factor 23</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23
Fuc	Fucose
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	kiloDalton
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
Man	Mannose
MS	Multiple Sklerose

Abkürzungsverzeichnis

N	Asparagin
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
P _i	Phosphat
PP	Pyrophosphat
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PNGase-F	<i>Peptide-N4-(acetyl-β-glucosaminyI)-asparagine-amidase N-glycosidase F</i>
Q _{Alb}	Quotient zwischen Albumin im Liquor cerebrospinalis und Albumin im Serum
Q _{Fet}	Quotient zwischen Fetuin-A im Liquor cerebrospinalis und Fetuin-A im Serum
Q _{Ig}	Quotient zwischen Immunglobulin im Liquor cerebrospinalis und Immunglobulin im Serum
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
S	Serin
Ser	Serum
Sia	Sialinsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF-β	<i>transforming growth factor-β</i>
T	Threonin
TLR-4	<i>toll-like receptor-4</i>
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 α 2-Heremans-Schmid-Glykoprotein (Fetuin-A, AHSG)

1.1.1 Synthese und Struktur von Fetuin-A

Fetuin-A ist ein ca. 60 kDa großes Glykoprotein, das v.a. im Blutplasma vorkommt und 1944 von Pedersen in fetalem Rinderserum erstbeschrieben wurde (Pedersen 1944). Das homologe humane Fetuin-A wurde von Heremans, Schmid und Bürgi beschrieben und wird als α 2-Heremans-Schmid-Glykoprotein (AHSG) bezeichnet (Heremans, 1960; Schmid und Bürgi, 1961).

Fetuin-A liegt bei Frühgeborenen in der höchsten Serum-Konzentration vor. Danach kommt es im Verlauf des Lebens zu einem Absinken der Fetuin-A-Konzentration im Serum auf ca. 0,3-0,6 mg/ml (Häusler et al. 2009).

Die Synthese von Fetuin-A erfolgt adult in Hepatozyten, in der Embryonalentwicklung auch in Knochen, Nieren, Atemwegen und Gehirn (Elsas et al. 2013). Erhöhte proinflammatorische Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), *Interleukin-1 β* (IL-1 β) und *Interleukin-6* (IL-6) inhibieren die hepatische Synthese von Fetuin-A. Hohe Blutzucker-Konzentrationen sowie hohe Glucocorticoid-Spiegel aktivieren hingegen die Fetuin-A-Synthese (Mori et al. 2011).

Fetuin-A gehört, wie das verwandte Fetuin-B (Olivier et al. 2000), zur Cystatin-Superfamilie und zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu weiteren Mitgliedern. Es besitzt die Cystatin-ähnlichen N-terminalen Domänen CY1 und CY2. Die C-terminale Region CTR zeigt hingegen keine strukturelle Ähnlichkeit (Elzanowski et al. 1988). Die Domäne CY1 enthält Bindungsstellen für Calcium-Ionen (Ca²⁺), *transforming growth factor- β* (TGF- β) und *bone morphogenetic protein* (BMP). Sie erzeugt eine hohe Affinität von Fetuin-A an Apatit (Brown et al. 1992). Abbildung 1.1 zeigt die Domänenstruktur von Fetuin-A.

Aus einem einkettigen Vorläuferprotein entsteht durch proteolytische Spaltung eine zweikettige Form aus schwerer Kette (N-terminal, 312 Aminosäuren) und leichter Kette (C-terminal, 27 Aminosäuren), die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Weiterhin kann ein *connecting peptide* aus 40 Aminosäuren proteolytisch abgespalten werden. Dadurch entstehen eine A-Kette (N-terminal,

282 Aminosäuren), B-Kette (entspricht der leichten Kette, C-terminal, 27 Aminosäuren) und das *connecting peptide* (Nawratil et al., 1996).

1994 konnten Jahnen-Dechent et al. in Zellkultur (hepatoma cell line, HepG2) drei Phosphorylierungsstellen an den Serin (S)-Resten S56, S120 und S312 nachweisen (Jahnen-Dechent et al. 1994). Haglund wies 2001 in aus humanem Plasma gewonnenem Fetuin-A zwei Phosphorylierungsstellen an S120 und S312 nach (Haglund et al. 2001). Zusätzlich ist eine FAM20C-Phosphorylierungsstelle an Threonin (T) bekannt (Tagliabracci et al. 2015).

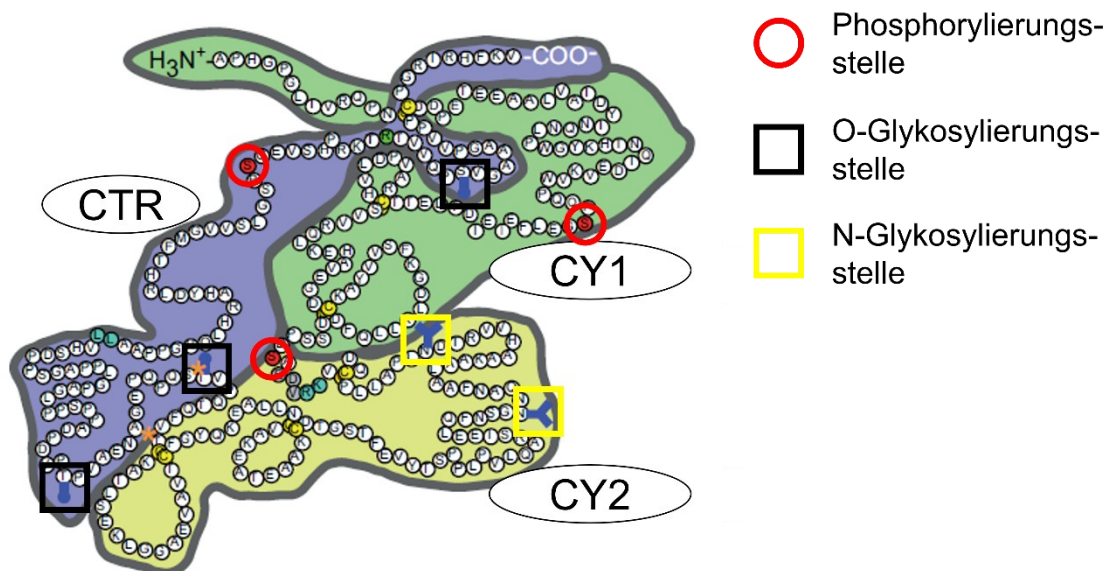


Abbildung 1.1 Struktur von Fetuin-A.

Die Cystatin-ähnlichen Domänen CY1 (grün unterlegt) und CY2 (gelb unterlegt) sowie die nicht-Cystatin ähnliche Domäne CTR (blau unterlegt) von Fetuin-A sind dargestellt. An den markierten Aminosäuren können posttranslationale Modifikationen stattfinden. Die roten Kreise markieren Phosphorylierungsstellen, die schwarzen Quadrate zeigen O-Glykosylierungsstellen, die gelben Quadrate zeigen N-Glykosylierungsstellen. Verändert nach Jahnen-Dechent et al., 2011.

Fetuin-A besitzt mehrere Glykosylierungsstellen, die terminal Sialinsäuren (Sia) enthalten. Sequenzvorhersagen und experimentelle Arbeiten gemäß dem Uniprot-Eintrag P02765 listen insgesamt zwei N-gebundene und sechs O-gebundene Glykosylierungsstellen auf (UniProt Consortium 2021).

O-Glykane sind an T270, S280, S293, T339, T341 und S346 beschrieben. Diese Glykane bestehen aus N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) und Galaktose (Gal) und tragen terminale Sialinsäuren (Abb. 1.2 A) (UniProt Consortium 2021; Watzlawick et al. 1992; Yoshioka et al. 1986).

Es sind zwei N-Glykosylierungsstellen bekannt, die an Asparagin (N) gebunden sind (N156, N176). Die dort gebundenen Glykane enthalten N-Acetylglukosamin (GlcNAc), Mannose (Man), verschiedene Hexosen sowie terminale Sialinsäuren (Abb. 1.2 B) (UniProt Consortium 2021). Von besonderer funktioneller Bedeutung sind die terminalen Sialinsäuren. Sie sind aufgrund ihrer negativen Ladung wichtig für die Bindung von Calcium (Wang et al. 1998) und schützen vor Abbau des Proteins. Eine Desialylierung führt zum Abbau durch den Asialofetuin-Rezeptor (Tolleshaug 1984).

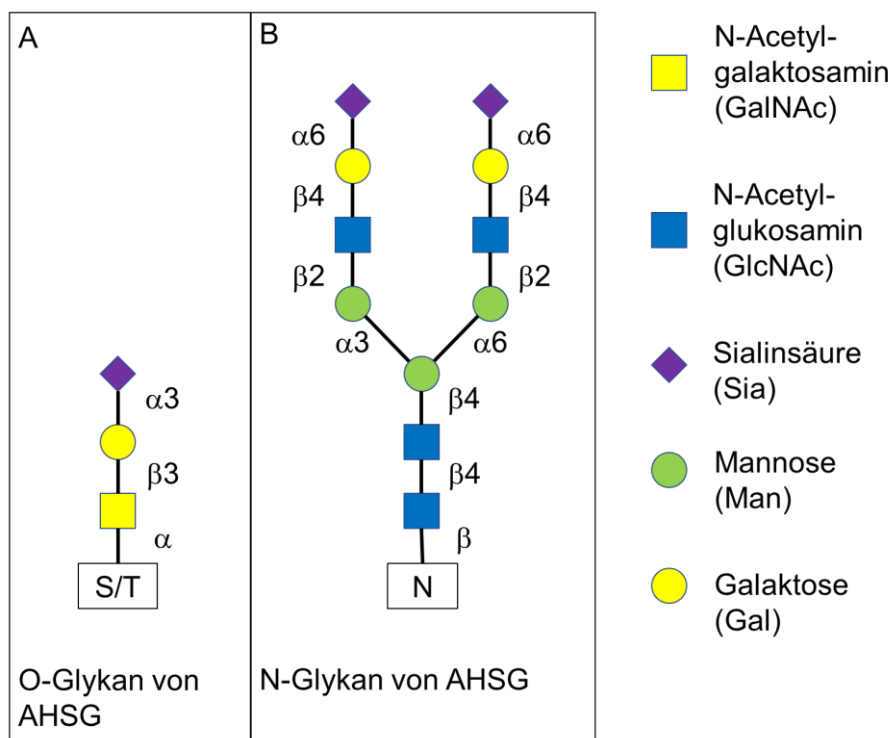


Abbildung 1.2 O- und N-Glykanstrukturen von Fetuin-A.

Abgebildet sind O- und N-Glykan-Strukturen von humanem Fetuin-A. **A** stellt dabei die Struktur des O-Glykans dar, bestehend aus GalNAc, Gal und terminaler Sia (Gejyo et al. 1983). In **B** ist ein biantennäres N-Glykan dargestellt, bestehend aus GlcNAc, Man, Gal und Sia. Die terminale Sia ist typischerweise N-Acetylneuraminsäure. Verändert nach Watzlawick et al., 1992.

1.1.2 Funktionen von Fetuin-A

1.1.2.1 Regulatorische Funktion von Fetuin-A in Knochen- und Calcium-Metabolismus

Fetuin-A reguliert Zell-Differenzierung und -Proliferation. Durch Bindung an TGF- β und BMP wirkt es regulierend auf den Knochenstoffwechsel (Demetriou et al. 1996). Es ist ein Inhibitor der Bildung von Apatit (Schinke et al. 1996) und schützt vor ektope Kalzifizierung. Fetuin-A-Knockout-Mäuse zeigen ektope Verkalkungen (Schafer et al. 2003). Ektope Verkalkungen zeigen sich v.a. beim Fehlen weiterer Inhibitoren dystropher Kalzifizierung wie Pyrophosphat (PP) oder Magnesium (Babler et al. 2020). Fetuin-A verhindert dystrophe Kalzifizierung durch die Bildung von *calciprotein particles* (CPPs), indem es sonst unlösbares Calcium und Phosphat bindet (Jahnen-Dechent et al. 2011; Rudloff et al. 2022; Rudloff et al. 2021). Es bilden sich zunächst *calciprotein monomers* (CPMs) durch Bindung von Calcium-Phosphat an die Domäne CY1. Aus diesen CPMs bilden sich im Verlauf größere primäre und sekundäre CPPs. Die Bildung von CPPs und deren *Clearance* verhindern so pathologische Kalzifizierung (Jahnen-Dechent et al. 2020). Zudem wurden regulatorische Effekte durch CPPs beschrieben. Sie beeinflussen die Produktion von *fibroblast growth factor-23* (FGF-23). Dadurch kommt es zur verminderten Phosphat-Wiederaufnahme und Hemmung der Aktivierung von 1,25 (OH)₂-Vitamin-D in der Niere. Allerdings zeigten sich auch bei Fetuin-A-Knockout-Mäusen erhöhte FGF-23-Konzentrationen (Jahnen-Dechent und Smith, 2020). Die Messung der Bildung von CPPs (Umwandlung von primären zu sekundären CPPs) kann zur Untersuchung der Phosphat-Toxizität und damit zur Untersuchung möglicher Verkalkungen bei chronischer Niereninsuffizienz verwendet werden (T50-Test) (Bavendiek et al. 2020). In Fetuin-A-Knockout-Mäusen zeigten sowohl genomische als auch morphologische Untersuchungen, dass die entstehende Kalzifizierung eher mit Thrombosierung, Fibrosierung und Inflammation korreliert als mit der Differenzierung zu osteogenen Zellen (Herrmann et al. 2020). Bei der seltenen 2,8-Dihydroxyadenin-Nephropathie zeigte sich kein Effekt auf die Ausprägung der Nierenschädigung bei Fetuin-A-Knockout-Mäusen. Fetuin-A spielt demnach bei der Bildung von Calcium-Phosphat-Kristallen eine Rolle, nicht aber bei 2,8-Dihydroxyadenin-Kristallen (Klinkhammer et al. 2020).

1.1.2.2 Fetuin-A beeinflusst Insulin-Stoffwechsel und Metabolismus

Ein Einfluss von Fetuin-A auf Insulin-Stoffwechsel und metabolische Erkrankungen wird diskutiert. Es wurde berichtet, dass phosphoryliertes Fetuin-A über Bindung an den Insulin-Rezeptor das Insulin-*signaling* hemmt (Auberger et al. 1989; Srinivas et al. 1993). Dies konnte in weiteren Studien nicht überzeugend bestätigt werden. Zwar wurde beschrieben, dass Fetuin-A Adipozyten-Dysfunktion induziert (Hennige et al. 2008) und erhöhte Fetuin-A-Konzentrationen im Serum mit metabolischem Syndrom, Diabetes mellitus Typ 2 und kindlicher Adipositas korrelieren (Ozyazgan et al. 2013; Pan et al. 2020; Reinehr and Roth 2008). Eine unabhängige Korrelation zwischen Fetuin-A-Serum-Konzentration und Insulin-Sensitivität (Reif et al. 2020) sowie ein Zusammenhang zwischen Fetuin-A und Diabetes-Risiko in einer Mendelschen Randomisierung konnten jedoch nicht festgestellt werden (Kröger et al. 2018). Von einem gesicherten kausalen Zusammenhang zwischen Fetuin-A und Insulin-Stoffwechsel kann aktuell nicht gesprochen werden.

1.1.2.3 Fetuin-A in der Entzündung

Für Fetuin-A sind sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Funktionen beschrieben. Bereits 1979 beschrieb Lebreton Fetuin-A als negatives Akut-Phase Protein (Lebreton et al. 1979). Eine erniedrigte Fetuin-A-Konzentration wurde bei durch Infektion bedingter Sepsis beschrieben (Wang und Sama, 2012). Erniedrigte Fetuin-A-Konzentrationen im Serum zeigten sich zudem bei schweren Covid-19-Verläufen sowie bei Vaskulitiden (Karadeniz et al. 2022; Kukla et al. 2021). Im Maus-Modell der Sepsis wirkt Fetuin-A protektiv (Li et al. 2011). Fetuin-A bindet über seine terminalen, negativ-geladenen Sialinsäuren an Spermin. Spermin inhibiert nur nach Bindung von Fetuin-A die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine aus Makrophagen und Monozyten (Dziegielewska et al. 1998; Wang et al. 1998). Fetuin-A korreliert invers mit pro-inflammatorischen Zytokinen (Sindhu et al. 2016).

Andererseits kommt es bei Trauma-getriggelter Inflammation zu einem Anstieg der Fetuin-A-Konzentration im Serum (Wang und Sama, 2012). Jersmann zeigte 2003, dass Fetuin-A *in vitro* die Phagozytose von Makrophagen verstärkt (Jersmann et al. 2003). Bei Multipler Sklerose (MS) beschrieb Harris einen Anstieg der Fetuin-A-Konzentration im *Liquor cerebrospinalis* (*cerebrospinal*

fluid, CSF) bei vermehrter Krankheitsaktivität (Harris et al. 2013). Im Mausmodell der MS zeigte sich eine Verstärkung der Krankheitsaktivität durch Fetuin-A, während eine Fetuin-A-Defizienz protektiv wirkte. Fetuin-A wird als Biomarker für MS bei Erwachsenen diskutiert (Harris et al. 2017).

Vermindert sialyliertes Fetuin-A wurde bei rheumatoider Arthritis (Saroha et al. 2012) und intrauteriner Wachstumsretardierung (Karamessinis et al. 2008) gezeigt. Bei Allergien wurde hingegen beschrieben, dass sialyliertes Fetuin-A synergistisch mit Lipopolysaccharid (LPS) auf den *TLR-4* wirkt und die TH2-Zellantwort verstärkt. Patienten mit stark sialyliertem Fetuin-A sprachen besser auf eine Hyposensibilisierung an (Caillot et al. 2017).

Es finden sich erhöhte Fetuin-A-Konzentrationen im fetalen CSF im Vergleich zum adulten CSF (Dziegielewska et al. 1993). Immunhistochemisch lässt sich Fetuin-A in adultem sowie neonatalem Gehirn histochemisch nachweisen. Es wird eine Rolle im neonatalen *tissue remodeling* diskutiert (Elsas et al. 2013). Bei ischämischen Hirninfarkten ist einerseits eine positive Korrelation zwischen Fetuin-A-Konzentration und Schlaganfall-Risiko beschrieben (Weikert et al. 2008), andererseits konnte Fetuin-A im Mausmodell das Ausmaß der Schädigungen verringern (Wang et al. 2010). Es zeigte sich eine erhöhte Fetuin-A-Immunreaktivität nach ischämischen Schädigungen, was auf eine Rolle in Reparaturmechanismen hindeutet (Heinen et al. 2018). Bei kognitiven Einschränkungen im Alter und Patienten mit Alzheimer-Erkrankung zeigten sich in Korrelationsuntersuchungen erniedrigte Fetuin-A-Konzentrationen in CSF und Serum (Laughlin et al. 2014; Puchades et al. 2003).

1.1.3 Fetuin-B

Fetuin-B gehört wie Fetuin-A zur Cystatin-Superfamilie und ist durch Inhibition der Metalloproteinase Ovastacin und damit der Verhinderung einer vorzeitigen *Zona pellucida*-Härtung essenziell für die Fertilität von Frauen. Über die Hemmung weiterer Metalloproteinasen (Meprin α und β) reguliert Fetuin-B Angiogenese, Immunreaktion und *Zell-signaling*. (Karmilin et al. 2019). Der Mechanismus der Inhibition der Metalloproteinasen wurde 2019 als *raised-elephant-trunk*-Mechanismus beschrieben (Cuppari et al. 2019; Guevara et al. 2019).

1.2 Glykosylierung und Glykoproteine

Glykoproteine bestehen aus einem Protein- und einem Kohlenhydratanteil. Sie entstehen durch Glykosylierung des translatierten Proteins. Glykosylierung ist eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen (Olden et al. 1982). Glykoproteine werden meist sezerniert oder sind an der Zelloberfläche lokalisiert, während zytosolische Proteine selten glykosyliert sind (Stanley 2011). Die entstehenden komplexen und variablen Glykosylierungsmuster sind spezies-, gewebe- und zellspezifisch (Brockhausen et al. 1998).

1.2.1 N-Glykosylierung

N-Glykosylierung ist die häufigste Form der Glykosylierung mit der Übertragung eines Vorläufer-Oligosaccharids auf N. Dabei ist die Erkennungssequenz zur Bindung S/T-x-N ($x \neq$ Prolin) (Aebi 2013). Die Synthese findet am und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie im Golgi-Apparat statt (Stanley et al. 2015).

Dolichol-Phosphat (Dol-P) dient als Membrananker an der ER-Membran. Zunächst entsteht zytosolisch an der ER-Membran Dol-PP-(GlcNAc)₂(Man)₅, welches durch Flippasen nach luminal transloziert wird. Dort entsteht Dol-PP-(GlcNAc)₂(Man)₉(Glc)₃, das durch die Oligosaccharyltransferase β -glykosidisch an N gebunden wird. (Aebi 2013). Nach Bindung an N werden die gebundenen Glc-Monosaccharide abgespalten (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Das entstandene Glykoprotein wird für weitere Modifikationen in den Golgi-Apparat transportiert. Die Regulation dort erfolgt über die im Golgi-Apparat vorhandenen Glykosyltransferasen, vorhandene Substrate und Produkte der Glykoprotein-Synthese, pH-Wert und Umgebung des Golgi-Apparats sowie Struktur und Organisation der Golgi-Membran (Brockhausen et al. 1998; Stanley 2011). Eine graphische Darstellung der N-Glykosylierung findet sich im Anhang (Abb. 8.1). Alle N-Glykane haben eine *core*-Struktur, die aus N-(GlcNAc)₂(Man)₃ besteht. Es werden drei Typen von N-Glykanen mit unterschiedlicher Variabilität unterschieden (Oligomannose-, Hybrid- und komplexer Typ) (Kobata 1992; Paulson 1989).

1.2.2 O-Glykosylierung

Bei der O-Glykosylierung werden an aktivierte Nukleotide gebundene Monosaccharide direkt, initial im ER, dann im Golgi-Apparat, durch spezifische Glykosyltransferasen an das Protein gebunden. Typisch ist die α -glykosidische Bindung von GalNAc an S oder T (Stanley 2011). Es sind mehrere *core*-Strukturen bekannt (Brockhausen und Stanley, 2015). O-Glykane bestehen aus weniger Monosacchariden als N-Glykane und haben ein geringeres Molekulargewicht. Die Variabilität ist aufgrund der Bindung zahlreicher verschiedener Monosaccharide und unterschiedlicher *core*-Strukturen sehr hoch (Spiro 1970).

1.2.3 Funktionen von Glykanen und Rolle in Krankheiten

Vor allem extrazelluläre Proteine und Membranproteine sind glykosyliert. Sie sind für die Zell-Zell- und Zell-Protein-Interaktion essenziell. Sie verstärken die Zellmembran nach außen und schützen Proteine vor Abbau, können aber auch Signal für den Abbau sein. Glykane sind an der Faltungskontrolle von Proteinen (Lis und Sharon, 1993) und an der Regulation von Zellwachstum, -differenzierung und -tod beteiligt (Brockhausen et al. 1998).

Immunologisch sind Glykane von großer Bedeutung, da Saccharide Schutz vor Pathogenen bieten und inflammatorische Signalwege beeinflussen (Baudoin und Issad, 2014). Glykane auf Endothelzellen dienen der Navigation von Immunzellen, was als *leucocyte trafficking* bezeichnet wird (Wright und Cooper, 2014).

Störungen der Synthese und Funktion von Glykoproteinen haben pathophysiologische Bedeutung und sind Forschungsziel zur Anwendung in Diagnostik und Therapie (Rek et al. 2009). So führen Veränderungen der Glykan-Struktur zu verbessertem Überleben von Tumorzellen (Brockhausen et al. 1998).

1.2.4 Sialinsäuren

Sialinsäuren sind eine Gruppe von Monosacchariden, die v.a. terminal an Glykanen vorkommen. Sialinsäuren werden selbst weiter posttranslational modifiziert. Diese Modifikationen und unterschiedliche α -glykosidische Bindungen erzeugen eine hohe Variabilität (Varki et al. 2015).

Sialinsäuren werden aus Mannose-6-Phosphat oder N-Acetylmannose-6-Phosphat und Phosphoenolpyruvat synthetisiert. Es kommt durch spezifische Sialyltransferasen zur Bindung an Gal oder GalNAc. Die Bindung der Sialinsäure verhindert meist das Anhängen weiterer Monosaccharide (Brockhausen et al. 1998). Sialinsäuren können durch Sialidasen (auch Neuraminidasen) abgespalten werden. Diese befinden sich auf der Zelloberfläche und im Zytosol, aber auch in Mikroorganismen (Varki et al. 2015).

Es sind zahlreiche Funktionen von Sialinsäuren beschrieben. Sie stabilisieren Moleküle und Membranen, interagieren mit Zellen und der extrazellulären Matrix und schützen Proteine vor Proteasen, Glykosidasen und oxidativem Stress (Varki et al. 2015). Asialoglykoproteine werden hingegen zügig durch den Asialoglykoprotein- oder Ashwell-Morell-Rezeptor abgebaut (Ashwell and Morell 1974; Tolleshaug 1984).

Sialinsäuren induzieren Immuntoleranz, wirken inhibitorisch auf Immunzellen und regulieren deren Migration. Eine reduzierte Sialylierung ist bei Autoimmunerkrankungen beschrieben (Mahajan und Pillai, 2016). Sie stellen Angriffspunkte für Mikroorganismen dar und Sialidasen dienen Pathogenen als Virulenzfaktor (Varki und Gagneux, 2012). Eine vermehrte Sialidase-Aktivität findet sich bei Sepsis (Demina et al. 2018).

Die Diagnostik von Sialylierungsmustern wird für maligne Erkrankungen verwendet (Pearce und Läubli, 2016). Therapeutische Ansätze für Sialinsäuren werden diskutiert (Varki et al. 2015).

1.3 Proteine im CSF und Nutzen als Biomarker

1.3.1 Blut-Liquor-Schrankenstörung, intrathekale Immunglobulin-Synthese und Reiber-Schema

Der Nachweis einer intrathekalen Immunglobulin-Synthese und Blut-Liquor-Schrankenstörung ist für die Diagnostik neuroinflammatorischer Erkrankungen von großer Wichtigkeit. Ein mathematisches Modell dazu wurde von Reiber entwickelt (Reiber 1994a).

Proteine im CSF werden intrathekal synthetisiert oder strömen vom Serum in den CSF ein. 35-80% der intrazerebralen Proteine strömen vom Serum ein, v.a. Albumin. Ca. 20 % der Proteine werden lokal im ZNS synthetisiert, v.a. in den *Plexus choroidei*. Diese Proteine zeigen höhere Konzentrationen im ventrikulären CSF im Vergleich zum lumbalen CSF. Zudem sind deren CSF-Konzentrationen typischerweise höher als deren Serum-Konzentrationen (Reiber 2001).

Die Konzentration der Plasmaproteine im CSF ist abhängig von der Serum-Konzentration, dem Konzentrationsgradienten und der CSF-Fluss-Rate. Der Konzentrationsgradient wiederum ist abhängig von der Diffusionsdistanz, -zeit und der Größe des Proteins. Je größer ein Protein ist, desto kleiner ist dessen Konzentrationsgradient (Reiber 1994a). Die CSF-Fluss-Rate wurde von Reiber als wichtigster Faktor für die Proteinkonzentration im CSF beschrieben. Kommt es zu einer Verringerung der CSF-Fluss-Rate, z.B. durch entzündliche Prozesse im ZNS, steigt die Proteinkonzentration im CSF an (Reiber 2003). Im Alter und auch bei Neugeborenen ist die CSF-Produktion reduziert, daher finden sich dort höhere CSF-Proteinkonzentrationen bei erniedrigter CSF-Fluss-Rate (Reiber 1994a).

Die Blut-Liquor-Schranke entspricht nach Reiber nicht einer morphologischen, sondern einer funktionellen Barriere. Eine Blut-Liquor-Schrankenstörung ist eine funktionelle Störung bedingt durch eine erniedrigte Fluss-Rate und damit einhergehend erhöhten CSF-Konzentrationen. Zur Diagnostik wird der Albumin-Quotient Q_{Alb} aus CSF- und Serum-Albumin-Konzentration verwendet. Übersteigt Q_{Alb} einen altersabhängigen Grenzwert, so wird von einer Schrankenstörung ausgegangen (Reiber 2005).

Die intrathekale Immunglobulin-Synthese ist eine bei pathologischen Zuständen auftretende lokale Synthese von Immunglobulinen im ZNS. Reiber hat 1994 ein mathematisches Konzept entwickelt, um eine intrathekale Synthese von Immunglobulinen zu diagnostizieren. Dazu wird der Quotient der Antikörperkonzentrationen in CSF und Serum gebildet (Q_{Ig}) und gegen Q_{Alb} doppelt logarithmisch aufgetragen (Reiber 1994a; Reiber 1994b). In Abbildung 1.3 ist ein solches Reiber-Schema dargestellt. Liegt der Punkt in Bereich 1 (wie in Abb. 1.3), handelt es sich um den physiologischen Zustand. In Bereich 2 liegt eine isolierte Schrankenstörung vor, die in Bereich 3 mit einer intrathekalen Ig-Synthese kombiniert ist. In Bereich 4 liegt eine isolierte intrathekale Ig-Synthese ohne Schrankenstörung vor (Reiber et al. 2001; Reiber 1994a).

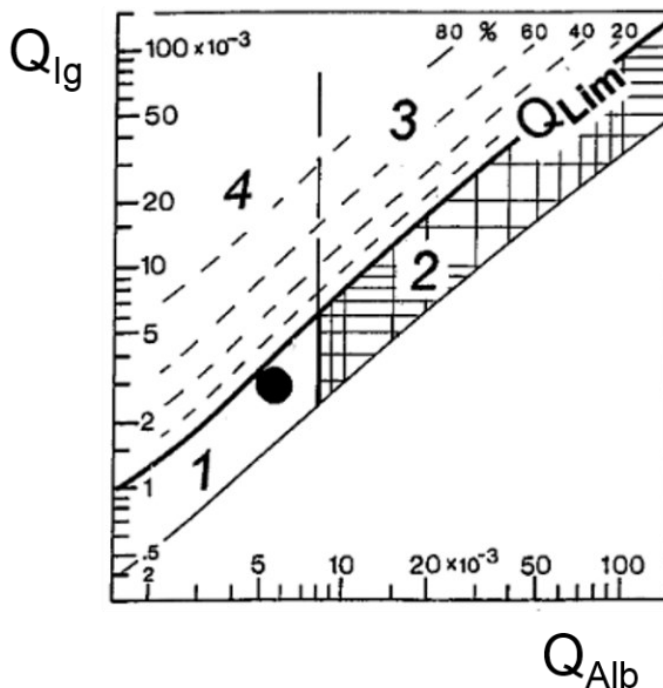


Abbildung 1.3 Reiber-Schema.

Auf der x-Achse ist $Q_{Alb} \times 10^{-3}$ logarithmisch aufgetragen, auf der y-Achse $Q_{Ig} \times 10^{-3}$ logarithmisch. Es sind vier Bereiche im Diagramm markiert. 1 zeigt den physiologischen Bereich. Liegt der Wert in Bereich 2, ist der Q_{Alb} -Grenzwert überschritten und es handelt sich um eine isolierte Schrankenstörung. In Bereich 3 werden sowohl der Q_{Alb} - als auch der Q_{Ig} -Grenzwert überschritten. Es handelt sich um eine Kombination aus Schrankenstörung und intrathekalen Immunglobulin-Synthese. In Bereich 4 ist nur der Q_{Ig} -Grenzwert überschritten. Es handelt sich um eine isolierte intrathekale Immunglobulin-Synthese ohne Schrankenstörung. Verändert nach Reiber et al., 2001.

1.3.2 Biomarker für entzündliche neurologische Erkrankungen

Die Diagnostik vieler entzündlicher neurologischer Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter ist herausfordernd und auf verschiedene, z.T. aufwändige Methoden angewiesen. Daher werden verschiedene Moleküle auf deren Nutzen als Biomarker untersucht. Besonders für die MS, die häufigste demyelinisierende Erkrankung, die in 1,7 – 5,6 % der Fälle im Kindesalter beginnt, werden zahlreiche potenzielle Biomarker untersucht (Alroughani und Boyko, 2018). Diese umfassen Transkriptionsfaktoren, Neurofilamente, Rezeptoren, microRNAs, Antikörper und zahlreiche weitere Moleküle (El Ayoubi und Khoury, 2017; Teunissen et al., 2015). Auch Fetuin-A wird als möglicher Biomarker für MS und entzündliche Erkrankungen untersucht (Harris et al. 2017; Harris et al. 2013).

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung von Fetuin-A bei inflammatorischen Erkrankungen des Nervensystems im Kindes- und Jugendalter. Aufgrund der beschriebenen Diskrepanz zwischen pro- und anti-inflammatorischen Funktionen von Fetuin-A soll untersucht werden, ob eine differentielle Glykosylierung dafür ursächlich sein kann. Dazu wird eine Methode zur Untersuchung der Glykosylierung etabliert. Diese soll an einer ausgewählten Stichprobe angewendet werden, um erste Hinweise auf mögliche Veränderungen im Glykosylierungsmuster, v.a. der N-Glykane und Sialinsäuren, bei inflammatorischen neurologischen Erkrankungen zu gewinnen.

Mittels Konzentrationsmessungen von Fetuin-A in Serum und CSF, soll Fetuin-A als möglicher Biomarker für entzündliche neurologische Erkrankungen beurteilt werden.

Mithilfe beider Methoden soll nach Hinweisen auf die Herkunft von Fetuin-A im ZNS gesucht werden. In den Untersuchungen der Glykosylierung werden daher Serum- und CSF-Proben derselben Patienten verglichen. Die Konzentrationen werden anhand des Vorliegens einer Blut-Liquor-Schrankenstörung oder einer intrathekalen IgG-Synthese ausgewertet. Es wird, angelehnt an das Reiber-Schema, ein Quotient der Fetuin-A-Konzentrationen in CSF und Serum (Q_{Fet}) gebildet und mit dem Albumin-Quotienten (Q_{Alb}) verglichen, um weitere Hinweise auf die Herkunft von Fetuin-A im ZNS zu gewinnen.

3 Material und Methoden

3.1 Serum und CSF-Proben

In dieser Arbeit wurden Serum- und CSF-Proben von Kindern zwischen 1,5 und 17,9 Jahren untersucht, die in der Kinderklinik der Uniklinik der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen (RWTH) behandelt wurden.

Dabei waren venöse Blutabnahmen sowie Lumbalpunktionen klinisch indiziert und wurden durch die jeweiligen Stationsärzte durchgeführt. Die hier durchgeführte Untersuchung wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der RWTH genehmigt (EK 139 / 07). Die Einverständniserklärung zur Nutzung der Proben wurde nach mündlicher Aufklärung durch die Erziehungsberechtigten (und Patienten soweit verfügbar) per Unterschrift erteilt. Die Serum-Proben wurden direkt nach Abnahme zentrifugiert (5 Minuten, 2000 rpm) und zunächst bei -20 °C eingefroren, die CSF-Proben wurden ohne weitere Behandlung direkt eingefroren. Schließlich wurden die Proben bei -80 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Da wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen die Stabilität von Proteinen beeinflussen können, wurde die Anzahl dieser Zyklen möglichst geringgehalten. McArthur et al. konnten 2015 zeigen, dass ein einmaliges Einfrieren und Auftauen keinen Effekt auf die Konzentrationsmessung von Fetuin-A hat (McArthur et al. 2015).

Es wurden 66 Serum-CSF-Paare gewonnen. Dabei wurden beide Proben jeweils am selben Tag abgenommen. Die Messung der Fetuin-A-Konzentrationen erfolgte verblindet. Das Patientenkollektiv wurde nach der Messung in unterschiedliche Gruppen unterteilt: nach Diagnose, nach Blut-Liquor-Schrankenstörung, nach intrathekaler IgG-Synthese und nach Wert des C-reaktiven Proteins (CRP). Die für die Einteilung benötigten Laborwerte wurden in der klinischen Routine durch das Zentrallabor der Uniklinik der RWTH Aachen ermittelt und für diese Arbeit verwendet. Die klinischen Daten sowie Diagnosen der Stichprobe der Fetuin-A-Konzentrationsuntersuchungen sind in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.1. Klinische Daten der Proben der Konzentrationsmessungen von Fetuin-A.

	Gesamt (n=66)	Entzündlich (n=35)	Nicht- Entzündlich (n=27)	Unklar (n=4)
Alter bei Untersuchung (Jahre)*	12,49 ± 4,63	12,15 ± 4,51	12,80 ± 4,97	13,44 ± 2,56
Geschlechts- verteilung				
<u>weiblich</u>	42	21	18	3
<u>männlich</u>	24	14	9	1
Serum Protein (g/dl)*	73,55 ± 5,99 (n=66)	74,17 ± 5,89 (n=35)	72,89 ± 6,37 (n=27)	72,50 ± 2,60 (n=4)
CSF Protein (g/l)*	0,36 ± 0,45 (n=66)	0,45 ± 0,60 (n=35)	0,26 ± 0,10 (n=27)	0,23 ± 0,09 (n=4)
CSF Albumin Quotient x 10⁻³ QAib*	5,94 ± 9,49 (n=53)	7,87 ± 12,60 (n=28)	3,73 ± 2,06 (n=22)	4,03 ± 1,64 (n=3)
C-reaktives Protein (CRP)				(
<u>Anzahl gesamt</u>	64	35	25	4
<u>CRP erhöht (≥ 5 mg/l)</u>	9	4	4	1
<u>CRP nicht erhöht (< 5 mg/l)</u>	55	31	21	3
Blut-Liquor- Schrankenstörung				
<u>Anzahl gesamt</u>	53	28	22	3
<u>gestört</u>	11	8	2	1
<u>nicht gestört</u>	42	20	20	2
Intrathekale IgG Synthese				
<u>Anzahl gesamt</u>	48	26	21	2
<u>intrathek. IgG Synthese</u>	10	9	1	0
<u>keine intrathek. IgG Synthese</u>	39	17	20	2

* Angabe als Mittelwert ± Standardabweichung

Tabelle 3.2. Klinische Diagnosen der Proben der Konzentrationsmessungen von Fetuin-A.

Entzündlich (n=35)		Nicht entzündlich (n=27)		unklar (n=4)	
Diagnose	n	Diagnose	n	Diagnose	n
ADEM	5	Ataxie	1	Ausschluss demyelinisierende Erkrankung	1
Anti-N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor Enzephalitis	1	Chronische Kopfschmerzen	11	Ausschluss Neuroborreliose	1
<i>clinically isolated syndrome</i> (CIS)	1	Chronische Schulterschmerzen	1	Ausschluss Meningitis	1
demyelinisierende Erkrankung	1	Dyskinesie	1	Vestibularneuritis	1
Fazialisparese	10	Epilepsie	3		
Guillain-Barré Syndrom	2	Ausschluss Meningitis	1		
<i>Herpes simplex</i> Virus Enzephalitis	1	Parästhesie	1		
MS	4	Paroxysmale Bewegungsstörung	1		
Neuritis nervi optici	3	Plexus-Neuropathie	1		
Neuroborreliose	5	Pseudotumor cerebri	1		
Neuromyelitis optica	1	Rezidivierende Fieberkrämpfe	1		
<i>Varicella zoster</i> Virus Enzephalitis	1	Somatisierungsstörung	2		
		Tremor	1		
		Sehverlust	1		

ADEM Akute Disseminierte Enzephalomyelitis, MS Multiple Sklerose

Für die Untersuchung der Glykosylierung von Fetuin-A mittels Glykosidase-Verdau, Western Blot und Immunodetektion wurden aus der oben beschriebenen Stichprobe 23 Serum-CSF-Paare ausgewählt. Diese Proben wurden für die Untersuchung verblindet und nach der Messung in eine Kontrollgruppe ($n = 10$) und eine Gruppe mit Proben von Patienten mit inflammatorischen Erkrankungen des Nervensystems ($n = 13$) unterteilt. Die klinischen Daten der Stichprobe der Glykosylierungsuntersuchungen sind in Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4. dargestellt.

Tabelle 3.3 Klinische Daten der Proben der Glykosylierungsuntersuchungen von Fetuin-A.

	Gesamt (n=23)	Entzündlich (n=13)	Kontrollen (n=10)
Alter bei Untersuchung (Jahre)	12,95 ± 4,09	11,41 ± 4,64	14,95 ± 1,82
Geschlechtsverteilung			
<u>weiblich</u>	16	8	8
<u>männlich</u>	7	5	2

* Angabe als Mittelwert ± Standardabweichung

Tabelle 3.4 Klinische Diagnosen der Proben der Glykosylierungsuntersuchungen von Fetuin-A.

Entzündlich (n=13)		Kontrollen (n=10)	
Diagnose	n	Diagnose	n
ADEM	2	Chronische Kopfschmerzen	5
<i>Herpes simplex</i> Virus Enzephalitis	1	Ausschluss Neuroborreliose	1
MS	4	Ausschluss Meningitis	1
Neuroborreliose	5	Epilepsie	1
SSPE	1	Somatisierungsstörung	2

ADEM Akute Disseminierte Enzephalomyelitis, MS Multiple Sklerose, SSPE Subakute Sklerosierende Panenzephalitis

3.2 Untersuchungen zur Glykosylierung von Fetuin-A

3.2.1 Verdau von Serum- und CSF-Proben mit Glykosidasen

Zur Diagnostik der Glykosylierung von Fetuin-A wurde eine Methode etabliert, um Unterschiede in der Glykosylierung darzustellen. Dazu wurden die Proben mit verschiedenen Glykosidasen verdaut und eventuelle Unterschiede mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) und Western Blot mit anschließender Immunodetektion dargestellt. Die verwendeten Glykosidasen stammen aus dem *Enzymatic CarboRelease Kit* von QA-Bio (KE-DG01, QA-Bio, Inc., Palm Desert, USA). Der Verdau mit *Peptide-N4-(acetyl- β -glucosaminyl)-asparagine amidase N-Glycosidase F* (PNGase-F) zum Verdau von N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratseitenketten und mit Sialidase-Au zum Verdau von Sialinsäuren wurde etabliert.

PNGase-F (aus *Elizabethkingia meningosepticum*) trennt die β -glykosidische Bindung von GlcNAc am N, wobei das N-Glykan abgespalten wird, dabei aber intakt bleibt (Abb. 3.1 A und B). Sialidase-Au (aus *Arthrobacter ureafaciens*) schneidet Sialinsäuren ab, die α -2,3; α -2,6; α -2,8 oder α -2,9 an ein Saccharid gebunden sind (Abb. 3.1 B und C). Die verwendeten Lösungen (Reaktionspuffer (5x), Denaturierungslösung, Triton-X) gehören ebenfalls zum *Enzymatic CarboRelease Kit* von QA-Bio.

Die Serum-Proben wurden zunächst 1:100 in Reinstwasser (TKA GenPure, 18,2 M Ω *cm, TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert, Deutschland) vorverdünnt. Dazu wurde 5 μ l Serum mit 495 μ l Reinstwasser gemischt. Aus dieser Vorverdünnung wurde der eigentliche Versuchsansatz erzeugt. 25 μ l der Vorverdünnung wurden mit 20 μ l Reaktionspuffer (5x), 10 μ l Protease-Inhibitor (*cOmpleteTM Mini EDTA free*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland; 10fach konzentriert), 40 μ l Reinstwasser und 2,5 μ l Denaturierungslösung gemischt. Dieses Gemisch wurde für fünf Minuten bei 96 °C denaturiert. Anschließend wurde die Probe auf Eis abgekühlt. Es wurden 2,5 μ l Triton-X hinzugegeben und gemischt. Diese Lösung wurde gleichmäßig auf drei 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt. In das erste Reaktionsgefäß wurde keine Glykosidase hinzugegeben, in das zweite Gefäß wurde 1 μ l PNGase-F gegeben und in das dritte Gefäß wurde 1 μ l Sialidase-Au

3 Material und Methoden

gegeben. Es wurde erneut gemischt und die Versuchsansätze wurden für drei Stunden bei 37 °C im Wasserbad (*Heating immersion circulator MP*, JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland) verdaut.

Bei den CSF-Proben wurde keine Vorverdünnung erstellt. 65 µl CSF wurden mit 20 µl Reaktionspuffer (5x), 10 µl Protease-Inhibitor und 2,5 µl Denaturierungslösung gemischt und fünf Minuten bei 96 °C denaturiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden 2,5 µl Triton-X hinzugegeben und nochmal gemischt. Anschließend wurde wie bei den Serum-Proben verfahren und schließlich für 3 Stunden bei 37°C im Wasserbad verdaut.

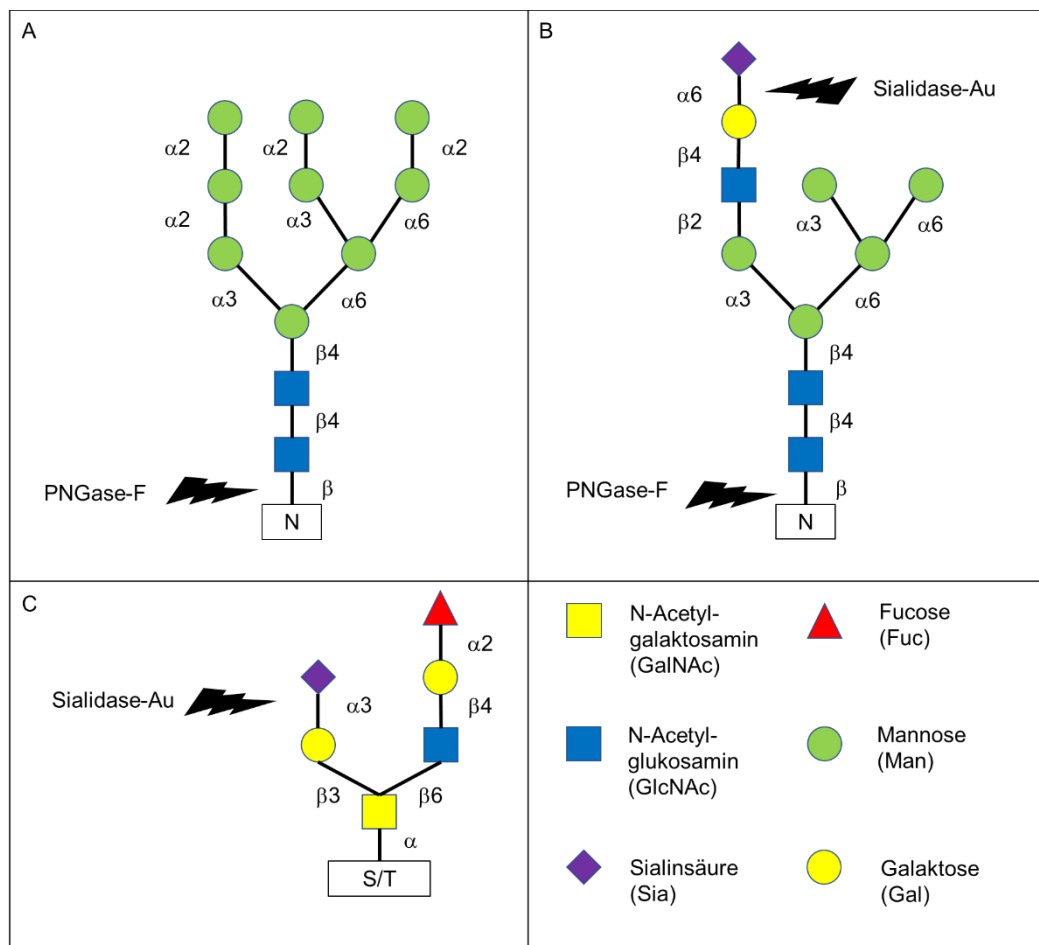


Abbildung 3.1 Angriffspunkte von PNGase-F und Sialidase-Au.

In dieser Abbildung sind drei verschiedene Kohlenhydratseitenketten abgebildet. **A** zeigt ein an N gebundenes N-Glykan vom Oligomannose-Typ, **B** ein an N gebundenes N-Glykan vom Hybrid-Typ und **C** ein an S oder T gebundenes O-Glykan. PNGase-F trennt direkt an der Proteinbindung die N-glykosidisch gebundenen Saccharide und lässt dabei das abgetrennte Oligosaccharid intakt (A und B). Sialidase-Au trennt Sialinsäuren der Glykane ab. Es werden α -2,3 (C), α -2,6 (B), α -2,8 (nicht dargestellt) und α -2,9 (nicht dargestellt) gebundene Sialinsäuren entfernt.

3 Material und Methoden

Nach drei Stunden wurden jeweils 25 µl aus jedem Reaktionsgefäß (sowohl Serum- als auch CSF-Proben) in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und mit 5 µl 6x SDS-Probenpuffer (Tab. 3.5) vermischt. Dieses Gemisch wurde für fünf Minuten bei 96 °C denaturiert, um den Verdau zu stoppen. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Untersuchung mit SDS-PAGE und Western Blot mit Immunodetektion gelagert.

Tabelle 3.5 Zusammensetzung 6x SDS-Probenpuffer

6x SDS-Probenpuffer (10 ml)	
4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 6,8)	7 ml
Glycerin	3 ml
Dithiothreitol (DTT)	0,93 g
SDS	1 g
Bromphenol-Blau Natrium-Salz	1,2 mg

Die weiteren im Kit vorhandenen Glykosidasen (O-Glykosidase, Glukosaminidase, β-Galaktosidase) wurden zur Etablierung der Methodik verwendet, nicht aber in der etablierten Methodik. Der Verdau aller 23 Proben nach Etablierung der Methodik wurde an einem Tag durchgeführt.

3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode, um Proteine auf einem Gel nach Molekulargewicht aufzutrennen und wurde von Laemmli 1970 entwickelt (Laemmli 1970). Dabei wird zunächst SDS zur Probe hinzugefügt. SDS überdeckt die eigentliche Ladung des Proteins, wodurch die Proteine unabhängig von der Ladung nach Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Die an einem Tag verdauten Proben wurden auf Eis aufgetaut und auf 42 °C erwärmt. Anschließend wurden die Proben gemischt und abzentrifugiert. Die Gele wurden wie in Tabelle 3.6 beschrieben hergestellt. Auf das Gel wurden 15 µl der Probe je Spur aufgetragen. Zusätzlich wurde auf jedem Gel ein Größenmarker (*Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS-Electrophoresis*; GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) aufgetragen, der eine Einordnung der Größe des Proteins möglich macht. Nach Anlegen von elektrischem Strom durchlaufen die Proben das Gel und die Proteine werden nach Molekulargewicht aufgetrennt.

Es wurden 10%-Polyacrylamid-Gele verwendet. Die Laufzeit betrug circa 60 Minuten bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel. Die SDS-PAGE wurde mit dem *Mini-PROTEAN® tetra system* von Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) in SDS-Laufpuffer nach Laemmli (Tab. 3.7) (Laemmli 1970) durchgeführt.

Tabelle 3.6 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für ein 10%-Polyacrylamid-Gel

	Trenngel	Sammelgel
4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 6,8)	-	0,625 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 8,8)	1,25 ml	-
Reinstwasser	2,1 ml	1,5 ml
Acrylamid 30%	1,65 ml	0,325 ml
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	4 µl	5 µl
APS (Ammoniumpersulfat)	25 µl	25 µl

Tabelle 3.7 SDS-Laufpuffer nach Laemmli

SDS-Laufpuffer nach Laemmli	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 %

Die aufgetrennten Proteine können mit verschiedenen Methoden sichtbar gemacht werden. Dazu gehören die direkte Färbung der Gele mittels Coomassie- oder Silber-Färbung oder, wie hier durchgeführt, die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran mittels Western Blot mit anschließender Immunodetektion.

3.2.3 Western Blot und Immunodetektion

Beim Western Blot werden Proteine unter Anlage von elektrischem Strom von einem SDS-PAGE-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dies dient dazu, ein Zielprotein immunochemisch nachzuweisen.

Es wurde ein Semi-Dry-Blot durchgeführt. Der Boden stellt hier die Anode dar. Das dorthin gerichtete Filterpapier sowie das SDS-PAGE-Gel werden in Anodenpuffer, die Nitrocellulose-Membran sowie das zur Kathode reichende Filterpapier in Kathodenpuffer äquilibriert (Tab. 3.8). Der Blot wurde mit konstanter Stromstärke von 150 mA je Gel für 60 Minuten durchgeführt. Der Western Blot wurde mit dem *Owl™ Semidry Electric Blotter HEP-1* (Thermo Fisher Scientific, Marietta, USA) durchgeführt.

Tabelle 3.8 Puffer für den Semi-Dry-Blot

	Anodenpuffer	Kathodenpuffer
Tris	300 mM	30 mM (pH 8,6-8,7)
Tricin	100 mM (pH 8,7-8,8)	-
ε-Aminocapronsäure	-	300 mM

3 Material und Methoden

Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran wurde mit Ponceau-S-Färbung überprüft (Tab. 3.9). Der Größenmarker wurde dabei auf der Membran markiert. Eine mit Ponceau-S gefärbte Membran ist in Abbildung 3.2 beispielhaft abgebildet. Anschließend wurde die Färbung durch Waschen der Membran für 20 Minuten in 0,05 %-PBS-Tween® (*phosphate buffered saline-Tween*®-20, PBS-T) entfernt. Zudem wurde die Blockierungs- und Suspensionslösung hergestellt. Dazu wurde eine Lösung aus 5 % Magermilchpulver in PBS-T hergestellt (5 % Magermilchpulver/PBS-T).

Tabelle 3.9 Ponceau-S Färbelösung

	Ponceau-S-Färbelösung
Essigsäure	5 %
Ponceau-S	0,1 %

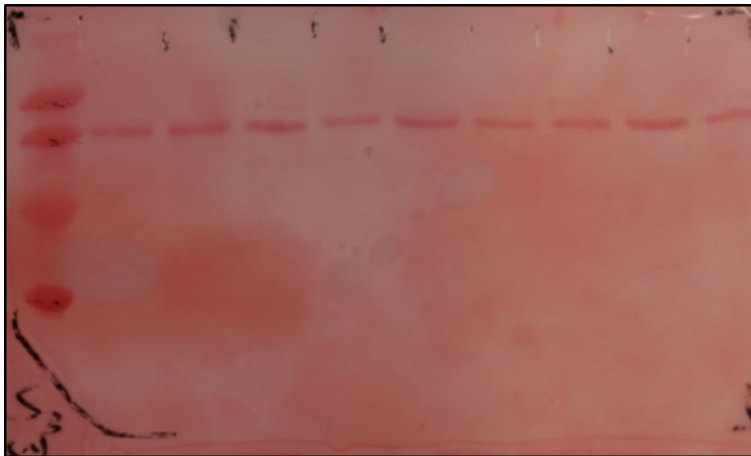


Abbildung 3.2 Ponceau-S-Färbung einer Nitrocellulose-Membran.

Dargestellt ist eine mit Ponceau-S gefärbte Nitrocellulose-Membran. Die Färbung dient der Überprüfung des Protein-Transfers auf die Membran. Die Banden des Größenmarkers sowie die Spuren wurden auf der Membran markiert, anschließend wird die Ponceau-S-Färbung durch Waschen mit PBS-T wieder entfernt.

3 Material und Methoden

Nach dem Waschen der Membranen wurden verbliebene unspezifische Bindungsstellen mit 10 ml der Blockierlösung (5 % Magermilchpulver/PBS-T) für 30 Minuten bei 37 °C rotierend blockiert, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern.

Danach wurde der primäre Antikörper hinzugefügt, der spezifisch an Fetuin-A bindet. Der Antikörper wurde 1:1.000 in 5% Magermilchpulver/PBS-T verdünnt. 10 ml dieser Lösung wurden auf jede Membran gegeben und für 45 Minuten bei 37 °C rotierend inkubiert. Die hier verwendeten Antikörper wurden in der AG Jahnen-Dechent erzeugt (Nawratil et al. 1996). Es handelt sich um polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen humanes Fetuin-A (*AS 5359, polyclonal rabbit anti-human-Fetuin-A*). Um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran anschließend dreimal rotierend für jeweils fünf Minuten mit PBS-T gewaschen, um eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers an nicht-gebundene Primärantikörper zu verhindern.

Der sekundäre Antikörper ist gegen Kaninchen-Antikörper gerichtet und mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase, HRP*) konjugiert (*polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins/HRP*, Antikörpernummer P0217, DAKO, Agilent, Santa Clara, USA). Der Sekundärantikörper wurde 1:5.000 in 5% Magermilchpulver/PBS-T verdünnt. Anschließend wurden 10 ml dieser Lösung auf jede Membran gegeben und für 45 Minuten bei 37 °C rotierend inkubiert. Es wurde dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS-T gewaschen, um nicht-gebundene Sekundärantikörper zu entfernen. Nun wurde die Chemolumineszenz-Lösung (Tab. 3.10) hinzugegeben und für eine Minute inkubiert.

Tabelle 3.10 Chemilumineszenz-Lösung für eine Membran

Chemilumineszenz-Lösung (10 ml)	
Grundlösung (0,1 M Tris pH 8,5)	10 ml
Luminol (250 mM in DMSO)	50 µl
p-Coumarsäure (90 mM in DMSO)	50 µl
H₂O₂ (30%)	5 µl

Die HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in dessen oxidierte Form. Die bei dieser Reaktion entstehende Lumineszenz wurde mit dem *ImageQuant™ LAS-4000 mini* (luminescent image analyser, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) gemessen. Nach jeweils 10 Sekunden Belichtungszeit wurde ein Bild gemacht, bis die Banden deutlich zu sehen waren. Die Banden-Intensität war zum Teil unterschiedlich aufgrund variabler Fetuin-A-Konzentrationen in den Proben, was für die qualitative Auswertung nicht von Bedeutung war. Bei einem Teil der untersuchten Membranen wurde der Kontrast mit *PowerPoint* (Microsoft Corporation, Redmond, USA) bearbeitet.

3.2.4 Statistische Auswertung der Glykosylierungsuntersuchungen

Die mathematisch-statistische Auswertung erfolgte mit *SPSS Statistics* (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland).

Zur statistischen Auswertung der Glykosylierungsstudien wurde der exakte Test nach Fisher verwendet. Es wurde die zweiseitige Signifikanz bestimmt.

3.3 Konzentrationsmessung von Fetuin-A

3.3.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Eine Möglichkeit zur Konzentrationsmessung von Proteinen in einer Flüssigkeit ist der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Hier wurde der *Human Fetuin A/AHSG DuoSet ELISA* (DY1184, R&D Systems, Minneapolis, USA) etabliert und verwendet. Die 96-*well*-Platten sowie die verwendeten Lösungen entstammen dem *DuoSet Ancillary Reagent Kit 2* (DY008, R&D Systems, Minneapolis, USA). Die Durchführung entspricht dem Protokoll des Herstellers.

Zunächst wurde der *capture*-Antikörper in 1 ml PBS gelöst und anschließend auf eine Konzentration von 4 µg/ml in PBS verdünnt. Pro *well* einer 96-*well*-Platte wurden je 100 µl *capture*-Antikörper aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Platte zunächst mit Wasch-Puffer (PBS-T) gewaschen. Dazu wurden 400 µl Wasch-Puffer je *well* hinzugegeben. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde die Platte mit *reagent*-Lösung (1 % *bovine serum albumin* (BSA) in PBS, *pH* 7,2-7,4) blockiert. Dazu wurden 300 µl je *well* auf die Platte gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die Proben und die Standards vorbereitet. Dazu wurden Serum-Proben 1:1.000.000 in *reagent*-Lösung verdünnt, die CSF-Proben wurden 1:4.000 in *reagent*-Lösung verdünnt. Aus den mitgelieferten Standards wurde eine Verdünnungsreihe mit sieben Standards zwischen 0 pg/ml und 2.000 pg/ml in *reagent*-Lösung erzeugt. Nach dem Blockieren der Platte wurde der oben beschriebene Wasch-Schritt wiederholt. Dann wurden je 200 µl Probe oder Standard pro *well* aufgetragen. Das Antigen, in diesem Fall Fetuin-A, bindet an den *capture*-Antikörper. Die Platte wurde mit Folie abgedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut dreimalig mit je 400 µl Wasch-Puffer gewaschen. Der *detection*-Antikörper wurde in 1 ml *reagent*-Lösung gelöst und anschließend auf eine Konzentration von 200 ng/ml in *reagent*-Lösung verdünnt. Nun wurden je 100 µl des *detection*-Antikörpers je *well* aufgetragen. Dieser bindet nun ebenfalls an Fetuin-A, sodass ein Sandwich zwischen *capture*-Antikörper, Fetuin-A und *detection*-Antikörper entsteht (Abb. 3.3). Die Platte wurde abgedeckt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Waschschrift, wie oben beschrieben.

Streptavidin-HRP wurde 1:200 in *reagent*-Lösung verdünnt und 100 µl je *well* auf die Platte gegeben. Streptavidin-HRP bindet an den *detection*-Antikörper. Die Platte wurde abgedeckt und für 20 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Wasch-Schritt.

Dann wurde *substrate*-Lösung hinzugegeben. Dazu wurden zunächst *Color Reagent A* (H₂O₂) und *Color Reagent B* (Tetramethylbenzidin) 1:1 gemischt. In jedes *well* wurden 100 µl der *substrate*-Lösung aufgetragen. Durch die Reaktion mit HRP kommt es zum ersten Farbumschlag. Die Platte wurde abgedeckt und für 20 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 50 µl der *stop*-Lösung (2 N H₂SO₄) in jedes *well* gegeben und der erneute Farbumschlag mit einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Korrekturwellenlänge von 540 nm gemessen. Die Messungen wurden mit dem *Fluostar optima Microplate reader* (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland) durchgeführt.

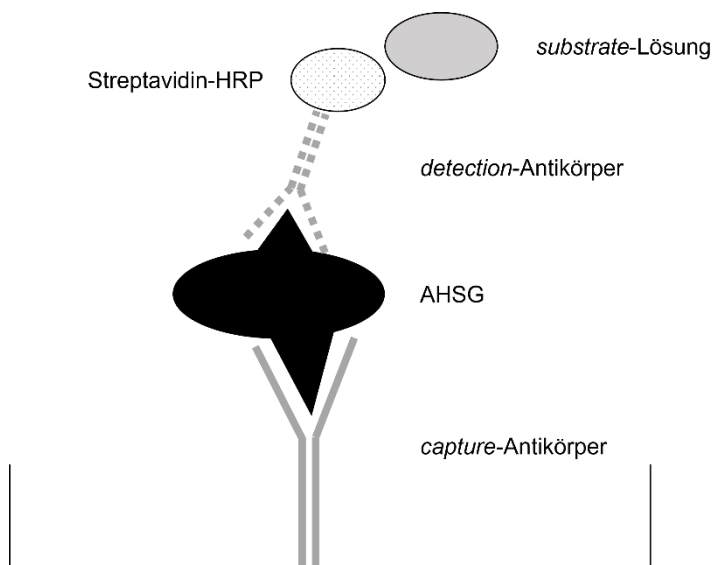


Abbildung 3.3 Schematischer Aufbau des Human Fetuin-A/AHSG DuoSet ELISA (R&D).

Es handelt sich um einen Sandwich-ELISA. Zunächst bindet der *capture*-Antikörper an die Platte. Dieser Antikörper bindet dann das Protein, hier Fetuin-A (schwarz). Daran bindet der *detection*-Antikörper (gestrichelter Antikörper). An den *detection*-Antikörper bindet das mit HRP konjugierte Streptavidin (gepunktetes Oval). Bei Zugabe der *substrate*-Lösung kommt es dann zum Farbumschlag (graues Oval). Bei Zugabe der *stop*-Lösung kommt es zum erneuten Farbumschlag (nicht dargestellt).

Von den bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessenen Werten wurde die Korrektur sowie der Hintergrund abgezogen. Mit den zugegebenen Standards wurde nun mit *Excel* (Microsoft Corporation, Redmond, USA) eine Standardgerade erzeugt und durch Einsetzen der Messwerte die Konzentrationswerte der Proben bestimmt.

3.3.2 Nephelometrie

Eine weitere Methode zur Konzentrationsmessung von Fetuin-A im Serum ist die Nephelometrie. Es handelt sich um ein optisches Verfahren zur Konzentrationsmessung. Dabei wird die durch die Trübung einer Flüssigkeit abgelenkte Streustrahlung gemessen. Die Methode für die Messung von Fetuin-A im Serum wurde in der AG Jahnen-Dechent etabliert (Häusler et al. 2009).

Pro Probe wurde zunächst ein Reaktionsgefäß mit 190 µl *Dako Turbidimetry/Nephelometry reaction Buffer 3* (DAKO, Agilent, Santa Clara, USA) befüllt. Es wurden 10 µl Serum oder Standard hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Der Fetuin-A-Standard lag in einer Konzentration von 1 mg/ml in NaCl 0,9% vor. Daraus wurde eine Verdünnungsreihe in PBS erzeugt.

Pro *well* einer 96-*well*-Platte (*Cliniplate™ 96-Well Microplate*, Thermo Fisher Scientific, Marietta, USA) wurden 25 µl der verdünnten Probe aufgetragen. Die Auftragung erfolgte in Triplikaten. In jedes *well* wurden 100 µl *reaction Buffer 3* zugegeben und für eine Minute bei 1200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Platte für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde 7 Zyklen am *Nepheostar microplate nephelometer* (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland) gemessen. Diese Messung dient der Bestimmung der Anfangstrübung. Währenddessen wurden 13,8 ml *reaction Buffer 3* pro Platte auf 37 °C vorgewärmt und mit 1,2 ml Antiserum gegen humanes Fetuin-A (AS 921006) vermischt. Von diesem Gemisch wurden 120 µl je *well* hinzugegeben. Die Platte wurde für 3 Minuten bei 1200 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 30 Zyklen gemessen. Die Messungen erfolgten bei konstanter Temperatur von 37 °C.

Für die Auswertung wurden die Messwerte aus den Zyklen 24 bis 26 gemittelt. Dann wurden die Messwerte der 7 Zyklen ohne Antiserum als Anfangstrübung gemittelt. Die Differenz aus der Endtrübung und der Anfangstrübung stellt die durch die Immunreaktion entstandene Trübung dar. Aus den Standards wurde mit *Excel* eine Standardgerade erzeugt und durch Einsetzen die Konzentrationen bestimmt.

Für die Messung der CSF-Proben ist eine Sensitivität im µg/ml-Bereich notwendig, daher kann die Nephelometrie nur für Messungen von Serum-Proben verwendet werden.

3.3.3 Statistische Auswertung der Konzentrationsmessungen

Die mathematisch-statistische Auswertung erfolgte mit *SPSS Statistics* (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland). Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit *SPSS Statistics 26* und *Excel* (Microsoft).

Es wurden die Fetuin-A-Konzentrationen sowie verschiedene Quotienten in Bezug auf Entzündung, CRP, Alter, intrathekale IgG-Synthese und Blut-Liquor-Schrankenstörung untersucht. Die Zusammenhänge wurden mittels multipler linearer Regression untersucht und mit Boxplots und Streudiagrammen dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung einer Methode zur Untersuchung der Glykosylierung von Fetuin-A

Primäres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methodik, um die Glykosylierung von Fetuin-A bei inflammatorischen und infektiösen Erkrankungen des Nervensystems bei Kindern und Jugendlichen zu untersuchen. Dazu wurde der Verdau mit Glykosidasen und anschließender SDS-PAGE und Western Blot mit Immunodetektion etabliert.

4.1.1 Glykosidasen-Verdau ist im 10 %-Polyacrylamid-Gel sichtbar

Zunächst sollte überprüft werden, ob der Masseverlust, der durch den Verdau der Glykane entsteht, im 10%-Polyacrylamid-Gel sichtbar ist. Abbildung 4.1 zeigt den Glykosidasen-Verdau einer Serum-Probe.

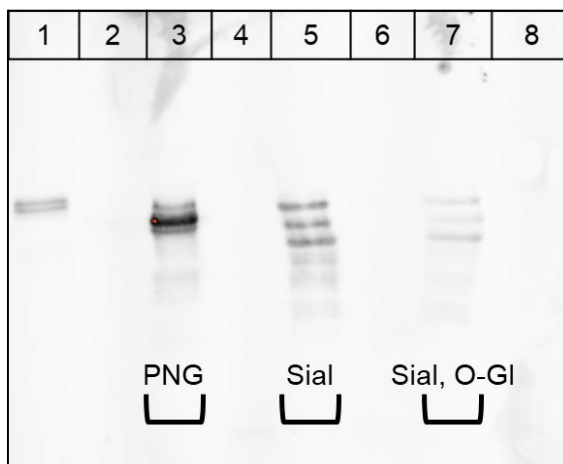


Abbildung 4.1 Glykosidasen-Verdau einer Serum-Probe.

Abgebildet ist eine Serum-Probe nach Verdau mit verschiedenen Glykosidasen. In Spur 1 ist die unverdaute Probe dargestellt. Spur 3 zeigt das Protein nach Verdau mit PNGase-F (PNG). Spur 5 zeigt die Probe nach Verdau mit Sialidase-Au (Sial). Spur 7 zeigt die Probe nach Verdau mit Sialidase-Au (Sial) und O-Glykosidase (O-Gl). Der Verdau wurde über Nacht durchgeführt. Im Vergleich zur etablierten Methodik (vgl. Kap. 3.2) war die Verdünnung der Serumprobe hier geringer. Die Belichtungszeit betrug 20 Sekunden. Ein Größenmarker wurde bei diesem Versuch nicht aufgetragen. In den Spuren 2, 4, 6 und 8 ist keine Probe aufgetragen.

Die erste Bande zeigt Fetuin-A im Serum in unveränderter Form, es zeigt sich allerdings eine Doppelbande. Nach PNGase-F-Verdau (Abb. 4.1, Spur 3) fällt auf, dass die Bande auf dem Gel weiter nach unten gelaufen ist. Dies zeigt, dass das Molekulargewicht des Fetuin-A durch den Verdau mit PNGase-F geringer wird. Auch der Verdau mit Sialidase-Au (Abb. 4.1, Spur 5) und der Verdau mit Sialidase-Au und O-Glykosidase (Abb. 4.1, Spur 7) zeigen einen Masseverlust des Fetuin-A. Es fällt auf, dass sich die Höhe der Banden zwischen Verdau mit Sialidase-Au und O-Glykosidase und dem Verdau nur mit Sialidase-Au nicht unterscheiden, die Intensität der Banden in Spur 7 aber geringer ist. Insgesamt lässt sich der Verdau im 10%-Polyacrylamid-Gel darstellen.

4.1.2 Sialidase-Au ist für den Verdau von O-Glykanen mit O-Glykosidase, β -Galaktosidase und Glukosaminidase notwendig

Laut Herstellerangaben können O-Glykosidase, β -Galaktosidase und Glukosaminidase (alle aus *Streptococcus pneumoniae*) nur dann O-glykosidisch gebundene Kohlenhydratseitenketten entfernen, wenn die Sialinsäuren vom Glykan abgetrennt wurden. Dies entspricht der biologischen Funktion von Sialinsäuren, die Proteine vor dem Abbau schützen (Varki et al. 2015). Im Rahmen der Methodenetablierung wurde untersucht, ob die Zugabe von Sialidase-Au zum Verdau der O-glykosidisch gebundenen Glykane notwendig ist. Dies ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

Der Verlust des Molekulargewichtes durch den Verdau mit Glykosidasen ist sichtbar, besonders nach Verdau mit PNGase-F, passend zum höheren Molekulargewicht der N-Glykane (Abb. 4.2 A, Spuren 3 und 6). In Teil A der Abbildung 4.2 wurde für den Verdau der O-glykosidisch gebundenen Saccharide Sialidase-Au hinzugegeben. In den Spuren 4 und 7 (Abb. 4.2 A) ist sichtbar, dass Fetuin-A nach Verdau mit Sialidase-Au (Sial), O-Glykosidase (O-GI), β -Galaktosidase (β -G) und Glukosaminidase (Glu) weiter auf dem Gel läuft, es also zu einem Masseverlust gekommen ist. Dabei stellen sich die Banden unscharf dar.

In Abbildung 4.2 B ist der Verdau ohne Zugabe von Sialidase-Au dargestellt. Es fällt eine zunehmende Banden-Unschärfe auf. Zudem ist die Laufstrecke der verdauten Proben nicht oder nur gering weiter als die Laufstrecke der

4 Ergebnisse

unverdauten Proben. Dies sieht man v.a. in den Spuren 4 bis 7 (Abb. 4.2 B). Dabei zeigt sich kein Unterschied zwischen CSF- und Serum-Proben. Für einen funktionierenden Verdau der O-glykosidisch gebundenen Glykane ist die Zugabe von Sialidase-Au notwendig.

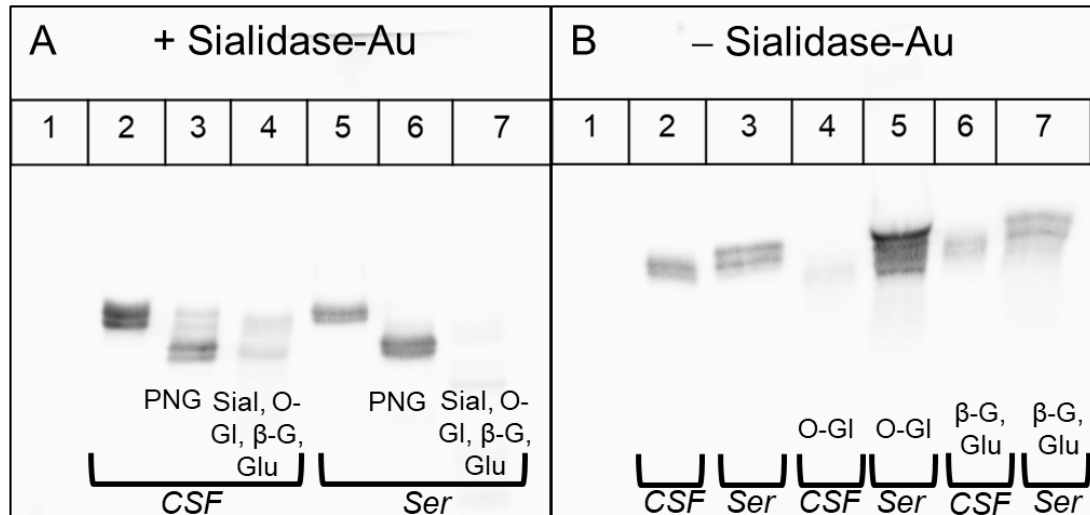


Abbildung 4.2 Vergleich des Glykosidasenverdaus mit und ohne Zugabe von Sialidase-Au. **A** zeigt den Verdau einer CSF- und einer Serum-Probe mit Zugabe von Sialidase-Au. In den Spuren 2 bis 4 ist eine CSF-Probe dargestellt, die Spuren 5 bis 7 zeigen den Verdau einer Serum-Probe (Ser). In Spur 2 (CSF) und Spur 5 (Serum) ist jeweils das unverdaute Fetuin-A dargestellt. Die Spuren 3 und 6 zeigen Fetuin-A nach Verdau mit PNGase-F (PNG). Die Spuren 4 und 7 zeigen den Verdau mit O-Glykosidase (O-Gl), beta-Galaktosidase (beta-G), Glukosaminidase (Glu) und Sialidase-Au (Sial). Die Belichtungszeit betrug 20 Sekunden. In Teil **B** der Abbildung ist der Verdau einer CSF- und einer Serum-Probe ohne Zugabe von Sialidase-Au dargestellt. Die Spuren 2, 4 und 6 zeigen den Verdau von CSF-Proben (CSF), die Spuren 3, 5 und 7 den Verdau von Serum-Proben (Ser). In den Spuren 2 und 3 ist das unverdaute Fetuin-A dargestellt. Die Spuren 4 und 5 zeigen Fetuin-A nach Verdau mit O-Glykosidase (O-Gl), die Spuren 6 und 7 den Verdau mit beta-Galaktosidase (beta-G) und Glukosaminidase (Glu). Die Belichtungszeit betrug 20 Sekunden.

4 Ergebnisse

4.1.3 Alleiniger Verdau mit Sialidase-Au erhöht im Vergleich zum Verdau mit O-Glykosidase, β -Galaktosidase, Glukosaminidase und Sialidase-Au die Bandenschärfe

In den bisherigen Vorversuchen zeigte sich eine Bandenunschärfe, wenn die Proben mit mehreren O-Glykosidasen (Sialidase-Au, O-Glykosidase, β -Galaktosidase und Glukosaminidase) gleichzeitig behandelt wurden (vgl. Kap. 4.1.2). Deshalb wurde versucht, die Anzahl der Glykosidasen, die O-glykosidisch gebundene Kohlenhydratseitenketten entfernen, zu reduzieren. Diese Schritte werden in Abbildung 4.3 gezeigt.

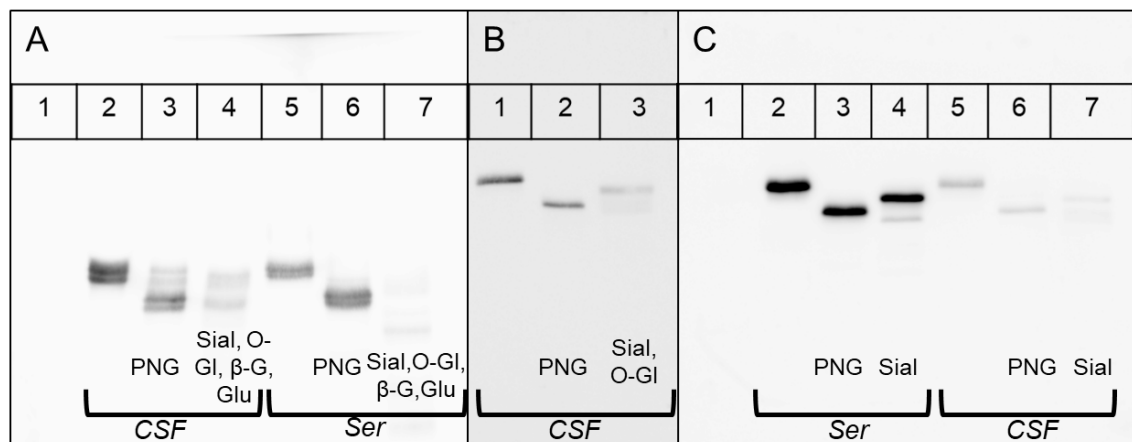


Abbildung 4.3 Schrittweise Reduktion der Glykosidasen zum Verdau von O-Glykanen

A entspricht Abbildung 4.2 A und zeigt den Verdau einer CSF- (Spuren 2 bis 4) und einer Serum-Probe (Spuren 5 bis 7). Es ist der Verdau mit PNGase-F (PNG, Spuren 3 und 6) und mit Sialidase-Au (Sial), O-Glykosidase (O-GI), β -Galaktosidase (β -G) und Glukosaminidase (Glu) (Spuren 4 und 7). Die Spuren 2 und 5 zeigen unverdautes Fetuin-A. **B** zeigt den Verdau einer CSF-Probe. Spur 1 zeigt unverdautes Fetuin-A, Spur 2 zeigt Fetuin-A nach Verdau mit PNGase-F (PNG) und Spur 3 zeigt den Verdau mit Sialidase-Au (Sial) und O-Glykosidase (O-GI). Die Belichtungszeit betrug 80 Sekunden. Der Kontrast wurde mit PowerPoint (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verstärkt. **C** zeigt den Verdau einer Serum- (Ser) und CSF-Probe. Die Spuren 2 bis 4 stellen den Verdau von Serum (Ser) dar, die Spuren 5 bis 7 den Verdau von CSF. Die Spuren 2 und 5 zeigen das unverdaute Fetuin-A, die Spuren 3 und 6 zeigen Fetuin-A nach Verdau mit PNGase-F (PNG) und die Spuren 4 und 7 zeigen den alleinigen Verdau mit Sialidase-Au (Sial). Die Belichtungszeit betrug 40 Sekunden.

Abbildung 4.3 A entspricht Abbildung 4.2 A und zeigt den Verdau mit verschiedenen O-Glykosidasen. Zunächst wurde der Verdau im Weiteren mit Sialidase-Au und O-Glykosidase durchgeführt (Abb. 4.3 B). Die Bande nach

Verdau der O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratseitenketten (Abb. 4.3 B, Spur 3) stellt sich verglichen mit den Banden in Abbildung 4.3 A (Abb. 4.3, Spuren 4 und 7) schärfer dar. Die verwendeten Glykosidasen trennen Sialinsäuren (Sialidase-Au) und O-Glykane (O-Glykosidase) vollständig ab. Im zweiten Schritt wurde nur mit Sialidase-Au verdaut (Abb. 4.3 C). Es zeigte sich keine Änderung des Bandenmusters. Daher wurde für die endgültige Methodik der Verdau mit PNGase-F und Sialidase-Au etabliert. So entstehen scharfe, gut abgrenzbare Banden. Damit lässt die Methodik eine Aussage über N-glykosidisch gebundene Kohlenhydratseitenketten (Verdau mit PNGase-F) und Sialinsäuren (Verdau mit Sialidase-Au) zu. Weitere Vorversuche wurden zunächst aber noch mit der Kombination von Sialidase-Au und O-Glykosidase durchgeführt.

4.1.4 Proteolytische Aktivität ist kein Störfaktor für Methodik

Neben der Glykosylierung können weitere posttranslationale Modifikationen ursächlich für unterschiedliche Bandenmuster sein. Deshalb wurde überprüft, ob proteolytische Aktivität die bisher etablierte Methodik beeinflusst. Dies wird in Abbildung 4.4 dargestellt.

Die Abbildung zeigt die Untersuchung einer CSF-Probe mit und ohne Zugabe von Protease-Inhibitor (*cOmplete™ Mini EDTA free*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland; 10fach konzentriert). In den Spuren 2 bis 4 ist der Verdau mit Zugabe von Protease-Inhibitor dargestellt. In den Spuren 5 bis 7 wurde dieselbe CSF-Probe ohne Protease-Inhibitor verdaut. Vergleicht man die Höhe der Banden nach PNGase-F-Verdau in den Spuren 3 und 6, so zeigt sich kein Unterschied. Bei beiden Ansätzen verringert sich das Molekulargewicht von Fetuin-A in gleicher Weise. Dies gilt ebenfalls für den Verdau mit Sialidase-Au und O-Glykosidase in den Spuren 4 und 7. Allerdings stellen sich die Banden in diesen Spuren unschärfer dar.

Es zeigt sich kein Unterschied bei der Zugabe von Protease-Inhibitor zum Verdau-Ansatz. Allerdings kann es bei Erkrankungen zu einer vermehrten proteolytischen Aktivität kommen. Dies ist für Fetuin-A für den Zustand der Sepsis beschrieben (Nawratil et al. 1996). Um diesen Störfaktor auszuschließen, wurde der Protease-Inhibitor für den endgültigen Versuchsansatz hinzugefügt.

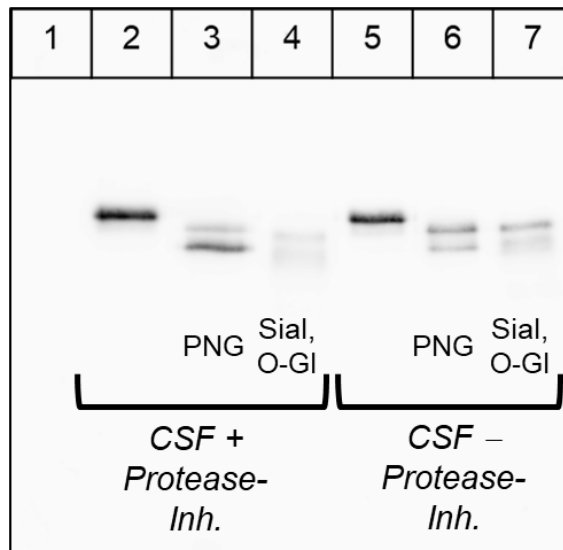


Abbildung 4.4 Vergleich des Verdau mit verschiedenen Glykosidasen mit und ohne Zugabe von Protease-Inhibitor.

Die Abbildung zeigt den Verdau von Fetuin-A in einer CSF-Probe mit und ohne Protease-Inhibitor. In den Spuren 2 bis 4 ist der Verdau mit Zugabe von Protease-Inhibitor (CSF + Protease-Inh.) dargestellt, in den Spuren 5 bis 7 ohne Zugabe von Protease-Inhibitor (CSF – Protease-Inh.). Dabei wurde die Probe mit PNGase-F (PNG) (Spuren 3 und 6) sowie Sialidase-Au (Sial) und O-Glykosidase (O-Gl) (Spuren 4 und 7) verdaut. Die Spuren 2 und 5 zeigen das unverdaute Fetuin-A. Die Belichtungszeit betrug 60 Sekunden.

4.1.5 Phosphorylierung ist kein Störfaktor für Methodik

Als weiterer Schritt wurde die Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation und mögliche Ursache für das veränderte Laufverhalten in der SDS-PAGE untersucht. Dazu wurden Proben sowohl auf ein 10%-Polyacrylamid-Gel als auch auf ein *Phos-tag*TM-Gel (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland), aufgetragen. In letzterem sind positiv-geladene Ionen (Zink²⁺ oder Mangan²⁺) in einem sogenannten *Phos-tag*TM integriert, welches in der Lage ist, Phosphat-Gruppen zu binden. Dieses Molekül wird in ein Polyacrylamid-Gel eingebaut. Phosphat-Reste binden an den *Phos-tag*TM und stärker phosphorylierte Proteine laufen langsamer durch das Gel. So ist eine Auftrennung anhand des Phosphorylierungsgrades möglich.

Um Phosphorylierung als Störfaktor auszuschließen, wurde eine Serum-Probe zusätzlich zum Verdau mit Glykosidasen auch mit alkalischer Phosphatase (bovin, 0,151 U/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verdaut. Diese Proben wurden

auf ein 10%-Polyacrylamid- (Abb. 4.5 A) und auf ein *Phos-tag*TM-Gel (Abb. 4.5 B) aufgetragen.

Zunächst wurde der Glykosidasen-Verdau über Nacht durchgeführt, anschließend wurde alkalische Phosphatase zum Versuchsansatz hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Für Abbildung 4.5 C wurde Serum nur mit alkalischer Phosphatase für eine Stunde bei 37 °C verdaut und auf ein 10%-Polyacrylamid-Gel ohne *Phos-tag*TM aufgetragen.

Vergleicht man im Teil A der Abbildung 4.5 die Spuren 1 und 5, zeigt sich kein Unterschied in der Höhe der Banden. In Spur 1 wird das unverdaute Fetuin-A dargestellt. Es zeigt sich eine Doppelbande, die nach Verdau mit PNGase-F (Abb. 4.5 A, Spur 2) und nach Verdau mit alkalischer Phosphatase (Abb. 4.5 A, Spur 5) weiterhin sichtbar ist. Im Gegensatz zu Teil A der Abbildung sieht man im *Phos-tag*TM-Gel weitere Unterschiede, da dieses auch nach Phosphorylierungsgrad auftrennt. Allerdings ist hier einschränkend zu sagen, dass die Methodik der Untersuchung mit *Phos-tag*TM-Gelen nicht vollständig etabliert ist. So wäre nach dem Verdau mit alkalischer Phosphatase (Abb. 4.5 B, Spur 5) nur eine einzelne Bande zu erwarten, da durch den Verdau alle Phosphat-Reste abgetrennt wurden.

Entscheidend für die hier etablierte Methodik zur Untersuchung der Glykane ist, dass sich eine differentielle Phosphorylierung nicht im 10%-Polyacrylamid-Gel zeigt. Dies wurde in Abbildung 4.5 A bereits gezeigt. In Abbildung 4.5 C wurde dies für vier weitere Serumproben überprüft. Es wurde untersucht, ob der Verdau mit alkalischer Phosphatase, ähnlich wie der Verdau mit Glykosidasen, im 10%-Polyacrylamid-Gel ohne *Phos-tag*TM als Veränderung des Molekulargewichts sichtbar ist. Dabei werden unverdaute und verdaute Probe desselben Patienten direkt nebeneinander dargestellt. Innerhalb dieser Bandenpaare sind keine Unterschiede sichtbar. Der Verdau mit alkalischer Phosphatase lässt sich im 10%-Polyacrylamid-Gel ohne *Phos-tag*TM nicht darstellen.

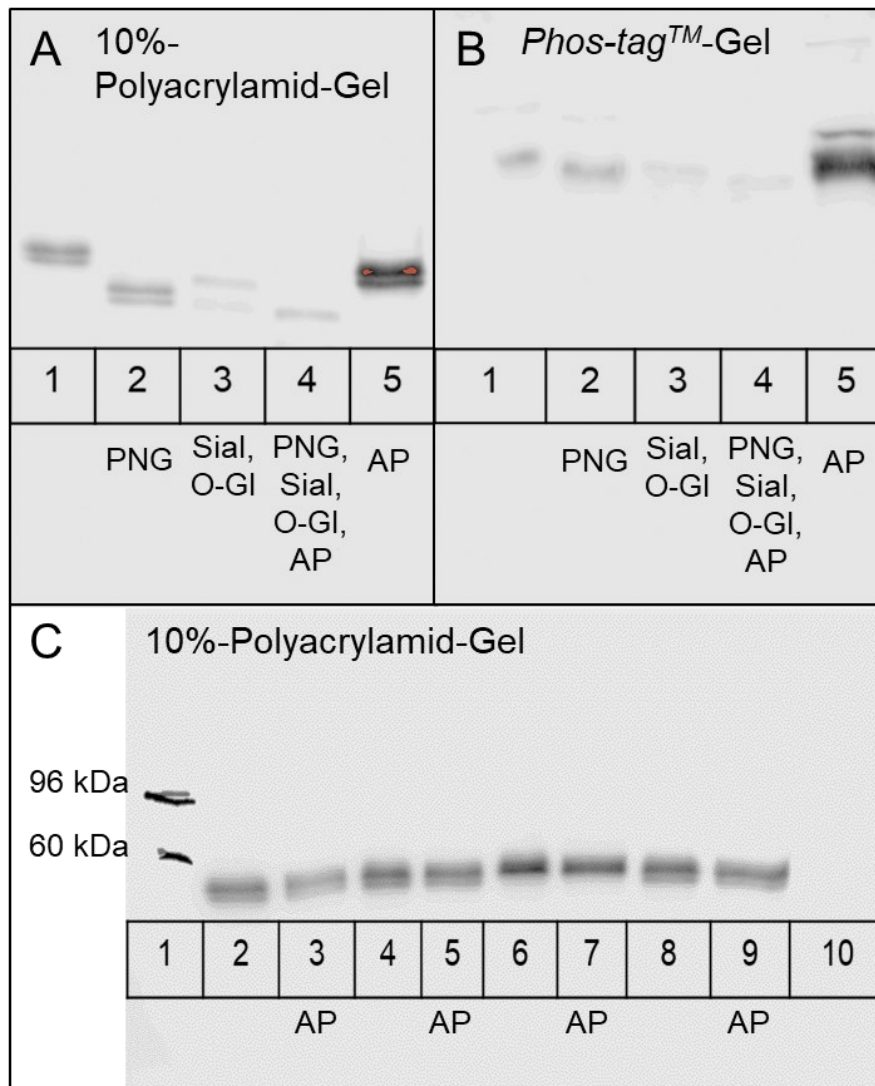


Abbildung 4.5 Verdau mit Glykosidasen und alkalischer Phosphatase.

A zeigt den Verdau einer Serum-Probe im 10%-Polyacrylamid-Gel. In Spur 1 ist das unverdaute Fetuin-A dargestellt. Spur 2 zeigt den Verdau mit PNGase-F (PNG), Spur 3 den Verdau mit Sialidase-Au (Sial) und O-Glykosidase (O-Gl), Spur 4 den Verdau mit PNGase-F (PNG), Sialidase-Au (Sial), O-Glykosidase (O-Gl) und alkalischer Phosphatase (AP), Spur 5 zeigt den Verdau nur mit alkalischer Phosphatase (AP). Die Belichtungszeit betrug 30 Sekunden, der Kontrast wurde mit PowerPoint bearbeitet. **B** zeigt den Verdau der gleichen Serum-Probe im Phos-tag™-Gel. Die Reihenfolge der Spuren entspricht der Reihenfolge in Teil A. Die Belichtungszeit betrug 20 Sekunden, der Kontrast wurde mit PowerPoint verstärkt. **C** zeigt den Verdau mit alkalischer Phosphatase (AP) von 4 Serum-Proben im 10%-Polyacrylamid-Gel ohne Phos-tag™. In Spur 1 ist ein Größenmarker aufgetragen. Die Spuren 2, 4, 6 und 8 zeigen die unverdaunten Proben, in der jeweils daneben liegenden Spur (3, 5, 7, 9) ist die jeweils selbe Serum-Probe nach Verdau mit alkalischer Phosphatase dargestellt. Die Belichtungszeit betrug 60 Sekunden, der Kontrast wurde mit PowerPoint erhöht.

4 Ergebnisse

4.1.6 Albumin wird nicht als stabilisierender Faktor für Verdau im CSF benötigt

Es traten zunächst Unterschiede zwischen Serum- und CSF-Proben auf. Als mögliche Ursachen wurden Substanzen in Betracht gezogen, die den Verdau im Serum positiv beeinflussen und im CSF in geringerer Konzentration vorhanden sind. Das am höchsten konzentrierte Protein im Serum ist Albumin, welches im CSF in deutlich niedrigerer Konzentration vorliegt. Es wird ausschließlich in der Leber produziert, kann aber ins ZNS einströmen (Reiber 2003). Um Albumin als möglichen beeinflussenden Faktor des Verdau durch Glykosidasen zu untersuchen, wurde eine CSF-Probe geteilt und zu einem Teil Humanalbumin hinzugegeben. Dies ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

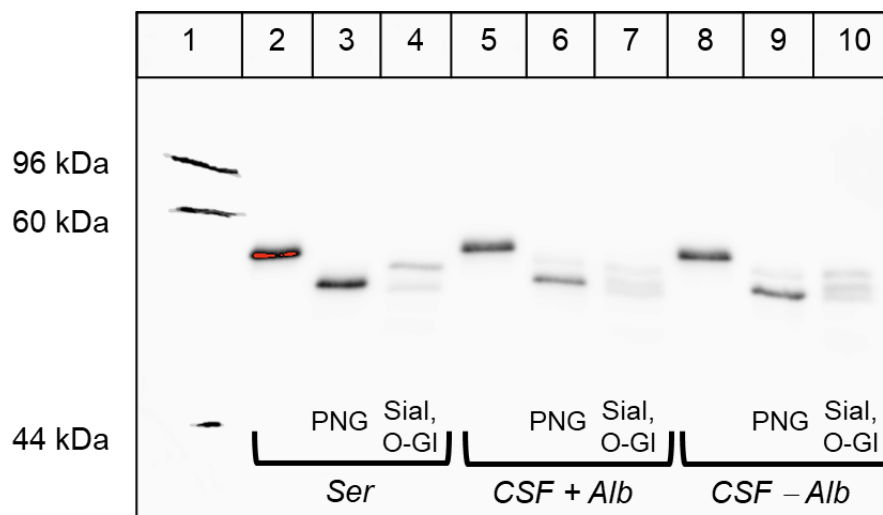


Abbildung 4.6 Glykosidasen-Verdau mit Zugabe von Humanalbumin in den CSF.

In Spur 1 ist der Größenmarker aufgetragen. Die Spuren 2 bis 5 zeigen den Verdau im Serum (Ser), in den Spuren 5 bis 7 ist der Verdau im CSF mit Zugabe von Humanalbumin (CSF + Alb), in den Spuren 8 bis 10 der Verdau im CSF ohne Zugabe von Humanalbumin (CSF - Alb) dargestellt. Die Proben in den Spuren 5 bis 10 stammen von einer CSF-Probe. Die Spuren 2, 5 und 8 zeigen das unverdaute Fetuin-A, in den Spuren 3, 6 und 9 wurden die Proben mit PNGase-F (PNG) verdaut. In den Spuren 4, 7 und 10 wurden die Proben mit Sialidase-Au (Sial) und O-Glykosidase (O-GI) verdaut. Die Belichtungszeit betrug 40 Sekunden.

Die Spuren, die mit den gleichen Glykosidasen verdaut wurden, zeigen keine Unterschiede. Die unverdauten Proben in den Spuren 5 und 8 zeigen das gleiche Laufverhalten nach Zugabe von Albumin. Auch die mit PNGase-F verdauten Proben zeigen keine Unterschiede in der Höhe der Banden (Abb. 4.6, Spuren 6

und 9), gleiches gilt nach Verdau der Probe mit Sialidase-Au und O-Glykosidase (Abb. 4.6, Spuren 7 und 10). In dieser Abbildung sind aber Unterschiede zwischen Serum-Probe (Abb. 4.6, Spuren 2 - 5) und den CSF-Proben (Abb. 4.6, Spuren 5 - 10) sichtbar. Beim Verdau der CSF-Proben stellt sich eine deutliche Unschärfe dar.

4.1.7 Verdau von fluoreszierendem bovinen Fetuin-A in Serum und CSF zeigt keine Unterschiede zum humanen Fetuin-A

Aufgrund der vermehrten Unschärfe beim Verdau im CSF wurde untersucht, ob das im CSF vorliegende humane Fetuin-A selbst ursächlich für die Unterschiede im Glykosidasen-Verdau sein kann. Um dies zu untersuchen, wurde fluoreszierendes bovines Fetuin-A (AT 0488, AG Jahnen-Dechent) in Serum und CSF gegeben, die Proben anschließend verdaut und der Verdau im Zeitverlauf dargestellt. Die Gele der SDS-PAGE wurden zunächst mit einem Flachbett-Fluoreszenz-Scanner (*Typhoon*, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) analysiert, der nur das fluoreszierende bovine Fetuin-A, nicht aber das humane Fetuin-A darstellt. Nach dieser Messung erfolgte der Western Blot mit Immunodetektion, entsprechend der vorher verwendeten Methodik. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

Es fällt auf, dass der Verdau mit PNGase-F eine größere Verlängerung der Laufstrecke erzeugt als der Verdau mit Sialidase-Au und O-Glykosidase, passend zum höheren Molekulargewicht der N-Glykane. Der Verdau mit PNGase-F läuft zudem schneller ab. Bereits nach einer Minute ist ein Masseverlust sichtbar, v.a. in der Serum-Probe (Abb. 4.7 A und C, Spur 7). Zwischen den Banden in der Messung mit *Typhoon*-Scanner (Abb. 4.7 A und B), die das fluoreszierende bovine Fetuin-A darstellen, und den Banden nach Western Blot (Abb. 4.7 C und D), die das humane Fetuin-A darstellen, sind keine Unterschiede sichtbar. Dennoch schien der Verdau im Serum besser abzulaufen als im CSF.

Nach Anpassung der Reaktionspuffer-Konzentration im Versuchsansatz zeigten sich keine Unterschiede zwischen Serum und CSF mehr. Die endgültige Methodik ergab sich aus den hier beschriebenen Vorversuchen. Sie ist in Kapitel 3.2 dargestellt.

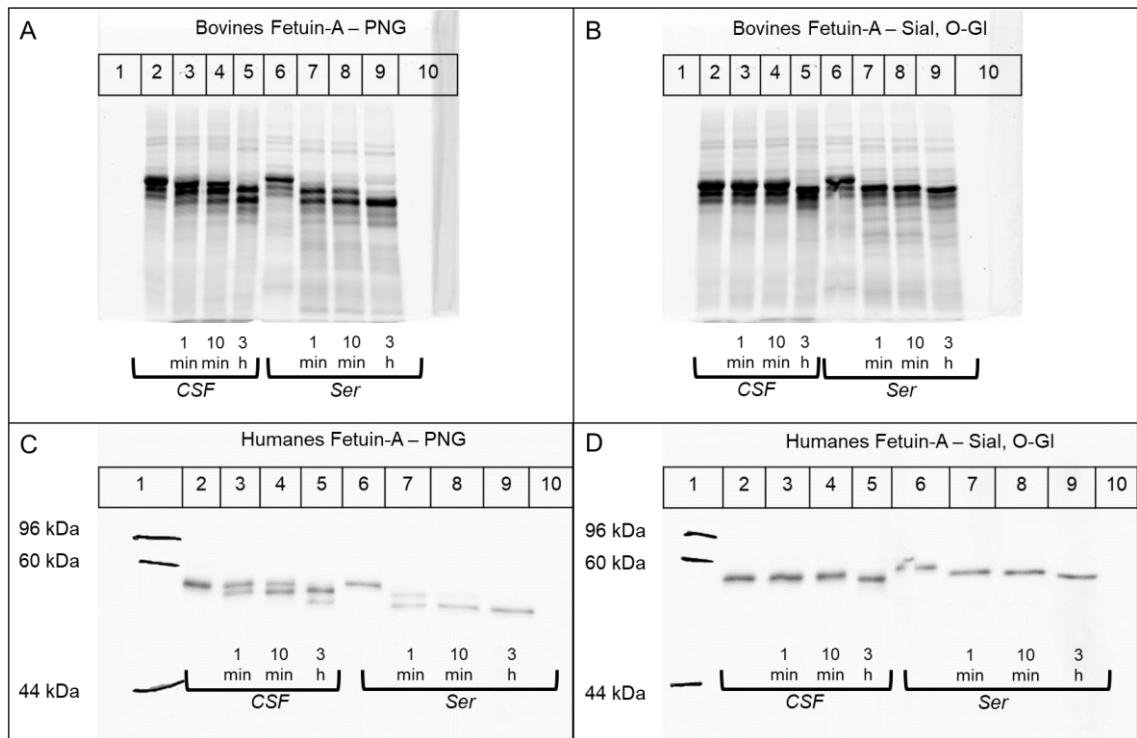


Abbildung 4.7 Verdau von Serum- und CSF-Probe mit Zugabe von fluoreszierendem bovinem Fetuin-A (AT 0488).

A und B zeigen den Verdau des fluoreszierenden bovines Fetuin-A in CSF und Serum (Ser), auf den mit dem Fluoreszenz-Scanner analysierten SDS-PAGE-Gelen. **A** zeigt den Verdau mit PNGase-F (PNG) in CSF (Spuren 2 bis 5) und Serum (Ser, Spuren 6 bis 10). In den Spuren 2 und 6 ist unverdautes Fetuin-A dargestellt, die Spuren 3 und 7 zeigen den Verdau nach 1 Minute (1 min), die Spuren 4 und 8 nach 10 Minuten (10 min) und die Spuren 5 und 9 nach 3 Stunden (3 h). In Teil **B** ist der Verdau mit Sialidase-Au (Sial) und O-Glykosidase (O-Gl) in CSF (Spuren 2 bis 5) und Serum (Ser, Spuren 6 bis 10) dargestellt. Die Spuren 2 und 6 zeigen unverdautes Fetuin-A, die Spuren 3 und 7 den Verdau nach 1 Minute (1 min), die Spuren 4 und 8 nach 10 Minuten (10 min) und die Spuren 5 und 9 nach 3 Stunden (3 h). Die Teile **C** und **D** zeigen den Verdau der gleichen Proben nach Western Blot und Immunodetektion und stellen das humane Fetuin-A dar. In Spur 1 ist ein Größenmarker eingezeichnet. **C** zeigt den Verdau mit PNGase-F (PNG) in CSF (Spuren 2 bis 5) und Serum (Spuren 6 bis 10). In den Spuren 2 und 6 ist unverdautes Fetuin-A dargestellt, die Spuren 3 und 7 zeigen den Verdau nach 1 Minute (1 min), die Spuren 4 und 8 nach 10 Minuten (10 min) und die Spuren 5 und 9 nach 3 Stunden (3 h). **D** zeigt den Verdau des humanen Fetuin-A mit Sialidase-Au (Sial) und O-Glykosidase (O-Gl) in CSF (Spuren 2 bis 5) und Serum (Ser, Spuren 6 bis 10) dargestellt. Die Spuren 2 und 6 zeigen unverdautes Fetuin-A, die Spuren 3 und 7 den Verdau nach 1 Minute (1 min), die Spuren 4 und 8 nach 10 Minuten (10 min) und die Spuren 5 und 9 nach 3 Stunden (3 h). Die Belichtungszeit betrug bei C und D jeweils 50 Sekunden.

4.2 Glykosylierung von Fetuin-A

Die etablierte Methodik (siehe Kap. 3.2) wurde an 23 Serum- und CSF-Paaren angewendet, um die Glykosylierung von Fetuin-A zu untersuchen. Dabei wurden zwei Gruppen gebildet: Eine Kontrollgruppe (n = 10) sowie eine Gruppe von Proben von Patienten im Kindes- und Jugendalter mit inflammatorischen und infektiösen Erkrankungen des Nervensystems (n = 13). Es waren Patienten mit Akuter Disseminierter Enzephalomyelitis (n = 2), MS (n = 4), Neuroborreliose (n = 5), Subakut Sklerosierender Panenzephalitis (n = 1) und *Herpes-simplex*-Enzephalitis (n = 1) (vgl. Tab. 3.4).

4.2.1 Asialofetuin-A tritt bei inflammatorischen neurologischen Erkrankungen vermehrt auf

Während der Vorversuche zur Etablierung der Methodik zeigten sich Doppelbanden im Western Blot. Dies lässt darauf schließen, dass es zwei Formen von Fetuin-A gibt, die ein unterschiedliches Molekulargewicht haben.

In Abbildung 4.8 wird gezeigt, dass sich diese Doppelbanden sowohl in unverdauten Proben als auch nach Verdau mit PNGase-F darstellen. Eine differentielle N-Glykosylierung ist daher nicht für die Banden ursächlich. Dies ist sowohl im Serum als auch im CSF der Fall (Abb. 4.8 A und B, Spuren 5 und 6). Nach Verdau mit Sialidase-Au zeigt sich hingegen keine Doppelbande mehr. Dies deutet darauf hin, dass eine differentielle Sialylierung für die Doppelbande ursächlich ist. Die zusätzlich vorhandene Bande der Doppelbande entspricht demnach einer vermindert sialylierten Form von Fetuin-A oder Asialofetuin-A. Dies zeigt Abbildung 4.8 C schematisch. Im Anhang ist eine Überblicksdarstellung von neun weiteren Serum- und CSF-Paaren dargestellt (Abb. 8.2), in denen sich zum Teil Doppelbanden zeigen.

Es zeigten sich bei CSF- und Serum-Proben des jeweils selben Patienten identische Sialylierungsmuster. Im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Gruppe mit entzündlichen neurologischen Erkrankungen traten Doppelbanden signifikant häufiger bei Vorliegen einer entzündlichen Erkrankung (9 von 13) als in der Kontrollgruppe (2 von 10) (Fisher-Exact Test; $p = 0,036$) auf.

4.2.2 Fetuin-A besitzt zwei N-Glykosylierungsstellen

Die von Yoshioka beschriebenen zwei N-Glykosylierungsstellen konnten hier ebenfalls nachgewiesen werden (Yoshioka et al. 1986). Dazu wurde der PNGase-F-Verdau im Zeitverlauf betrachtet. Es wurden nach einer Minute, zehn Minuten und drei Stunden eine Probe aus dem Versuchsansatz entnommen, mit 6x SDS-Probenpuffer gemischt und für fünf Minuten bei 96 °C denaturiert. In Abbildung 4.9 ist dies in Serum (Abb. 4.9 A), CSF (Abb. 4.9 B) sowie schematisch (Abb. 4.9 C) dargestellt.

In Spur 1 zeigt sich das unverdaute Fetuin-A mit zwei gebundenen N-Glykanen. Nach der Dauer von einer Minute (Abb. 4.9, Spur 2) zeigen sich drei Banden entsprechend drei verschiedener Glykosylierungsgrade. Die oberste Bande zeigt das vollständig, zweifach N-glykosylierte Protein. Zudem liegt eine partiell verdaute Form vor. Dort ist noch eine der N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratseitenketten an Fetuin-A gebunden. Diese Bande zeigt nach einer Minute die höchste Intensität, sodass davon auszugehen ist, dass das partiell N-glykosylierte Fetuin-A in der höchsten Konzentration vorliegt. Die niedrigste Bande zeigt Fetuin-A ohne gebundene N-Glykane. Nach zehn Minuten des PNGase-F-Verdaus (Abb. 4.9, Spur 3) sind nur noch zwei Banden sichtbar. Die oberste Bande, die zweifach N-glykosyliertem Fetuin-A entspricht, liegt in der Probe nicht mehr vor. Bereits nach zehn Minuten ist das Fetuin-A, das sich in der Probe befindet, zumindest partiell deglykosyliert. Im Gegensatz zum Bandenmuster in Spur 2 zeigt sich nun die unterste Bande als Bande mit der höchsten Intensität. Daraus lässt sich schließen, dass der größte Teil des vorliegenden Fetuin-A bereits nach zehn Minuten vollständig N-deglykosyliert ist. Nach drei Stunden (Abb. 4.9, Spur 4), entsprechend der Verdau-Dauer der etablierten Methodik (vgl. Kap. 3.2), zeigt sich nur eine Bande, die der vollständig N-deglykosylierten Form entspricht. PNGase-F schneidet beide N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratseitenketten des Fetuin-A ab. Bei diesem Versuch zeigten sich ebenfalls Doppelbanden. Die jeweils korrespondierende Bande entspricht daher jeweils einer Sialylierungsvariante von Fetuin-A (vgl. Kap. 4.1.2).

Die unterschiedlichen Intensitäten lassen sich v.a. in der Serum-Probe (Abb. 4.9 A) darstellen. Die Banden des Verdaus im CSF (Abb. 4.9 B) stellen sich unschärfer da.

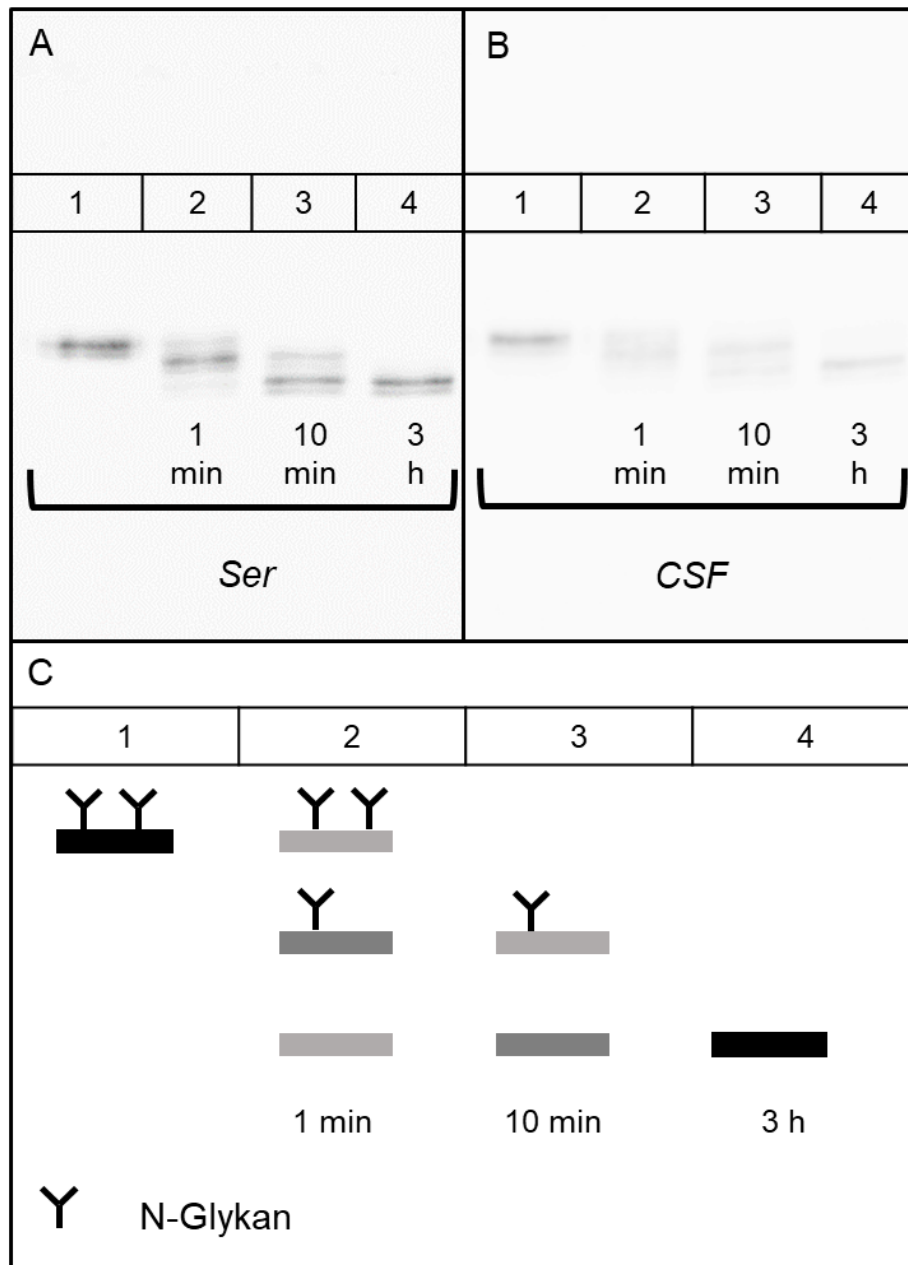


Abbildung 4.9 Verdau von Fetuin-A mit PNGase-F im Zeitverlauf.

Dargestellt ist der PNGase-F-Verdau im Zeitverlauf in Serum (A, Ser), CSF (B) sowie schematisch (C). Spur 1 zeigt das unverdaute Fetuin-A. Die weiteren Spuren zeigen den PNGase-F-Verdau nach 1 Minute (Spur 2), 10 Minuten (Spur 3) und 3 Stunden (Spur 4). Zur Vereinfachung sind in C nur die gebundenen N-Glykane (Y) dargestellt, die bekannten O-Glykane sind nicht dargestellt. Die Grautöne entsprechen den Intensitäten der Banden im Serum-Verdau. Nach 1 Minute (Spur 2) zeigt sich zweifach N-glykosyliertes Fetuin-A (oberste Bande, 2 N-Glykane), einfach N-glykosyliertes Fetuin-A (zweite Bande, 1 N-Glykan, höchste Intensität) und vollständig N-deglykosyliertes Fetuin-A (dritte Bande). Nach 10 Minuten (Spur 3) zeigt sich einfach N-glykosyliertes (obere Bande) und N-deglykosyliertes Fetuin-A (untere Bande). Nach 3 Stunden (Spur 4) zeigt sich nur N-deglykosyliertes Fetuin-A. PNGase-F hat nach 3 Stunden beide N-glykosidisch verbundenen Glykane abgetrennt.

4.3 Fetuin-A-Konzentrationen in Serum und CSF

4.3.1 Vergleich Nephelometrie und ELISA

Die Messung von Serum-Proben mittels Nephelometrie wurde in der Arbeitsgruppe etabliert und wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben durchgeführt. Allerdings zeigte sich, dass eine Messung von CSF-Proben mit dieser Methodik nicht möglich war, da die Sensitivität der Nephelometrie für die niedrigen Fetuin-A-Konzentrationen im CSF zu niedrig war. Daher wurde eine Messung mittels ELISA (siehe Kap. 3.3.1) etabliert. Zunächst wurden die Messwerte der Fetuin-A-Konzentration im Serum aus ELISA und Nephelometrie miteinander verglichen. Abbildung 4.10 A zeigt die Messwerte von 22 Serum-Proben, die parallel mit Nephelometrie und ELISA untersucht wurden. Die in dieser Voruntersuchung verwendeten Proben entsprechen nicht dem eigentlichen Patientenkollektiv.

Die Serum-Proben wurden mittels Nephelometrie zweimal unabhängig voneinander gemessen. Dabei zeigte sich nur eine geringe Abweichung zwischen den Messungen. Aus den Ergebnissen dieser Messungen wurde der Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte sind in den grauen Säulen abgebildet. Die weiße Säule stellt die mit ELISA gemessenen Konzentrationen derselben Proben dar. Die absoluten Messwerte der ELISA-Messung liegen niedriger als die Messwerte der Nephelometrie, weshalb ein direkter Vergleich zwischen Nephelometrie und ELISA nicht möglich ist. Für beide Methoden wurden nicht die gleichen Standards verwendet.

Die Werte aus den ELISA- und Nephelometrie-Messungen korrelieren stark miteinander. Dies ist in Abbildung 4.10 B dargestellt. Der errechnete Korrelationskoeffizient nach Pearson zwischen Mittelwerten der Ergebnisse der nephelometrischen Messungen und der Ergebnisse mit ELISA beträgt $r = 0,936^{**}$. Dies zeigt eine signifikante ($p < 0,01$), starke, positive Korrelation. Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen CSF- und Serum-Proben erfolgten die Messungen von Fetuin-A im weiteren Verlauf mit ELISA.

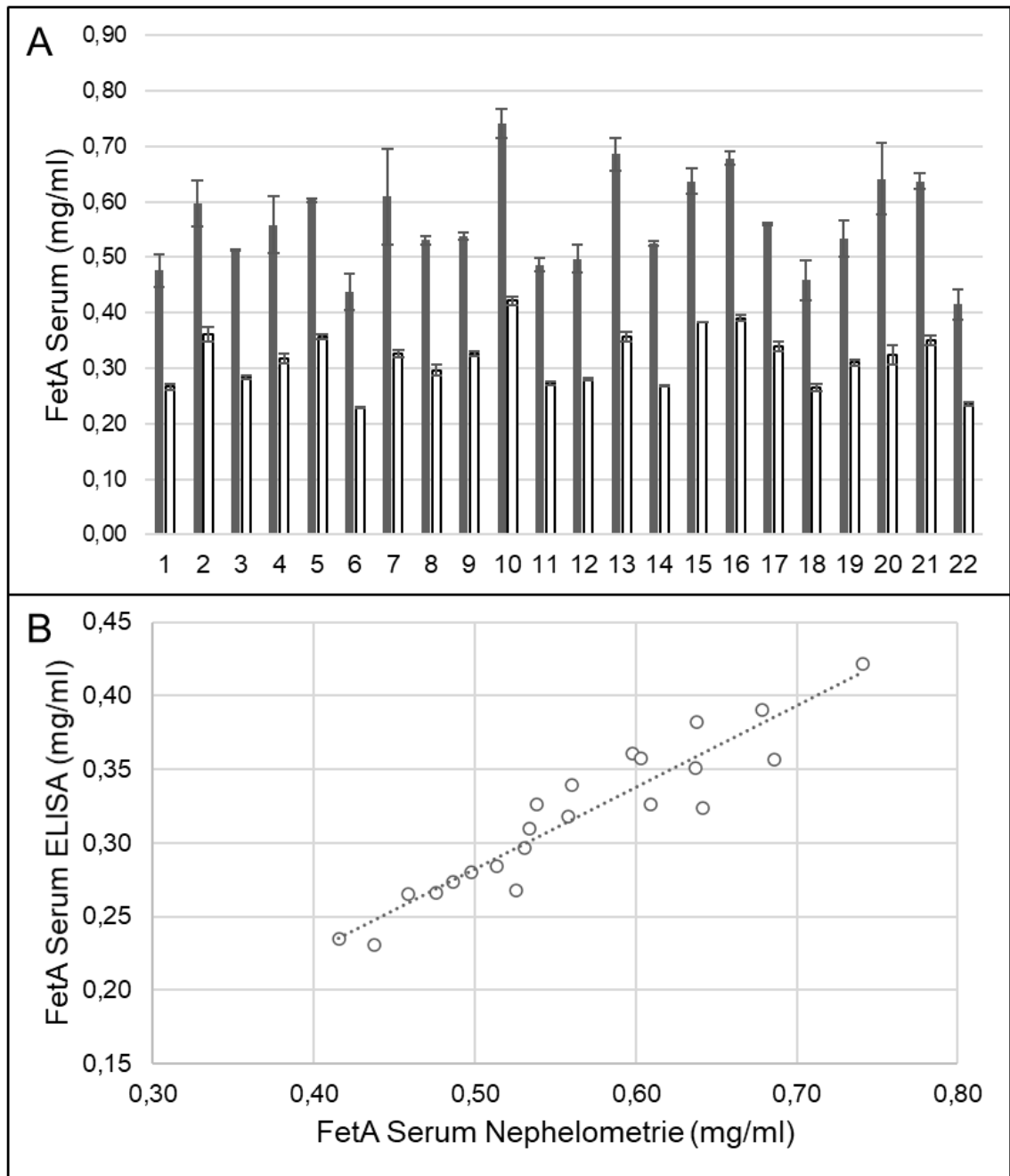


Abbildung 4.10 Vergleich der Fetuin-A-Konzentrationsmessung in Nephelometrie und ELISA.

A stellt die Konzentrationsmessungen von 22 Serum-Proben dar. Die x-Achse zeigt die verschiedenen Proben. Auf der y-Achse ist die Konzentration von Fetuin-A im Serum in mg/ml (FetA Serum mg/ml) dargestellt. Die graue Säule zeigt den Mittelwert zweier unabhängiger Messungen mittels Nephelometrie, die weiße Säule zeigt die Ergebnisse der gleichen Proben der Messung mittels ELISA. Als Indikator ist die Standardabweichung angegeben. **B** zeigt die starke positive Korrelation ($p < 0,01$) zwischen beiden Messmethoden als Streudiagramm. Auf der x-Achse ist die durch Nephelometrie gemessene Fetuin-A-Konzentration im Serum (FetA Serum Nephelometrie mg/ml) dargestellt, auf der y-Achse die durch ELISA gemessene Fetuin-A-Konzentration im Serum (FetA Serum ELISA mg/ml).

4.3.2 Fetuin-A-Konzentration im Serum ist bei inflammatorischer neurologischer Erkrankung und erhöhter CRP-Konzentration erniedrigt

Es wurde zunächst eine multiple lineare Regression mit der Fetuin-A-Konzentration im Serum als abhängige Variable durchgeführt. Die mittlere Fetuin-A-Konzentration in 66 gemessenen Serum-Proben betrug $0,30 \pm 0,06$ mg/ml. Es wurde der Einfluss der Faktoren Alter, C-reaktives Protein (CRP) und Vorliegen einer neurologischen inflammatorischen Erkrankung auf die Fetuin-A-Konzentration im Serum untersucht. Eine CRP-Konzentration > 5 mg/l wurde als erhöht gewertet. Da nicht alle Messwerte der unabhängigen Variablen bei allen Patienten vorlagen, konnten 60 Proben in die Regression einbezogen werden.

Tabelle 4.1 Teststatistik multiple lineare Regression, abhängige Variable Fetuin-A im Serum

Modellzusammenfassung	Adj. R²				
	0,215				
ANOVA	ΔF (2,57)	p			
	9,06	p < 0,001			
Modell	B*	Beta**	Sign.	CI für B (untere Grenze)	CI für B (obere Grenze)
CRP < 5 mg/l / > 5mg/l	-0,069	-0,386	0,001	-0.110	-0,028
Entzündliche neurol. Erkrankung?	-0,041	-0.330	0,006	-0,070	-0,012

* nicht-standardisierter Koeffizient; ** standardisierter Koeffizient

Im Modell der multiplen linearen Regression zeigt sich, dass eine erhöhte CRP-Konzentration und das Vorliegen einer entzündlichen neurologischen Erkrankung einen signifikanten negativen Einfluss auf die Fetuin-A-Konzentration im Serum

haben. Eine Erhöhung der CRP-Konzentration geht mit einem Absinken der Fetuin-A-Konzentration im Serum einher. Auch bei Vorliegen einer entzündlichen neurologischen Erkrankung zeigt sich eine erniedrigte Fetuin-A-Konzentration im Serum. Die Teststatistik ist in Tabelle 4.1 dargestellt. Es zeigt sich ein korrigiertes R^2 von 0,21. Dies entspricht nach Cohen einem mittleren Effekt (Cohen 1992). Die Abbildung 4.11 zeigt die Konzentration von Fetuin-A im Serum im Bezug zu entzündlichen neurologischen Erkrankungen (Abb. 4.11 A) und zur CRP-Konzentration (Abb. 4.11 B), dargestellt als Boxplots.

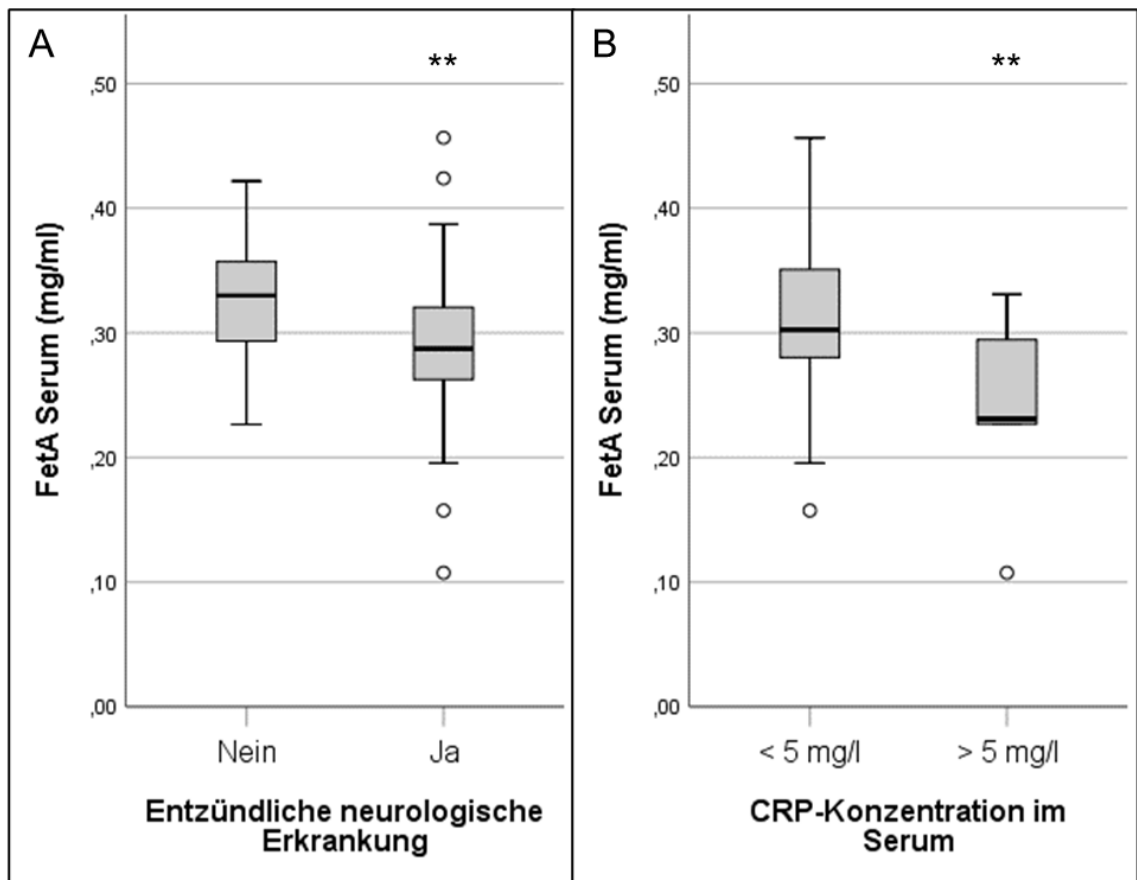


Abbildung 4.11 Fetuin-A-Konzentration im Serum in Abhängigkeit von entzündlicher neurologischer Erkrankung und erhöhter CRP-Konzentration.

A zeigt die Fetuin-A-Konzentration im Serum (FetA Serum in mg/ml) in Abhängigkeit vom Vorliegen einer entzündlichen neurologischen Erkrankung. Bei Vorliegen einer entzündlichen neurologischen Erkrankung zeigt sich die Fetuin-A-Konzentration im Serum signifikant erniedrigt ($p < 0,01$). **B** zeigt die Fetuin-A-Konzentration im Serum (FetA Serum in mg/ml) in Abhängigkeit von der CRP-Konzentration. Bei einer erhöhten CRP-Konzentration > 5 mg/l zeigt sich eine signifikant erniedrigte Fetuin-A-Konzentration im Serum ($p < 0,01$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4 Ergebnisse

4.3.3 Fetuin-A-Konzentration im CSF ist bei Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung erhöht und bei erhöhter CRP-Konzentration erniedrigt

Für die Fetuin-A-Konzentration im CSF wurde analog zur Auswertung der Fetuin-A-Konzentration im Serum eine multiple lineare Regression durchgeführt. Der Mittelwert der Fetuin-A-Konzentration im CSF betrug $0,66 \pm 0,68 \mu\text{g/ml}$ in den 66 gemessenen CSF-Proben. Verglichen mit den Serum-Konzentrationen von Fetuin-A ($0,30 \pm 0,06 \text{ mg/ml}$) zeigen sich die CSF-Konzentrationen um den Faktor 500-1000 niedriger als im Serum. Dies ist am ehesten ursächlich für die hohe Schwankung der Fetuin-A-Konzentrationen im CSF. In der multiplen linearen Regression konnten 49 von 66 Proben einbezogen werden, da für diese Anzahl an Proben alle einbezogenen Variablen vorhanden waren. Die Zahl der Einflussfaktoren wurde um das Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung sowie intrathekalen IgG-Synthese erweitert. Von einer Blut-Liquor-Schrankenstörung wurde bei einem Albumin-Quotienten $Q_{\text{Alb}} > 5 \times 10^{-3}$ (Alter ≤ 15 Jahre) bzw. $Q_{\text{Alb}} > 6,5 \times 10^{-3}$ (Alter > 15 Jahre) ausgegangen.

Tabelle 4.2 Teststatistik multiple lineare Regression, abhängige Variable Fetuin-A im CSF

Modellzusammenfassung	Adj. R ²				
	0,41				
ANOVA	ΔF (2,44)	p			
	17,003	p < 0,001			
Modell	B*	Beta**	Sign.	CI für B (untere Grenze)	CI für B (obere Grenze)
Blut-Liquor-Schrankenstörung?	1,220	0,736	0,000	0,792	1,648
CRP < 5 mg/l / > 5mg/l	-0,889	-0,459	0,001	-1,389	-0,388

* nicht-standardisierter Koeffizient; ** standardisierter Koeffizient

In der multiplen linearen Regression zeigte sich, dass zwei der untersuchten Faktoren Einfluss auf die Fetuin-A-Konzentration im CSF haben. Diese sind in Abbildung 4.12 dargestellt. Die Teststatistik zeigt Tabelle 4.2 mit einem

korrigierten R^2 von 0,41. Dies entspricht laut Cohen einem starken Effekt. Bei Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung ist die Konzentration von Fetuin-A im CSF erhöht (Abb. 4.12 A). Zusätzlich beeinflusst die CRP-Konzentration die Fetuin-A-Konzentration im CSF. Bei einer erhöhten CRP-Konzentration > 5 mg/l ist die Fetuin-A-Konzentration im CSF erniedrigt (Abb. 4.12 B). Der Einfluss der CRP-Konzentration auf die Fetuin-A-Konzentration im CSF ist geringer als auf die Fetuin-A-Konzentration im Serum. Die untersuchten Faktoren Alter, Entzündung und intrathekale IgG-Synthese haben in dieser Stichprobe keinen Einfluss auf die Fetuin-A-Konzentration im CSF.

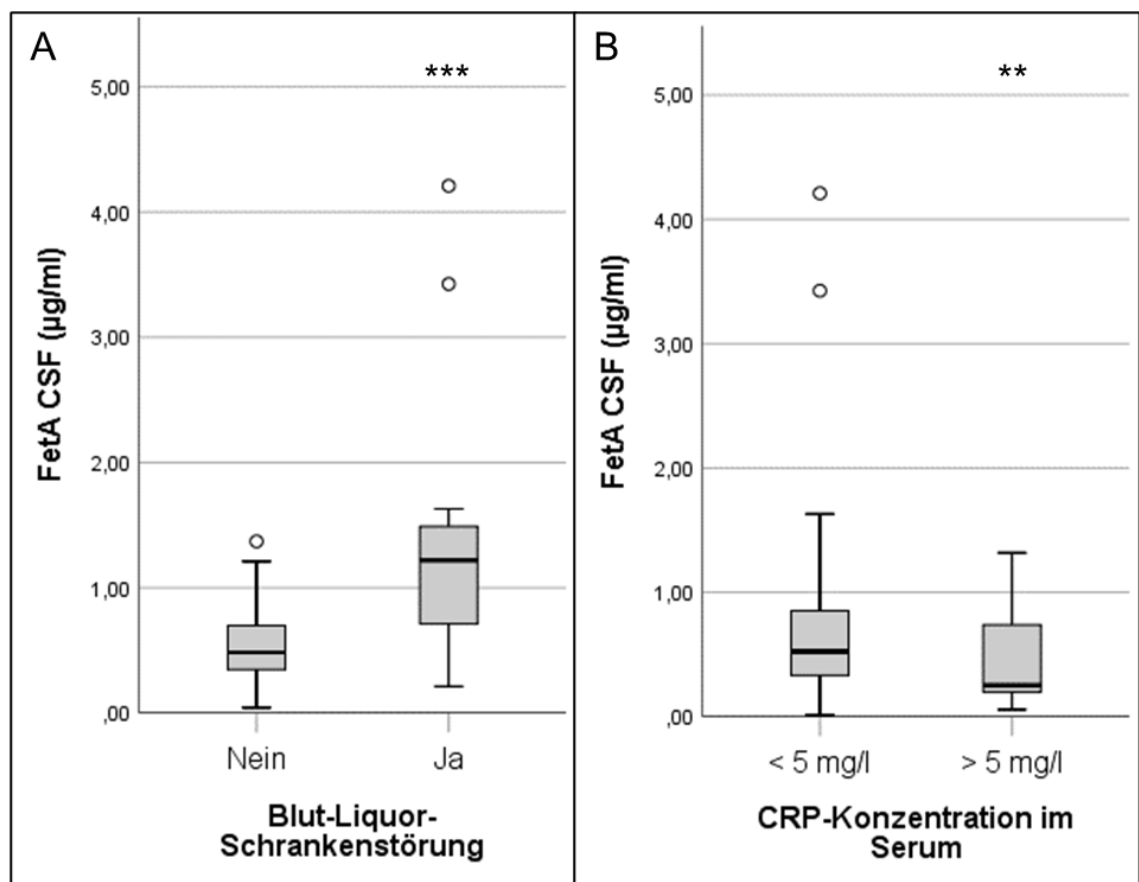


Abbildung 4.12 Fetuin-A-Konzentration im CSF in Abhängigkeit von Blut-Liquor-Schrankenstörung und CRP-Konzentration.

A stellt die Fetuin-A-Konzentration im CSF (FetA CSF in µg/ml) abhängig vom Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung dar. Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Fetuin-A-Konzentration im CSF bei Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung ($p < 0,001$). **B** stellt die Fetuin-A-Konzentration im CSF in Abhängigkeit von der CRP-Konzentration dar. Es zeigt sich eine signifikant verringerte Fetuin-A-Konzentration im CSF bei erhöhtem CRP-Wert ($p < 0,01$).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4 Untersuchung der Fetuin-A / Gesamtprotein-Quotienten in Serum und CSF und des Fetuin-A im CSF/Fetuin-A im Serum-Quotienten

4.4.1 Fetuin-A im Serum/Serum-Gesamtprotein-Quotient (FetA i.S./Prot. i.S.) ist bei Vorliegen intrathekaler IgG-Synthese und bei Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung erniedrigt

Neben den absoluten Fetuin-A-Konzentrationen in Serum und CSF wurden auch die Fetuin-A / Gesamtprotein-Quotienten in beiden Kompartimenten untersucht. Bei der Untersuchung des Fetuin-A im Serum/Serum-Gesamtprotein-Quotienten (FetA i.S./Prot. i.S.) wurde eine multiple lineare Regression mit den unabhängigen Variablen inflammatorische neurologische Erkrankung, Alter, CRP, intrathekale IgG-Synthese und Blut-Liquor-Schrankenstörung durchgeführt. Es konnten 49 Proben einbezogen werden.

Die multiple lineare Korrelation zeigte erniedrigte FetA i.S./Prot. i.S.-Quotienten bei Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung (Abb. 4.13 A) sowie bei Vorliegen einer intrathekalen IgG-Synthese (Abb. 4.13 B). Der Anteil von Fetuin-A am Gesamtserumprotein war dann kleiner. Es errechnete sich ein korrigiertes R^2 von 0,257 (Tab. 4.3). Graphisch sind die Zusammenhänge in Abbildung 4.13 dargestellt.

Tabelle 4.3 Teststatistik multiple lineare Regression, abhängige Variable FetA i.S./Prot. i.S.-Quotient

Modellzusammenfassung	Adj. R^2				
		0,257			
ANOVA	ΔF (2,44)	p			
	8,946	p = 0,001			
Modell	B*	Beta**	Sign.	CI für B (untere Grenze)	CI für B (obere Grenze)
Blut-Liquor-Schrankenstörung?	-0,001	-0,372	0,005	-0,001	0,000
Intrathekale IgG-Synthese?	-0,001	-0,369	0,006	-0,001	0,000

* nicht-standardisierter Koeffizient; ** standardisierter Koeffizient

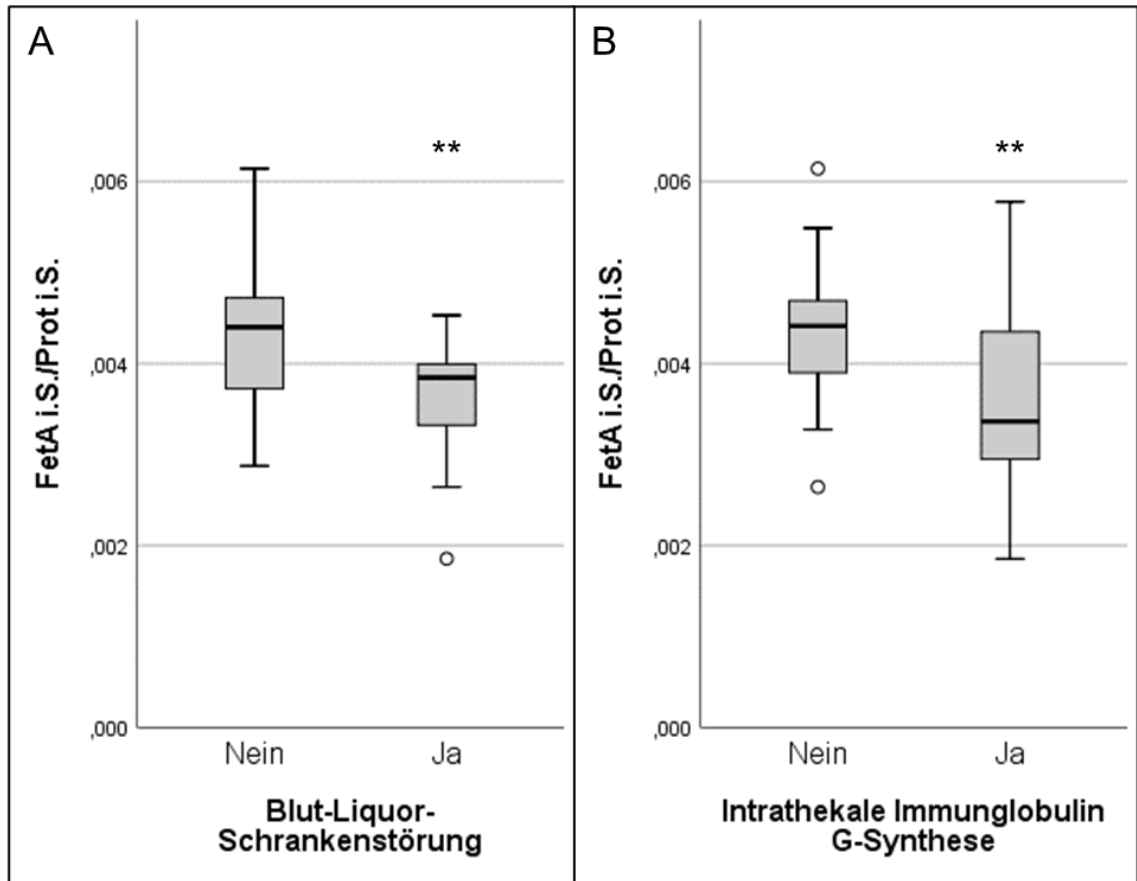


Abbildung 4.13 Fetuin-A/Serum-Gesamtprotein-Quotient in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung und Vorliegen einer intrathekalen IgG-Synthese.

Abbildung 4.13 zeigt den Fetuin-A/Serum-Gesamtprotein-Quotient (FetA i.S./Prot. i.S.), dargestellt als Boxplot, in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung (A) sowie einer intrathekalen IgG-Synthese (B). A zeigt einen signifikant erniedrigten FetA i.S./Prot. i.S.-Quotienten bei Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung ($p < 0,01$). B zeigt einen signifikant erniedrigten FetA i.S./Prot. i.S.-Quotienten bei Vorliegen einer intrathekalen IgG-Synthese ($p < 0,01$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.2 Fetuin-A im CSF/CSF-Gesamtprotein-Quotient (FetA i.CSF/Prot. i.CSF) steigt mit zunehmendem Alter

Analog zum Serum wurde im CSF ein Quotient zwischen Fetuin-A-Konzentration im CSF und Gesamteiproteinkonzentration im CSF (FetA i.CSF/Prot. i.CSF - Quotient) gebildet. Es wurden 49 Proben in die Berechnung einbezogen. Die unabhängigen Variablen entsprechen den Variablen aus der Untersuchung des Fetuin-A im Serum/Gesamtserumprotein-Quotienten.

4 Ergebnisse

Die multiple lineare Regression zeigte eine positive Korrelation zwischen Alter und FetA i.CSF/Prot. i.CSF -Quotient. In der Teststatistik ergibt sich ein korrigiertes R^2 von 0,174 (Tab. 4.4). Der Anteil von Fetuin-A im CSF am Gesamtliquorprotein nimmt mit dem Alter zu. Dies ist in Abbildung 4.14 dargestellt.

Tabelle 4.4 Teststatistik multiple lineare Regression, abhängige Variable FetA i.CSF/Prot. i.CSF -Quotient.

Modellzusammenfassung	Adj. R^2				
	0,174				
ANOVA	ΔF	p			
	10,715	p = 0,002			
Modell	B*	Beta**	Sign.	CI für B (untere Grenze)	CI für B (obere Grenze)
Alter	0,0001	0,439	0,002	0,000	0,000

* nicht-standardisierter Koeffizient; ** standardisierter Koeffizient

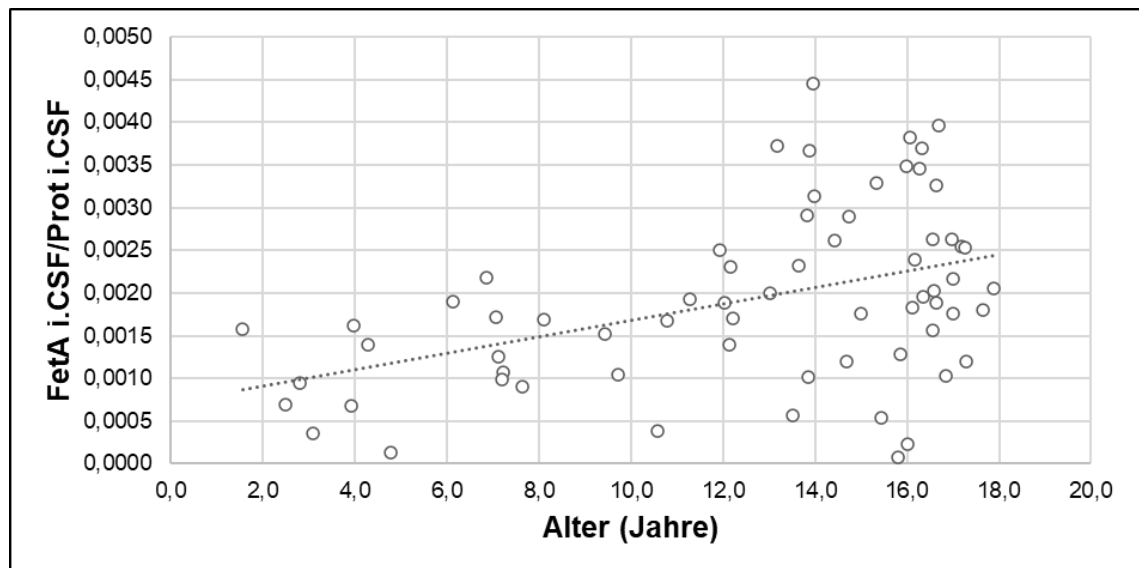


Abbildung 4.14 Fetuin-A/CSF-Gesamtprotein-Quotient in Abhängigkeit vom Alter.

Die Abbildung zeigt den Zusammenhang zwischen Fetuin-A/CSF-Gesamtprotein-Quotient (FetA i.CSF/Prot. i.CSF) und Alter der Probanden (in Jahren). Der FetA i.CSF/Prot. i.CSF -Quotient nimmt mit dem Alter signifikant zu ($p < 0,01$).

4.4.3 Fetuin-A im CSF/Fetuin-A im Serum-Quotient (Q_{Fet}) steigt mit dem Alter, dem Albumin-Quotienten (Q_{Alb}) und bei Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung an und sinkt bei erhöhter CRP-Konzentration ab

Angelehnt an die Untersuchung der Blut-Liquor-Schrankenstörung und intrathekalen Immunglobulin-Synthese nach Reiber (Reiber 1994a), wurde der Quotient aus Fetuin-A-Konzentration in CSF und Serum (Q_{Fet}) gebildet. Es wurden 49 Proben untersucht. Die unabhängigen Variablen der vorherigen Untersuchungen wurden übernommen. Es wurde der Albumin-Quotient, (Albumin im CSF/Albumin im Serum, Q_{Alb}) als weitere unabhängige Variable hinzugefügt, angelehnt an das Reiber-Schema (vgl. Kap. 1.3.1).

Die multiple lineare Regressionsanalyse zeigte positive Korrelationen zwischen Q_{Fet} und Alter, Q_{Alb} und dem Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung. Es zeigte sich zudem eine negative Korrelation zwischen Q_{Fet} und erhöhter CRP-Konzentration. Die Teststatistik zeigt Tabelle 4.5. Das korrigierte R^2 beträgt 0,878, damit kann durch dieses Modell 87% der Varianz von Q_{Fet} erklärt werden. Laut Cohen entspricht dies einem starken Effekt.

Tabelle 4.5 Teststatistik multiple lineare Regression, abhängige Variable Q_{Fet} .

Modellzusammenfassung	Adj. R^2				
	0,878				
ANOVA	ΔF (4,42)	p			
	83,860	p < 0,001			
Modell	B*	Beta**	Sign.	CI für B (untere Grenze)	CI für B (obere Grenze)
Q_{Alb}	0,191	0,761	0,000	0,159	0,223
Alter	0,077	0,150	0,007	0,022	0,132
Blut-Liquor-Schrankenstörung?	1,548	0,264	0,001	0,704	2,391
CRP < 5 mg/l / > 5mg/l	-1,151	-0,168	0,010	-2,016	-0,286

* nicht-standardisierter Koeffizient; ** standardisierter Koeffizient

4 Ergebnisse

In Abbildung 4.15 ist der Zusammenhang zwischen Q_{Fet} und Alter (Abb. 4.15 A) sowie zwischen Q_{Fet} und Q_{Alb} (Abb. 4.15 B) als Streudiagramm graphisch dargestellt. Die negative Korrelation zwischen Q_{Fet} und CRP-Konzentration (Abb. 4.16 A) sowie die positive Korrelation zwischen Q_{Fet} und Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung (Abb. 4.16 B) sind als Boxplots in Abbildung 4.16 dargestellt.

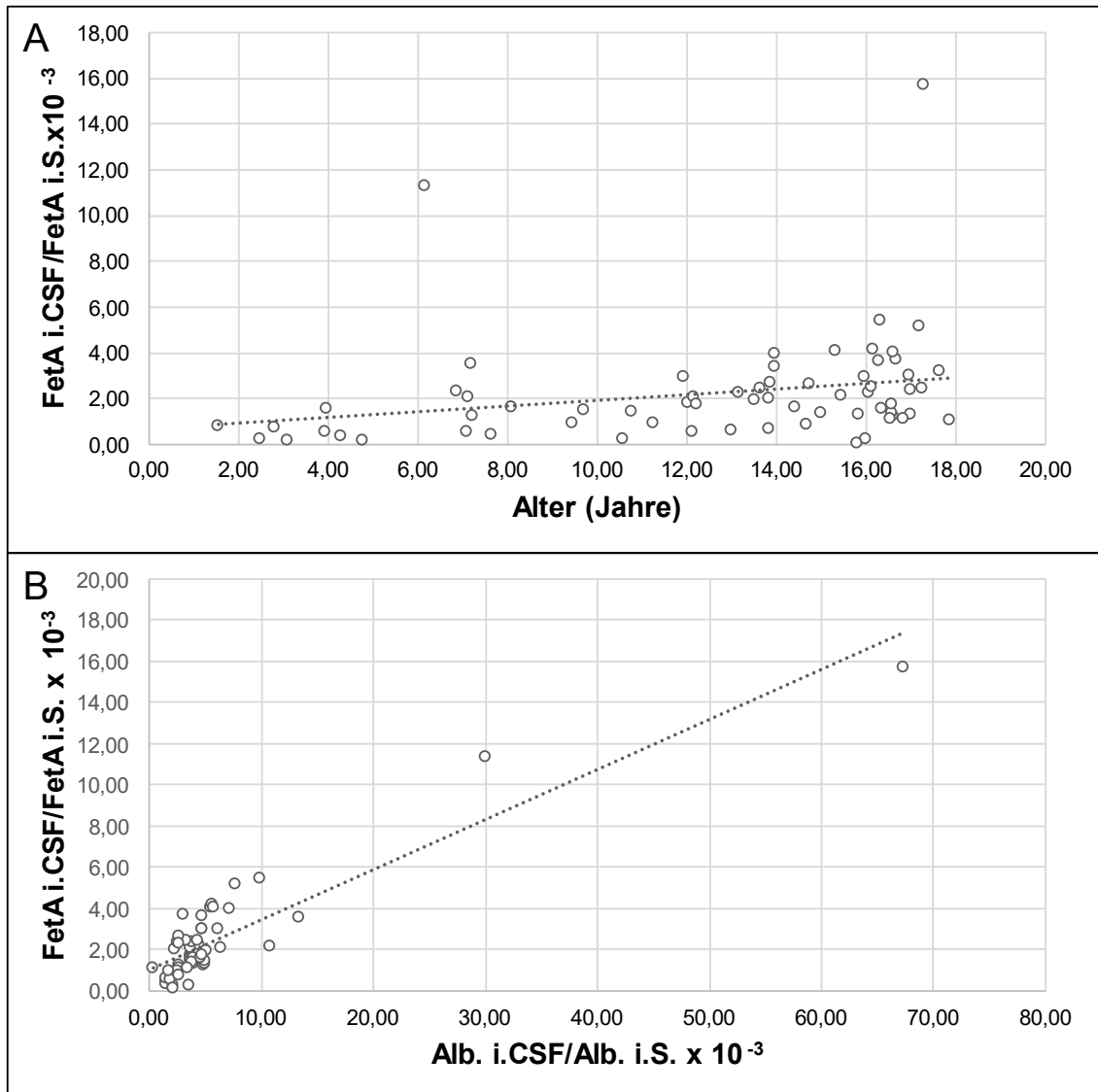


Abbildung 4.15 Fetuin-A im CSF/Fetuin-A im Serum-Quotient (Q_{Fet}) in Abhängigkeit vom Alter und vom Albumin-Quotienten Q_{Alb} .

A zeigt den Zusammenhang zwischen $Q_{Fet} \times 10^{-3}$ (y-Achse) und dem Alter in Jahren (x-Achse). Es zeigt sich eine signifikante Zunahme von Q_{Fet} mit steigendem Alter ($p < 0,01$). **B** zeigt den Zusammenhang zwischen $Q_{Fet} \times 10^{-3}$ (y-Achse) und $Q_{Alb} \times 10^{-3}$ (x-Achse). Es zeigt sich eine signifikante Zunahme von Q_{Fet} mit steigendem Q_{Alb} ($p < 0,001$).

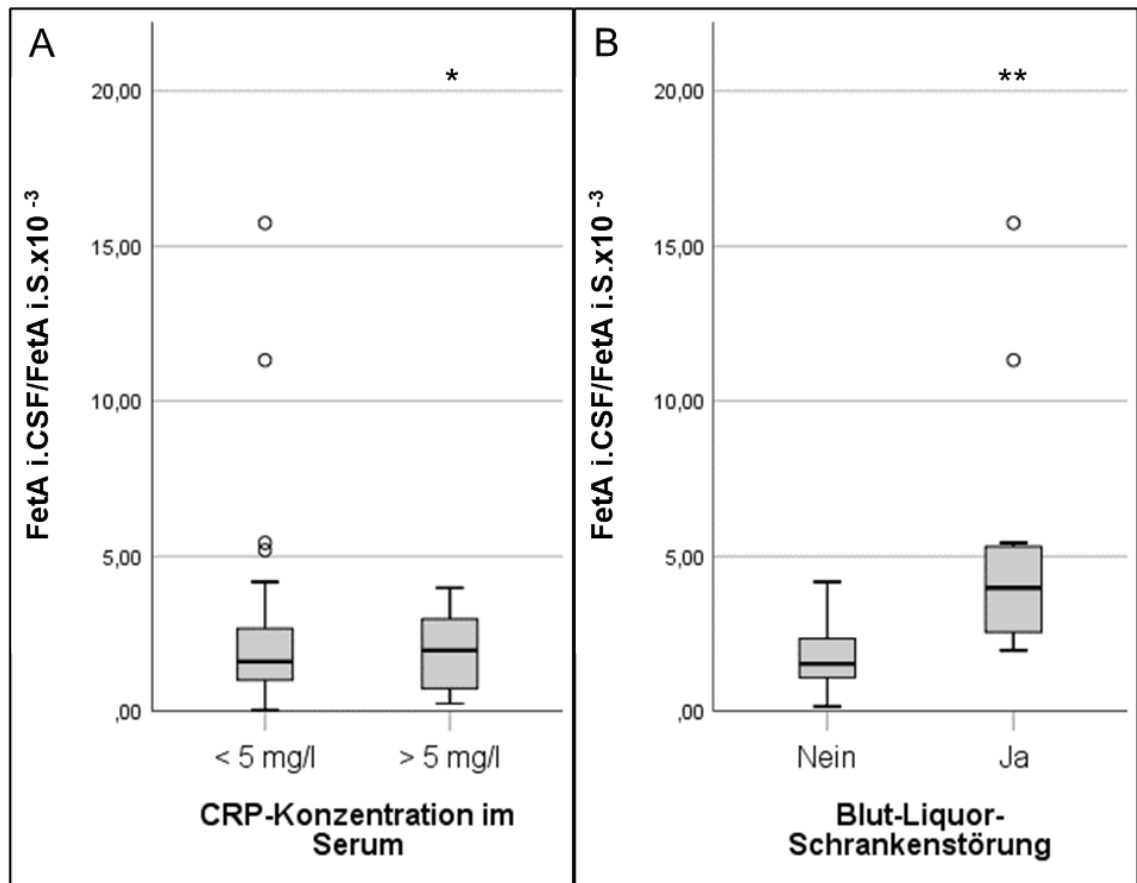


Abbildung 4.16 Fetuin-A im CSF/Fetuin-A im Serum-Quotient (Q_{Fet}) in Abhängigkeit von der CRP-Konzentration im Serum und dem Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung. Abbildung 4.16 zeigt den Fetuin-A im CSF/Fetuin-A im Serum-Quotient (Q_{Fet}), dargestellt als Boxplot in Abhängigkeit von der CRP-Konzentration im Serum (**A**) und dem Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung (**B**). **A** zeigt einen signifikant erniedrigten Q_{Fet} bei erhöhter CRP-Konzentration im Serum ($p < 0,05$). **B** zeigt einen signifikant erhöhten Q_{Fet} bei Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung ($p < 0,01$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5 Diskussion

5.1 Differentielle Glykosylierung von Fetuin-A bei Inflammation

In dieser Arbeit wurde eine Methodik zur Untersuchung der Glykosylierung von Fetuin-A bei neurologischen inflammatorischen Erkrankungen entwickelt. Diese Methodik mit Glykosidasen-Verdau, SDS-PAGE und Western Blot mit Immunodetektion wurde, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, etabliert und an einer Stichprobe von 23 Patientenproben durchgeführt. Sie erlaubt Aussagen über N-Glykosylierung und Sialylierung und ist analog in Serum und CSF durchführbar.

Während der Etablierung konnte ausgeschlossen werden, dass proteolytische Aktivität (vgl. Kap. 4.1.4) oder eine differentielle Phosphorylierung (vgl. Kap. 4.1.5) diese Methodik beeinflussen. Dies schließt nicht aus, dass Phosphorylierung als regulierender Faktor wirkt, lässt sich mit der hier entwickelten Methode aber nicht untersuchen. So ist beschrieben, dass nur phosphoryliertes Fetuin-A den Insulin-Rezeptor inhibiert (Mathews et al. 1997). Die Bedeutung der Phosphorylierung von Fetuin-A wurde auch in Zellkultur für die Verstärkung von Insulin-Resistenz beschrieben (Ren et al. 2019). Eine Albumin-Konzentration im CSF, die der Konzentration von Albumin im Serum entspricht, ist ebenfalls nicht für eine störungsfreie Messung notwendig (vgl. Kap. 4.1.6). Die hier etablierte Methodik ist nicht spezifisch für humanes Fetuin-A, auch bovines Fetuin-A wird durch die Glykosidasen verdaut (hier fluoreszenzmarkiert, vgl. Kap. 4.1.7). Die Bandenintensität zeigte sich unterschiedlich, allerdings wird hier nur eine qualitative Aussage getätigt. Auf das Laufverhalten der Banden und den Verdau hat die Konzentration keinen Einfluss.

Mit dieser Methode konnten wir bestätigen, dass Fetuin-A terminale Sialinsäuren (vgl. Kap. 4.2.1) sowie zwei N-Glykosylierungsstellen (vgl. Kap. 4.2.2) besitzt. Die aufgetretenen Doppelbanden lassen sich durch das Auftreten von Asialofetuin-A erklären. Doppelbanden traten immer sowohl im CSF als auch im Serum desselben Probanden auf. Es zeigte sich keine differentielle Sialylierung zwischen den Kompartimenten. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass Fetuin-A passiv über die Blut-Liquor-Schranke ins Gehirn eintritt. Eine Desialylierung scheint dementsprechend kein Hindernis für den Übertritt über die Blut-Liquor-Schranke zu sein. Zudem wäre bei einer intrathekalen Synthese eine veränderte

Sialylierung zu erwarten, da der Vorgang der Sialylierung stark vom umgebenden Milieu abhängt (Brockhausen et al. 1998). Es ist beschrieben, dass Asialofetuin-A zügig über den Asialofetuin-Rezeptor abgebaut wird (Tolleshaug 1984).

In der hier untersuchten Stichprobe ($n = 23$) von pädiatrischen Patienten mit und ohne entzündliche neurologische Erkrankung traten Doppelbanden, also Asialofetuin-A, in der Gruppe der entzündlichen neurologischen Erkrankungen signifikant häufiger auf (vgl. Kap. 4.2.1). Dies zeigt sich passend zu einer verminderten Sialylierung von Fetuin-A bei der rheumatoiden Arthritis (Sarooha et al. 2012) oder der intrauterinen Wachstumsretardierung (Karamessinis et al. 2008). Auch weitere Proteine, wie beispielsweise IgG, sind bei Inflammation als vermindert sialyliert beschrieben (Wong et al. 2016). Sialidasen, die Sialinsäuren abtrennen können, treten bei Entzündung vermehrt auf (Demina et al. 2018). Dies kann eine mögliche Ursache für das vermehrte Auftreten von Asialofetuin-A sein.

Insgesamt kann das Auftreten von vermindert sialyliertem Fetuin-A als möglicher Biomarker für Entzündung des ZNS dienen und mit der in dieser Arbeit etablierten Methodik untersucht werden. Einschränkend ist zu sagen, dass bei der hier durchgeführten Methodik keine Aussage über die genaue Zusammensetzung der Glykane getroffen werden kann. Um die Saccharid-Zusammensetzung zu untersuchen, wären weitergehende Untersuchungen mit Massenspektroskopie oder spezifischen Lectin-Blots notwendig.

5.2 Fetuin-A-Konzentrationen in Serum und CSF bei neurologischen inflammatorischen Erkrankungen und Herkunft von Fetuin-A im ZNS

In dieser Arbeit wurden neben der Glykosylierung die Konzentrationen von Fetuin-A in Serum und CSF untersucht. Hier zeigten sich die CSF-Konzentrationen ca. 500 mal niedriger als die Serum-Konzentrationen mit Mittelwerten von $0,30 \pm 0,06$ mg/ml im Serum und $0,66 \pm 0,68$ µg/ml im CSF. Im Serum zeigen sich damit niedrigere Werte als in vorherigen Studien der Arbeitsgruppe (Häusler et al. 2009). Dies lässt sich durch die Verwendung des ELISA anstelle der Nephelometrie erklären. Hier konnten wir in vorbereitenden Untersuchungen zeigen, dass die gemessenen Konzentrationen zwischen ELISA und Nephelometrie stark positiv korrelieren, die absoluten Messwerte aber in der Nephelometrie höher sind (vgl. Kap. 4.3.1). Bei Neugeborenen sind erhöhte CSF-Proteinkonzentrationen beschrieben (Reiber 1994a). Die große Abweichung der Fetuin-A-Konzentration im CSF lässt sich am ehesten durch die geringe absolute Konzentration erklären.

Fetuin-A wurde bereits 1979 von Lebreton als negatives Akut-Phase-Protein beschrieben (Lebreton et al. 1979). Erniedrigte Serum-Fetuin-A-Konzentrationen wurden auch bei inflammatorischen Erkrankungen wie chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Ma und Feng, 2014), rheumatoider Arthritis (Saroha et al. 2012) und Sepsis (Wang und Sama, 2012) nachgewiesen. Beim hämolytisch-urämisches Syndrom bei Kindern und Pneumokokken-Pneumonie traten ebenfalls erniedrigte Fetuin-A-Konzentrationen im Serum auf. In der selben Arbeit konnten die Autoren zudem zeigen, dass Fetuin-A Ziel von Sialidasen ist (Janapatla et al. 2016). Bei schweren Covid-19-Verläufen zeigte sich eine erniedrigte Fetuin-A-Konzentration im Serum (Kukla et al. 2021). In der hier untersuchten Stichprobe konnten passend dazu signifikant niedrigere Fetuin-A-Konzentrationen bei Inflammation gemessen werden (vgl. Kap. 4.3.2), passend zu einem negativen Akut-Phase-Protein.

Eine mögliche Ursache für die verminderte Fetuin-A-Konzentration im Serum ist die vermehrte Desialylierung von Fetuin-A bei Inflammation. Bei Entzündung ist eine vermehrte Sialidase-Aktivität beschrieben, die als Ursache für die verminderte Sialylierung in Frage kommt (Demina et al. 2018). Auch in dieser Arbeit zeigte sich eine verminderte Sialylierung, möglicherweise basierend auf

einer vermehrten Sialidase-Aktivität bei Inflammation. Wir konnten zeigen, dass eine vermehrte Desialylierung von Fetuin-A bei entzündlichen neurologischen Erkrankungen signifikant häufiger auftritt (vgl. Kap. 4.2.1). Aufgrund der vermehrten Desialylierung entsteht Asialofetuin-A. Asialofetuin-A ist nicht durch endständige Sialinsäuren vor Abbau geschützt. Es kommt zum Kontakt von nun endständigen Monosacchariden, wie z.B. Galaktose, mit dem Asialofetuin- oder Ashwell-Morell-Rezeptor, der sich an Hepatozyten und Makrophagen befindet (Tolleshaug 1984). Dadurch wird Fetuin-A, welches in der Leber synthetisiert wird, vermehrt abgebaut und es kommt zu einem Absinken der Fetuin-A-Konzentration im Serum (Abb. 5.1 A).

Zudem kommt es bei Inflammation zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ oder IL-6 , beispielweise aus Leukozyten. Diese hemmen die hepatische Synthese von Fetuin-A (Mori et al. 2011). Dies trägt damit zu einer erniedrigten Fetuin-A-Konzentration im Serum bei (Abb. 5.1 B).

Ein dritter möglicher Mechanismus basiert auf der zentralen Funktion von Fetuin-A als Inhibitor dystropher Kalzifikation. Bei Auftreten von Entzündung kommt es zu lokalem Zellzerfall. *In vitro* Studien konnten zeigen, dass nach Zelluntergang in der Zell-Umgebung vermehrt dystrophe Kalzifikation auftritt. Es kommt zu dystropher Mineralisierung im Bereich von Zell-Debris (Fratzl-Zelman et al. 1998). Durch den Zerfall der Zelle findet keine ATP-Produktion mehr statt. Dies führt in der Folge zu einem Mangel an Pyrophosphat, einem wichtigen Inhibitor dystropher Mineralisation. So konnte bei Fetuin-A-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass Pyrophosphat und Magnesium zur Inhibition dystropher Kalzifizierung notwendig sind (Babler et al. 2020). Zusätzlich wird Calcium und Phosphat aus der Zelle frei, speziell aus den Mitochondrien. Es kommt damit bei Entzündung und damit einhergehendem Zelltod zu einem vermehrten Auftreten dystropher Kalzifikation (Ghadially 2001). Bei Auftreten lokaler dystropher Mineralisation bindet Fetuin-A Calcium und Phosphat und führt diese der *Clearance* zu, indem es zunächst *calciprotein monomers* (CPMs) und im Verlauf *calciprotein particles* (CPPs) bildet. Es dient damit der Inhibition der entstehenden dystrophen Kalzifikation (Jahnen-Dechent et al. 2011; Rudloff et al. 2022; Rudloff et al. 2021). Die gebildeten CPPs werden durch das retikuloendotheliale System abgebaut, insbesondere durch Kupffer-Zellen der Leber (Jahnen-Dechent und Smith, 2020). Auch lokale Makrophagen kommen

zum Abbau in Betracht. Diese Zellen tragen den Asialofetuin-Rezeptor. Daher kann die Desialylierung durch lokal vermehrt aufgetretene Sialidasen auch als Signal wirken, die CPPs der *Clearance* zuzuführen. Die Desialylierung würde hier also Fetuin-A betreffen, das bereits Calcium und Phosphat gebunden hat. Es kommt daher bei Entzündung zu vermehrtem Verbrauch des Fetuin-A zur Vermeidung von dystropher Kalifizierung und damit zu einer erniedrigten Konzentration von Fetuin-A im Serum (Abb. 5.1 C). Neueste Ergebnisse zeigen, dass die Stabilisierung von übersättigten Mineralien durch Proteine auch in der normalen Physiologie eine wichtige Rolle spielt, wobei Fetuin-A im Blut eine Rolle übernimmt, die dem Casein in der Milch entspricht. Während allerdings Casein in der Milch Calciumphosphat für lange Zeit stabilisiert, sorgt Fetuin-A im Blut dafür, dass potenziell gefährliches Calciumphosphat rasch gebunden und ausgeschieden oder gezielt metabolisiert werden kann (Jahnen-Dechent und Smith, 2020; Jahnen-Dechent et al., 2020).

Zur weiteren Auswertung der Fetuin-A-Konzentration im Serum wurde ein Quotient mit der Gesamtproteinkonzentration im Serum gebildet (vgl. Kap. 4.4.1). Dort zeigte sich ein erniedrigter Quotient bei Vorliegen einer intrathekalen Immunglobulin-Synthese sowie bei Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung, jedoch keine signifikante Korrelation zur CRP-Konzentration. Somit scheint eine Inflammation des ZNS, die mit Schrankenstörung und intrathekaler Immunglobulin-Synthese einhergeht, einen Effekt auf die systemischen Fetuin-A-Konzentrationen zu haben.

In dieser Arbeit wurde zudem die Fetuin-A-Konzentration im CSF untersucht (vgl. Kap. 4.3.3). Erniedrigte Fetuin-A-Konzentrationen im CSF wurden bei der Progression vom *clinically isolated syndrome* zur MS (Tumani et al. 2009) und bei Alzheimer (Puchades et al. 2003) beobachtet. Erhöhte Fetuin-A-Konzentrationen im CSF zeigten sich bei Patienten mit niedrig-gradigen Gliomen (Ribom et al. 2003), bei Patienten mit sekundär progressiver MS (Ottervald et al. 2010) sowie bei aktiver MS im Vergleich zu inaktiver MS (Harris et al. 2013).

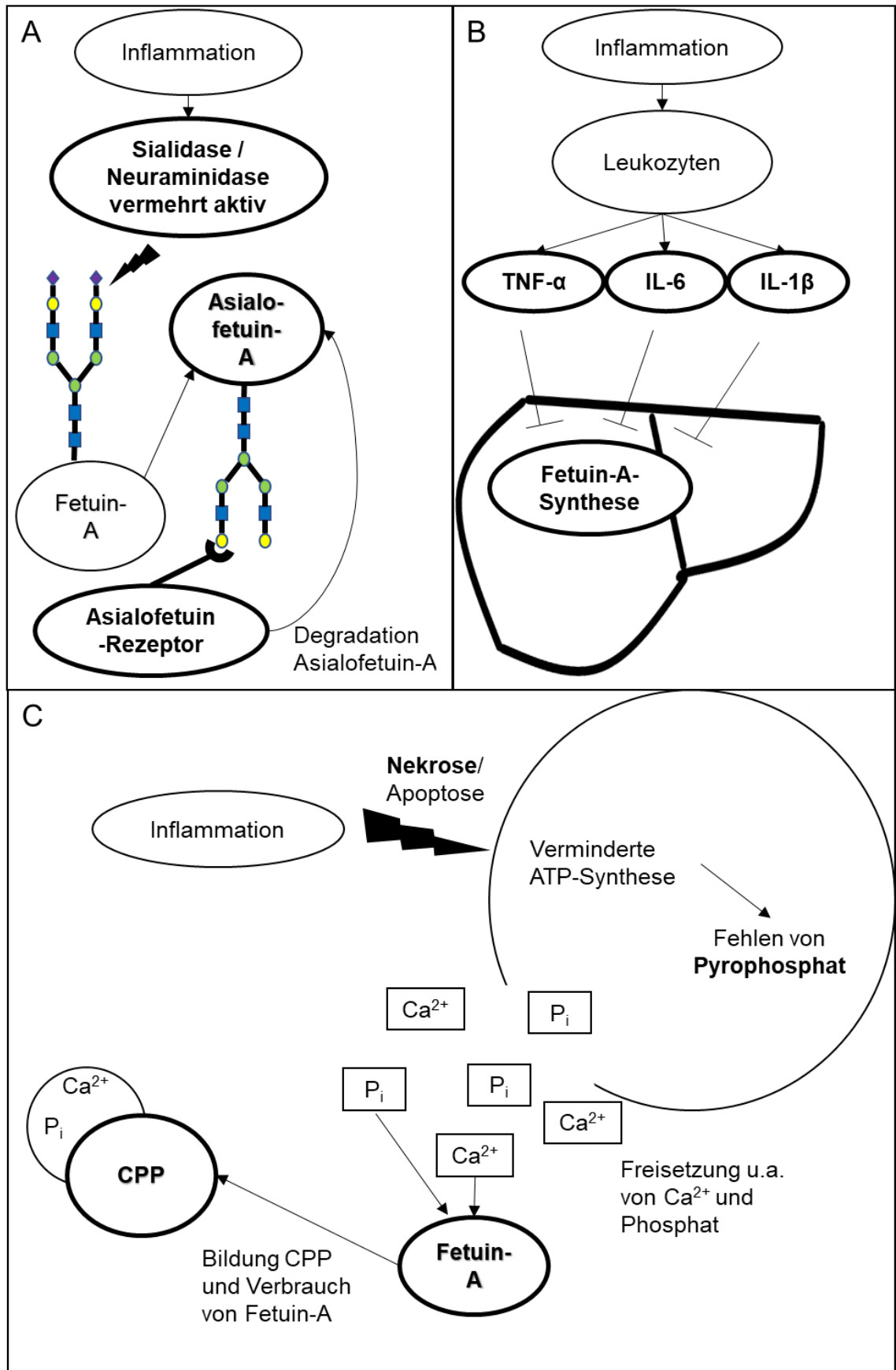


Abbildung 5.1 Ursachen für die erniedrigte Fetuin-A-Konzentration im Serum bei Entzündung.

Abbildung 5.1 zeigt schematisch mögliche Ursachen und Mechanismen für eine verminderte Fetuin-A-Konzentration im Serum. **A** stellt die bei Inflammation vermehrt auftretende Aktivität von Sialidasen dar. Dadurch kommt es zum Verlust der terminalen Sialinsäuren, es entsteht Asialofetuin-A. Dieses bindet nun an den Asialofetuin-Rezeptor. Dadurch kommt es zum vermehrten Abbau von Fetuin-A und einem konsekutiven Absinken der Fetuin-A-Konzentration. **B** zeigt, dass durch die Inflammation beispielsweise von Leukozyten vermehrt pro-inflammatorische Zytokine ausgeschüttet werden. Hier sind beispielhaft TNF- α , IL-1 β und IL-6 dargestellt. Die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine hemmt die Synthese von Fetuin-A in der Leber. Dadurch kommt es ebenfalls zu einer erniedrigten Serumkonzentration. **C** zeigt einen Mechanismus, der auf der Fähigkeit von Fetuin-A beruht, dystrophe Kalzifizierung zu verhindern. Aufgrund der Inflammation kommt es zu Zelltod, z.B. durch Nekrose oder Apoptose. In den betroffenen Zellen wird kein ATP mehr produziert und dadurch sinkt die Konzentration von Pyrophosphat. Pyrophosphat ist ein wichtiger Inhibitor dystropher Kalzifizierung. Zudem wird durch den Zellschaden neben anderen Substanzen Ca²⁺ und Phosphat (P) freigesetzt. Diese werden durch Fetuin-A gebunden und es entstehen Protein-Mineral-Komplexe, zunächst calciprotein monomers (CPMs), dann calciprotein particles (CPPs), die ausgeschieden oder abgelagert werden. Dadurch wird die dystrophe Kalzifizierung verhindert und es kommt zum Verbrauch von Fetuin-A und einem Absinken der Konzentration.

Harris zeigte zudem erhöhte Fetuin-A i.CSF/Fetuin-A i.Serum-Quotienten bei aktiver MS gegenüber inaktiver MS bei sich nicht unterscheidenden Serum-Fetuin-A-Konzentrationen. Da sich auch die CSF-Albumin/Serum-Albumin-Quotienten nicht unterschieden, wurde dies als Hinweis darauf gewertet, dass Fetuin-A intrathekal synthetisiert wird (Harris et al. 2013). In weiteren Studien zeigte Harris im Mausmodell, dass eine Fetuin-A-Defizienz protektiv gegenüber experimenteller autoimmuner Enzephalitis wirkt. Zudem zeigten Maus-Mikroglia-Zellen eine Fetuin-A-Expression nach LPS-Stimulation. Dies wurde ebenfalls als Hinweis auf eine intrathekale Synthese gewertet (Harris et al. 2017).

Dayon konnte 2019 in vergleichenden proteomischen Studien von CSF- und Serum-Proben bei älteren Patienten eine starke Korrelation zwischen Blut-Liquor-Schrankenstörung und erhöhter Fetuin-A-Konzentration im CSF zeigen (Dayon et al. 2019). Dies deutet eher auf einen passiven Einstrom von Fetuin-A ins ZNS hin.

In der hier untersuchten Stichprobe zeigten sich erniedrigte CSF-Konzentrationen bei erhöhter CRP-Konzentration im Serum als Zeichen einer systemischen Inflammation. Bei Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung zeigten sich hingegen erhöhte CSF-Konzentrationen (vgl.

Kap. 4.3.3), was auf einen passiven Einstrom über die Blut-Liquor-Schranke hindeutet. Der Quotient zwischen Fetuin-A-Konzentration im CSF und Gesamtprotein-Konzentration im CSF zeigte sich unabhängig vom Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung oder intrathekaler Immunglobulin-Synthese (vgl. Kap. 4.4.2). Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass Fetuin-A zusammen mit weiteren Proteinen beim pathologischen Vorliegen einer Schrankenstörung ins ZNS einströmt und nicht intrathekal synthetisiert wird. Bei intrathekaler Synthese von Fetuin-A wäre ein Anstieg dieses Quotienten zu erwarten. Der Anteil von Fetuin-A an der Gesamtprotein-Konzentration im CSF zeigte hingegen eine positive Korrelation mit dem Alter (vgl. Kap. 4.4.2). Eine altersabhängige Zunahme der Blut-Liquor-Schranken-Permeabilität mit ansteigendem Albumin-Quotienten als mögliche Ursache für die altersabhängige Zunahme von Protein-Konzentrationen im CSF beschrieb Reiber (Reiber et al. 2001; Reiber 1994b). Basierend auf dem Reiber-Schema wurde in dieser Arbeit der Fetuin-A im CSF/Fetuin-A im Serum-Quotient (Q_{Fet}) untersucht. Dieser Quotient zeigte einen Anstieg mit dem Alter sowie mit steigendem Q_{Alb} (vgl. Kap. 4.4.3). Ein altersabhängiger Anstieg von Q_{Alb} konnte in dieser Stichprobe nicht nachgewiesen werden. Mögliche Erklärungen sind ein verminderter Abbau von Fetuin-A im ZNS oder ein vermehrter Abbau von Fetuin-A außerhalb des ZNS. Eine negative Korrelation zeigte sich mit der CRP-Konzentration (vgl. Kap. 4.4.3). Somit scheint das Absinken der Fetuin-A-Konzentration im Serum bei systemischer Inflammation gegenüber dem Absinken im CSF zu überwiegen. Es zeigten sich starke positive Korrelationen von Q_{Fet} mit dem Albumin-Quotienten (Q_{Alb}) und dem Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung (vgl. Kap. 4.4.3). Fetuin-A scheint sich ähnlich wie Albumin zu verhalten, was auf einen passiven Einstrom von Fetuin-A über die Blut-Liquor-Schranke und gegen eine intrathekale Synthese spricht. Da der Anstieg von Q_{Fet} im Vergleich zum Anstieg von Q_{Alb} allerdings langsamer ist, sind zusätzliche Mechanismen, wie ein aktiver Transport über die Blut-Liquor-Schranke, zu diskutieren (Reiber et al. 2001).

Bezieht man neben den Konzentrationsmessungen auch die Untersuchung der Glykosylierungsmuster mit ein, so deuten beide Methoden darauf hin, dass Fetuin-A v.a. über die Blut-Liquor-Schranke ins ZNS gelangt und nicht lokal synthetisiert wird. Allerdings konnte Terkelsen 1997 bei Ratten sowohl Fetuin-mRNA als auch Fetuin-Protein im sich entwickelnden ZNS, insbesondere

im Bereich der ventrikulären Zone und kortikalen Platte, nachweisen. Dies könnte auf eine intrathekale Synthese im Bereich der Plexus choroidei hindeuten (Terkelsen et al. 1998). Um vertiefende Aussagen bezüglich der Herkunft von Fetuin-A im CSF zu treffen, sind erneute Untersuchungen auf Genom-Ebene im Tiermodell notwendig.

5.3 Ausblick

Die hier etablierte Methodik der kombinierten Deglykosylierung und anschließenden Detektion mit Immunoblot, *sweet Western Blot* genannt, zur spezifischen Untersuchung der Glykosylierung von Fetuin-A ermöglicht eine qualitative Untersuchung, ob N-Glykane und Sialinsäuren gebunden sind. Mithilfe des Zeitverlaufs des Verdaus konnte die Anzahl der gebundenen N-Glykane bestimmt werden. Bei der Untersuchung der Sialinsäuren kann Asialofetuin-A dargestellt werden. Um die Glykane genauer charakterisieren zu können, sind weitere Untersuchungen, z.B. mit Massenspektroskopie notwendig. Spezifische Lectin-Blots ermöglichen zudem, spezifische Monosaccharide nachzuweisen und ggf. auch eine quantitative Analyse des desialylierten Fetuin-A durchzuführen.

Zur weiteren Validierung des Auftretens von verminderter Sialylierung bei Entzündung und deren Eignung als möglicher Biomarker ist eine größere Stichprobe notwendig. Diese erlaubt eine genauere Differenzierung bezüglich verschiedener Erkrankungen unterschiedlicher Ursache.

Auch für die quantitativen Analysen der Fetuin-A-Konzentration ist es sinnvoll, eine größere Stichprobe zu untersuchen. Eine hohe Anzahl von untersuchten CSF-Serum-Paaren ermöglicht eine Anwendung der hyperbolischen Funktion nach Reiber (Reiber 1994b). Um die Frage nach der Herkunft des Fetuin-A klären zu können, sind weitere Methoden notwendig. Die hier verwendete Methodik kann nur indirekte Hinweise liefern. So könnte eine simultane Bestimmung von Fetuin-A aus CSF nach Lumbalpunktion und ventrikulärer CSF-Gewinnung erfolgen. Im ZNS synthetisierte Proteine zeigen dabei eine erhöhte Konzentration im ventrikulär gewonnenen CSF (Reiber et al. 2001). Allerdings ist diese Methodik mit einem erhöhten Risiko für den Patienten verbunden. Daher ist eine Untersuchung auf Genom-Ebene, z.B. im Tierversuch, sinnvoller, um die Herkunft von Fetuin-A im CSF zu bestimmen.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Methode bestehend aus Verdauung mit PNGase-F und Sialidase-Au mit anschließender SDS-PAGE und Western Blot, genannt *sweet Western Blot*, etabliert, um die Glykosylierung von Fetuin-A zu untersuchen. Mithilfe dieser Methodik konnte bestätigt werden, dass Fetuin-A zwei N-Glykosylierungsstellen besitzt. Bei der Untersuchung von 23 CSF-Serum-Paaren traten signifikant häufiger Doppelbanden als Zeichen einer verminderten Sialylierung bei Proben mit entzündlichen neurologischen Erkrankungen auf. Zwischen Serum- und CSF-Proben desselben Patienten zeigten sich keine Unterschiede.

Im Serum fanden sich niedrigere Fetuin-A-Konzentrationen bei Entzündung. Es konnte gezeigt werden, dass Fetuin-A ein negatives Akut-Phase-Protein ist. Mögliche Erklärungen dafür sind die verminderte Sialylierung und der damit erhöhte Abbau des Asialofetuin-A durch den Asialofetuin-Rezeptor, die Inhibierung der hepatischen Synthese von Fetuin-A durch die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine sowie ein Verbrauch von Fetuin-A durch die Opsonisierung dystropher Kalzifikation, die bei Zelltod und damit einhergehendem Pyrophosphat-Mangel auftritt. Hier ist möglicherweise die Desialylierung regulierend beteiligt.

Durch die Konzentrationsmessungen sowie die Glykosylierungsuntersuchungen ergaben sich Hinweise auf den Einstrom von Fetuin-A über die Blut-Liquor-Schranke ins ZNS und gegen eine intrathekale Synthese. Fetuin-A-Konzentrationen im CSF zeigen sich erhöht bei Vorliegen einer Schrankenstörung, jedoch nicht bei intrathekaler Immunglobulin-Synthese. Q_{Fet} zeigt zudem eine starke positive Korrelation mit Q_{Alb} . Fetuin-A verhält sich damit ähnlich wie Albumin, das passiv ins ZNS einströmt. Zudem zeigte sich eine Altersabhängigkeit von Q_{Fet} sowie vom Fetuin-A i.CSF/Protein i.CSF-Quotienten. Die fehlenden Unterschiede in der Sialylierung zwischen den Kompartimenten deuten ebenfalls eher auf einen passiven Einstrom, da Sialylierung milieuhängig stattfindet.

Für bessere Aussagen bezüglich der Glykosylierung sind größere Stichproben sowie Untersuchungen mittels Massenspektroskopie oder Lectin-Blots möglich. Für die sichere Klärung der Herkunft von Fetuin-A im CSF sind weitere Untersuchungen, zum Beispiel auf Genomebene notwendig.

Summary

In this thesis a method consisting of digestion with PNGase-F and sialidase-Au followed by SDS-PAGE and Western Blot, named *sweet Western Blot*, was established to study the glycosylation of fetuin-A. Using this method it was confirmed that fetuin-A contains two N-glycosylation sites. In the analysis of 23 CSF serum pairs, double bands as signs of reduced sialylation were significantly more frequent in samples with inflammatory neurological disorders. No differences were found between serum and CSF samples from the same proband.

Serum levels of fetuin A were found to be lower during inflammation. Fetuin-A has been shown to be a negative acute phase protein. Possible explanations for this are the reduced sialylation and thus increased degradation of asialofetuin-A by the asialofetuin receptor, the inhibition of the hepatic synthesis of fetuin-A by the release of pro-inflammatory cytokines, and a consumption of fetuin-A by the opsonization of dystrophic calcification, which occurs with cell death and associated pyrophosphate deficiency. Here, desialylation may be involved in regulating the process.

Concentration measurements and glycosylation studies provided evidence for the influx of fetuin-A across the blood-CSF barrier and against intrathecal synthesis. Fetuin-A concentrations in CSF are elevated in the presence of a barrier disorder, but not in intrathecal immunoglobulin synthesis. Q_{Fet} also shows a strong positive correlation with Q_{Alb} . Fetuin-A thus shows a similar behaviour to albumin which passively enters the CNS. Furthermore, an age dependency of Q_{Fet} as well as of the fetuin-A i.CSF/protein i.CSF quotient was shown. The lack of differences in sialylation between the compartments rather suggests a passive influx, as sialylation is milieu dependent.

For better understanding of the glycosylation, a larger sample size as well as investigations by mass spectroscopy or lectin blots are possible. For a confirmation of the origin of fetuin-A in CSF, further investigations, for example at genome level, are necessary.

7 Literatur

Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013 Nov;1833(11):2430–7.

Alroughani, R., und Boyko, A. (2018). Pediatric multiple sclerosis: a review. *BMC Neurol.* 18, 27.

Ashwell, G., und Morell, A.G. (1974). The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 41, 99–128.

Auberger P, Falquerho L, Contreres JO, Pages G, Le Cam G, Rossi B, et al. Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity. *Cell.* 1989 Aug 25;58(4):631–40.

Babler A, Schmitz C, Buescher A, Herrmann M, Gremse F, Gorgels T, et al. Microvasculopathy and soft tissue calcification in mice are governed by fetuin-A, magnesium and pyrophosphate. *PloS One.* 2020;15(2):e0228938.

Baudoin, L., und Issad, T. (2014). O-GlcNAcylation and Inflammation: A Vast Territory to Explore. *Front. Endocrinol.* 5, 235.

Bavendiek J, Maurer P, Gräber S, Pasch A, Schomburg WK, Jahnen-Dechent W. Rapid calcification propensity testing in blood using a temperature controlled microfluidic polymer chip. *PloS One.* 2020;15(4):e0230493.

Brockhausen, I., Schutzbach, J., und Kuhns, W. (1998). Glycoproteins and their relationship to human disease. *Acta Anat. (Basel)* 161, 36–78.

Brockhausen, I., und Stanley, P. (2015). O-GalNAc Glycans. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, et al., eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.

Brown WM, Saunders NR, Møllgård K, Dziegielewska KM. Fetuin--an old friend revisited. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 1992 Nov;14(11):749–55.

Caillot N, Bouley J, Jain K, Mariano S, Luce S, Horiot S, et al. Sialylated Fetuin-A as a candidate predictive biomarker for successful grass pollen allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017 Sep;140(3):759-770.e13.

Cohen J. A power primer. *Psychol. Bull.* 1992 Jul;112(1):155–9.

Cuppari A, Körschgen H, Fahrenkamp D, Schmitz C, Guevara T, Karmilin K, et al. Structure of mammalian plasma fetuin-B and its mechanism of selective metallopeptidase inhibition. *IUCrJ.* 2019 Mar 1;6(Pt 2):317–30.

Dayon L, Cominetti O, Wojcik J, Galindo AN, Oikonomidi A, Henry H, et al. Proteomes of Paired Human Cerebrospinal Fluid and Plasma: Relation to Blood-Brain Barrier Permeability in Older Adults. *J. Proteome Res.* 2019 Mar 1;18(3):1162–74.

- Demetriou M, Binkert C, Sukhu B, Tenenbaum HC, Dennis JW. Fetuin/alpha2-HS glycoprotein is a transforming growth factor-beta type II receptor mimic and cytokine antagonist. *J. Biol. Chem.* 1996 May 31;271(22):12755–61.
- Demina EP, Pierre WC, Nguyen ALA, Londono I, Reiz B, Zou C, et al. Persistent reduction in sialylation of cerebral glycoproteins following postnatal inflammatory exposure. *J. Neuroinflammation.* 2018 Dec 5;15(1):336.
- Dziegielewska KM, Andersen NA, Saunders NR. Modification of macrophage response to lipopolysaccharide by fetuin. *Immunol. Lett.* 1998 Jan;60(1):31–5.
- Dziegielewska KM, Matthews N, Saunders NR, Wilkinson G. alpha 2HS-glycoprotein is expressed at high concentration in human fetal plasma and cerebrospinal fluid. *Fetal Diagn. Ther.* 1993 Feb;8(1):22–7.
- El Ayoubi, N.K., und Khoury, S.J. (2017). Blood Biomarkers as Outcome Measures in Inflammatory Neurologic Diseases. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 14, 135–147.
- Elsas J, Sellhaus B, Herrmann M, Kinkeldey A, Weis J, Jahnen-Dechent W, et al. Fetuin-a in the developing brain. *Dev. Neurobiol.* 2013 May;73(5):354–69.
- Elzanowski, A., Barker, W.C., Hunt, L.T., und Seibel-Ross, E. (1988). Cystatin domains in alpha-2-HS-glycoprotein and fetuin. *FEBS Lett.* 227, 167–170.
- Fratzl-Zelman N, Fratzl P, Hörandner H, Grabner B, Varga F, Ellinger A, et al. Matrix mineralization in MC3T3-E1 cell cultures initiated by beta-glycerophosphate pulse. *Bone.* 1998 Dec;23(6):511–20.
- Gejyo F, Chang JL, Bürgi W, Schmid K, Offner GD, Troxler RF, et al. Characterization of the B-chain of human plasma alpha 2HS-glycoprotein. The complete amino acid sequence and primary structure of its heteroglycan. *J. Biol. Chem.* 1983 Apr 25;258(8):4966–71.
- Ghadially FN. As you like it, Part 3: A critique and historical review of calcification as seen with the electron microscope. *Ultrastruct. Pathol.* 2001 Jun;25(3):243–67.
- Guevara T, Körschgen H, Cuppari A, Schmitz C, Kuske M, Yiallourous I, et al. The C-terminal region of human plasma fetuin-B is dispensable for the raised-elephant-trunk mechanism of inhibition of astacin metallopeptidases. *Sci. Rep. Nature Publishing Group;* 2019 Oct 11;9(1):14683.
- Haglund, A.C., Ek, B., und Ek, P. (2001). Phosphorylation of human plasma alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein (human fetuin) in vivo. *Biochem. J.* 357, 437–445.
- Harris VK, Bell L, Langan R-A, Tuddenham J, Landy M, Sadiq SA. Fetuin-A deficiency protects mice from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) and correlates with altered innate immune response. *PloS One.* 2017;12(4):e0175575.

Harris VK, Donelan N, Yan QJ, Clark K, Touray A, Rammal M, et al. Cerebrospinal fluid fetuin-A is a biomarker of active multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 2013 Oct;19(11):1462–72.

Häusler, M., Schäfer, C., Osterwinter, C., und Jahnen-Dechent, W. (2009). The physiologic development of fetuin-a serum concentrations in children. *Pediatr. Res.* 66, 660–664.

Heinen MC, Babler A, Weis J, Elsas J, Nolte K, Kipp M, et al. Fetuin-A protein distribution in mature inflamed and ischemic brain tissue. *PLoS One.* 2018;13(11):e0206597.

Hennige, A.M., Staiger, H., Wicke, C., Machicao, F., Fritsche, A., Häring, H.-U., und Stefan, N. (2008). Fetuin-A induces cytokine expression and suppresses adiponectin production. *PLoS One* 3, e1765.

Heremans J. Les globulines sériques du système gamma leur nature et leur pathologie. Bruxelles: Editions Arscia; 1960.

Herrmann M, Babler A, Moshkova I, Gremse F, Kiessling F, Kusebauch U, et al. Lumenal calcification and microvasculopathy in fetuin-A-deficient mice lead to multiple organ morbidity. *PLoS One.* 2020;15(2):e0228503.

Jahnen-Dechent, W., Büscher, A., Köppert, S., Heiss, A., Kuro-O, M., und Smith, E.R. (2020). Mud in the blood: the role of protein-mineral complexes and extracellular vesicles in biomineralisation and calcification. *J. Struct. Biol.* 212, 107577.

Jahnen-Dechent, W., Heiss, A., Schäfer, C., und Ketteler, M. (2011). Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ. Res.* 108, 1494–1509.

Jahnen-Dechent, W., und Smith, E.R. (2020). Nature's remedy to phosphate woes: calciprotein particles regulate systemic mineral metabolism. *Kidney Int.* 97, 648–651.

Jahnen-Dechent, W., Trindl, A., Godovac-Zimmermann, J., und Müller-Esterl, W. (1994). Posttranslational processing of human alpha 2-HS glycoprotein (human fetuin). Evidence for the production of a phosphorylated single-chain form by hepatoma cells. *Eur. J. Biochem. FEBS* 226, 59–69.

Janapatla, R.P., Hsu, M.-H., Liao, W.-T., Chien, K.-Y., Lee, H.-Y., und Chiu, C.-H. (2016). Low Serum Fetuin-A as a Biomarker to Predict Pneumococcal Necrotizing Pneumonia and Hemolytic Uremic Syndrome in Children. *Medicine (Baltimore)* 95, e3221.

Jersmann, H.P.A., Dransfield, I., und Hart, S.P. (2003). Fetuin/alpha2-HS glycoprotein enhances phagocytosis of apoptotic cells and macropinocytosis by human macrophages. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 105, 273–278.

Karadeniz H, Güler AA, Koca G, Salman RB, Satış H, Ataş N, et al. Serum levels of fetuin-A as a novel biomarker for disease activity in patients with Takayasu arteritis and granulomatous polyangiitis. *Clin. Rheumatol.* 2022 Apr;41(4):1169–76.

- Karamessinis PM, Malamitsi-Puchner A, Boutsikou T, Makridakis M, Vougas K, Fountoulakis M, et al. Marked defects in the expression and glycosylation of alpha2-HS glycoprotein/fetuin-A in plasma from neonates with intrauterine growth restriction: proteomics screening and potential clinical implications. *Mol. Cell. Proteomics MCP*. 2008 Mar;7(3):591–9.
- Karmilin K, Schmitz C, Kuske M, Körschgen H, Olf M, Meyer K, et al. Mammalian plasma fetuin-B is a selective inhibitor of ovastacin and meprin metalloproteinases. *Sci. Rep.* 2019 24;9(1):546.
- Klinkhammer BM, Djudjaj S, Kunter U, Palsson R, Edvardsson VO, Wiech T, et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Injury in 2,8-Dihydroxyadenine Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*. 2020;31(4):799–816.
- Kobata A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* 1992 Oct 15;209(2):483–501.
- Kornfeld, R., und Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 631–664.
- Kröger J, Meidtner K, Stefan N, Guevara M, Kerrison ND, Ardanaz E, et al. Circulating Fetuin-A and Risk of Type 2 Diabetes: A Mendelian Randomization Analysis. *Diabetes*. 2018 Jun;67(6):1200–5.
- Kukla M, Menzyk T, Dembiński M, Winiarski M, Garlicki A, Bociąga-Jasik M, et al. Fetuin-A Deficiency but Not Pentraxin 3, FGF-21, or Irisin, Predisposes to More Serious COVID-19 Course. *Biomolecules*. 2021 Sep 28;11(10):1422.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680–5.
- Laughlin, G.A., McEvoy, L.K., Barrett-Connor, E., Daniels, L.B., und Ix, J.H. (2014). Fetuin-A, a new vascular biomarker of cognitive decline in older adults. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 81, 134–140.
- Lebreton, J.P., Joisel, F., Raoult, J.P., Lannuzel, B., Rogez, J.P., und Humbert, G. (1979). Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. *J. Clin. Invest.* 64, 1118–1129.
- Li W, Zhu S, Li J, Huang Y, Zhou R, Fan X, et al. A hepatic protein, fetuin-A, occupies a protective role in lethal systemic inflammation. *PLoS One*. 2011;6(2):e16945.
- Lis, H., und Sharon, N. (1993). Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem. FEBS* 218, 1–27.
- Ma, P., und Feng, Y. (2014). Decreased serum fetuin-A levels and active inflammatory bowel disease. *Am. J. Med. Sci.* 348, 47–51.
- Mahajan, V.S., und Pillai, S. (2016). Sialic acids and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 269, 145–161.

- Mathews, S.T., Srinivas, P.R., Leon, M.A., und Grunberger, G. (1997). Bovine fetuin is an inhibitor of insulin receptor tyrosine kinase. *Life Sci.* *61*, 1583–1592.
- McArthur, L., Johnston, L., Sattar, N., Logue, J., und Welsh, P. (2015). Preanalytical study of fetuin-A: effect of sample type, processing speed and freeze-thaw cycles. *Ann. Clin. Biochem.* *52*, 165–168.
- Mori, K., Emoto, M., und Inaba, M. (2011). Fetuin-A: a multifunctional protein. *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.* *5*, 124–146.
- Nawratil, P., Lenzen, S., Kellermann, J., Haupt, H., Schinke, T., Müller-Esterl, W., und Jahnen-Dechent, W. (1996). Limited proteolysis of human alpha2-HS glycoprotein/fetuin. Evidence that a chymotryptic activity can release the connecting peptide. *J. Biol. Chem.* *271*, 31735–31741.
- Olden, K., Parent, J.B., und White, S.L. (1982). Carbohydrate moieties of glycoproteins. A re-evaluation of their function. *Biochim. Biophys. Acta* *650*, 209–232.
- Olivier, E., Soury, E., Ruminy, P., Husson, A., Parmentier, F., Daveau, M., und Salier, J.P. (2000). Fetuin-B, a second member of the fetuin family in mammals. *Biochem. J.* *350 Pt 2*, 589–597.
- Ottervald J, Franzén B, Nilsson K, Andersson LI, Khademi M, Eriksson B, et al. Multiple sclerosis: Identification and clinical evaluation of novel CSF biomarkers. *J. Proteomics.* 2010 Apr 18;73(6):1117–32.
- Ozyazgan S, Karaoglu K, Kurt A, Altinok A, Konukoglu D, Osar Siva Z, et al. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on serum fetuin-A levels in type 2 diabetic patients. *Minerva Med.* 2013 Jun;104(3):287–93.
- Pan, X., Wen, S.W., Bestman, P.L., Kaminga, A.C., Acheampong, K., und Liu, A. (2020). Fetuin-A in Metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis. *PloS One* *15*, e0229776.
- Paulson JC. Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends Biochem. Sci.* 1989 Jul;14(7):272–6.
- Pearce, O.M.T., und Läubli, H. (2016). Sialic acids in cancer biology and immunity. *Glycobiology* *26*, 111–128.
- Pedersen KO. Fetuin, a New Globulin Isolated from Serum. *Nature.* 1944 Nov 4;154:575–575.
- Puchades, M., Hansson, S.F., Nilsson, C.L., Andreasen, N., Blennow, K., und Davidsson, P. (2003). Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *118*, 140–146.
- Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)--a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J. Neurol. Sci.* 1994a Apr;122(2):189–203.

- Reiber H. The hyperbolic function: A mathematical solution of the protein flux/CSF flow model for blood-CSF barrier function a reply to the letter by S. Öhman (J. Neurol. Sci., 126 (1994) 240–242). J. Neurol. Sci. - J NEUROL SCI. 1994b;126(2):243–5.
- Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem. 2001 Aug 20;310(2):173–86.
- Reiber H. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. Restor. Neurol. Neurosci. 2003;21(3–4):79–96.
- Reiber H. Liquordiagnostik. In: Berlit, Peter, editor. Klin. Neurol. 2. Auflage. Heidelberg: Springer Verlag; 2005.
- Reiber, H., Otto, M., Trendelenburg, C., und Wormek, A. (2001). Reporting cerebrospinal fluid data: knowledge base and interpretation software. Clin. Chem. Lab. Med. 39, 324–332.
- Reif, S., Moschko, S., Gar, C., Ferrari, U., Hesse, N., Sommer, N.N., Seißler, J., und Lechner, A. (2020). No Independent Association of Circulating Fetuin-A with Insulin Sensitivity in Young Women. Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab. 52, 809–814.
- Reinehr T, Roth CL. Fetuin-A and its relation to metabolic syndrome and fatty liver disease in obese children before and after weight loss. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2008 Nov;93(11):4479–85.
- Rek, A., Krenn, E., und Kungl, A.J. (2009). Therapeutically targeting protein-glycan interactions. Br. J. Pharmacol. 157, 686–694.
- Ren G, Kim T, Papizan JB, Okerberg CK, Kothari VM, Zaid H, et al. Phosphorylation status of fetuin-A is critical for inhibition of insulin action and is correlated with obesity and insulin resistance. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2019 01;317(2):E250–60.
- Ribom, D., Westman-Brinkmalm, A., Smits, A., und Davidsson, P. (2003). Elevated levels of alpha-2-Heremans-Schmid glycoprotein in CSF of patients with low-grade gliomas. Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med. 24, 94–99.
- Rudloff S, Jahnen-Dechent W, Huynh-Do U. Tissue chaperoning-the expanded functions of fetuin-A beyond inhibition of systemic calcification. Pflugers Arch. 2022 Apr 11;
- Rudloff S, Janot M, Rodriguez S, Dessalle K, Jahnen-Dechent W, Huynh-Do U. Fetuin-A is a HIF target that safeguards tissue integrity during hypoxic stress. Nat. Commun. 2021 Jan 22;12(1):549.
- Saroha, A., Kumar, S., Chatterjee, B.P., und Das, H.R. (2012). Jacalin bound plasma O-glycoproteome and reduced sialylation of alpha 2-HS glycoprotein (A2HSG) in rheumatoid arthritis patients. PloS One 7, e46374.

Schafer, C., Heiss, A., Schwarz, A., Westenfeld, R., Ketteler, M., Floege, J., Muller-Esterl, W., Schinke, T., und Jahnen-Dechent, W. (2003). The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J. Clin. Invest.* 112, 357–366.

Schinke, T., Amendt, C., Trindl, A., Pöschke, O., Müller-Esterl, W., und Jahnen-Dechent, W. (1996). The serum protein alpha2-HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. A possible role in mineralization and calcium homeostasis. *J. Biol. Chem.* 271, 20789–20796.

Schmid, K., und Bürgi, W. (1961). Preparation and properties of the human plasma Ba-alpha2-glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 47, 440–453.

Sindhu, S., Akhter, N., Shenouda, S., Wilson, A., und Ahmad, R. (2016). Plasma fetuin-A/ α 2-HS-glycoprotein correlates negatively with inflammatory cytokines, chemokines and activation biomarkers in individuals with type-2 diabetes. *BMC Immunol.* 17, 33.

Spiro RG. Glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 1970;39:599–638.

Srinivas, P.R., Wagner, A.S., Reddy, L.V., Deutsch, D.D., Leon, M.A., Goustin, A.S., und Grunberger, G. (1993). Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 7, 1445–1455.

Stanley P. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011 Apr 1;3(4).

Stanley, P., Taniguchi, N., und Aebi, M. (2015). N-Glycans. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, et al., eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.

Tagliabracci VS, Wiley SE, Guo X, Kinch LN, Durrant E, Wen J, et al. A Single Kinase Generates the Majority of the Secreted Phosphoproteome. *Cell.* 2015 Jun 18;161(7):1619–32.

Terkelsen, O.B., Jahnen-Dechent, W., Nielsen, H., Moos, T., Fink, E., Nawratil, P., Müller-Esterl, W., und Møllgård, K. (1998). Rat fetuin: distribution of protein and mRNA in embryonic and neonatal rat tissues. *Anat. Embryol. (Berl.)* 197, 125–133.

Teunissen, C.E., Malekzadeh, A., Leurs, C., Bridel, C., und Killestein, J. (2015). Body fluid biomarkers for multiple sclerosis--the long road to clinical application. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 585–596.

Tolleshaug H. Intracellular segregation of asialo-transferrin and asialo-fetuin following uptake by the same receptor system in suspended hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1984 Mar 23;803(3):182–90.

Tumani H, Lehmensiek V, Rau D, Guttman I, Tauscher G, Mogel H, et al. CSF proteome analysis in clinically isolated syndrome (CIS): candidate markers for conversion to definite multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 2009 Mar 13;452(2):214–7.

UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jan 8;49(D1):D480–9.

Varki, A., und Gagneux, P. (2012). Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253, 16–36.

Varki, A., Schnaar, R.L., und Schauer, R. (2015). Sialic Acids and Other Nonulosonic Acids. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, et al., eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.

Wang H, Li W, Zhu S, Li J, D'Amore J, Ward MF, et al. Peripheral administration of fetuin-A attenuates early cerebral ischemic injury in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 2010 Mar;30(3):493–504.

Wang, H., und Sama, A.E. (2012). Anti-inflammatory role of fetuin-A in injury and infection. *Curr. Mol. Med.* 12, 625–633.

Wang, H., Zhang, M., Bianchi, M., Sherry, B., Sama, A., und Tracey, K.J. (1998). Fetuin (alpha2-HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophage-deactivating molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14429–14434.

Watzlawick, H., Walsh, M.T., Yoshioka, Y., Schmid, K., und Brossmer, R. (1992). Structure of the N- and O-glycans of the A-chain of human plasma alpha 2HS-glycoprotein as deduced from the chemical compositions of the derivatives prepared by stepwise degradation with exoglycosidases. *Biochemistry* 31, 12198–12203.

Weikert, C., Stefan, N., Schulze, M.B., Pischon, T., Berger, K., Joost, H.-G., Häring, H.-U., Boeing, H., und Fritsche, A. (2008). Plasma fetuin-a levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *Circulation* 118, 2555–2562.

Wong, A.H.Y., Fukami, Y., Sudo, M., Kokubun, N., Hamada, S., und Yuki, N. (2016). Sialylated IgG-Fc: a novel biomarker of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 87, 275–279.

Wright, R.D., und Cooper, D. (2014). Glycobiology of leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology* 24, 1242–1251.

Yoshioka, Y., Gejyo, F., Marti, T., Rickli, E.E., Bürgi, W., Offner, G.D., Troxler, R.F., und Schmid, K. (1986). The complete amino acid sequence of the A-chain of human plasma alpha 2HS-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 261, 1665–1676.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Struktur von Fetuin-A.	2
Abbildung 1.2 O- und N-Glykanstrukturen von Fetuin-A.	3
Abbildung 1.3 Reiber-Schema.	11
Abbildung 3.1 Angriffspunkte von PNGase-F und Sialidase-Au.	19
Abbildung 3.2 Ponceau-S-Färbung einer Nitrocellulose-Membran.	23
Abbildung 3.3 Schematischer Aufbau des Human Fetuin-A/AHSG DuoSet ELISA (R&D).	27
Abbildung 4.1 Glykosidasen-Verdau einer Serum-Probe.	30
Abbildung 4.2 Vergleich des Glykosidasenverdaus mit und ohne Zugabe von Sialidase-Au.	32
Abbildung 4.3 Schrittweise Reduktion der Glykosidasen zum Verdau von O-Glykanen.	33
Abbildung 4.4 Vergleich des Verdaus mit verschiedenen Glykosidasen mit und ohne Zugabe von Protease-Inhibitor.	35
Abbildung 4.5 Verdau mit Glykosidasen und alkalischer Phosphatase. ...	37
Abbildung 4.6 Glykosidasen-Verdau mit Zugabe von Humanalbumin in den CSF.	38
Abbildung 4.7 Verdau von Serum- und CSF-Probe mit Zugabe von fluoreszierendem bovinem Fetuin-A (AT 0488).	40
Abbildung 4.8 Vergleich der Glykosylierung in Serum- und CSF-Proben dreier Probanden.	42
Abbildung 4.9 Verdau von Fetuin-A mit PNGase-F im Zeitverlauf.	44
Abbildung 4.10 Vergleich der Fetuin-A-Konzentrationsmessung in Nephelometrie und ELISA.	46
Abbildung 4.11 Fetuin-A-Konzentration im Serum in Abhängigkeit von entzündlicher neurologischer Erkrankung und erhöhter CRP-Konzentration.	48
Abbildung 4.12 Fetuin-A-Konzentration im CSF in Abhängigkeit von Blut-Liquor-Schrankenstörung und CRP-Konzentration.	50
Abbildung 4.13 Fetuin-A/Serum-Gesamtprotein-Quotient in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung und Vorliegen einer intrathekalen IgG-Synthese.	52

Abbildung 4.14 Fetuin-A/CSF-Gesamtprotein-Quotient in Abhängigkeit vom Alter.....	53
Abbildung 4.15 Fetuin-A im CSF/Fetuin-A im Serum-Quotient (Q_{Fet}) in Abhängigkeit vom Alter und vom Albumin-Quotienten Q_{Alb}.....	55
Abbildung 4.16 Fetuin-A im CSF/Fetuin-A im Serum-Quotient (Q_{Fet}) in Abhängigkeit von der CRP-Konzentration im Serum und dem Vorliegen einer Blut-Liquor-Schrankenstörung.	56
Abbildung 5.1 Ursachen für die erniedrigte Fetuin-A-Konzentration im Serum bei Entzündung.....	62
Abbildung 8.1 N-Glykosylierung im ER.	80
Abbildung 8.2 Vergleich von neun verschiedenen CSF- und Serum-Proben nach Glykosidasen-Verdau.....	82

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1. Klinische Daten der Proben der Konzentrationsmessungen von Fetuin-A.	15
Tabelle 3.2. Klinische Diagnosen der Proben der Konzentrationsmessungen von Fetuin-A.	16
Tabelle 3.3. Klinische Daten der Proben der Glykosylierungsuntersuchungen von Fetuin-A.	17
Tabelle 3.4. Klinische Diagnosen der Proben der Glykosylierungsuntersuchungen von Fetuin-A.	17
Tabelle 3.5. Zusammensetzung 6x SDS-Probenpuffer	20
Tabelle 3.6. Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für ein 10%-Polyacrylamid-Gel.	21
Tabelle 3.7. SDS-Laufpuffer nach Laemmli.	22
Tabelle 3.8. Puffer für den Semi-Dry-Blot	22
Tabelle 3.9. Ponceau-S Färbelösung	23
Tabelle 3.10. Chemilumineszenz-Lösung für eine Membran.	24
Tabelle 4.1. Teststatistik multiple lineare Regression, abhängige Variable Fetuin-A im Serum	47
Tabelle 4.2. Teststatistik multiple lineare Regression, abhängige Variable Fetuin-A im CSF	49
Tabelle 4.3. Teststatistik multiple lineare Regression, abhängige Variable FetA i.S./Prot. i.S.-Quotient	51
Tabelle 4.4. Teststatistik multiple lineare Regression, abhängige Variable FetA i.CSF/Prot. i.CSF -Quotient.	53
Tabelle 4.5. Teststatistik multiple lineare Regression, abhängige Variable $Q_{Fet.}$	54

8.3 Weitere Abbildungen und Tabellen

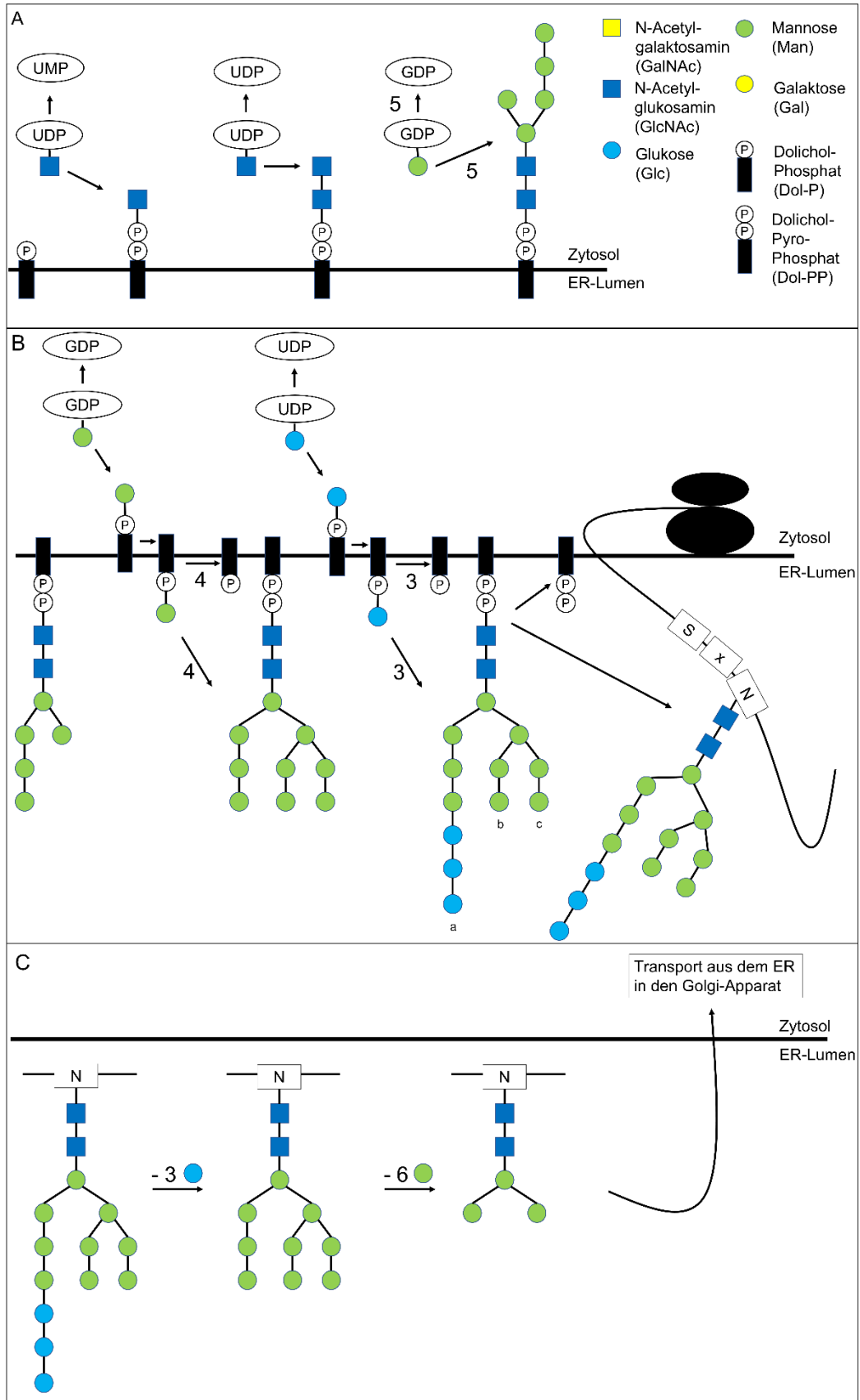


Abbildung 8.1 N-Glykosylierung im ER.

Abgebildet ist der schematische Ablauf der N-Glykosylierung am und im ER. Auf der zytosolischen Seite der ER-Membran (**A**) werden an aktivierte Nukleotide (UDP Uridindiphosphat, GDP Guanosindiphosphat) gebundene Monosaccharide zunächst mit einem weiteren Phosphatrest auf Dolichol-Phosphat, dann ohne Abgabe von Phosphatresten auf das entstehende, an Dolichol-Pyrophosphat gebundene, Oligosaccharid übertragen. Es entsteht Dol-PP-GlcNAc₂Man₅, welches durch Flippasen ins ER-Lumen transloziert wird. Im ER-Lumen (**B**) kommt es dann zur Übertragung von weiteren vier Man- und drei Glc-Monosacchariden und zur Bildung eines triantennären lipidgebundenen Vorläufersaccharids (a-, b- und c-Antenne). Sind die drei Glc-Reste gebunden, dient dies als Signal zur β -glykosidischen Bindung des Vorläufersaccharids durch die Oligosaccharyltransferase an Asparagin (N). Die Erkennungssequenz ist S/T-x-N (x \neq Prolin). Nach Bindung kommt es zum Trimming (**C**), dazu werden die drei Glc-Saccharide sowie ggf. Man-Reste abgespalten. Die Abspaltung der Glc-Reste dient als Faltungskontrolle für das Protein. Nach dem Trimming werden die N-Glykane zum Golgi-Apparat transportiert und können dort weiter modifiziert werden. UDP Uridindiphosphat, UMP Uridinmonophosphat, GDP Guanosindiphosphat. Verändert nach Aebi, 2013.

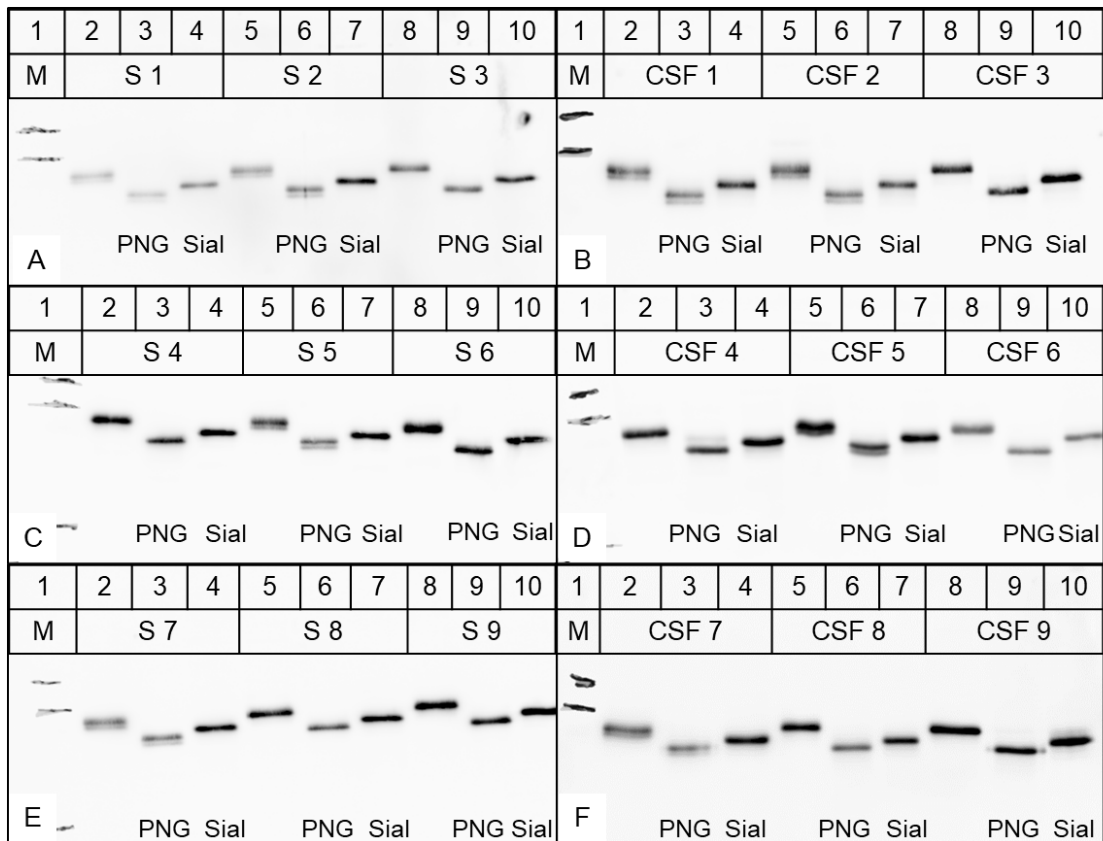


Abbildung 8.2 Vergleich von neun verschiedenen CSF- und Serum-Proben nach Glykosidasen-Verdau.

Diese Abbildung stellt die Western Blots von je neun CSF- und Serum-Proben dar. Dabei sind in A, C und E die Serum-Proben und in B, D und F die CSF-Proben dargestellt. In Spur 1 ist jeweils der Größenmarker aufgetragen. Die Spuren 2, 5 und 8 zeigen das unverdaute Fetuin-A, die Spuren 3, 6 und 9 zeigen Fetuin-A nach Verdau mit PNGase-F (PNG). Die Spuren 4, 7 und 10 zeigen Fetuin-A nach Verdau mit Sialidase-Au (Sial). Es zeigen sich Doppelbanden in Probe 1, 2, 5 und 7 jeweils beim unverdauten Fetuin-A sowie nach Verdau mit PNGase-F (PNG). Nach Verdau mit Sialidase-Au (Sial) zeigen sich keine Doppelbanden mehr.

Chemikalien

ϵ -Aminocaprönsäure: 6-Aminohexansäure (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Acrylamid 30% 4K-solution (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Alkalische Phosphatase, bovin, Best.-Nr. P0114; 0,151 U/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Ammoniumpersulfat APS (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Bromphenol Blau Na-Salz (Serva, Feinbiochem. GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland)
Dimethylsulfoxid DMSO (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Dithiothreitol DTT BioChemica (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Fluoreszierendes bovines Fetuin-A, AT0488 (AG Jahnen-Dechent)
Glycerin wasserfrei (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Glycin (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Größenmarker Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS-Electrophoresis (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland)
Luminol (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Magermilchpulver, non-fat dried milk powder (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
PBS Dulbecco w/o Ca^{2+} w/o Mg^{2+} 9,55 g/l (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland)
p-Courmarsäure (Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
Phos-tag™ Acrylamide (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland)
Polyclonal rabbit anti-human-Fetuin-A antibody, AS5359 (AG Jahnen-Dechent)
Polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins/HRP, P0217 (DAKO, Agilent, Santa Clara, USA)
Ponceau-S (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Salzsäure, HCl (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Sodiumdodecylsulfat SDS BioChemica (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Tetramethylethylendiamin TEMED (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Tricin BioChemica (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Tris ultrapure (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Tween®-20 BioChemica (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Wasserstoffperoxid H_2O_2 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

8.4 Geräte und Gebrauchsmaterialien

Glykosidasen-Verdau:

Enzymatic Carbo Release Kit KE-DG01 (QA-Bio, Inc., Palm Desert, USA)

cOmplete™ Mini EDTA free (Protease-Inhibitor) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

Heating immersion circulator MP (JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland)

TKA GenPure, 18,2 M Ω *cm (0,055 μ S/cm) (TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert, Deutschland)

Typhoon-Flachbett-Fluoreszenz-Scanner (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland)

SDS-PAGE:

Mini-PROTEAN® tetra system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA)

Power Pac Basic (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA)

Western Blot:

Power Pac HC (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA)

Owl™ Semidry Electric Blotter HEP-1 (Thermo Fisher Scientific, Marietta, USA)

Filterpapier Whatman GB 005 Gel-blotting-Paper, 200x200 mm (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland)

Amersham Protran 0,2 NC Nitrocellulose Blotting Membrane (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland)

ImageQuant™ LAS-4000 mini; luminescent image analyser (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland)

ELISA:

Human Fetuin A/AHSG DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA)

DuoSet Ancillary Reagent Kit 2 (R&D Systems, Minneapolis, USA)

Fluostar optima Microplate Reader (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland)

Nephelometrie:

Dako Turbidimetry/Nephelometrie Reaction Buffer 3 (DAKO, Agilent, Santa Clara, USA)

Antiserum gegen humanes Fetuin-A, AS921006 (AG Jahnen-Dechent)

AHSG Glykoprotein 1 mg/ml in 0,9% NaCl, A280 (AG Jahnen-Dechent)

Cliniplate™ 96-Well Microplate (Thermo Fisher Scientific, Marietta, USA)

Nephelostar microplate Nephelometer (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland)

Zentrifugen:

Heraeus® Megafuge® 1.0R (Thermo Fisher Scientific, Marietta, USA)

Heraeus® Labofuge® 200 (Thermo Fisher Scientific, Marietta, USA)

Sigma 1-15 Microfuge (SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland)

VWR™ Galaxy Mini Microcentrifuge (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)

VWR™ test tube shaker (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Publikationen

Ricken F, Can AD, Gräber S, Häusler M, Jahnen-Dechent W.:

Post-translational modifications glycosylation and phosphorylation of the major hepatic plasma protein fetuin-A are associated with CNS inflammation in children.

PLoS One. 2022 Oct 7;17(10):e0268592. doi: 10.1371/journal.pone.0268592.

PMID: 36206263; PMCID: PMC9544022.

Danksagung

Ich danke meinen Betreuern, Univ.-Prof. Willi Jahnen-Dechent und Univ.-Prof. Martin Häusler, für die Möglichkeit, die Promotion in euren Abteilungen durchführen zu können. Ich danke Beiden für viele kluge Ratschläge und Unterstützung bei der Konzeption der Arbeit. Zusätzlich danke ich Martin für die Unterstützung der statistischen Auswertung und Willi für die Unterstützung im Labor. Beiden danke ich für die Verwirklichung der Vorveröffentlichung der Ergebnisse. Vielen Dank für die Überwachung der Studiendurchführung und Hilfe bei der Datenauswertung und -interpretation.

Besonderer Dank gilt Steffen Gräber für seine Unterstützung im Labor. Danke für die große Unterstützung bei der Etablierung der Konzentrationsmessungen und das Messen der Proben der Konzentrationsmessungen.

Auch den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für zahlreiche Tipps und Unterstützung während der Laborarbeit. Namentlich möchte ich hier Julia Floehr und Anne Babler nennen, die mich mit ihrer Hilfe und konstruktiver Kritik weitergebracht haben.

Ich danke Damla Can als medizinische Mit-Doktorandin für die Mitarbeit und Unterstützung im Labor. Das Arbeiten zu zweit hat doch vieles einfacher gemacht. Zusätzlich danke ich Johannes Elsas für die Einarbeitung und Mit-Konzeption der Arbeit.

Ich danke den Ärzten der Kinderklinik, die die Lumbalpunktionen und Blutentnahmen im Rahmen ihrer klinischen Tätigkeit durchgeführt haben.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und Franzi danken, die mich bei der Erstellung der Arbeit unterstützt haben. Besonderen Dank an Franzi für das wiederholte Korrekturlesen.

Vielen Dank!

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten

bei meinem Betreuer, **Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Willi Jahnen-Dechent, Institut für Zell- und Molekularbiologie an Grenzflächen** des Universitätsklinikums Aachen,

hinterlegt sind.

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, Frederik Ricken an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „**Reduzierte Sialylierung von Fetuin-A sowie Konzentrationen von Fetuin-A in Serum und Liquor cerebrospinalis sind assoziiert mit neuroinflammatorischen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter**“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind.

	Doktor- and (F. Ricken)	Stationsarzt J. Elsass	Kooperations- partner/in / Statistiker/in	Assistent/in (CTA Steffen Gräber)	Betreuer (Prof. Jahren- Dechent, Prof. Häusler)	Summe (%)
Studienüberwachung					100 (beide)	100
Studiendesign/Konzeption	60	20			20 (beide)	100
Datenauswertung	60			20	20 (beide)	100
Durchführung der Experimente: Etablierung Glykosylierung (inkl. Phosphorylierung im Rahmen der Etablierung, Kap. 4.1.5)	100					100
Durchführung der Experimente: Glykosylierungsuntersuchung	100					100
Statistische Auswertung	70				30 (Prof. Häusler)	100
Bereitstellung von Materialien inkl. Bereitstellung der Liquor- und Serum-Proben					100 (beide)	100
Interpretation der Datenauswertung	70				30 (beide)	100
Durchführung der Experimente: Etablierung ELISA + Nephelometrie	60			40		100
Durchführung der Experimente: ELISA	20			80		100

Unterschrift der Doktorandin/des Doktoranden

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Frederik Ricken.

Unterschrift des Doktorvaters

Lebenslauf

Persönliche Daten: **Frederik Ricken**

Geburtsdatum: 05.01.1992 in Goch (NRW), Deutschland

Ausbildung:

- 1998-2002: Christopherus Grundschule, Kranenburg, Deutschland
2002-2011: Collegium Augustinianum Gaesdonck, Goch (NRW), Deutschland
2011-2017: Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen
2015: Beginn der Promotion bei Univ.-Prof. Dr. Jahnen-Dechent und Univ.-Prof. Dr. Martin Häusler
29.10.2016: Vortrag bei Research Meeting der European Pediatric Neurology Society (EPNS), Essen, Deutschland
30.11.2017: Approbation als Arzt

Famulaturen:

- 2013: Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters, Uniklinik Aachen, Deutschland
2014: Praxis für Kinder- und Jugendmedizin, Dr. Brüninghaus, Kleve, Deutschland
2015: Klinik für Kinder- und Jugendmedizin und Klinik für Gefäßchirurgie, Uniklinik Aachen, Deutschland
2016: Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychosomatik, Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien, Österreich

Praktisches Jahr:

1. Tertial (21.11.16-12.03.17): Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Uniklinik Aachen, Deutschland
2. Tertial (13.03.17-02.07.17): Klinik für Innere Medizin, Katholisches Karl Leistner Klinikum, Kleve/Goch, Deutschland
3. Tertial (03.07.17-21.10.17): Klinik für Gefäßchirurgie und Klinik für Allgemein Chirurgie, Uniklinik Aachen, Deutschland

Arbeitserfahrung:

- Seit 05.02.2018: Department für operative und konservative Kinder- und Jugendmedizin, Uniklinik Halle (Saale), Deutschland

Publikationen:

- 07.10.2022: Ricken F, Can AD, Gräber S, Häusler M, Jahnen-Dechent W.: Post-translational modifications glycosylation and phosphorylation of the major hepatic plasma protein fetuin-A are associated with CNS inflammation in children. PLoS One. 2022 Oct 7;17(10):e0268592. doi: 10.1371/journal.pone.0268592. PMID: 36206263; PMCID: PMC9544022.